

乳铁蛋白治疗牙周炎的炎症免疫机制研究

徐俊峰¹, 徐婉君¹, 董艳蓉¹, 邓祖跃², 蒋霞², 袁颖¹, 方建红¹, 万悦³, 任艳云^{3*} (1.浙江省立同德医院, 杭州 310012; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 3.联勤保障部队第九〇三医院, 杭州 310013)

摘要: 目的 研究乳铁蛋白调节炎症免疫反应在治疗牙周炎中的作用及其机制。方法 取 100 只 SD 大鼠随机分成空白对照组, 模型组, 乳铁蛋白给药组低、中、高剂量组(1, 2, 3 g·kg⁻¹), 甲硝唑阳性对照组(0.02 g·kg⁻¹), PDTC 组(200 mg·kg⁻¹), 乳铁蛋白+PDTC 组(2 g·kg⁻¹, 200 mg·kg⁻¹), MCC950 组(1 mg·kg⁻¹), 乳铁蛋白+MCC950(2 g·kg⁻¹, 1 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。采用丝线结扎联合 10%蔗糖饮水建立模型后开始给药, 每天 1 次口腔给药, 空白对照组和模型组口腔给药 0.9% NaCl, 连续给药 1 个月后处死各组大鼠。ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 、IL-8、IL-10 的含量; Western blotting 检测 TLR2-NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达。采用 HE 染色观察各组大鼠牙周组织的病理变化。结果 与模型组比较, 乳铁蛋白各剂量组牙周炎症状得到明显改善, HE 染色显示炎症细胞浸润减少, 成纤维细胞增生活跃。TLR2、NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 p20 和 GSDMD-N 蛋白表达降低, 促炎因子 IL-1 β 、IL-8 的含量降低, 抗炎因子 IL-10 的含量升高。结论 乳铁蛋白在治疗牙周炎中发挥的调节炎症免疫反应可能通过下调 TLR2-NF- κ B-NLRP3 通路的蛋白表达, 降低炎症反应的启动和炎症因子的释放, 从而达到抗炎的目的。

关键词: 乳铁蛋白; 牙周炎; NLRP3 炎症小体; 抗炎; 炎症因子

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)15-2086-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223405

引用本文: 徐俊峰, 徐婉君, 董艳蓉, 等. 乳铁蛋白治疗牙周炎的炎症免疫机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(15): 2086-2092.

Study on Inflammatory Immune Mechanism of Lactoferrin in the Treatment of Periodontitis

XU Junfeng¹, XU Wanjuan¹, DONG Yanrong¹, DENG Zuyue², JIANG Xia², YUAN Ying¹, FANG Jianhong¹, WAN Yue³, REN Yanyun^{3*} (1. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 3. No. 903 Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the anti-inflammatory immune response effects of lactoferrin in the treatment of periodontitis and its mechanism. **METHODS** One hundred SD rats were randomly divided into blank control group, model group, lactoferrin administration group low, medium, high dose group(1, 2, 3 g·kg⁻¹), metronidazole positive control group (0.02 g·kg⁻¹), PDTC group(200 mg·kg⁻¹), lactoferrin+PDTC group(2 g·kg⁻¹, 200 mg·kg⁻¹), MCC950 group(1 mg·kg⁻¹) and lactoferrin+MCC950 group(2 g·kg⁻¹, 1 mg·kg⁻¹), 10 rats in each group. Silk thread ligation combined with 10% sucrose drinking water was used to establish the model, and then the drug was administered orally once a day. The blank control group and the model group were administered orally with 0.9% NaCl. The rats in each group were sacrificed after one month of continuous administration. The contents of IL-1 β , IL-8 and IL-10 were detected by ELISA kit, and the expressions of TLR2-NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome related proteins were detected by Western blotting. HE staining was used to observe the pathological changes of the periodontal tissues of the rats in each group. **RESULTS** Compared with the model group, the symptoms of periodontitis in each dose group of lactoferrin were significantly improved. HE staining showed that the infiltration of inflammatory cells was reduced, and the proliferation of fibroblasts was active. The protein expressions of TLR2, NF- κ B, NLRP3, Caspase-1 p20 and GSDMD-N decreased, the content of pro-inflammatory factor IL-8 and IL-1 β decreased, and the content of anti-inflammatory factor IL-10 increased. **CONCLUSION** Lactoferrin may play a role in the regulation of inflammatory immune response in the treatment of periodontitis by down-regulating the protein expression of TLR2-NF- κ B-NLRP3 pathway, reducing the initiation of inflammatory response and the release of inflammatory factors, so as to achieve the purpose of anti-inflammatory.

KEYWORDS: lactoferrin; periodontitis; NLRP3 inflammasome; anti-inflammatory; inflammatory factor

基金项目: 浙江省医药卫生计划(2020373643)

作者简介: 徐俊峰, 男, 硕士, 主任医师 E-mail: 1821807447@qq.com

*通信作者: 任艳云, 女, 硕士, 主任医师 E-mail: rry220@sohu.com

牙周炎是一种常见的口腔疾病,其特点是牙周病原微生物引起的炎症反应,其破坏了牙齿支持组织,包括牙周膜、牙骨质及牙槽骨,表现为牙龈红肿出血、牙槽骨吸收,进而导致牙齿松动、脱落,造成牙周软硬组织的破坏,影响口腔功能^[1]。许多研究发现,牙周炎的发生与口腔微生物相关,Håversen 等^[2]研究发现,口腔微生物主要通过激活牙周组织的 TLR 受体引起炎症因子的分泌,如白介素(interleukin-IL)-1 β 、IL- γ 、IL-6 和核因子 κ B 受体激活剂配体,这些细胞因子导致组织损伤。另有研究发现,慢性牙周炎患者的唾液和血浆中 TLR2、TLR4 的表达水平均显著增高^[3]。近年研究发现,牙周炎的发生与炎症小体密切相关,牙周炎的发生由 NLRP3 炎症小体的激活所致^[4]。而目前对牙周炎的治疗中,甲硝唑、替硝唑等药物占据了主要地位,西药治疗重在局部治疗,如在急性期服用相应抗菌药物,较为快速地缓解症状,但不适合长期服用,而炎症发生后,对炎症通路的治疗效果更好^[5]。牙周炎在这方面的治疗药物报道比较少,而本实验室的前期研究发现,乳铁蛋白对牙周炎的炎症反应起着重要抑制作用。

乳铁蛋白是一种具有多种生理功能的天然多糖蛋白,1939 年首次从牛乳中被分离发现,随后科学家们在其他人体和其他哺乳动物中的多种组织中,如乳汁、泪液、唾液、胆汁/胰腺分泌物和中性粒细胞血浆衍生的次级颗粒,研究发现,乳铁蛋白具有明显的抗菌、抗肿瘤和免疫调节作用^[6-7]。Moslemi 等^[8]发现较低浓度的未刺激唾液乳铁蛋白和溶菌酶与儿童早期龋病相关。Li 等^[9]发现乳铁蛋白下调 NF- κ B、TNF- α 和 IL-1 β 的表达。但乳铁蛋白对炎症因子产生的机制特别与 NLRP3 炎症小体的活化报道较少,本研究考察乳铁蛋白对 TLR-NF- κ B-NLRP3 信号通路的影响,明确乳铁蛋白抑制牙周炎的免疫作用机制,以期为乳铁蛋白的临床应用提供实验数据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

大鼠 IL-1 β (货号:ELS-2803-2)、大鼠 IL-10(货号:ELS-2871-2)、IL-8(货号:ELS-2803-2) ELISA 试剂盒均购自合肥博美生物科技有限责任公司;NF- κ B p65 抗体(货号:sc-8008)、TLR2 抗体(货号:sc-293072)、NLRP3 抗体(货号:sc-66846)、Caspase-1 p20 抗体(货号:sc-56036)均购自美国

Santa; 消皮素 D-N 端抗体(cleaved N-terminal GSDMD, GSDMD-N, 美国 Affinity 公司,货号:DF13758); GAPDH(货号:AF1186)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0006)、NF- κ B 抑制剂-吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(PDTC, 货号:S1809)均购自碧云天生物技术有限公司;羊抗大鼠抗体(美国 Bioworld, 货号:BS13278/BS12478);乳铁蛋白原料(上海荣晖生物科技有限公司,批号:202108);NLRP3 抑制剂 MCC950(上海陶术生物科技有限公司,货号:T6887)。

Spectra Max190 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);AI6000 化学发光成像系统(美国 GE 公司);RM2400 型切片机、DM4B 生物显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 动物及牙周炎模型的建立

SD 大鼠,♂,体质量 180~200 g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005,质量合格证号:0058903,该实验获得了浙江省中医药研究院实验动物伦理委员会批准。根据其他研究者的方法进行改进,建立了实验性大鼠牙周炎模型^[2]。首先,用 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠(每 100 g 体质量腹腔注射 0.3 mL),将大鼠固定后,将 3-0 的丝线结扎于上颌左侧第 2、第 3 磨牙之间,并将其两端打结,并与 10%蔗糖一起饮用。每日对结扎部位进行检查,以保证其在试验过程中处于合适的状态。对照组大鼠无任何处置。在造模周期中,每周观察 1 次,如果发现有断掉的,应立即再进行结扎。4 周后,可以观察到模型组出现大鼠牙龈红肿、出血、牙槽骨吸收、牙龈松动。

1.3 动物分组与给药

100 只大鼠随机分成空白对照组、模型组、乳铁蛋白低剂量(LF-L, 1 g·kg⁻¹, 口腔给药)组、乳铁蛋白中剂量(LF-M, 2 g·kg⁻¹, 口腔给药)组、乳铁蛋白高剂量(LF-H, 3 g·kg⁻¹, 口腔给药)组、PDTC 组(0.2 g·kg⁻¹, 腹腔注射)、乳铁蛋白+PDTC (LF+PDTC, 剂量分别为 2, 0.2 g·kg⁻¹)组、MCC950 组(0.001 g·kg⁻¹, 局部注射)、乳铁蛋白+MCC950 (LF+MCC950, 剂量分别为 2, 0.001 g·kg⁻¹)组、甲硝唑阳性(MNZ, 0.2 g·kg⁻¹, 口腔给药)组,每组 10 只,成功建立模型后开始给药,每天 1 次,空白对照组和模型组口腔给药 0.9%NaCl,连续给药 1 个月处死动物,取牙齿及牙周组织冻于液氮、10%

中性甲醛备用。

1.4 HE 染色

将大鼠上颌骨标本用 4℃ PBS 冲洗后,置 10%的中性甲醛中,48 h 后,用乙二酸四乙酸二钠(EDTA·2Na)脱钙剂脱钙 1 个月,乙醇梯度脱水,透明,石蜡包埋,切片,切片厚度为 5 μm,常规 HE 染色,光学显微镜下观察其周围组织的形态学改变,如炎症细胞浸润、牙槽骨损伤等。

1.5 ELISA 法检测牙组织中相关炎症因子含量

取大鼠上颌骨样本,称重,加适量 PBS(pH 7.4),用匀浆器使样品均匀,离心,用 ELISA 试剂盒所提供的试验方法,测定大鼠牙组织中 IL-1β、IL-8 和 IL-10 水平。

1.6 Western blotting 检测牙周炎大鼠 TLR2-NF-κB 通路和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达水平

取适量牙周炎大鼠牙周组织,按 10 μL·mg⁻¹ 加入 RIPA 裂解液。然后,用匀浆器将其完全溶解、离心、上清、Bradford 蛋白浓度检测试剂盒定量,以 4:1 的比例加入蛋白上样缓冲溶液,加热使蛋白质变性。制备凝胶进行电泳。电泳结束后进行转膜,5%的脱脂奶粉封闭 1 h,抗体 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,室温孵育二抗 1 h, TBST/TBS 洗膜后, BeyoECL Plus 显色,以 GAPDH 作为内参,应用 Image J 进行分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行单因素方差分析后,用 LSD 检验进行各组间均数两两比较分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立大鼠牙周炎模型

经过不同建模处理后,可以发现各组动物牙

周组织出现明显变化。牙周炎模型组表现出牙龈组织呈现深红色,牙槽骨吸收明显,有明显分叉牙根,探诊会出血,软化的牙周组织表明有显著的发炎变化。而正常对照组的牙周组织为粉色,未见探查出血,未发生牙槽骨吸收,见图 1。说明牙周炎模型建模成功。



图 1 大鼠实验性牙周炎模型

Fig. 1 Rat laboratory periodontitis model

2.2 乳铁蛋白对牙周炎大鼠牙齿病理形态的影响

与空白对照组相比,牙周炎模型组的牙周组织中可见大量的炎症细胞浸润,差异具有统计学意义($P < 0.01$),且牙槽骨的吸收作用显著。与模型组相比,乳铁蛋白不同剂量组的炎症细胞浸润程度明显降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而成纤维细胞的增殖则明显增多,有剂量关系。PDTC 组和 MCC950 组的炎症细胞浸润相对于模型组来说,也发生了明显的降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$),乳铁蛋白和 PDTC/MCC950 的联合用药也表现出了很好的抑制牙周炎的作用,与 PDTC/MCC950 组相比,LF+PDTC/LF+MCC950 组的炎症细胞浸润面积差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图 2。

2.3 乳铁蛋白给药对牙周炎大鼠牙周组织中相关炎症分子的影响

在牙周炎大鼠上颌牙周组织中,模型组 IL-1β 和 IL-8 水平较空白对照组明显增高,抗炎因子

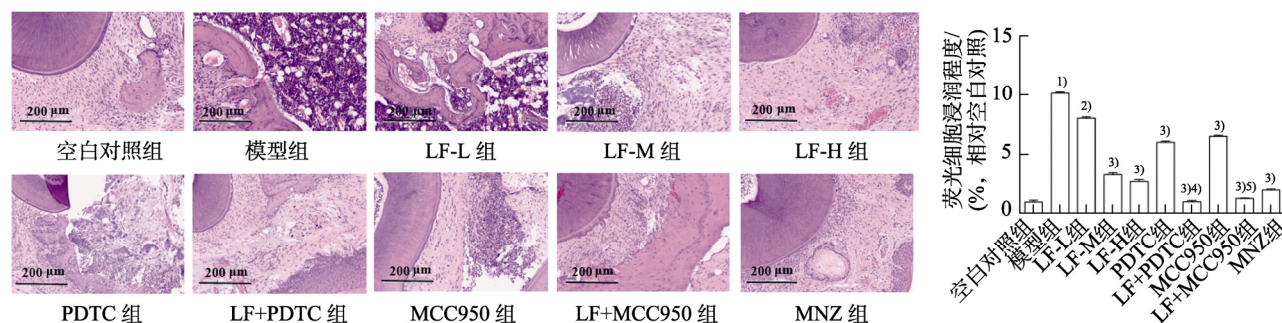


图 2 乳铁蛋白对牙周炎大鼠牙齿病理形态的影响(HE, 100×)

与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与 PDTC 组比较, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与 MCC950 组比较, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effects of lactoferrin on pathological morphology in the rats with laboratory periodontitis(HE, 100×)

Compared with blank control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; compared with PDTC group, ⁴⁾ $P < 0.01$; compared with MCC950 group, ⁵⁾ $P < 0.01$.

IL-10 的含量较空白对照组明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.01$); 与模型组相比, 乳铁蛋白各剂量组内的 IL-1 β 和 IL-8 水平呈下降趋势, IL-10 水平呈上升趋势($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 有剂量差异, MNZ 组与 LF-H 组相近; 同时, 与模型组比较, PDTC 组和 MCC950 组的 IL-1 β 和 IL-8 水平明显下降, IL-10 的水平又明显升高($P<0.01$), 乳铁蛋白和抑制剂 PDTC/MCCP50 的联合应用使牙周炎大鼠牙组织中的 IL-1 β 和 IL-8 水平进一步下降, IL-10 的水平进一步上升($P<0.01$), 结果见表 1。

表 1 乳铁蛋白给药对牙周炎大鼠牙组织中的乳铁蛋白含量和相关炎症分子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Effects of lactoferrin administration on the content of lactoferrin and related inflammatory molecules in dental tissues of periodontitis rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-1 β	IL-8	IL-10
空白对照组	—	87.43 $\pm$ 2.10	144.43 $\pm$ 1.93	10.22 $\pm$ 0.31
模型组	—	173.75 $\pm$ 2.47 ¹⁾	425.12 $\pm$ 8.48 ¹⁾	1.83 $\pm$ 0.02 ¹⁾
LF-L 组	1	154.95 $\pm$ 3.61 ²⁾	396.54 $\pm$ 11.52 ²⁾	2.04 $\pm$ 0.09 ²⁾
LF-M 组	2	128.54 $\pm$ 5.49 ³⁾	293.85 $\pm$ 8.63 ³⁾	3.63 $\pm$ 0.11 ³⁾
LF-H 组	3	112.51 $\pm$ 1.79 ³⁾	219.57 $\pm$ 3.00 ³⁾	5.78 $\pm$ 0.08 ³⁾
PDTC 组	0.2	134.54 $\pm$ 3.71 ³⁾	334.07 $\pm$ 11.10 ³⁾	3.07 $\pm$ 0.14 ³⁾
LF+PDTC 组	2+0.2	98.45 $\pm$ 3.54 ³⁾⁴⁾	173.80 $\pm$ 8.85 ³⁾⁴⁾	6.97 $\pm$ 0.08 ³⁾⁴⁾
MCC950 组	0.001	129.95 $\pm$ 3.09 ³⁾	341.69 $\pm$ 9.03 ³⁾	2.87 $\pm$ 0.11 ³⁾
LF+MCC950 组	2+0.001	95.93 $\pm$ 4.56 ³⁾⁵⁾	188.08 $\pm$ 10.54 ³⁾⁵⁾	6.11 $\pm$ 0.06 ³⁾⁵⁾
MNZ 组	0.2	112.96 $\pm$ 2.51 ³⁾	211.55 $\pm$ 9.03 ³⁾	5.87 $\pm$ 0.03 ³⁾

注: 与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与 PDTC 组比较, ⁴⁾ $P<0.01$; 与 MCC950 组比较, ⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with PDTC group, ⁴⁾ $P<0.01$; compared with MCC950 group, ⁵⁾ $P<0.01$.

2.4 乳铁蛋白对牙周炎大鼠 TLR2-NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

通过对蛋白效应分子表达水平的检测, 发现模型组在牙周炎大鼠上颌牙周组织中, TLR2、NF- κ B p65 的表达水平较空白对照组高, 且差异具有统计学意义($P<0.01$); 与模型组相比, 乳铁蛋白各剂量组 TLR2、NF- κ B p65 蛋白表达呈下降趋势, MNZ 组与 LF-H 组相近, 两组间差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 结果见图 3。

2.5 乳铁蛋白对牙周炎大鼠 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达的影响

在牙周炎上颌牙周组织中, 与空白对照组相比, 模型组的 NLRP3、Caspase-1 p20 和 GSDMD-N 蛋白表达明显上升, 差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比, 乳铁蛋白各剂量组的 NLRP3、Caspase-1 p20 和 GSDMD-N 蛋白表达逐渐下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 基本呈剂量依赖, 而 LF-H 组的 NLRP3、Caspase-1 p20 和 GSDMD-N 蛋白表达下降最为明显, 与阳性 MNZ 组相接近, 见图 4。

2.6 乳铁蛋白和 NF- κ B 抑制剂对牙周炎大鼠 TLR2-NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

在 NF- κ B 抑制剂组中, 与模型组比较, LF-M 组 TLR2 和 NF- κ B p65 蛋白的表达明显下降 ($P<0.01$), PDTC 组中 NF- κ B p65 蛋白的表达也有下降 ($P<0.01$), 而 TLR2 蛋白的表达无明显变化, LF+PDTC 组中的 NF- κ B p65 蛋白表达进一步下降 ($P<0.01$); 与 PDTC 组比较, LF+PDTC 组中 NF- κ B p65 蛋白表达下降 ($P<0.05$), 而 TLR2 蛋白的表达也发生了下降, 但差异没有统计学差异。结果见图 5。

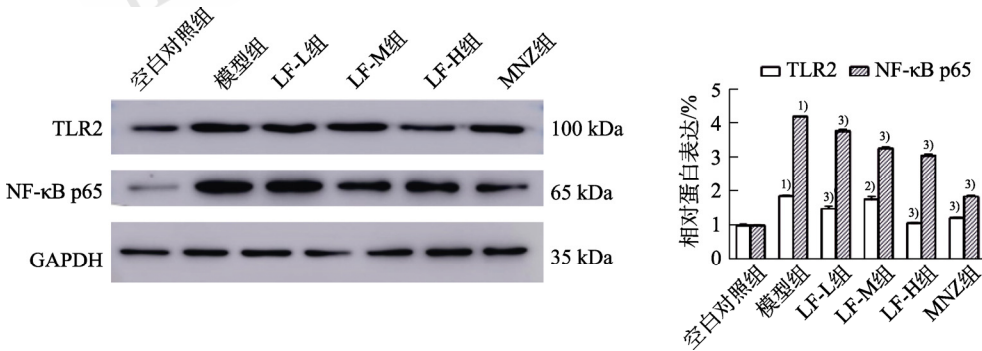


图 3 乳铁蛋白对牙周炎大鼠 TLR2 和 NF- κ B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of lactoferrin on the expression of TLR2 and NF- κ B proteins in rats with laboratory periodontitis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

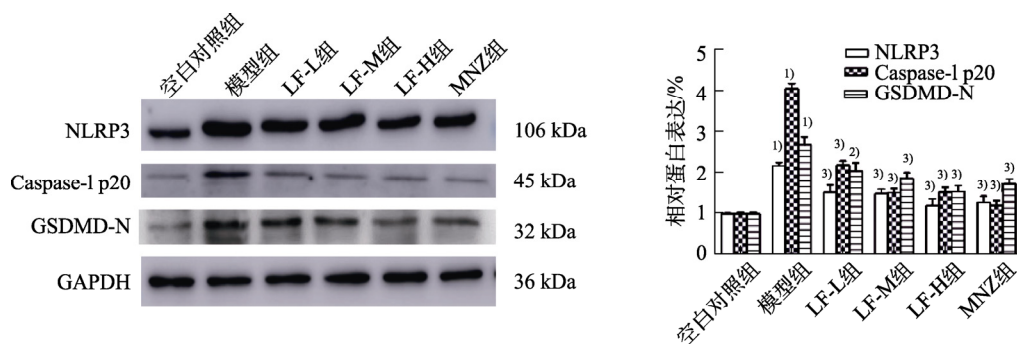


图4 乳铁蛋白对牙周炎大鼠 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of lactoferrin on the expression of NLRP3 inflammasome-related protein in periodontitis rats($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

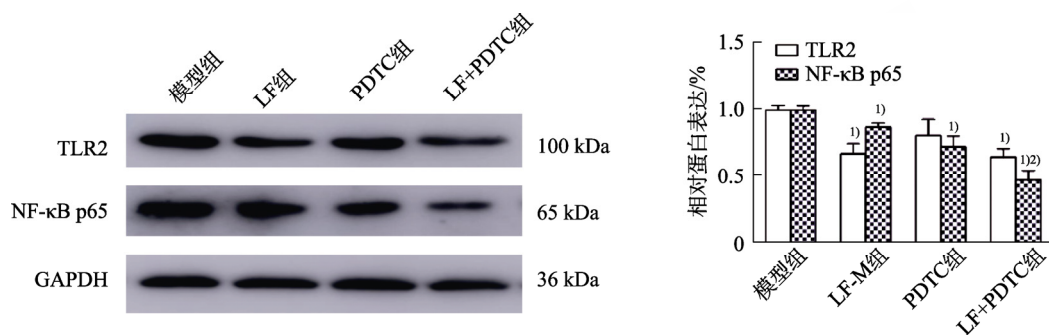


图5 乳铁蛋白和 NF-κB 抑制剂对牙周炎大鼠 TLR2-NF-κB 通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与模型组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 PDTTC 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Effects of lactoferrin and NF-κB inhibitors on the expression of TLR2-NF-κB pathway-related proteins in periodontitis rats($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with PDTTC group, ²⁾ $P<0.05$.

2.7 乳铁蛋白和 NLRP3 抑制剂对牙周炎大鼠 NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达的影响

在 NLRP3 抑制剂 MCC950 组中, 与模型组比较, LF-M 组、MCC950 组和 LF+ MCC950 组中的 NLRP3、Caspase-1 p20 和 GSDMD-N 蛋白表达明

显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 MCC950 组比较, LF+MCC950 组的 NLRP3 蛋白表达下降明显, 差异具有统计学意义($P<0.01$), Caspase-1 p20 和 GSDMD-N 蛋白表达也发生了下降, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 6。

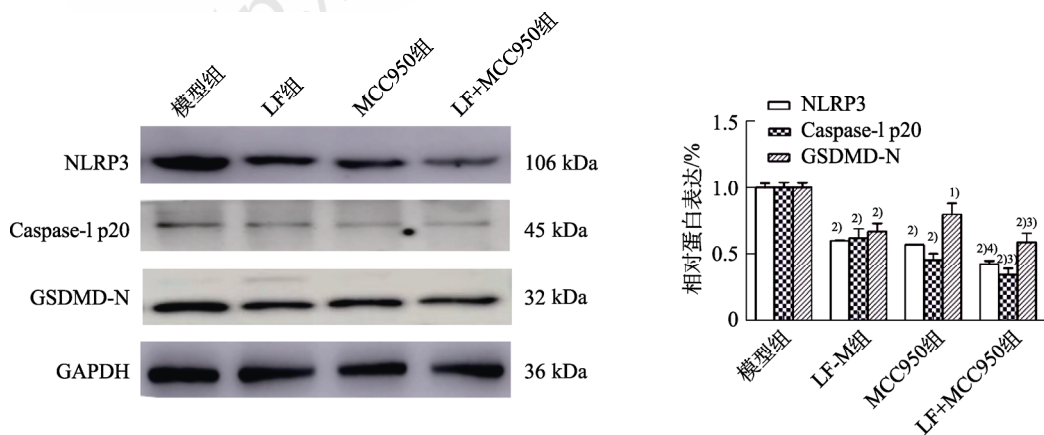


图6 乳铁蛋白和 NLRP3 抑制剂对牙周炎大鼠 NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 MCC950 组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effects of lactoferrin and NLRP3 inhibitors on the expression of NLRP3 inflammasome pathway-related proteins in periodontitis rats($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with MCC950 group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

3 讨论

本实验结果显示,采用丝线结扎于上颌磨牙,并给 10%的蔗糖,大鼠造模处的牙龈组织颜色加深,牙槽骨明显吸收,探诊出血,牙周组织软化,检测炎症相关的因子,IL-1 β 、IL-8 水平明显升高,IL-10 升高,说明造模成功。给予乳铁蛋白可降低牙周炎模型大鼠牙周组织的炎症细胞浸润,促进成纤维细胞的增殖,降低 IL-1 β 、IL-8 水平,升高 IL-10 水平,这些结果表明,乳铁蛋白抑制牙周炎的发展,这与 Wakabayashi 等^[10]研究结果一致。

从 NF- κ B 活化到炎症因子释放这个过程,以前有很多不同的讨论,近年来,随着炎症小体在炎症中的中心作用被确定,目前,牙周炎的发病机制更倾向于 NLRP3 炎症小体活化发挥主要作用^[11]。人类牙龈组织样本的分析显示,与健康牙龈相比,慢性牙周炎患者的 NLRP3 mRNA 表达显著增加 4~5 倍,侵袭性牙周炎患者的 NLRP3 mRNA 表达增加 7 倍^[12]。Fleetwood 等^[13]采用 *P.gingivalis* 活菌、加热灭活的 *P.gingivalis*、外膜囊泡刺激小鼠 BMDMs,均可以上调 NLRP3、前体 caspase-1 和 IL-1 β 的表达,为 NLRP3 炎症小体激活准备了材料。然后,在口腔病原微生物及非病原物质如牙菌斑等的刺激下,激活 NLRP3, NLRP3 促进 pro-caspase-1 激活进而裂解成 Caspase-1,活化的 Caspase-1 将 GSDMD 切割裂解成熟,形成成孔结构域^[14],同时, Caspase-1 将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 剪切为成熟形式,通过 GSDMD 形成的孔道释放 IL-1 β 、IL-18 等内容物,引起炎症反应^[15]。Huang 等^[16]的研究报道也支持这个过程,对牙周炎患者检测发现,其 NLRP3 水平显著高于健康人群,牙龈组织的 IL-1 β 、18 表达水平与 NLRP3 水平呈正相关。本实验也发现一致的结果,在牙周炎大鼠模型中,牙周组织的 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N 表达增加,IL-1 β 及 IL-8 水平升高,IL-10 的水平降低,这些结果进一步证实了牙周炎的发生与 NLRP3 炎症小体活化密切相关。

近年的文献报道,乳铁蛋白能抑制牙周炎和降低炎症因子水平。Rosa 等^[17]证明口服牛源性乳铁蛋白可以抑制鼠牙周组织细胞分泌 TNF- α 。乳铁蛋白干扰 LPS 引发的 TLR4 免疫反应,降低 NF- κ B、TNF- α 。TNF- α 和 IL-1 β 、IL-6 等引起牙周组织炎症^[18]。本实验给予 3 个剂量的乳铁蛋白明显抑制了牙周组织的 TLR2、NF- κ B p65、

NLRP3、Caspase-1 p20、GSDMD 表达,降低了 IL-1 β 和 IL-8 的水平,升高了 IL-10 水平,并呈一定的剂量关系,不仅证实了乳铁蛋白抑制牙周炎大鼠的 TLR2、NF- κ B 和炎症因子表达,同时也发现了乳铁蛋白还能抑制 NLRP3 炎症小体活化相关蛋白的表达。为了进一步明确乳铁蛋白的作用,本实验对不同炎症反应节点进行调控,用 NF- κ B 抑制剂阻断了 NF- κ B 的活化,炎症因子表达降低,与乳铁蛋白的结果一致,两者叠加效果更明显,说明了乳铁蛋白通过抑制 NF- κ B 活化来发挥作用。同理本研究考察了 NLRP3 抑制剂的作用,阻断了 NLRP3 的活化,进一步影响下游的 Caspase-1、GSDMD-N 的剪切活化,乳铁蛋白给药组得到的结果与抑制剂一致,两者联合给药抑制效果更明显,结果表明乳铁蛋白抑制 TLR2-NF- κ B-NLRP3 炎症通路发挥作用。进一步分析乳铁蛋白抑制 TLR2-NF- κ B-NLRP3 炎症通路的原因,可能与乳铁蛋白生物学活性有关,由于乳铁蛋白有抗菌、消炎、调节机体免疫反应等作用^[7]。乳铁蛋白的抗菌作用消除了口腔微生物,降低了微生物对 TLR 的激活,抗菌也降低了牙菌斑生物膜的聚集和发展,后者是激活 NLRP3 的激活剂,另外乳铁蛋白降低炎症因子和炎症小体的相关蛋白表达,阻断了 TLR2-NF- κ B-NLRP3 炎症通路对炎症信号的传递,达到了降低炎症反应的作用。

本实验证实了乳铁蛋白通过抑制细菌在口腔中的定殖、生长和侵袭,降低了起始因素微生物的影响;同时下调 TLR2-NF- κ B-NLRP3 通路的蛋白表达,降低炎症反应的启动和炎症因子的释放,从而达到抗炎的目的。

REFERENCES

- [1] CHAPPLE I L, VAN DER WEIJDEN F, DOERFER C, et al. Primary prevention of periodontitis: Managing gingivitis[J]. J Clin Periodontol, 2015, 42(Suppl 16): S71-S76.
- [2] HÄVERSEN L, OHLSSON B G, HAHN-ZORIC M, et al. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B[J]. Cell Immunol, 2002, 220(2): 83-95.
- [3] PROMSUDTHI A, POOMSAWAT S, LIMSRICHARON W. The role of Toll-like receptor 2 and 4 in gingival tissues of chronic periodontitis subjects with type 2 diabetes[J]. J Periodontal Res, 2014, 49(3): 346-354.
- [4] LIU F, ZHOU Z F, MI Y, et al. A case-control study on the relationship between the expression of inflammatory factors and the incidence of gestational diabetes in patients with

- periodontitis[J]. Chin J Stomatol(中华口腔医学杂志), 2022, 57(6): 569-575.
- [5] YANG S L, YANG F. Clinical efficacy of different antibiotic delivery routes combined with basic periodontal therapy for generalized aggressive periodontitis[J]. Med Recapit(医学综述), 2019, 25(14): 2903-2907.
- [6] VELLIYAGOUNDER K, BAHDILA D, PAWAR S, et al. Role of lactoferrin and lactoferrin-derived peptides in oral and maxillofacial diseases[J]. Oral Dis, 2019, 25(3): 652-669.
- [7] ZHOU T, KANG N. Research progress of lactoferrin in stomatology medical domain[J]. J Oral Sci Res(口腔医学研究), 2019, 35(8): 730-733.
- [8] MOSLEMI M, SATTARI M, KOOSHKI F, et al. Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with early childhood caries[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2015, 9(2): 109-114.
- [9] LI W S, FU K Q, LV X P, et al. Lactoferrin suppresses lipopolysaccharide-induced endometritis in mice via down-regulation of the NF- κ B pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 695-699.
- [10] WAKABAYASHI H, KONDO I, KOBAYASHI T, et al. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin[J]. Biometals, 2010, 23(3): 419-424.
- [11] GAO Y, CHEN S Y, HUANG J, et al. Mechanism of periodontitis aggravating insulin resistance in obese rats based on NLRP3 signaling pathway[J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2022, 42(15): 3760-3763.
- [12] XIE F, SHU R, XIE Y F. The expression of NLRP3, NLRP1 and AIM2 in the gingival tissue of periodontitis patients: RT-PCR study and immunohistochemistry[J]. Arch Oral Biol, 2015, 60(6): 948-958.
- [13] FLEETWOOD A J, LEE M K S, SINGLETON W, et al. Metabolic remodeling, inflammasome activation, and pyroptosis in macrophages stimulated by *Porphyromonas gingivalis* and its outer membrane vesicles[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017(7): 351.
- [14] MAN S M, KARKI R, KANNEGANTI T D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases[J]. Immunol Rev, 2017, 277(1): 61-75.
- [15] KAYAGAKI N, STOWE I B, LEE B L, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. Nature, 2015, 526(7575): 666-671.
- [16] HUANG C C, ZHANG C T, YANG P P, et al. Eldecalcitol inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in human gingival fibroblasts by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2020(14): 4901-4913.
- [17] ROSA L, LEPANTO M S, CUTONE A, et al. Lactoferrin and oral pathologies: A therapeutic treatment[J]. Biochem Cell Biol, 2021, 99(1): 81-90.
- [18] SHIGEMORI S, NAMAI F, YAMAMOTO Y, et al. Genetically modified *Lactococcus lactis* producing a green fluorescent protein-bovine lactoferrin fusion protein suppresses proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells[J]. J Dairy Sci, 2017, 100(9): 7007-7015.

收稿日期: 2022-09-30

(本文责编: 沈倩)