

杜仲醇提取物通过 NF- κ B 信号通路改善大鼠牙周组织病的作用研究

史雪聪¹, 陈泳杏¹, 肖青锋^{2*} (1.武汉大学口腔医院口腔科, 武汉 430072; 2.湖北文理学院襄阳市中心医院口腔科, 湖北 襄阳 441021)

摘要:目的 探讨杜仲醇提取物通过 NF- κ B 信号通路作用于牙周病破骨细胞活化因子(IL-1 β)改善大鼠牙周组织病的疗效。方法 选取 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, ♂, 随机数字表法分成 4 组, 正常组, 模型组, 杜仲醇提取物低、高剂量组, 各 15 只。除正常组外, 其他大鼠制备牙周病模型, 造模 1 周后杜仲醇提取物低、高剂量组分别在大鼠上颌右侧第一、第二磨牙间腭、颊侧的龈沟底内注入 0.2 mL 0.1, 1.0 μ g·mL⁻¹ 的杜仲醇提取物, 正常组与模型组大鼠注入等剂量生理盐水, 连续注入 5 d。Western-blot、荧光定量 PCR 检测大鼠牙周膜成纤维细胞内破骨细胞活化因子(IL-1 β)蛋白、mRNA 表达状况。结果 与正常组相比, 模型组大鼠成纤维细胞内 IL-1 β 、NF- κ B mRNA 相对表达量显著上升($P<0.05$); 与模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠成纤维细胞内 IL-1 β 、NF- κ B mRNA 相对表达量显著下降($P<0.05$)。与正常组相比, 模型组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 含量显著上升($P<0.05$); 与模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 含量显著下降($P<0.05$)。与正常组相比, 模型组大鼠上颌组织内 NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达显著上升($P<0.05$); 与模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠上颌组织内 NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达下降 ($P<0.05$)。结论 杜仲醇提取物通过 NF- κ B 信号通路对牙周病破骨细胞活化因子(IL-1 β)产生作用, 降低牙周组织内炎症因子含量, 对牙周病起到治疗作用。**关键词:** 牙周病; 杜仲醇提取物; 破骨细胞活化因子; 牙周膜成纤维细胞; NF- κ B 信号通路
中图分类号: R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2019)22-2759-06
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.22.002
引用本文: 史雪聪, 陈泳杏, 肖青锋. 杜仲醇提取物通过 NF- κ B 信号通路改善大鼠牙周组织病的作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22): 2759-2764.

Effect of Eucommiae Cortex Alcohol Extract on Periodontal Disease of Orthodontic Tooth in Rats by NF- κ B Signaling Pathway

SHI Xuecong¹, CHEN Yongxing¹, XIAO Qingfeng^{2*} (1.Department of Stomatology, Wuhan University Hospital, Wuhan 430072, China; 2.Department of Stomatology, Xiangyang Central Hospital Affiliated to Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the effect of Eucommiae Cortex alcohol extract on periodontal disease osteoclast activating factor (IL-1 β) through NF- κ B signaling pathway to improve the periodontal disease of orthodontic tooth in rats. **METHODS** Sixty Wistar male rats of SPF grade were randomly divided into four groups: the normal group, the model group, the low and high doses of Eucommiae Cortex group, 15 rats in each group. Except the normal group, other rat model of periodontal disease was prepared. After one week of modeling, the low and high dose groups of Eucommiae Cortex were injected into the bottom of the first and second molars of the right maxillary and the buccal side of the rat with dose of 0.2 mL 0.1, 1.0 μ g·mL⁻¹ Eucommiae Cortex. Normal group and model group were injected with equal dose of normal saline for 5 d. The expression of osteoclast activating factor (IL-1 β) protein and mRNA in rat periodontal ligament fibroblasts was detected by Western-blot and real-time PCR. **RESULTS** Compared with the normal group, the relative expression of IL-1 β and NF- κ B mRNA in the fibroblasts of the model group significantly increased($P<0.05$). Compared with the model group, the relative expression of IL-1 β and NF- κ B mRNA in the fibroblasts of low and the high dose of Eucommiae Cortex group decreased($P<0.05$). Compared with the normal group, the serum IL-6 and IL-1 β in the model group were significantly increased($P<0.05$). Compared with the model group, the serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in the low and the high dose group of Eucommiae Cortex($P<0.05$). Compared with the normal group, the expression of NF- κ B and IL-1 β protein in the maxillary tissue of the model group significantly increased($P<0.05$); compared with the model group, the expression of NF- κ B and IL-1 β protein in the maxillary tissue of the rats in the high and low dose of Eucommiae Cortex group was decreased($P<0.05$). **CONCLUSION** Eucommiae Cortex alcohol extraction has a role in the periodontal disease osteoclast activating factor (IL-1 β) through NF- κ B signal pathway, which reduces the content of inflammatory factors in periodontal tissues and has a therapeutic effect on periodontal disease. **KEYWORDS:** periodontal disease; Eucommiae Cortex alcohol extract; osteoclast activating factor; periodontal ligament fibroblasts; NF- κ B signaling pathway

基金项目: 国家自然科学基金项目(81300855)

作者简介: 史雪聪, 女, 硕士, 主治医师 Tel: 18108665831 E-mail: linjie198002@163.com *通信作者: 肖青锋, 男, 硕士, 主治医师 Tel: 13508668280 E-mail: xqf8501@163.com

牙周病为临床多见疾病,发病率为4.3%~12.3%^[1],患者临床表现为牙龈组织病变及深层牙组织发生坏死等。尤其是近些年来,随着人们饮食习惯和生活方式的改变,临床牙周病患者逐渐增加,对人们日常生活与工作带来了严重影响。随着临床医疗手段不断提升,人们对于牙周病探究有了实质性进展,但对牙周病治疗当前没有特效药物^[2-3]。破骨细胞活化因子(osteoclast activating factor, OAF)在机体内可诱导形成破骨细胞,白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)为其主要成分且能够加速软骨组织与骨组织吸收^[4]。本课题组所承担的国自然科学基金项目证实了破骨细胞分化在细胞骨架形成中的作用,认为破骨细胞分化在牙周病的发病过程中亦发挥重要调控作用。NF- κ B 信号通路为机体内多种信号转导通路内主要构成部分,参加机体炎症反应。陈铁楼等^[5]研究发现,健康牙龈组织成纤维细胞中 NF- κ B 处于非激活状态,而给予脂多糖刺激后人枯否细胞中 NF- κ B 可被激活发生核转位,产生炎症因子破坏牙周组织。林晓萍等^[6]研究亦发现, NF- κ B 受体激活蛋白配体-NF- κ B 受体激活蛋白-护骨因子这一信号轴参与了牙周骨吸收的关键过程,在牙周病的发生中发挥重要作用。因此, NF- κ B 信号通路被认为是介导牙周病发生的关键通路。

杜仲为我国传统中药材,现代药理显示杜仲有广谱抗菌等作用。相关研究显示,杜仲醇提取物有抗炎和抑制破骨细胞活性等特征。李艳红等^[7]研究发现,杜仲对 11 种牙髓根尖周炎和牙周病的常见优势菌具有良好的抑制作用,同时,亦有研究显示其药理影响和 NF- κ B 有联系,而牙周病与 NF- κ B 活性有联系^[5]。目前关于杜仲醇提取物对牙周病的作用鲜有研究,因此,本研究观察了杜仲醇提取物通过 NF- κ B 信号通路作用于牙周病破骨细胞活化因子(IL-1 β)改善大鼠正畸牙周组织病的影响,为临床患者治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 大鼠

选取 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,♂,6 周龄,购自北京维通利华实验动物公司,体质量 170~190 g,平均(181.06 $\pm$ 4.31)g,许可证号:SCXK(京)2018-17。常规饲养 1 周后开始实验,大鼠分笼饲养,每个笼内 5 只,室温维持在 22~26℃,相对湿度为 55%~65%,昼夜循环,保持 12 h 光照,

大鼠灌胃、添加饲料及换水等都由专人进行。

1.2 药物、试剂及仪器

杜仲醇提取物(参考郭延伟等^[8]报道的方法进行制备,选取 2 g 盐杜仲,加入 15 mL 乙醇,室温下震荡 1 h,过夜后离心机 15 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 8 min,取上清液,真空浓缩后加 15 mL 清水将剩余物溶解,即为杜仲醇提取物,0.22 μ m 膜过滤后保存)。

大肠杆菌 ATCC O₅₅(美国 Sigma 公司); B₅ 脂多糖(E-LPS, 美国 Sigma 公司,批号: 16307); 多聚甲醛(天津市进丰化工有限公司,批号: 180864); PBS 缓冲液(北京中杉金桥公司,批号: 20180731); 二甲苯及无水乙醇(成都科龙公司,批号: 180609、171125); 鼠抗人免疫组化试剂盒(瑞士 Roche 公司,批号: 173050); 白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(上海西唐生物公司,批号: F18942、F20741、F20874)。

PHY-III 病理组织漂烘仪(常州中威电子仪器); 莱卡-2016 转轮式切片机(德国莱卡公司); BMJ-III 包埋机(常州中威电子仪器厂); TSJ-II 全自动封闭式组织脱水机(常州中威电子仪器厂); PE9600 PCR 扩增仪(美国 PE 公司); DHG-9023A 电热恒温鼓风干燥箱、PYX-DHS 数字显示隔水式电热恒温培养箱、XW-80A 漩涡混合器、TGL-168 离心机均由美国 KIMBLE 公司生产。

1.3 研究方法

随机数字表法将大鼠分成 4 组: 正常组,模型组,杜仲醇提取物低、高剂量组,各 15 只。依据瞿凤环等^[9]报道的方法建立牙周炎模型,除正常组外,其他各组大鼠腹腔注射剂量为 0.3 g $\cdot$ kg⁻¹ 的水合氯醛麻醉,而后注射 0.2 mL 剂量为 1 mg $\cdot$ mL⁻¹ E-LPS 溶液于大鼠上颌右侧第一、第二磨牙间腭、颊侧的龈沟底内,连续注射 3 d,每天 1 次,1 周后大鼠形成牙周袋,牙龈红肿易出血则说明造模成功。实验大鼠均造模成功,造模 1 周后杜仲醇提取物低、高剂量组分别在大鼠上颌右侧第一、第二磨牙间腭、颊侧的龈沟底内注入 0.2 mL 剂量为 0.1, 1.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的杜仲醇提取物,正常组与模型组大鼠注入等剂量生理盐水,连续注入 5 d,每天 1 次。

1.4 观察指标

1.4.1 各组大鼠牙周大体观察及组织病理状况 给药期间观察各组大鼠牙周变化及饮食、活动、毛色等一般情况。末次给药后各组大鼠富强注射剂量为 0.3 g $\cdot$ kg⁻¹ 的水合氯醛麻醉,断颈处死,快

速截取右上颌(第一、第二磨牙与牙周组织)颌骨标本,缓冲液冲洗,10%甲醛固定,而后行酒精梯度脱水、透明,石蜡包埋后切片,厚度为4 μm ,常规行HE染色,在光镜下查看各组大鼠上颌组织的病理状况。

1.4.2 荧光定量检测大鼠牙周膜成纤维细胞内NF- κ B mRNA、IL-1 β mRNA表达 Trizol法提取大鼠牙周膜成纤维细胞总RNA行RT-PCR扩增,NF- κ B上游引物5'-GATTGAGATGATTTTGAGAG-3',下游引物5'-GTATGTTAAGTATATGATTG-3',扩增片段是482 bp;IL-1 β 上游引物5'-GCTCCAGGAATTCCTCGGTA-3',下游引物5'-GAGTCCTGCATGCTAGCTAG-3',扩增片段为389 bp;内参 β -actin上游引物5'-CTTGATCGTACGTAGCCTGA-3',下游引物5'-GTGTAGTGTACTGTTCATGCA-3',扩增片段482 bp。PCR反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 下45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 下50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 下75 s,在40次循环以后获取NF- κ B mRNA、IL-1 β mRNA循环阈值(C_t),使用 $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_t = C_t$ 目的基因- ΔC_t 内参基因)分析,算出 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 目的基因相对表达量。

1.4.3 大鼠外周血内炎症因子含量状况 选取大鼠腹主动脉血清6 mL,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心后采集上清液,ELISA法检测血清IL-1、IL-1 β 及TNF- α 含量,标准品稀释后加入至酶标板标准品孔内,样品加入到样品孔内,每个孔内10 μL ,胶纸将反应孔封住,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2 h,洗板5次,在加入10 μL 生物素化抗体工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h,洗板5次,加入10 μL 酶结合物工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育30 min,洗板5次,每孔加入10 μL 显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育20 min,最后加入终止液,混匀后检测 OD_{450} 数值。

1.4.4 免疫组化检测大鼠牙周膜成纤维细胞IL-1 β 状况 石蜡切片脱蜡后将内源性过氧化物酶灭活,热修复暴露抗原位点,置入孵育盒内,使用PBS溶液冲洗3次,每次3 min,加入山羊血清,孵育10 min,再加入一抗兔多克隆抗体,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。PBS溶液冲洗3次,每次5 min,滴入二抗在室温下孵育10 min,使用PBS溶液冲洗3次,每次3 min,在滴入辣根酶标记链霉卵白素,采用DAB显色,中性树胶封片。棕黄色为染色阳性,一个视野内随机选取100个细胞观察。

1.4.5 Western-blot检测NF- κ B与IL-1 β 蛋白表达 选取大鼠上颌组织研磨,经过组织裂解后上样电

泳,起始电压80 V,溴酚蓝染料前缘进入到分离胶上缘后电压提升到100 V,溴酚蓝泳出分离胶下缘后电泳结束。半干电转移仪于PVDF膜内行蛋白质电转移,恒流为30 mA,连续90 min。PVDF膜取出后采用5%TBST脱脂奶粉封闭,震荡60 min。结束封闭后采用TNS-T漂洗液洗膜10 min,3次,把膜转移到杂交袋内,加入适量漂洗液稀释抗体,封口后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;TBST漂洗液洗膜10 min,3次,在加入漂洗液稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,震荡60 min。PVDF膜放置在ECL显色液内震荡温育5 min,暗室下曝光、显影及定影。清水冲洗以后,晾干扫描,IPP软件对扫描图像目的条带行灰度分析。

1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验,计数资料 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠大体状况观察

正常组大鼠全身和牙周没有显著改变,饮食、活动等均正常;模型组大鼠形成牙周袋,牙龈组织肿胀、易出血,大便干燥,神态倦怠,饮水及饮食量下降,活动量下降,毛色暗带无光泽;杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠牙周袋变浅,牙龈水肿好转,饮水、饮食及活动量增大,毛色有光泽。

2.2 各组大鼠牙周病理状况

正常组大鼠牙龈上皮、下皮下的结缔组织完整光滑,牙槽骨光滑,牙周膜纤维整齐排列,破骨细胞与骨吸收未见陷窝;模型组大鼠形成牙周袋,牙周纤维排列紊乱,牙龈上皮与下皮结缔组织可看到局部坏死、溃疡,牙槽骨内骨吸收与破骨细胞陷窝显著,牙槽嵴明显吸收。杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠牙槽骨与牙周膜结构趋向正常,牙龈上、下皮结缔组织比较完整,牙周间隙正常,牙槽嵴吸收程度低于模型组、且炎症细胞降低成纤维细胞变多。见图1。

2.3 各组大鼠牙周膜内成纤维细胞内IL-1 β 、NF- κ B mRNA相对表达量状况

与正常组相比,模型组大鼠成纤维细胞内IL-1 β 、NF- κ B mRNA相对表达量显著上升($P < 0.05$);与模型组相比,杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠成纤维细胞内IL-1 β 、NF- κ B mRNA相对表达量下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图2。

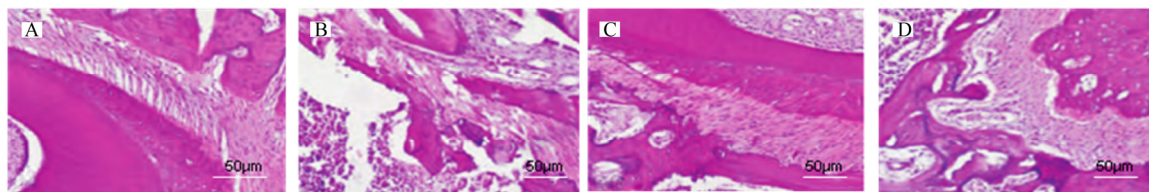


图1 各组大鼠牙周病理状况(HE, 200×)

A-正常组; B-模型组; C-杜仲醇提取物低剂量组; D-杜仲醇提取物高剂量组。

Fig. 1 Periodontal pathological condition of rats in each group (HE, 200×)

A-normal group; B-model group; C-Eucommiae Cortex low dose group; D-Eucommiae Cortex high dose group.

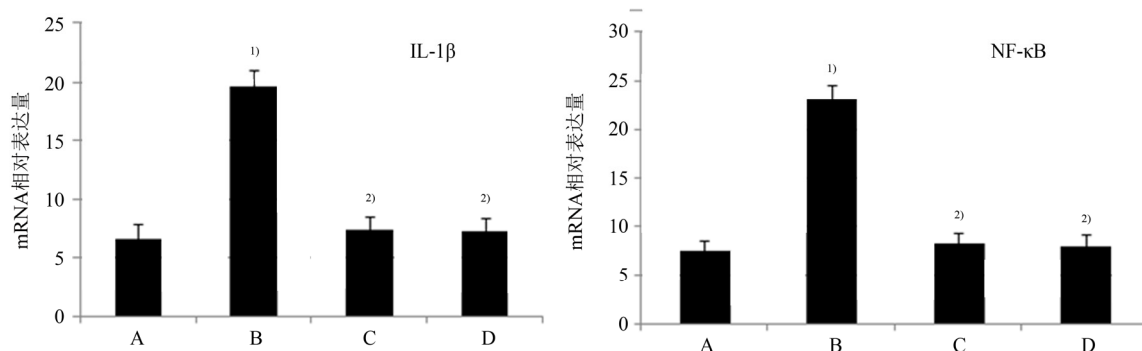


图2 各组大鼠牙周膜内成纤维细胞内 IL-1β、NF-κB mRNA 相对表达量

A-正常组; B-模型组; C-杜仲醇提取物低剂量组; D-杜仲醇提取物高剂量组; 与正常组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组对比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Relative expression levels of IL-1β and NF-κB mRNA in rats periodontal ligament fibroblasts

A-normal group; B-model group; C- Eucommiae Cortex low dose group; D-Eucommiae Cortex high dose group; compared with the normal group; ¹⁾ $P<0.05$, compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

2.4 各组大鼠血清炎症因子含量状况

与正常组相比, 模型组大鼠血清 IL-6、IL-1β 及 TNF-α 含量显著上升($P<0.05$); 与模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠血清 IL-6、IL-1β 及 TNF-α 含量显著下降, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 结果见表 1。

2.5 免疫组化检测各组大鼠牙周膜成纤维细胞 IL-1β 表达

与正常组相比, 模型组大鼠阳性细胞比例显著上升, 阴性细胞比例显著下降($P<0.05$); 与模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠阳性细胞比例显著下降, 阴性细胞比例显著上升, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 见表 2、图 3。

表1 各组大鼠血清炎症因子含量状况对比($n=15$)

Tab. 1 Comparison of serum inflammatory factors in rats of each group($n=15$)

组别	IL-6/pg·mL ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	TNF-α/pg·mL ⁻¹
正常组	1.01±0.23	3.18±0.46	0.99±0.20
模型组	2.10±0.24 ¹⁾	8.72±0.59 ¹⁾	2.18±0.19 ¹⁾
杜仲醇提取物低剂量组	1.26±0.20 ²⁾	3.71±0.53 ²⁾	1.34±0.23 ²⁾
杜仲醇提取物高剂量组	1.18±0.21 ²⁾	3.39±0.55 ²⁾	1.17±0.21 ²⁾

注: 与正常组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组对比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group; ¹⁾ $P<0.05$, compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

表2 成纤维细胞内 IL-1β 阳性细胞计数状况

Tab. 2 IL-1β positive cell counts in fibroblasts

组别	细胞数/个	阴性细胞数/个(%)	阳性细胞数/个(%)
正常组	100	86(86.00)	14(14.00)
模型组	100	12(12.00) ¹⁾	88(88.00) ¹⁾
杜仲醇提取物低剂量组	100	84(84.00) ²⁾	16(16.00) ²⁾
杜仲醇提取物高剂量组	100	85(85.00) ²⁾	15(15.00) ²⁾

注: 与正常组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组对比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group; ¹⁾ $P<0.05$, compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

2.6 大鼠上颌组织内 NF-κB、IL-1β 蛋白表达状况

与正常组相比, 模型组大鼠上颌组织内 NF-κB、IL-1β 蛋白表达显著上升($P<0.05$); 与模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠上颌组织内 NF-κB、IL-1β 蛋白表达显著下降, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 见图 4。

3 讨论

革兰氏阴性厌氧菌为牙周组织发生感染的优势菌, 内毒素为菌体中主要有效结构, 有高度生物学活性物质, 内毒素中主要成分是细胞壁 LPS, 其包含免疫学活性与细胞毒作用等生物学活性^[10-11]。相关研究显示, 牙周病发病主要因素之一为细菌 LPS, 经过结合细胞膜表层受体将机体内平滑肌细

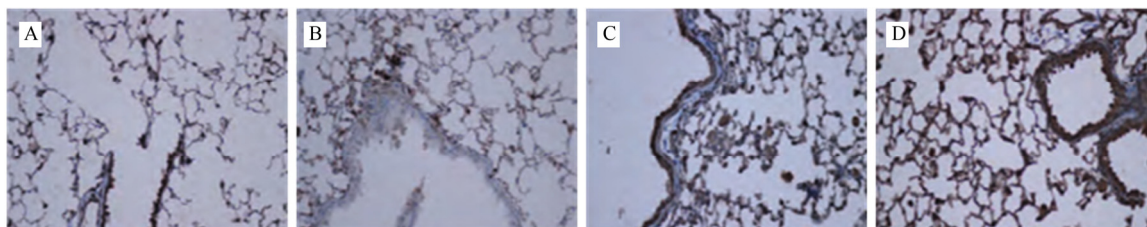


图3 大鼠牙周膜成纤维细胞 IL-1 β 表达(IHC, 200 $\times$)

A-正常组; B-模型组; C-杜仲醇提取物低剂量组; D-杜仲醇提取物高剂量组。

Fig. 3 IL-1 β expression in rat periodontal ligament fibroblasts (IHC, 200 $\times$)

A-normal group; B-model group; C-Eucommiae Cortex low dose group; D-Eucommiae Cortex high dose group.

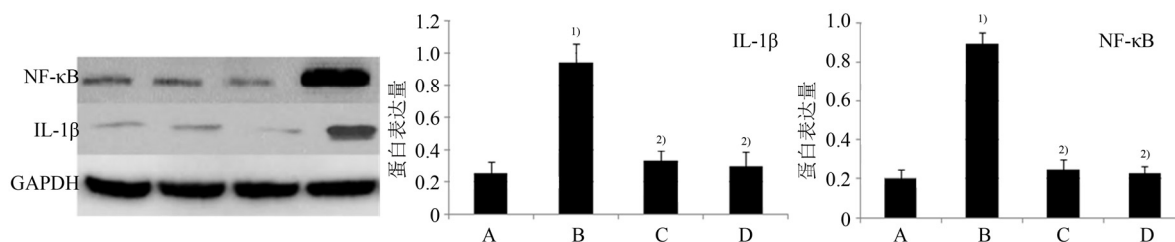


图4 各组大鼠上颌组织内 NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达对比

A-正常组; B-模型组; C-杜仲醇提取物低剂量组; D-杜仲醇提取物高剂量组; 与正常组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组对比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Comparison of NF- κ B and IL-1 β protein expression in maxillary tissue of rats in each group

A-normal group; B-model group; C-Eucommiae Cortex low dose group; D-Eucommiae Cortex high dose group; compared with the normal group; ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

胞、内皮细胞与单核巨噬细胞激活, 诱导形成、释放 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症细胞因子, 进而激活淋巴细胞参加到局部免疫反应, 介导炎症反应对牙周病的发生与进展重要影响^[12-13]。NF- κ B 信号通路为调节免疫反应与炎症的主要信号路径, 可对炎症因子 TNF- α 与 IL-1 β 等下游目的基因转录进行调控。在静息状况下, NF- κ B 在胞质内结合抑制分子 I κ B β 或者 I κ B α 。当受到细胞因子或者 LPS 等刺激时, 其抑制分子在 I κ B 酶影响下发生磷酸化, 泛素化降解, 而后 NF- κ B p65 转位进入到细胞核内, 和黏附分子、炎症细胞因子及酶等目的基因启动子区域结合, 从而介导相应基因表达。

不同种类细胞内 LPS 毒性影响基本一致, 所以对内毒素探究多采用 E-LPS 当做其他细胞内 LPS 毒性对照物质。本研究依据瞿凤环^[9]方法建立牙周病模型, E-LPS 诱导建立牙周病模型优势为重复性好、可比性强, 和人类牙周病组织内病理学变化近似。本研究显示, 大鼠右上颌磨牙颊侧龈沟底内注射 E-LPS, 1 周后形成牙周袋、牙龈红肿充血、探诊出血。病理组织显示, 牙周纤维排列紊乱, 牙龈上皮与下皮结缔组织可看到局部坏死、溃疡, 牙槽骨内骨吸收与破骨细胞陷窝显著, 牙槽嵴明显吸收, 说明牙周病大鼠成功造模。

杜仲为杜仲科植物, 药性温、甘, 主要功效为强筋骨、补肝肾, 杜仲内主要有效成分为苯丙素、木脂素类、杜仲胶及环烯醚萜类等^[14-16]。相关研究显示, 杜仲醇提取物有抗炎和抑制破骨细胞活性等特征, 且多数研究显示其药理影响和 NF- κ B 有联系, 而牙周病与 NF- κ B 活性有关^[17-19]。本研究以牙周动物模型作为研究对象, 经 Western-blot 及实时荧光定量 PCR 确定杜仲醇提取物对牙周病破骨细胞活化因子 IL-1 β 蛋白与 mRNA 表达及作用牙周膜成纤维细胞内 NF- κ B 路径分子靶点。结果显示, 和正常组相比, 模型组大鼠成纤维细胞内 IL-1 β 、NF- κ B mRNA 相对表达量上升; 和模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠成纤维细胞内 IL-1 β 、NF- κ B mRNA 相对表达量下降; 和正常组相比, 模型组大鼠上颌组织内 NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达上升; 和模型组相比, 杜仲醇提取物低、高剂量组大鼠上颌组织内 NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达下降, 差异均有统计学意义, 说明杜仲醇提取物能够在蛋白及 mRNA 水平上经过 NF- κ B 路径抑制牙周病破骨细胞 IL-1 β 表达, 从而抑制牙周膜成纤维细胞增殖治疗牙周病。

综上所述, 杜仲醇提取物经过 NF- κ B 信号通路对牙周病破骨细胞活化因子(IL-1 β)产生作用, 降低牙周组织内炎症因子含量, 对牙周病起到治

疗作用。但由于本研究为初步研究,仅设立了杜仲醇提取物高、低剂量组,未设立中剂量组,无法观察药物的剂量-效应关系,同时,缺乏同类药物的疗效比较,在下一步研究中,将补充相应实验分组,进一步观察杜仲醇提取物对牙周病的疗效。

REFERENCES

- [1] TANG C H, SHI S G, NIU Z Y, et al. Primary culture of human periodontal ligament fibroblasts by explants with enzymatic digestion [J]. Natl Med J China(中华医学杂志), 2004, 84(8): 656-658.
- [2] YU W W, XU Y, LI L. Research progress of inflammatory injury in human periodontal ligament cells induced by LPS under hypoxia [J]. Stomatology(口腔医学), 2017, 37(5): 449-452.
- [3] DING Y J, WANG B Y, YANG Y T. Preparation of phenytoin sodium carboxymethyl chitosan microsphere and its bacteriostasis experiment research on periodontal common pathogenic bacteria [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 492-496.
- [4] LEE S I, YI J K, BAE W J, et al. Thymosin Beta-4 suppresses osteoclastic differentiation and inflammatory responses in human periodontal ligament cells [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146708. DOI: 10.1371/journal.pone.0146708.
- [5] CHEN T L, XU B, SU D, et al. Activating effects and significant of lipopolysaccharide to the activity of nuclear transcription factor- κ B in human gingival fibroblasts [J]. J Clin Stomatol(临床口腔医学杂志), 2010, 26(4): 217-219.
- [6] LIN X P, HAN X Z, KAWAI T, et al. NF- κ B 受体激活蛋白配体抗体抑制 T 细胞介导的牙周骨吸收[J]. 中华口腔医学杂志, 2011, 46(10): 621-624.
- [7] LI Y H, LIU J, YANG L C, et al. Antibacterial activity determination of six kinds of natural herbs in Yunnan on normal oral predominant bacteria *in vitro* [J]. West China J Stomatol(华西口腔医学杂志), 2010, 28(2): 199-202, 207.
- [8] GUO Y W, LI S, FANG D J. Effects of *Eucommia* water/alcohol extract on proliferation and osteogenic differentiation of rabbit adipose derived mesenchymal stem cells [J]. J Clin Rehabilitative Tissue Eng Res(中国组织工程研究), 2012, 16(32): 5959-5962.
- [9] QU F H. Effects of LPS on reparative dentine and dental pulp cells in periodontal animal model [D]. Qingdao, China: Qingdao University, 2012.
- [10] ZHANG H J, LI S N, XU X N, et al. Effects of force and inflammatory factors on the expressions of osteogenesis regulators in human periodontal ligament cells [J]. Acta Acad Med Sin(中国医学科学院学报), 2017, 39(5): 602-611.
- [11] YE Y, YU W W, CHEN X, et al. Effect of A20 on modulating RANKL expression of human periodontal ligament cells (hPDLs) through IL-17 [J]. Stomatology(口腔医学), 2016, 36(6): 489-493.
- [12] YI J R, YAN B X, LI M L, et al. Caffeine May enhance orthodontic tooth movement through increasing osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells under compression [J]. Arch Oral Biol, 2016, 64: 51-60.
- [13] MA L, XU D, REN J F. The effects of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on the proliferation and apoptosis of human periodontal ligament fibroblasts [J]. Chin J Conserv Dent(牙体牙髓牙周病学杂志), 2016, 26(5): 272-276.
- [14] YANG M H, ZHANG D S, CHEN X H, et al. The histological study of inhibitory role of emodin to endotoxin-induced periodontal breakdown in rat [J]. Jiangsu Med J(江苏医药), 2002, 28(9): 659-661, 640.
- [15] LIAO W W, SONG Z C, SHU R, et al. Effects of recombinant human amelogenin on expressions of inflammatory factors of human periodontal ligament fibroblasts under inflammatory microenvironment [J]. J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci(上海交通大学学报: 医学版), 2016, 36(1): 33-37.
- [16] LI L J, LI M, PENG J M, et al. Effects of different concentration of IL-17 on the expression of RANKL and OPG in human periodontal ligament fibroblasts [J]. Chongqing Med(重庆医学), 2017, 46(23): 3177-3179, 3183.
- [17] YANG N, LI Y, WANG G, et al. Tumor necrosis factor- α suppresses adipogenic and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell by inhibiting miR-21/Spry1 functional axis [J]. Differentiation, 2017, 97(21): 33-35.
- [18] ZHU Q Y, CHEN W J, ZHU H, et al. Inhibition expression of Kv1.3 could reduce human periodontal ligament fibroblasts proliferation and osteogenic differentiation capacity [J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2017, 52(6): 819-823.
- [19] CAO Y, WANG L L. Effects of vascular endothelial growth factor combined with basic fibroblast growth factor on periodontal ligament fibroblast proliferation and alkaline phosphatase activity in rats [J]. Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究), 2017, 21(4): 580-585.

收稿日期: 2018-12-25

(本文责编: 曹粤锋)