

消退素 D1 治疗实验性大鼠牙周炎的研究

唐彩金^{1,2} 曾启新^{1*} 方梅飞^{1,2} 马飞^{1*} 陶人川^{1,2} Niyukty Arjal^{1,2}

(1. 广西医科大学附属口腔医院牙周黏膜科 广西南宁 530021;

2. 广西艾滋病防治研究重点实验室 广西南宁 530021)

[摘要] 目的:探讨消退素 D1(RvD1)对治疗牙周炎的作用。方法:取 18 只大鼠建立牙周炎模型,按随机化原则均分为实验甲组(100 $\mu\text{g/L}$ 的 RvD1),实验乙组(50 $\mu\text{g/L}$ 的 RvD1)及阴性对照丙组(生理盐水)。所有大鼠均经尾静脉注射给药进行治疗。治疗后不同时间进行临床检查和形态学测量。采用 SPSS21.0 软件包对数据进行单因素方差分析。结果:治疗后,实验甲组(100 $\mu\text{g/L}$ RvD1)中牙周袋深度、牙龈指数、松动度、牙槽骨丧失量均低于阴性对照组($P < 0.05$)。实验乙组(50 $\mu\text{g/L}$ RvD1)的以上 4 个指标虽均低于阴性对照组,但仅牙龈指数和松动度与阴性对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。两实验组治疗后的牙周袋深度相近($P > 0.05$)。结论:两种浓度的 RvD1 对实验性大鼠牙周炎有治疗作用;100 $\mu\text{g/L}$ 的 RvD1 可阻止实验性大鼠牙周炎的牙槽骨继续破坏。

[关键词] 消退素 D1 牙周炎 动物模型

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2017)12—1270—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.12.008

Curative Effect of Endogenous Resolvin D1 on Periodontitis in Rats. TANG Cai-jin^{1,2}, ZENG Qi-xin^{1*}, FANG Mei-fei^{1,2}, MA Fei^{1*}, TAO Ren-chuan^{1,2}, Niyukty Arjal^{1,2}. 1. Department of Periodontics & Oral Medicine, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Key Laboratory of AIDS Prevention and Treatment, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of resolvin D1 (RvD1) on periodontitis in rat. **Methods:** The models of periodontitis were established in eighteen rats, which were randomly divided into 3 groups, experimental group A (100ng/ml RvD1), experimental group B (50ng/ml RvD1), and control group C (saline). Intervention was provided by systemic injection from the tail vein. Clinical parameters and morphological analysis were measured at different time intervals after treatment. All statistical analysis was performed using the SPSS 21.0 statistical package.

Results: After 1 week of treatment, periodontal pocket depth (PD), gingival index (GI), tooth mobility (TM), and alveolar bone loss (ABL) in experimental group A (100ng/ml RvD1) were lower than those in the control group ($P < 0.05$). For experimental group B (50ng/ml RvD1), only GI and TM showed statistical significance when compared with control group ($P < 0.05$). PD in both experimental groups was similar. **Conclusion:** RvD1 might be used to prevent alveolar bone resorption in periodontitis.

[Key words] Resolvin D1 Periodontitis Animal model

牙周炎是一种由菌斑引起的牙周支持组织破坏的炎症性疾病,主要表现为软组织的炎性感染,牙周附着丧失以及牙槽骨吸收。牙周炎的基础治疗包括去除菌斑牙石的机械治疗以及抗炎类的药物治疗。

但抗炎类药物主要为抗生素,易导致机体耐药性。近年来人工合成的促炎症反应及时消退的内源性炎症消退介质成为炎症领域研究的关注点。消退素是由 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸衍生的内源性促炎症消退介质。根据 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸来源不同,消退素可分为 E 类和 D 类,共 10 种。其中, D 类消退素(resolvin D, RvD)来源于二十二碳六(docosahexaenoic acid, DHA),共有 8 种^[1]。RvD 具有抑制白细胞浸润,下调促炎介质,限制炎症损伤等多种生物学效应^[1,2]。体外研究发现,消退素 D1(resolvin D1)对牙周膜具有保护作用并能抑制破骨细胞的功能。

基金项目 广西高校科学研究项目(编号:YB2014076)

广西南宁市青秀区科技局科技攻关项目(编号:2015S04)

作者简介 唐彩金(1989~),女,广西人,硕士在读,主要从事牙周黏膜病学的研究工作。

* **通讯作者** 曾启新, E-mail: qixinzeng@aliyun.com

马飞, E-mail: mafei8388@163.com

能^[3,4]。而关于消退素与牙周炎关系的研究,国内外较少研究报道,机制尚未明确。因此,本实验研究初步探讨 RvD1 对大鼠牙周炎的治疗效果,为临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 RvD1 (13275, Sigma, 美国); 切片机 (Leica, 德国); 倒置相差显微镜 (DP70, Olympus, 日本); 相机 (D90, NIKON, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物模型建立 清洁级 SD 雄性大鼠 21 只, 体重 200~250 g (广西医科大学动物实验中心提供)。大鼠牙周炎模型的建立: SD 大鼠在 10% 水合氯醛注射液 (4 ml/kg) 腹腔注射麻醉下, 使用尖头探针分离大鼠双侧上颌第二磨牙牙龈, 将 4# 缝线 (直径 0.040 mm) 放入龈沟内并结扎固定, 将结扎端转至颊侧。定期检查, 若缝线脱落则再次结扎^[5]。2 周后, 取下两侧结扎线, 并随机抽取 3 只大鼠, 另外取 3 只正常大鼠, 均截取上颌骨中第二磨牙及其周围 2 mm 的磨牙段, HE 染色, 行组织学观察, 确立牙周炎模型。

1.2.3 实验分组及治疗 将剩下已建立牙周炎模型的 18 只大鼠按随机化原则编号, 均分 3 组, 每组 6 只。实验甲组: 注射 100 $\mu\text{g/L}$ RvD1; 实验乙组: 注射 50 $\mu\text{g/L}$ RvD1; 丙组: 阴性对照组, 注射生理盐水。采用单次疗法, 注射量为 2 μL /只, 均经尾静脉注射给药。

1.2.4 临床检查 治疗后 0、1、4 周对每个结扎单位 (共 36 颗牙) 进行牙周检查, 包括用牙周探诊检查的牙周袋深度 (periodontal pocket depth, PD)、牙龈指数 (gingival index, GI)、探诊出血 (bleeding on probing, BOP) 以及闭合镊子检查松动度 (tooth mobility, TM)。牙周袋探诊的部位为左或右上颌第二磨牙颊、腭侧远中、中央、近中, 6 个测量值的均值作为每个结扎单位的值。

1.2.5 牙槽骨丧失量 4 周后, 处死全部大鼠, 分离上颌骨, 从腭中缝劈开, 将上颌骨放入装有 4% 多聚甲醛离心管中固定一段时间, 取出自然干燥, 去除软组织, 修剪标本, 用游标卡尺测量釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离, 部位与牙周袋探诊部位一致, 6 个测量值的均值为该单位牙的牙槽骨丧失量 (alveolar bone loss, ABL)。

1.2.6 统计学分析 应用 SPSS21.0 软件包进行统计分析。PD、GI、TM、ABL 使用均数加减标准差表示; 不同组间的比较均用单因素方差分析, $P < 0.$

05 有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理观察 显微镜观察, 正常大鼠中, 上皮未见增生, 未见炎性细胞浸润, 牙槽嵴高度正常, 见图 1a。牙周炎模型大鼠中, 上皮钉突变长, 向深层结缔组织内增生, 上皮及深层结缔组织内均有大量炎性细胞浸润, 胶原纤维排列紊乱, 肿胀、断裂, 牙槽骨吸收破坏, 牙槽嵴不完整, 见图 1b; 骨吸收边缘有较多骨吸收陷窝, 内可见破骨细胞, 见图 1c。

2.2 临床观察指标

2.2.1 治疗前后各组牙周探诊深度 (PD) 比较 药物治疗 1 周后, 甲组的 PD 值低于乙组和丙组 ($P < 0.001$); 4 周后, 丙组 PD 值最高, 甲组最低 ($P < 0.05$), 甲组和丙组 PD 值相近 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 治疗前后各组大鼠牙周袋深度比较

Table 1 Comparison of PD among all groups before and after treatment mm, $\bar{x} \pm s$

组别	0 周	1 周	4 周
甲	1.65 \pm 0.05	0.22 \pm 0.05 *1*2	0.20 \pm 0.08 *1
乙	1.65 \pm 0.24	0.61 \pm 0.07	0.27 \pm 0.09
丙	1.65 \pm 0.20	0.64 \pm 0.08	0.45 \pm 0.07

注: 与丙组 (阴性对照组) 比较, * 1 $P < 0.05$; 与乙组比较, * 2 $P < 0.05$

2.2.2 治疗前后各组牙龈指数 (GI) 比较 药物治疗 1 周后, 甲组和乙组的 GI 值均低于丙组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2.3 治疗前后各组松动度 (TM) 比较 治疗 1 周和 4 周时, 甲组和乙组的 TM 值均低于丙组 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 治疗前后各组大鼠牙龈指数比较

Table 2 Comparison of GI among all groups before and after treatment mm, $\bar{x} \pm s$

组别	0 周	1 周	4 周
甲	2.00 \pm 0.00	0.60 \pm 0.51 *	0.00 \pm 0.00
乙	2.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.95 *	0.00 \pm 0.00
丙	2.00 \pm 0.00	1.80 \pm 0.44	0.00 \pm 0.00

注: 与丙组 (阴性对照组) 比较, * $P < 0.05$

表 3 治疗前后各组大鼠上颌第二磨牙松动度比较

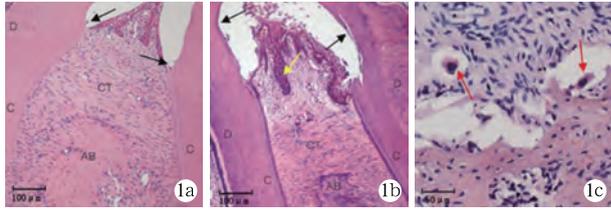
Table 3 Comparison of tooth mobility of upper second molar among all groups before and after treatment mm, $\bar{x} \pm s$

组别	0 周	1 周	4 周
甲	1.90 \pm 0.31	0.91 \pm 0.51 *	0.58 \pm 0.51 *
乙	1.90 \pm 0.31	1.16 \pm 0.57 *	1.08 \pm 0.66 *
丙	2.00 \pm 0.00	2.00 \pm 0.63	2.25 \pm 0.45

注: 与丙组 (阴性对照组) 比较, * $P < 0.05$

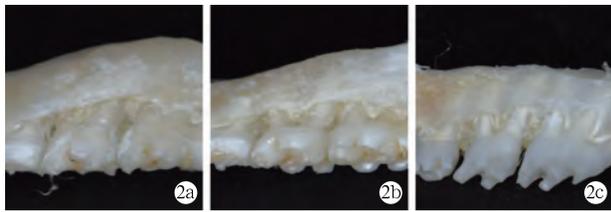
2.3 治疗后各组牙槽骨丧失量比较

2.3.1 大体观察 经治疗后大鼠的牙槽骨吸收情况,见图 2a、图 2b、图 2c;甲组、乙组、丙组牙槽骨丧失量依次增多,丙组最明显。



D:牙本质;CT:结缔组织;C:牙骨质;AB:牙槽骨;黑色箭头:釉牙骨质界;黄色箭头:炎性细胞;红色箭头:破骨细胞;1a为正常大鼠;1b和1c为实验性牙周炎模型大鼠

图 1 实验第 2 周大鼠上颌第二磨牙牙周组织的苏木精-伊红染色
Fig. 1 HE staining of periodontal tissues of the maxillary secondary molar of rats after 2 weeks



2a:实验甲组;2b:实验乙组;2c:阴性对照丙组

图 2 大体观察药后 4 周时各组大鼠牙槽骨吸收情况

Fig. 2 Gross observation of SD rats' alveolar bone loss in experimental group 2a, 2b, and control group 2c at 4 weeks after treatment

2.3.2 3 组牙槽骨丧失量的测定及比较 药物治疗 4 周后,相对于对照组,实验组的牙槽骨丧失量有微量降低,但仅甲组与丙组的 ABL 相比,差异有统计学($P < 0.05$),其余组间差异无统计学意义,见表 4。

表 4 治疗后各组大鼠牙槽骨丧失比较

Table 4	Comparison of ABL among all groups before and after treatment	mm, $\bar{x} \pm s$
	组别	4 周
	甲	0.72 ± 0.07 *
	乙	0.86 ± 0.19
	丙	1.03 ± 0.04

注:与丙组(阴性对照组)比较,* $P < 0.05$

3 讨论

Schwab 等^[2]从小鼠腹腔腔炎性渗出物中分离出由 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸衍生的促炎症消退分子——消退素(resolvin)和保护素(protectin),它们属于内源性消退介质,与脂氧素一起构成了促炎症消退介质的三大新兴家族。

牙周炎是一种支持组织遭受破坏的慢性感染性疾病。研究发现,牙周膜干细胞可以通过合成广谱

促炎症消退的脂类介质,包括 RvD1、D2、D5 和 D6 等,促进炎症消退。其中,RvD1 通过识别 FRP2 受体,行使其抗炎功能^[6]。反过来,牙周膜干细胞所产生的促炎消退介质也能使牙周膜成纤维细胞增值、创伤愈合、碱性成纤维生长因子释放产生的前列腺素(PGE2)^[3]。因此,RvD 使牙周膜干细胞在牙周炎中发挥了修复受损组织以及再生的作用。本实验通过建立大鼠牙周炎模型,初步观察不同浓度的 RvD1 对牙周炎临床指标改善情况,探讨 RvD1 对牙周炎的治疗是否有良好的效果以及哪种 RvD1 浓度更适合用于牙周药物治疗。治疗前,3 组大鼠牙周病变程度相近,具有可比性。RvD1 治疗 1 周后,100 $\mu\text{g/L}$ RvD1 治疗组的 PD 值低于 50 $\mu\text{g/L}$ RvD1 治疗组和阴性对照组;4 周后,治疗组的 PD 值相近,均低于阴性对照组,而仅 100 $\mu\text{g/L}$ RvD1 治疗组与对照组相比,差异有统计学意义。但在 TM 指标上,100 $\mu\text{g/L}$ RvD1 和 50 $\mu\text{g/L}$ RvD1 治疗组均低于阴性对照组。综上,两种浓度的 RvD1 可改善大鼠实验性牙周炎的 PD 和 TM,这或许是 RvD1 对牙周膜成纤维起保护作用的表现。

控制局部炎症是治疗牙周炎的关键。学者们发现,RvE 抑制牙周炎中性粒细胞内活性氧的释放^[7],修复巨噬细胞的吞噬功能^[8]。而 RvD1 也能作用于这两种细胞,即 RvD1 可能通过抑制了嗜中性粒细胞招募炎性因子的再聚集,并激活吞噬细胞发挥其清除病原体的作用^[3]。本实验结果分析发现,与阴性对照组相比,治疗组用药 1 周后,牙龈急性炎症很快消退,治疗组组间差异无统计学意义。所以,本实验可以得出这两种浓度(100 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$)的 RvD1 对牙周炎也起到了促炎症消退的作用。而关于 RvD1 的抗炎机制,Schwab, J. M 认为 RvD1 通过降低人单核细胞中 NF- κ B 和 Smad 的核转录水平来抑制炎症基因的表达,控制炎症的发展。而在促炎症消退的循环通路中,RvD1 建立 RvD1-依赖 GPR32 的 miRNA 轴,来发挥其促炎症消退反应^[9]。

治疗牙周炎的最终目的是尽量保护骨组织。研究发现,E 类消退素在牙周炎动物模型当中的局部使用,可以有效降低破骨细胞的密度和改变炎性细胞的数量,大大地减少炎性相关基因的表达(MMP3、MMP10、MMP13)并逆转到一个健康水平,逆转骨丧失^[10]。与 RvE1 相似,RvD1 可以有效地发挥骨保护作用。体外实验发现 RvD1 作用于成骨细胞,逆转睾酮对成骨细胞骨钙蛋白下调作用,同

时显著性地提高 OPG 表达水平,对骨组织起保护作用^[4]。有学者认为,RvD1 依赖 Del-1 来降低牙周炎中过氧化氢酶和中性粒细胞相关分子 mRNA 的表达,抑制细胞因子诱导的牙槽骨吸收^[11]。本实验通过测量釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离,比较各组牙槽骨丧失量(ABL),观察 RvD1 是否对骨组织起保护作用。治疗 4 周后,处死大鼠,测量 ABL,发现 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ RvD1 治疗组的 ABL 值低于阴性对照组,说明 RvD1 可以防止牙槽骨骨量丧失,在骨保护中发挥了作用,这与前面学者研究的结果相一致。

综上,本实验初步观察到两种药物浓度的 RvD1 均可促使牙周炎的炎症消退,保护结缔组织,且 100 ng/mL RvD1 可抑制牙槽骨吸收,保护骨组织。

参考文献

- [1] Kohli P, Levy BD. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation [J]. *British journal of pharmacology*, 2009,158(4): 960-971
- [2] Schwab JM, Chiang N, Arita M, et al. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes [J]. *Nature*,2007,447(7146): 869-874
- [3] Mustafa M, Zarrouh A, Bolstad AI, et al. Resolvin D1 protects periodontal ligament [J]. *American journal of physiology Cell physiology*,2013,305(6): C673-679
- [4] Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation [J]. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*,2014,46(3): 193-200

- [5] 刘飞,张林,肖刚,等.生命早期负性应激对大鼠实验性牙周炎的影响[J]. *口腔医学研究*,2017,33(3): 244-248
- [6] Cianci E, Recchiuti A, Trubiani O, et al. Human Periodontal Stem Cells Release Specialized Proresolving Mediators and Carry Immunomodulatory and Prohealing Properties Regulated by Lipoxins [J]. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2016,5(1): 20-32
- [7] Damgaard C, Kantarci A, Holmstrup P, et al. Porphyromonas gingivalis-induced production of reactive oxygen species, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, CXCL8 and CCL2 by neutrophils from localized aggressive periodontitis and healthy donors: modulating actions of red blood cells and resolvin E1 [J]. *Journal of periodontal research*, 2017,52(2): 246-254
- [8] Fredman G, Oh SF, Ayilavarapu S, et al. Impaired phagocytosis in localized aggressive periodontitis: rescue by Resolvin E1 [J]. *PloS one*,2011,6(9): e24422
- [9] Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution [J]. *The Biochemical journal*,2011,437(2): 185-197
- [10] Lee CT, Teles R, Kantarci A, et al. Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis [J]. *Journal of immunology*,2016,197(7): 2796-806
- [11] Maekawa T, Hosur K, Abe T, et al. Antagonistic effects of IL-17 and D-resolvins on endothelial Del-1 expression through a GSK-3beta-C/EBPbeta pathway [J]. *Nature communications*,2015,6: 8272

[收稿日期:2017-06-14]

(本文编辑 汪喻忠)

《口腔疾病防治》杂志征稿及征订启事

《口腔疾病防治》是由广东省口腔医院、广东省牙病防治指导中心主办,中南大学湘雅口腔医学院、郑州大学口腔医学院、南昌大学口腔医学院、重庆医科大学口腔医学院、福建医科大学口腔医学院等五所大学协办,月刊,CN44-1724/R,ISSN2096-1456。主要报道国内外口腔医学研究新进展和口腔疾病防治新成果、新技术、新经验,服务口腔疾病预防治疗领域学术交流和口腔疾病防控工作。

本刊图随文走、全铜版纸彩色印刷,设有专家论坛、专家述评、专栏论著、基础研究、临床研究、防治实践、病例报告、综述等栏目。其中含有省级以上基金优秀论文录用后可 3 个月内快速发表。

本刊官网及投稿网址为 <http://www.kqjbfz.com>,本刊不收取审稿费,本刊没有授权或委托任何其他网站受理作者投稿,谨防诈骗。欢迎广大读者订阅。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 46-225。每月 20 日出版,定价为每册 5.00 元,全年 60 元。

如错过邮局订阅时间,可直接向编辑部订购。请将款项汇入开户银行:广州市建行昌岗路支行,账号:44001430402050202779,户名:广东省口腔医院,并且将订阅者的邮政编码、详细地址、姓名、订阅年度、份数及汇款回执扫描件发送至本刊邮箱(kqjbfz@126.com)。编辑部电话:020-84403311,传真:020-84445386,Email:kqjbfz@126.com。