

葛根素对牙周炎导致的牙槽骨吸收的影响及作用机理研究

Effects of puerarin on alveolar bone resorption induced by periodontitis and its mechanism

肖彬倩 董泽龙 谢丛捷 林天文 戴洪滔 竺世骅 王利*

Xiao Binqian, Dong Zelong, Xie Cong Jie, Lin Tianwen, Dai Hongtao, Zhu Shijiao, Wang Li *

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

(Changsha Medical University, Hunan, Changsha 410219)

摘要: 目的 探讨葛根素对牙周炎导致的牙槽骨吸收的影响及作用机理。方法 将 40 只雄性清洁级 SD 牙周炎模型大鼠分成 4 组, 每组 10 只即牙周炎模型组(灌胃相应剂量的 0.9% 的生理盐水)、低剂量葛根素组(100mg/kg)、中剂量葛根素组(200mg/kg)、高剂量葛根素组(400mg/kg)建模成功后, 对每组 SD 大鼠饲喂同等同质常规饲料, 进行不同浓度给药, 正常对照组: 不做其他干预; 每日灌胃等量溶液, 连续 6 周。检测大鼠牙槽骨吸收量、活性破骨细胞计数、骨密度测量以及观察牙周组织病理学情况。结果 连续 6 周后, 与牙周炎模型组相比, 低、中、高剂量葛根素组牙槽骨吸收量明显降低; 而模型组牙槽骨吸收量升高, 差异比较有显著性意义 ($P < 0.05$); 低、中、高剂量葛根素组活性破骨细胞数目明显少于牙周炎模型组, 差异比较有显著性意义 ($P < 0.05$); 与牙周炎模型组相比, 低、中、高剂量葛根素组上颌骨骨密度显著升高 ($P < 0.05$), 而牙槽骨高度降低值显著减少 ($P < 0.05$); 牙周组织中有大量炎细胞浸润, 在高倍光镜下观察可见到多个核的破骨细胞形成。结论 葛根素对牙周炎导致的牙槽骨吸收有一定的相关性, 能抑制实验性牙周炎牙槽骨的吸收。

【Abstract】 Objective To investigate the effect of puerarin on alveolar bone resorption induced by periodontitis and its mechanism. Methods 40 male clean SD periodontitis model rats were divided into 4 groups with 10 rats in each group, including periodontitis model group (0.9% normal saline), low dose puerarin group (100mg/kg), medium dose puerarin group (200mg/kg) and high dose puerarin group (400mg/kg). SD rats in each group were fed the same conventional diet with different concentrations. Normal control group was given no other intervention. The same amount of solution was given daily for 6 weeks. Alveolar bone absorption, active osteoclast count, bone mineral density and periodontal histopathology were measured.

Results After 6 weeks, compared with periodontitis model group, the alveolar bone absorption of low, medium and high dose puerarin group was significantly decreased. The alveolar bone absorption volume increased, and the difference was significant ($P < 0.05$). The number of active osteoclasts in low, medium and high dose puerarin groups was significantly lower than that in periodontitis model group ($P < 0.05$). Compared with periodontitis model group, maxillary bone mineral density in low, medium and high dose puerarin groups was significantly increased ($P < 0.05$), while alveolar bone height decreased significantly ($P < 0.05$). A large number of inflammatory cells infiltrated the periodontal tissue, and osteoclast formation of multiple nuclei was observed under high power light microscope. Conclusion Puerarin has a certain correlation with alveolar bone resorption caused by periodontitis, and can inhibit the resorption of alveolar bone in experimental periodontitis.

关键词: 葛根素; 大鼠; 牙周炎; 牙槽骨吸收

【Key words】 puerarin; Rat; Periodontitis; Alveolar bone resorption

牙周炎 (Periodontitis) 又称破坏性牙周病, 是我国成年人丧失牙齿的首要原因。牙周炎是由菌斑微生物引起的牙周组织(包括牙龈、牙周膜、牙槽骨、牙骨质)的慢性感染性疾病, 能够造成牙龈红肿出血、牙周袋形成、牙槽骨吸收, 进而导致牙齿松动、脱落, 危害口腔健康^[1]。葛根素在临床上被认为是一种安全有效的药物, 同时具有清热排毒、抗蛋白酶、抗炎、抗骨吸收多重生物学活性, 提示它可能成为牙周炎宿主调节治疗的有效药物^[2]。本课题拟采用的干预物葛根素, 以 SD 大鼠为研究对象, 利用结扎诱导大鼠牙周炎建立病理模型, 探究葛根对牙周炎牙槽骨吸收的作用和机理, 为葛根素应用于牙周病的防治提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象

雄性清洁级 SD 大鼠 50 只, 6~8 周龄, 体重为 210 ± 10 g, 所有大鼠饲养于长沙医学院实验中心动物房。饲养条件: 温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度(35 ± 5)%, 光照 12h/d, 噪音控制在 60dB 以下, 每笼 5 只, 自由饮水和摄食, 常规饲料饲养 1 周后进行实验。

1.1.2 实验试剂及仪器

葛根素、5%葡萄糖溶液、正畸结扎丝、1%戊巴比妥钠、多聚甲醛、75%乙醇溶液、伊红染液、电子天平、石蜡切片机、光学显微镜。

1.2 方法

1.2.1 牙周炎模型的建立

将体重接近, 生长状况良好的 50 只 SPF 级 SD 大鼠随机选取 10 只作为正常对照组, 其余 40 只建立牙周炎模型。采用结扎丝法建立 SD 大鼠牙周炎模型: 各组大鼠均采用 1%戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉, 仰卧位将大鼠四肢固定在实验台上, 用丝线将大鼠的上颌前磨牙牵拉紧, 固定在实验台上。正常对照组不做干预待其正常苏醒, 其余四组用 0.2mm 的正畸结扎丝在双侧上颌第一磨牙颈部结扎。

1.2.2 实验分组及给药

将 40 只雄性清洁级 SD 牙周炎模型大鼠分成 4 组, 每组 10 只即牙周炎模型组(灌胃相应剂量的 0.9% 的生理盐水)、低剂量葛根素组(100mg/kg)、中剂量葛根素组(200mg/kg)、高剂量葛根素组(400mg/kg), 建模成功后, 对每组 SD 大鼠饲喂同等同质常规饲料, 进行不同浓度给药, 正常对照组不做其他干预; 每日灌胃等量溶液, 连续 6 周。

1.3 检测指标

1.3.1 牙槽骨吸收量的测量

参照文献[3]的方法将双侧上颌骨的牙龈及骨膜剔除干净, 测量牙槽骨吸收量。

1.3.2 活性破骨细胞计数

参照文献[4]的方法计数上颌第一磨牙根分叉区牙槽骨表面的活性破骨细胞数量。

1.3.3 骨密度测量

取大鼠上颌骨、牙槽骨、牙和牙周组织在内的完整组织块, 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h, 修整标本, 仅保留磨牙区段颌骨和牙周组织, 颊舌向摄 X 射线片, 采集标本数码照片, 利用图像处理程序进行骨密度分析。

1.3.4 牙周组织病理学观察

取上颌骨标本, 修整组织后常规脱钙、梯度脱水、石蜡包埋, 沿牙齿的近远中方向切片, 获取 5 μ m 层厚的平行于牙齿长轴方向的牙体牙周联合切片, 再行后续苏木素-伊红 (HE) 染色、免疫组织化学染色并进行光镜组织学观察, 记录组织学变化并分析。

1.4 统计分析

采用 SPSS23.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较先进行方差齐性检验, 方差齐者采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 各组牙槽骨吸收和活性破骨细胞数情况

连续 6 周后, 与牙周炎模型组相比, 低、中、高剂量葛根素组牙槽骨吸收量明显降低, 差异比较有显著性意义 ($P < 0.05$); 与正常对照组相比, 低、中、高剂量葛根素组牙槽骨吸收量升高, 差异比较也有显著性意义 ($P < 0.05$); 正常对照上颌磨牙根分叉区牙槽骨表面偶见活性破骨细胞; 低、中、高剂量葛根素组均可见活性破骨细胞, 明显高于正常对照组, 其中低、中、高剂量葛根素组活性破骨细胞数目明显少于牙周炎模型组, 差异比较有显著性意义 ($P < 0.05$)。具体见表 1。

表 1 各组牙槽骨吸收和活性破骨细胞数情况比较 ($\bar{x} \pm s$, 只)

分组	例数	浓度 (mg/kg)	牙槽骨吸收量 /um	活性破骨细胞
正常对照组	10	-	120.45 $\pm$ 6.34	0.59 $\pm$ 0.61
牙周炎模型组	10	-	183.51 $\pm$ 15.78	4.13 $\pm$ 1.27
低剂量葛根素组	10	100	162.05 $\pm$ 10.45	3.08 $\pm$ 1.02
中剂量葛根素组	10	200	136.33 $\pm$ 7.82	2.24 $\pm$ 0.81
高剂量葛根素组	10	400	122.68 $\pm$ 7.08	1.94 $\pm$ 0.62

2.2 各组上颌骨骨密度和牙槽骨降低值情况

连续 6 周后, 与牙周炎模型组相比, 低、中、高剂量葛根素组上颌骨骨密度显著升高 ($P < 0.05$), 牙槽骨高度降低值显著减少 ($P < 0.05$)。具体见表 2。

表 2 各组上颌骨骨密度和牙槽骨降低值情况比较 ($\bar{x} \pm s$, 只)

分组	例数	骨密度 (A)	牙槽骨降低值 (mm)
正常对照组	10	105.12 $\pm$ 2.38	0.501 $\pm$ 0.024
牙周炎模型组	10	88.54 $\pm$ 2.76	0.836 $\pm$ 0.032
低剂量葛根素组	10	90.25 $\pm$ 2.91	0.651 $\pm$ 0.030
中剂量葛根素组	10	107.12 $\pm$ 3.46	0.531 $\pm$ 0.041
高剂量葛根素组	10	112.85 $\pm$ 3.85	0.412 $\pm$ 0.022

2.3 各组牙周组织病理学观察

牙周组织中有大量炎细胞浸润, 在高倍光镜下观察可见到多个核的破骨细胞形成。由左至右依次为低、中、高剂量葛根素组、牙周炎模型组及正常对照组。具体见图 1。

3 讨论

牙周炎是由口腔中的不良环境引起的, 其患病率高达 70%^[5], 主要表现为牙龈的炎症、牙周袋的形成、牙槽骨的吸收和牙齿的松动移位, 慢性牙周炎性牙槽骨吸收也是导致牙丧失的主要原因。本

实验与正常对照组相比, 牙周炎模型组和葛根素组大鼠牙龈红肿、牙周袋形成, 牙槽骨的高度有明显降低并且有大量炎性细胞浸润, 提示牙周炎大鼠病理模型构建成功。葛根素是植物葛根中的主要活性成分, 可扩张血管、降血压、降血糖、抗肿瘤、提高机体免疫力、抗氧化、抗炎及调控骨代谢等^[1]。早期有研究发现, 经过葛根素治疗以后, 牙槽嵴顶出现成骨细胞。张黎^[7]等基于 IL-23 / Th17 炎症轴探讨葛根素对大鼠牙周炎的影响表明, 葛根素可能通过 IL-23 / Th17 炎症轴上调 OPG 表达控制牙槽骨吸收。本研究与牙周炎模型组相比, 低、中、高剂量葛根素组的牙槽骨吸收量明显降低, 表明葛根素对牙周炎导致的牙槽骨有一定相关性。且与牙周炎模型组相比, 低、中、高剂量葛根素组上颌骨骨密度显著升高并且牙周组织中有大量炎细胞浸润, 在高倍光镜下观察可见到多个核的破骨细胞形成。低、中、高剂量葛根素组活性破骨细胞数目明显少于牙周炎模型组。

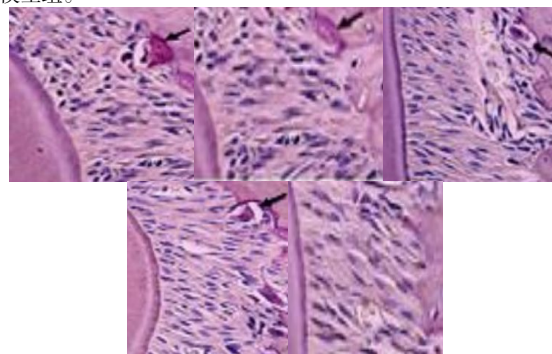


图 1 牙周组织病理学观察 (40 $\times$)

综上所述, 葛根素对牙周炎导致的牙槽骨吸收有一定的相关性。葛根素可在某种程度上抑制实验性牙周炎牙槽骨的吸收, 其具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴梦鑫, 梁文红, 杨琨等. 牙周膜干细胞促进牙周组织再生的影响因素[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30): 4912-4920.
- [2] 王子禹, 刘洋, 张鑫等. 基于抗炎活性的葛根茎切片整体的中药生物药剂学分类系统研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3662-3671.
- [3] Paola R D, Marzocco S, Mazzon E, et al. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats[J]. J Dent Res, 2004, 83(4): 343-349.
- [4] 王国芳, 吴织芬, 万玲等. 三种中药提取物抑制牙周炎牙槽骨吸收的实验研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2005, 21(6): 325-327.
- [5] 唐彩金, 曾启新, 方梅飞等. 消退素 D1 治疗实验性大鼠牙周炎的研究[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(12): 1270-1273.
- [6] 邢志华, 马誉畅, 李新萍等. 葛根素及其衍生物抗炎、抗痛风作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3703-3708.
- [7] 张黎, 刘育崧, 吴芸菲等. 基于 IL-23/Th17 炎症轴探讨葛根素对大鼠牙周炎牙槽骨吸收及 OPG/RANKL/RANK 通路的影响[J]. 口腔医学研究, 2020, 36(09): 844-849.

第一作者: 肖彬倩, 2002 年, 女, 湖南常德, 本科在读, 口腔医学专业

通讯作者: 王利, 1985 年, 男, 湖南株洲, 教授, 研究方向: 药理学

项目基金: 长沙医学院大学生创新创业训练计划项目: 长医教 [2022]41 号-148