

· 基础研究 ·

实验性牙周炎对小鼠骨髓活性氧生成影响的实验研究

胡芳¹, 周淑², 龚爱秀^{2*}

¹南京医科大学附属口腔医院第二门诊部, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属儿童医院口腔科, 江苏 南京 210008

[摘要] 目的: 研究实验性牙周炎对小鼠骨髓活性氧(reactive oxygen species ROS)生成的影响, 初步探讨ROS在牙周炎中的作用。方法: 选用8周龄C57BL/6雌性小鼠20只, 采用丝线结扎法建立实验性牙周炎动物模型, 在术后4周取材, 对小鼠上颌骨进行micro-CT扫描、HE染色及TRAP染色; 取小鼠四肢骨髓, 通过流式细胞仪检测骨髓中ROS含量水平。结果: 实验组术后4周, 上颌第二磨牙从釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离增大, 近远中及根分叉处牙槽骨吸收明显, 成骨细胞减少; 单位长度破骨细胞数显著增多($P < 0.001$); 小鼠骨髓中ROS平均荧光强度显著高于对照组($P < 0.001$)。结论: ROS含量在实验性牙周炎小鼠骨髓中增加, 可能影响成骨和破骨细胞的分化, 参与牙周炎骨吸收。

[关键词] 实验性牙周炎; 牙槽骨吸收; 活性氧

[中图分类号] R781.42

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1147-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20190810

Effects of experimental periodontitis on the expression of reactive oxygen species in marrow of mice

Hu Fang¹, Zhou Shu², Gong Aixiu^{2*}

¹The Secomd Outpatient Department, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Stomatology, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of experimental periodontitis on the expression of reactive oxygen species (ROS) in marrow of mice. **Methods:** A total of 20 eight-week-old C57BL/6 mice were used in the study, and experimental periodontitis was induced in mice by thread ligature. After 4 weeks of experiment, the maxilla were undergone micro-CT scanning, HE staining, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Flow cytometry was employed to study the expression of ROS in marrow. **Results:** After four weeks of experimental periodontitis, alveolar bone resorption and TRAP positive osteoclast number were all increased. There were significantly increases of the ROS level in marrow compared with controls. **Conclusion:** Experimental periodontitis can increase the expression of ROS in mice marrow, which may play regulatory roles in alveolar bone loss.

[Key words] experimental periodontitis; alveolar bone loss; reactive oxygen species

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1147-1150, 1244]

牙周炎是一种常见的口腔疾病, 以牙周袋形成、牙槽骨吸收为特点, 最终导致牙齿脱落^[1]。有研究表明活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)参与牙周炎的发生与发展, 自由基产生和清除失衡介导了牙周组织损伤^[2-6]。为探讨牙周炎对骨髓ROS生

成的影响, 我们建立了小鼠实验性牙周炎动物模型, 通过micro-CT、组织学检测以及流式细胞仪检测小鼠骨髓ROS含量的变化情况, 初步探讨ROS在牙周炎中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

雌性C57BL/6J小鼠(南京大学动物模式中心),

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(YKK15133); 江苏省妇幼健康科研项目(F201557)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: gongax2013@163.com

饲养条件:屏障环境,温度为22~26℃,湿度为45%~75%。micro-CT(SkyScan 1072 scanner),5-0 无菌非吸收丝线(强生医疗器材上海有限公司),TRAP 染色试剂盒、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)(Sigma 公司,美国),流式细胞检测仪(FACSCalibur型,Becton-Dickinson 公司,美国),图像采集系统(DP70 型,Olympus 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验性牙周炎模型建立

参照文献[7],10%水合氯醛按0.1 mL/g体重的剂量腹腔注射麻醉小鼠后,使用5-0 无菌非吸收丝线从腭侧近远中邻面的龈沟进入,并在颊侧打结,结扎于上颌双侧第二磨牙牙颈部,建立牙周炎模型。20只8周龄C57BL/6小鼠随机分为两组:假手术组为对照组,实验性牙周炎组为实验组,每组小鼠各10只。假手术组小鼠全麻后实施上颌第二磨牙丝线结扎手术,然后拆除丝线,实验组小鼠行建立牙周炎手术,观察4周。本研究经过南京医科大学动物实验伦理委员会批准。

1.2.2 标本制备和指标检测

实验性牙周炎模型建立4周后取材,小鼠全麻后,取其四肢骨髓,以检测ROS含量;取上颌第二磨牙及其牙周组织,其中一侧上颌骨用4%多聚甲醛固定,进行Micro-CT扫描,用于测定牙槽骨吸收,进而行组织学检测。

1.2.3 micro-CT扫描

将各小鼠上颌骨标本置于载物杯中,进行micro-CT扫描,参数设定为:电压100 kV,电流98 mA,每9 μm为一个层面,扫描后分别利用NRecon、Data-viewer、CTan、ANT软件进行三维重建,其中二维矢状面选择包括上颌第一磨牙、第二磨牙近远中根根尖孔及它们的根分叉的区域,测定上颌第二磨牙近中、远中釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离,即为牙槽骨吸收高度^[8]。

1.2.4 组织学改变观察

小鼠上颌骨行micro-CT检测后,经10%的EDTA脱钙,石蜡包埋。每个标本做5 μm厚的近远中向连续切片。选取包括上颌第一磨牙远中根、第二磨牙近远中根及它们的根分叉的切片。37℃烤片过夜后4℃保存。HE染色后,光镜下观察结合上皮、沟内上皮、牙龈上皮、上皮炎症细胞浸润。按试剂盒说明进行TRAP染色,切片二甲苯脱蜡水化,梯度酒精水化,用酒石酸盐缓冲液孵育标本20 min,

用TRAP染色液孵育15 min,甲基绿复染5 min,水溶性封片剂封片。采集图像后用Image-pro plus软件进行图像定量分析,测量指标包括:即单位长度骨小梁的破骨细胞数目。

1.2.5 ROS的测定

取小鼠四肢骨髓,收集在已加5 mL 2% FBS-DSB的6 cm培养皿中磨碎。将细胞悬液反复冲过筛网,滤去颗粒杂质,再转入15 mL离心管,1 200 r/min离心10 min,弃上清。根据细胞量加适量2% FBS-DSB重悬细胞,制备成单细胞悬液,并调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL。取1 mL单细胞悬液,加1 μL浓度1 μg/mL的二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)工作液,混匀,37℃避光孵育30 min,再用2% FBS-DSB洗1遍。DCFH-DA可以顺利穿过细胞膜,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解,生成DCFH,而DCFH不能通透细胞膜,从而使探针被留在细胞内,细胞内各种形式的ROS可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF,因此,采用流式细胞术检测DCF的荧光强度能够反映细胞内ROS的水平,所用激发波长和发射波长均是488 nm。

1.3 统计学方法

用SPSS15.0件进行统计分析,对照组及实验性牙周炎组数据采用独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 micro-CT扫描重建结果

牙周结扎4周后,实验组出现明显牙槽骨吸收(图1),实验组牙槽骨高度丧失高于对照组。

2.2 HE染色结果

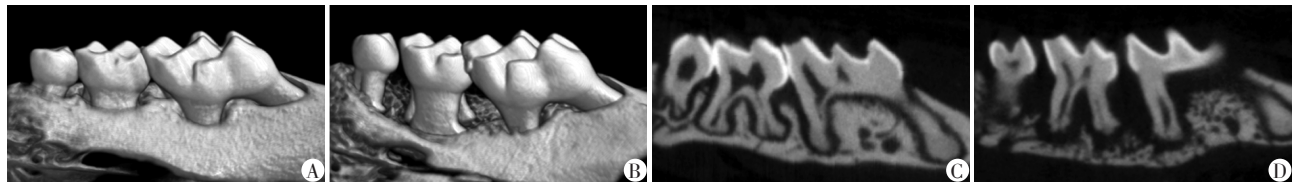
对照组牙龈上皮完整,上皮下可见极少量的中性粒细胞浸润,牙周膜纤维束排列整齐。实验性牙周炎术后4周,上颌第二磨牙牙龈上皮及结缔组织可见大量炎性细胞浸润,结合上皮根方增生明显,附着丧失,牙周膜纤维束排列紊乱,近远中及根分叉处牙槽骨吸收明显,成骨细胞减少(图2)。

2.3 TRAP染色结果

实验性牙周炎小鼠牙槽骨区域可见大量破骨细胞(图3),术后4周与对照组比较,实验组单位长度破骨细胞数均显著增多($P < 0.001$)。

2.4 实验性牙周炎对骨髓ROS含量的影响

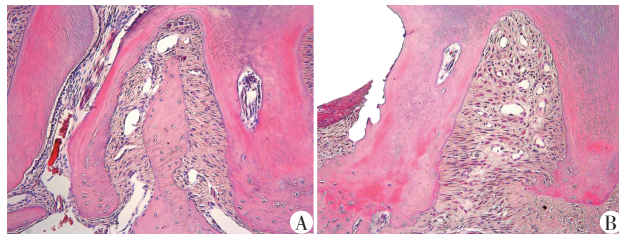
小鼠骨髓ROS含量水平对照组较低,而实验组含量升高。实验性牙周炎术后4周与对照组比较,实验组ROS平均荧光强度显著高于对照组($P < 0.001$,图4)。



A: 对照组3D图; B: 实验组3D图; C: 对照组2D图; D: 实验组2D图

图1 Micro-CT扫描检查实验性牙周炎对小鼠牙槽骨吸收的影响

Figure 1 Effect of experimental periodontitis on alveolar bone resorption detected by Micro-CT scanning



A: 对照组; B: 实验组。

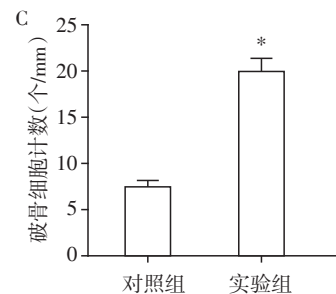
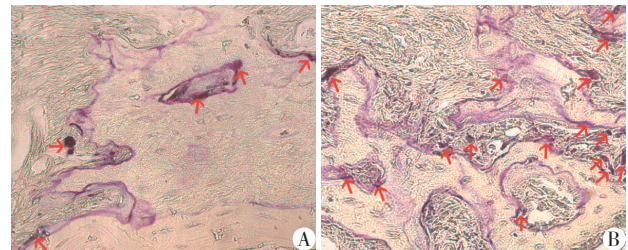
图2 两组小鼠牙周组织学观察(HE, ×200)

Figure 2 The histological examination of periodontal tissue of the two groups (HE, ×200)

3 讨论

ROS 为生物体线粒体有氧代谢产生的一类活性含氧化合物的总称,包含超氧阴离子、自由基(超氧化物、羟自由基)和过氧化物等。细胞内的ROS含量超过其抗氧化能力时可引起氧化应激,ROS水平升高通过调节DNA损伤介导引起机体衰老^[9-10],是细胞衰老的重要诱因之一。

以往研究显示,牙周炎与龈沟液、唾液和血液中抗氧化水平过低以及脂质过氧化增高有关^[10-13]。血液活性氧代谢产物含量与牙周附着水平正相关,并且在牙周炎患者中显著高于健康者,牙周治疗既可以减轻局部炎症程度,也可以降低血液活性氧水平^[12,14-16]。在牙周炎情况下,牙周致病菌激发过度宿主炎症反应,促使牙周组织内产生的ROS过多,抗氧化防御系统不能将其及时清除,进而使ROS



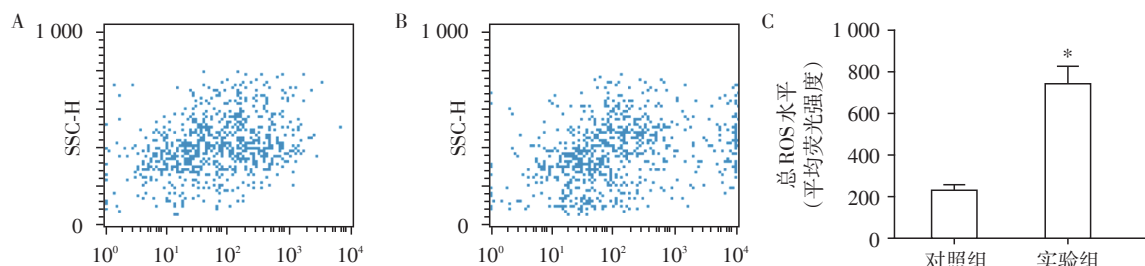
A: 对照组; B: 实验组; C: 单位长度破骨细胞数,与对照组比较, * $P < 0.001$ 。

图3 实验性牙周炎对牙槽骨破骨细胞形成的影响 (TRAP, ×400)

Figure 3 Effect of experimental periodontitis on osteoclast formation in alveolar bone (TRAP, ×400)

在牙周组织内蓄积,可造成牙周组织细胞损伤和破坏^[4],全身氧化应激状态与牙周组织病变密切相关^[6,16]。

成骨细胞主要来源于骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC),是骨形成的重要细胞学基础,牙周炎发生发展过程中的炎性因子可以抑制BMSC分化和增殖能力,在成骨分化过



A: 对照组; B: 实验组; C: 总ROS含量变化,与对照组比较, * $P < 0.001$ 。

图4 实验性牙周炎对小鼠骨髓ROS含量的影响

Figure 4 Effect of experimental periodontitis on the level of ROS in marrow of mice

程中发挥调控作用^[17]。骨髓具有较高氧化性的微环境,ROS对骨髓中的各组成成分的功能有重要的调控作用^[18]。因此,本文推测牙周炎可能通过改变骨髓中的氧化应激水平,从而影响骨细胞的形成。

为探讨牙周炎对骨髓ROS生成的影响,通过物理机械刺激建立了小鼠实验性牙周炎动物模型,通过micro-CT、组织学染色以及流式细胞仪检测小鼠骨髓ROS含量的变化情况,初步探讨ROS在牙周炎中的作用。结果显示,建模4周后实验组较对照组牙槽骨有明显吸收,出现附着丧失,牙周组织有大量炎性细胞浸润,成骨细胞减少,而破骨细胞增加,骨髓组织中ROS含量显著增高。

牙槽骨高度丧失是牙周炎的临床表现之一,主要由于牙槽骨吸收增加和牙槽骨形成减少引起。ROS是调控破骨细胞骨吸收作用的重要因子,有学者发现在破骨细胞与骨的接触面间存在超氧化物,抑制破骨细胞超氧化物的产生或利用可减少骨吸收^[19]。ROS可通过激活MAPK信号途径,促进破骨细胞的生成,加重牙周病变^[20],而给予抗氧化剂后,可减轻牙槽骨吸收^[21]、降低血液中ROS水平及牙周病变程度^[20]。研究表明,当在骨髓培养时加入过氧化氢,能显著增加破骨样细胞数量,并呈剂量依赖的关系,并且,抗氧化剂能阻断破骨细胞形成作用^[22]。低剂量过氧化氢可抑制颅骨成骨细胞和兔骨髓基质细胞分化标志物的表达,而高剂量的过氧化氢可诱导成骨细胞凋亡^[23]。ROS可能通过影响成骨细胞和破骨细胞的形成和分化^[22-24],参与了牙槽骨的破坏和吸收,进而影响骨重塑和骨形成。

抗氧化剂具有干扰自由基生成,清除已生成的自由基,调节细胞代谢活性的作用,通过清除体内ROS而降低机体氧化应激水平,可能成为牙周炎辅助治疗的重要方法之一^[5,25]。

[参考文献]

[1] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases[J]. Lancet, 2005, 366(9499): 1809-1820

[2] Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction [J]. Periodontol 2000, 2007, 43(1): 160-232

[3] Dahiya P, Kamal R, Gupta R, et al. Reactive oxygen species in periodontitis [J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17(4): 411-416

[4] 张海元, 刘鲁川. 氧自由基与牙周炎关系研究进展[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(1): 46-49

[5] Muniz FW, Nogueira SB, Mendes FL, et al. The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy

on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review [J]. Arch Oral Biol, 2015, 60(9): 1203-1214

[6] Nibali L, Donos N. Periodontitis and redox status: a review [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(15): 2687-2697

[7] Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice [J]. J Immunol Methods, 2013, 394(1-2): 49-54

[8] Liu YF, Wu LA, Wang J, et al. Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats [J]. J Periodontol Res, 2010, 45(6): 714-719

[9] 黄元清, 苗登顺, 陈宁. 吡咯喹啉醌对Bmi-1基因缺失引起小鼠皮肤早衰的保护作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(6): 691-696

[10] 张翠利, 付丽娜, 杨小云, 等. 活性氧自由基与细胞衰老关系的研究进展[J]. 广州化工, 2015, 43(19): 5-7

[11] Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis [J]. J Clin Periodontol, 2007, 34(7): 558-565

[12] Wei D, Zhang XL, Wang YZ, et al. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy [J]. Aust Dent J, 2010, 55(1): 70-78

[13] Khalili J, Biloklytska HF. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals [J]. Oral Dis, 2008, 14(8): 754-760

[14] Tamaki N, Tomofuji T, Maruyama T, et al. Relationship between periodontal condition and plasma reactive oxygen metabolites in patients in the maintenance phase of periodontal treatment [J]. J Periodontol, 2008, 79(11): 2136-2142

[15] Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D, et al. Short-term effects of non-surgical periodontal treatment on plasma level of reactive oxygen metabolites in patients with chronic periodontitis [J]. J Periodontol, 2009, 80(6): 901-906

[16] D' Aiuto F, Nibali L, Parkar M, et al. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis [J]. J Dent Res, 2010, 89(11): 1241-1246

[17] 李晓光, 王一珠, 郭斌. 慢性牙周炎中肿瘤坏死因子 α 对骨髓间充质干细胞成骨分化的调控作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2017, 35(3): 334-338

[18] 徐洁, 刘俊许, 康雪玲, 等. 活性氧在多能干细胞中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(1): 188-192

[19] Vaaraniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, et al. Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts [J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(9): 1432-1440

(下转第1244页)

- Epileptic Disord, 2014, 16(3):354-357
- [22] Zhiliang Y, Guilian S, Fang Y, et al. A novel compound mutation in GLRA1 cause hyperekplexia in a Chinese boy - a case report and review of the literature[J]. BMC Medical Genetics, 2017, 18(110). doi: 10.1186/s12881-017-0476-6
- [23] Huang Z, Lian Y, Xu H, et al. Weird laughing in hyperekplexia: A new phenotype associated with a novel mutation in the GLRA1 gene?[J]. Seizure, 2018, 58(1):6-8
- [24] Zhang Y, Bode A, Nguyen B, et al. Investigating the mechanism by which gain-of-function mutations to the $\alpha 1$ glycine receptor cause hyperekplexia [J]. J Biol Chem, 2016, 291(29):15332-15341
- [25] Chung SK, Vanbellinthen JF, Mullins JG, et al. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia[J]. J Neurosci, 2010, 30(28):9612-9620
- [26] Bode A, Lynch JW. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function [J]. Mol Brain, 2014, 7(1):2
- [27] 李慧, 杨志仙, 薛姣, 等. 过度惊吓反应症1例的临床及分子遗传学分析并文献复习[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(2):120-124
- [28] Lynch JW, Zhang Y, Talwar S, et al. Glycine receptor drug discovery[J]. Adv Pharmacol, 2017, 79:225-253
- [29] Ronne MS, Nielsen PB, Mogensen CB. Stiff baby syndrome is a rare cause of neonatal hypertonicity [J]. Ugeskr Laeger, 2014, 178(9A):893
- [30] McAbee GN. Clobazam-clonazepam combination effective for stimulus-induced falling in hyperekplexia [J]. J Child Neurol, 2015, 30(1):91-92
- [31] Aliyu I, Ibrahim Z. An unusual startling [J]. Indian J Psychol Med, 2015, 37(4):460-461
- [32] Vigeveno F, Di Capua M, Dalla Bernardina B. Startle disease: an avoidable cause of sudden infant death [J]. Lancet, 1989, 8631(1):216
- [33] Mine J, Taketani T, Yoshida K, et al. Clinical and genetic investigation of 17 Japanese patients with hyperekplexia [J]. Dev Med Child Neurol, 2015, 57(4):372-377
- [34] Lee CG, Kwon MJ, Yu HJ, et al. Clinical features and genetic analysis of children with hyperekplexia in Korea [J]. J Child Neurol, 2014, 28(1):90-94
- [35] Ganser LR, Yan Q, James VM, et al. Distinct phenotypes in zebrafish models of human startle disease [J]. Neurobiol Dis, 2013, 60:139-151
- [收稿日期] 2018-09-03

(上接第1150页)

- [20] Kasuyama K, Tomofuji T, Ekuni D, et al. Hydrogen-rich water attenuates experimental periodontitis in a rat model [J]. J Clin Periodontol, 2011, 38(12):1085-1090
- [21] Saita M, Kaneko J, Sato T, et al. Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption [J]. Biomaterials, 2016, 76:292-301
- [22] Ha H, Kwak HB, Lee SW, et al. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts [J]. Exp Cell Res, 2004, 301(2):119-127
- [23] Mody N, Parhami F, Sarafian TA, et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells [J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(4):509-519
- [24] Nakanishi A, Hie M, Iitsuka N, et al. A crucial role for reactive oxygen species in macrophage colony-stimulating factor-induced RANK expression in osteoclastic differentiation [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(4):874-880
- [25] 张馨艺, 李萌, 隋秉东, 等. 氧化应激及抗氧化防御系统在慢性牙周炎中的作用 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(1):52-56
- [收稿日期] 2018-12-23