

β-隐黄素对大鼠实验性牙周炎炎症因子的影响

李冬雪¹ 王国芳^{1#*} 崔晓宇² 李小红³ 轩亚茹⁴ 王守儒⁵

(1. 郑州大学第一附属医院口腔科 河南 郑州 450052;

2. 濮阳市油田总医院口腔科 河南 濮阳 457001;

3. 安阳市第六人民医院(安阳市口腔医院)口腔科 河南 安阳 455000;

4. 郑州人民医院口腔科 河南 郑州 450053; 5. 河南省中医院口腔科 河南 郑州 450002)

[摘要] 目的:研究 β-隐黄素对大鼠实验性牙周炎炎症因子的影响并探讨其相关作用机制。方法:30 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组(N 组)、牙周炎组(P 组)、β-隐黄素干预组(E 组),每组 10 只。采取结扎双侧上颌第二磨牙颈部联合注射脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导牙周炎模型。E 组同时于相同位点注射 β-隐黄素(每只 12 μL),每 48 h 注射 1 次,共 3 次。实验第 7 天采血并立即分离双侧上颌骨,右侧颌骨行组织学分析,血清及左侧分离的牙龈组织以酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测细胞白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)含量。结果:E 组和 P 组大鼠 IL-1β、TNF-α、PGE₂ 水平明显高于 N 组,且炎症细胞浸润较多,牙槽骨吸收明显。与 P 组比较,E 组中 IL-1β、TNF-α、PGE₂ 水平明显降低($P < 0.05$),炎症细胞浸润较少,牙槽骨吸收减轻。结论:β-隐黄素可能通过降低组织中的炎症因子水平,减少炎症细胞浸润,从而减轻牙周组织的炎症反应,减少牙槽骨吸收。

[关键词] β-隐黄素 牙周炎 炎症因子 骨吸收

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)05—0471—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqyxj.2019.05.014

Effect of β-cryptoxanthin on Level of Inflammatory Factors in Experimental Periodontitis. LI Dong-xue¹, WANG Guo-fang^{1#*}, CUI Xiao-yu², LI Xiao-hong³, XUAN Ya-ru⁴, WANG Shou-ru⁵. 1. Department of Periodontology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Stomatology, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang 457001, China; 3. Department of Stomatology, Anyang Sixth People's Hospital (Anyang Stomatological Hospital), Anyang 455052, China; 4. Department of Stomatology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450012, China; 5. Department of Stomatology, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

[Abstract] **Objective:** To study the effect of β-cryptoxanthin on inflammatory factors in rats with experimental periodontitis and to explore its mechanism. **Methods:** 30 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group (group N), periodontitis group (group P), and β-cryptoxanthin intervention group (group E), with 10 rats of each. Experimental periodontitis model was induced by ligation of bilateral maxillary second molars cervix and injection with lipopolysaccharide (LPS). At the same time, β-cryptoxanthin (12μl/each) was injected in group E at the same site. All groups were treated every 48 hours for three times. Blood was collected and the bilateral maxilla were immediately separated on day 7, the right part of the tissues were subjected to histological analysis, serum and the left gingival tissues were detected by ELISA for IL-1β, TNF-α, and PGE₂. **Results:** The levels of IL-1β, TNF-α and PGE₂ in group E and group P were higher than those in group N, the infiltration of inflammatory cells was

基金项目 王守儒全国名老中医药专家传承工作室

作者简介 李冬雪(1992~),女,吉林人,硕士在读,研究方向:牙周病病因及临床研究。

王国芳(1976~),女,河南人,讲师,博士,主要从事牙周病的病因研究及临床治疗。

* 通讯作者 王国芳, E-mail: wgfzx2003@163.com

王国芳为共同第一作者

increased and the alveolar bone absorption was obvious. Compared with group P, the levels of IL-1β, TNF-α, and PGE₂ in group E were significantly lower, the infiltration of inflammatory cells was less, and the absorption of alveolar bone was mild. **Conclusion:** β-cryptoxanthin can decrease the level of inflammatory factors and the inflammatory cells infiltration in tissues, thereby reducing the inflammation of periodontal

tissues and alleviating alveolar bone resorption.

[Keywords] β -cryptoxanthin Periodontitis Inflammatory factors Bone resorption

牙周炎是发病率较高的牙周组织的慢性感染性炎症性疾病,主要特征是牙龈炎症和牙槽骨吸收,最终会导致牙齿松动甚至脱落,严重危害口腔健康。众所周知,细菌是牙周炎的始动因子,感染发生后,由炎症介质如白细胞介素(interleukin, IL)、前列腺素(prostaglandin, PG)等导致的组织破坏途径随之发生^[1]。 β -隐黄素是一种从柑橘和热带水果中分离的类胡萝卜素。Cicone 等^[2]研究发现 β -隐黄素可改善动脉粥样硬化的症状和发生率,有抗炎和氧化的作用。Nishigaki 等^[3]对人牙周膜细胞进行体外研究发现 β -隐黄素可抑制牙周致病菌诱导的牙周膜细胞中炎症因子的产生。笔者前期研究发现, β -隐黄素可降低牙周组织中的核因子 κ B 受体活化因子配体/骨保护素(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin, RANKL/OPG)比值,减少成熟的破骨细胞数目^[4]。所以推测 β -隐黄素可能通过抗炎作用抑制炎症因子释放,从而调控 RANKL 和 OPG 的表达,阻止牙周炎导致的牙槽骨吸收,用于牙周炎及全身炎症性疾病的预防和治疗。本实验旨在研究 β -隐黄素干预下牙周炎大鼠牙周组织及血清中炎症因子的水平,探讨其对牙周炎的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器械 β -隐黄素(美国 Sigma 公司)溶于玉米油中,配成 1 g/L 溶液;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS,北京索莱宝科技有限公司)溶于生理盐水中,配成 1 g/L 溶液;酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);兔抗鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)试剂盒(北京中杉生物技术有限公司);Bio-Rad iMark 酶标仪(北京友华照钦医疗器械有限公司);低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);日本 Olympus 显微照相系统(北京新华腾达科技有限公司);LEICA SM2000R 组织切片机(德国莱卡 Microsystems Nussloch 公司);显微外科器械等。

1.2 实验动物及分组 30 只 8 周龄雄性 SD 大鼠(山东省济南朋悦实验动物繁育有限公司提供),许

可证号:SCXK(鲁)20140007,无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级,体重 280~300 g,于河南省中医药研究院实验动物中心进行分笼饲养,自由摄取食物和水。大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 3 组,每组 10 只:空白对照组(N 组);牙周炎组(P 组);牙周炎模型+玉米油; β -隐黄素干预组(E 组);牙周炎模型+ β -隐黄素。本研究已通过本院动物伦理委员会批准。

1.3 方法

1.3.1 建立牙周炎模型 7%水合氯醛以 3 mL/kg 的剂量对大鼠麻醉后,P 组和 E 组分别选取直径为 0.2 mm 的正畸结扎丝线于双侧上颌第二磨牙牙颈部进行结扎,同时在龈沟内注射 LPS(每只 30 μ L)^[5],每 48 h 注射 1 次,共 3 次。

1.3.2 分组处理 β -隐黄素干预组(E 组)每次注射 LPS 的同时在相同位点注射 β -隐黄素(每只 12 μ L)^[6],每 48 h 注射 1 次,共 3 次。P 组于相同位点注射等量的玉米油作为对照。注射后第 7 天,腹主动脉采血后室温下静置 30 min~1 h,低温离心取血清于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存,处死大鼠,取右侧上颌组织(含牙齿、牙龈、牙槽骨)于福马林溶液中固定,左侧上颌分离牙龈组织于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3.3 组织学和免疫组织化学分析 固定后的右侧上颌组织于 10%乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙液中脱钙 4~6 周后,梯度乙醇脱水,二甲苯溶液透明,石蜡包埋,沿近远中方向切成 4 μ m 厚的切片,苏木精-伊红溶液(haematoxylin and eosin, HE)染色,观察组织形态学变化。免疫组织化学染色分析 IL-1 β 和 TNF- α 的特异性表达。一抗用兔抗鼠 IL-1 β 、TNF- α 多克隆抗体(稀释浓度为 1:100),操作步骤严格按照说明书进行,显微镜下观察拍照。免疫组织化学染色呈棕黄色、棕褐色或褐色区域为阳性表达。每张切片于牙槽嵴顶附近选取 3 个区域,Image Pro Plus 图像分析系统检测总光密度值及所选区域总面积。平均光密度值为总光密度值/区域总面积。

1.3.4 ELISA 检测 将牙龈组织称重,按比例加入生理盐水,放入组织匀浆器中制备匀浆,离心取上清液,ELISA 法测定牙龈组织中 IL-1 β 、TNF- α 、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE₂) 的含量。同样

采用 ELISA 法检测血清中 3 种炎症因子的含量,均严格按说明书操作,操作如下:(1)将样品从冰箱取出,平衡至室温,按比例配制洗涤液和各工作液;(2)将每个浓度的工作液并列加入前两列孔中,待测样品加入到其他孔中,每孔 100 μ L,给酶标板覆膜,37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min;(3)弃液甩干,加入生物素化抗体工作液 100 μ L,覆膜后 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;(4)甩尽液体后加入洗涤液浸泡 1~2 min,吸取液体,重复洗涤 3 次。(5)每孔加酶结合物工作液 100 μ L,覆膜后 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min;(6)弃液甩干,洗涤 5 次后每孔加入底物溶液 90 μ L,覆膜后 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15~30 min;(7)每孔加入终止液 50 μ L,终止反应后立即用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔 A 值;(8)以 A 值作为纵坐标,各标准品浓度作为横坐标,绘制标准曲线,再根据标准曲线及各样品的 A 值计算牙龈组织和血清中各炎症因子浓度。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用单因素方差分析;方差齐时,组间比较采用 Bonferroni's 检验;方差不齐时,组间比较采用 Dunnett's 检验;两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在整个实验过程中未见大鼠出现死亡,健康状况良好,结扎丝未脱落,所有大鼠牙周炎模型建立成功。

2.1 体重变化 实验后,每组大鼠体重均较实验前增加,实验前以及实验后 3 组大鼠之间体重差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

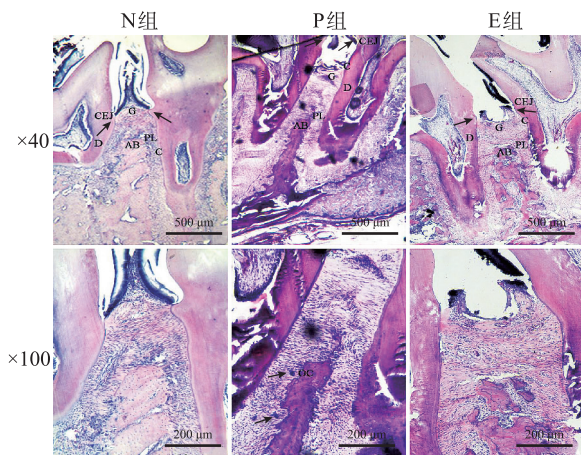
2.2 组织学分析 HE 染色可见,N 组龈乳头充满

邻间隙,结合上皮最顶端附着于釉牙骨质界处。P 组结合上皮向根方迁移,牙周袋形成,牙槽骨明显吸收。E 组结合上皮略向根方迁移,牙周袋较浅,牙槽嵴顶少量吸收。N 组和 E 组牙龈组织中炎症细胞浸润较少,牙周膜纤维排列正常。而 P 组牙龈组织中大量炎细胞浸润,牙周膜增宽,牙周膜纤维排列紊乱,可见较多成熟破骨细胞,见图 1。

表 1 实验前后大鼠体重

Tab. 1 Weight of rats before and after the experiment

组别	实验前体重	实验后体重
N 组	321.80 \pm 9.85	381.00 \pm 11.53
P 组	328.90 \pm 11.03	379.90 \pm 7.53
E 组	321.10 \pm 11.54	375.80 \pm 11.27



G: 牙龈结缔组织;D: 牙本质;C: 牙骨质;AB: 牙槽骨;PL: 牙周韧带;CEJ: 釉牙骨质界;OC: 破骨细胞

图 1 大鼠牙周组织苏木精-伊红染色

Fig. 1 HE staining of rat periodontal tissues.

2.3 IL-1 β 、TNF- α 的免疫组织化学分析 牙周组织中炎症因子的免疫组织化学染色结果见图 2。与

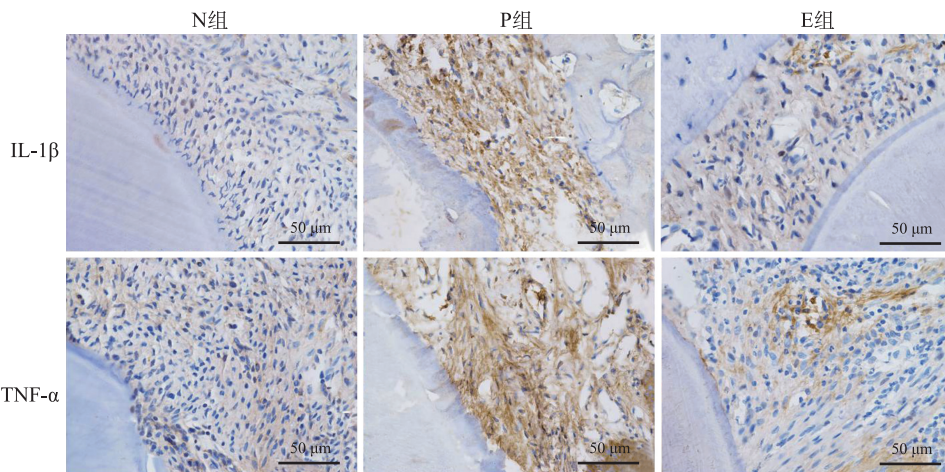


图 2 大鼠牙周组织免疫组织化学染色($\times 400$)

Fig. 2 Immunohistochemistry staining of rat periodontal tissues ($\times 400$).

表3 大鼠牙龈组织中炎症因子含量

Tab. 3 The level of inflammatory factors in gingival tissues of rats ng/L, $\bar{x} \pm s$

组别	IL-1 β	TNF- α	PGE ₂
N组	30.71 \pm 10.59	210.24 \pm 25.51	26.61 \pm 6.39
P组	208.66 \pm 126.10 ^{*2}	511.75 \pm 111.87 ^{*2}	109.95 \pm 21.47 ^{*2}
E组	70.41 \pm 38.22 ^{*1*2}	338.42 \pm 65.88 ^{*1*2}	53.53 \pm 8.37 ^{*1*2}

注:与N组比较,*1 $P < 0.001$;与P组比较,*2 $P < 0.001$

表4 大鼠血清中炎症因子含量

Tab. 4 The level of inflammatory factors in serum of rats ng/L, $\bar{x} \pm s$

组别	IL-1 β	TNF- α	PGE ₂
N组	38.41 \pm 9.11	89.87 \pm 30.08	34.43 \pm 14.19
P组	168.26 \pm 86.55 ^{*2}	418.20 \pm 106.98 ^{*2}	113.24 \pm 21.92 ^{*2}
E组	76.22 \pm 38.57 ^{*1*2}	183.33 \pm 46.89 ^{*1*2}	80.09 \pm 15.26 ^{*1*2}

注:与N组比较,*1 $P < 0.001$;与P组比较,*2 $P < 0.001$

表2 大鼠牙周组织中炎症因子的表达

Tab. 2 The expression of inflammatory factors in rat periodontal tissues $\bar{x} \pm s$

组别	IL-1 β 的MOD	TNF- α 的MOD
N组	36.80 \pm 1.66	38.10 \pm 1.08
P组	93.17 \pm 3.02 ^{*1}	94.96 \pm 2.18 ^{*1}
E组	43.69 \pm 2.42 ^{*1*2}	61.50 \pm 3.03 ^{*1*2}

注:MOD,平均光密度值。与N组相比,*1 $P < 0.001$;与P组相比,*2 $P < 0.001$

N组比较,E组和P组中IL-1 β 和TNF- α 的表达均增加($P < 0.05$);与P组比较,E组中IL-1 β 和TNF- α 的表达均显著减少($P < 0.05$),见表2。

2.4 ELISA检测结果分析 E组和P组牙龈组织和血清中IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂水平均显著高于N组($P < 0.05$);而E组牙龈组织和血清中IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂水平均显著低于P组($P < 0.05$),但高于N组($P < 0.05$)。

3 讨论

有研究报道,炎症因子在牙周炎的发生发展中发挥重要作用。牙周组织的破坏除了致病菌的直接作用外,宿主免疫炎症反应也是造成或加重组织破坏的重要原因。在宿主反应过程中,一系列的炎性介质起到了至关重要的作用,尤以IL-1 β 、TNF- α 及PGE₂与牙周炎关系最为密切,它们不仅可以直接导致牙周结缔组织损伤及牙槽骨的吸收,还可以进一步影响宿主炎症和免疫反应进程。因此,目前认为,控制炎症反应的发生是治疗此类炎症性疾病的关键。牙周致病菌定植后,产生大量毒性物质如脂多糖和蛋白酶直接刺激牙龈成纤维细胞,同时还可以激活和趋化单核细胞、巨噬细胞,分泌IL-8、TNF- α 、PGE₂、IL-1、IL-6、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)等炎症介质,这些炎症介

质又反过来激活血管平滑肌细胞、成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞,导致活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1)蛋白和核因子- κ B(nuclear factor-kappa-binding, NF- κ B)通路活化,使PGE₂及MMP等产生进一步增加,RANKL表达增加,激活破骨细胞(osteoclast, OC),从而导致组织损伤和骨吸收^[1,7]。因此,寻找一种能够降低全身及局部组织炎症反应并且安全、不良反应小、成本低的天然化合物预防及治疗牙周炎尤为重要。

既往研究结果表明, β -隐黄素具有抗氧化和提高免疫力的作用,可抑制全身炎症反应^[8]。本实验采取结扎联合注射LPS的方法进行造模,诱导牙周组织炎症反应。造模后牙龈红肿,牙齿轻微松动,牙龈出现不同程度退缩。组织学检查结果显示,牙周炎组结合上皮向根方迁移,炎性细胞浸润增加,牙槽骨明显吸收。而实验组牙龈红肿明显减轻,炎细胞浸润明显减少,结合上皮附着于釉牙骨质界稍根方,骨吸收减少。表明 β -隐黄素对牙周炎的组织破坏有一定的抑制作用。

β -隐黄素对各种疾病的预防和治疗并不是单一作用结果,其作用机制十分复杂。 β -隐黄素可通过抑制炎症细胞的活化,减少炎症因子释放,抑制RANKL的表达。前期研究发现, β -隐黄素可使OPG表达增加,RANKL表达下降,RANKL/OPG比值降低,抑制实验性牙周炎破骨细胞的产生。本实验通过对牙龈组织进行检测发现,P组和E组牙龈中IL-1 β 、TNF- α 及PGE₂水平均显著高于N组。 β -隐黄素干预组中,牙龈组织中IL-1 β 、TNF- α 及PGE₂水平均显著低于P组,表明 β -隐黄素可能通过减少牙周组织中炎症因子的释放,抑制NF- κ B活化,下调RANKL/OPG比值,进而抑制破骨细胞的

活化,减少成熟破骨细胞数目,从而减少炎症性骨吸收。

牙周组织炎症状态下,常表现为袋内壁上皮水肿、白细胞密集浸润,并常有表面糜烂或溃疡,牙周袋内产生的促炎症反应免疫介质通过弥漫性溃疡进入循环系统,导致全身炎症介质水平升高,引起系统性疾病。如 PGE₂ 水平升高可增加早产低体重儿的风险;IL-1 β 、TNF- α 等升高可增加胰岛素抵抗;此外血清中炎症因子水平升高还可增加类风湿性关节炎、慢性阻塞性肺疾病^[9]及肾脏疾病患病风险。此外,大量研究已证实牙周病患者的血液中可测得较高水平的 IL-1 β 、TNF- α 等炎症介质,能够增加血管通透性及趋化炎症细胞聚集。IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等多种急性期反应炎症因子与动脉粥样硬化的形成、发展和斑块破裂相关^[10]。本实验通过对外周血检测发现, β -隐黄素干预组中,血清 IL-1 β 、TNF- α 及 PGE₂ 水平高于正常组,但均显著低于牙周炎组,说明 β -隐黄素在降低牙龈组织中炎症因子水平的同时,也可以降低血清中炎症因子水平。Linden 等^[11]通过流行病学调查发现,血清中 β -隐黄素的水平与牙周炎患病率相关,牙周炎患者血清中 β -隐黄素水平明显较低。以上研究结果表明, β -隐黄素可能通过降低血清中 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 等炎症因子水平,抑制全身或局部组织炎症反应。因此, β -隐黄素可能用于预防和治疗与全身炎症性疾病相关的牙周疾病。

综上所述, β -隐黄素对牙周组织发挥保护作用,可减轻局部和全身的炎症反应和氧化应激,从而减少骨吸收。同时,本实验为 β -隐黄素可能应用于牙周疾病及全身炎症性疾病的预防和治疗提供了有力的证据,但其具体作用机制还尚未明确,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Araujo AA, Souza TO, Moura LM, et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model [J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(12): 1104-1111.
- [2] Ciccone MM, Cortese F, Gesualdo M, et al. Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013:782137.
- [3] Nishigaki M, Yamamoto T, Ichioka H, et al. β -cryptoxanthin regulates bone resorption related-cytokine production in human periodontal ligament cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58(7):880-886.
- [4] 轩亚茹,卫晓霞,崔晓宇,等. β -隐黄素对大鼠牙槽骨吸收的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(1):76-80.
- [5] Moradi J, Abbasipour F, Zaringhalam J, et al. Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF-alpha and IL-1 β in a rat model of LPS-induced periodontitis [J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(4): 1319-1325.
- [6] Matsumoto C, Ashida N, Yokoyama S, et al. The protective effects of β -cryptoxanthin on inflammatory bone resorption in a mouse experimental model of periodontitis [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(4):860-862.
- [7] Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease [J]. *Periodontol 2000*, 2014, 64(1):57-80.
- [8] 盛冉,孙志高,黄巧娟,等. β -隐黄素的生理活性及其机理研究进展[J]. *食品与机械*, 2016, 32(12):218-223.
- [9] 韩静,李威,李一梓,等. 牙周炎伴 COPD 患者血清 25-(OH) D、TNF- α 和 IL-6 水平检测的研究[J]. *口腔医学研究*, 2014, 30(8):743-746.
- [10] 韩斐斐,郑纪伟,丁志江,等. 冠心病与牙周病患者 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平相关性研究[J]. *口腔医学研究*, 2013, 29(10):936-938.
- [11] Linden GJ, McClean KM, Woodside JV, et al. Antioxidants and periodontitis in 60-70-year-old men [J]. *J Clin Periodontol*, 2009, 36(10):843-849.

[收稿日期:2018-09-26]

(本文编辑 关隽)