

· 口腔医学研究 ·

## 牙周炎对肥胖小鼠炎症因子、肾纤维化的影响

赵璐, 张彦, 顾敏\*

常州市第一人民医院口腔科, 江苏 常州 213000

**[摘要]** 目的:初步探索牙周炎对肥胖小鼠炎症因子、肾损伤的影响。方法:采用高、低脂饲料诱导小鼠肥胖合并牙周炎模型,分为高脂牙周炎组(High+Pre)、高脂非牙周炎组(High+NCPre)、低脂牙周炎组(Low+Pre)、低脂非牙周炎组(Low+NCPre);观察小鼠血清总蛋白、白蛋白、肌酐含量的变化;采用免疫印迹试验(Western blot)检测TGF- $\beta$ 1/Samd6信号通路相关蛋白、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)的蛋白水平;应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平的变化。结果:高脂饲喂小鼠的体重第20周已达显著肥胖;与Low+NCPre组相比,High+NCPre组和High+Pre组小鼠血清中总蛋白、白蛋白显著降低( $P < 0.05$ ),肾组织MMP-2、MMP-9蛋白含量显著下调( $P < 0.05$ ),血清肌酐、TNF- $\alpha$ 、IL-6显著升高( $P < 0.05$ ),肾组织中TIMP-1蛋白水平显著增加( $P < 0.05$ ),促进肾组织TGF- $\beta$ 1蛋白表达( $P < 0.05$ ),抑制肾组织Samd6、E-cadherin蛋白分泌( $P < 0.05$ );与High+NCPre组相比,High+Pre小鼠血清中总蛋白、白蛋白显著降低( $P < 0.05$ ),抑制炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP-2、MMP-9蛋白表达水平( $P < 0.05$ ),血清肌酐、肾组织TIMP-1显著增加( $P < 0.05$ ),肾组织TGF- $\beta$ 1蛋白显著上调( $P < 0.05$ ),肾组织Samd6、E-cadherin蛋白显著下调( $P < 0.05$ )。结论:牙周炎加重肥胖小鼠肾损伤,其可能通过影响TGF- $\beta$ 1/Samd6信号通路促进肾纤维化,抑制细胞外基质降解,促进上皮间质转化。

**[关键词]** 牙周炎;肥胖小鼠;EMT;TGF- $\beta$ 1/Samd6

**[中图分类号]** R781.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)09-1383-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190926

## Effects of periodontitis on inflammatory factors and renal fibrosis in obese mice

Zhao Lu, Zhang Yan, Gu Min\*

Department of Stomatology, First People's Hospital of Changzhou City, Changzhou 213000, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to investigate the effect of inflammatory factors on renal injury in periodontitis model of mice. **Methods:** High or low fat diet-induced periodontitis models of mice were established. Mice were divided into high fat diet without periodontitis group (High+NCPre), high fat diet with periodontitis group (High+Pre), low fat diet with periodontitis group (Low+Pre), low fat diet without periodontitis group (low+NCPre). The changes of serum total protein, albumin and creatinine in mice were observed. The protein levels of TGF- $\beta$ 1/Samd6 signaling pathway related proteins, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 were detected by Western blot. Changes of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Mice fed with high fat diet were significant obesity at the 20th week. Compared with those in Low+NCPre group, the levels of total protein and albumin in serum were significantly decreased in High+NCPre group and High+Pre group ( $P < 0.05$ ); MMP-2 and MMP-9 protein expression in kidney were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); serum creatinine, TNF- $\alpha$  and IL-6 were increased ( $P < 0.05$ ); The TIMP-1 protein expression in kidney was significantly increased in High+NCPre group and High+Pre group ( $P < 0.05$ ). The expression of TGF- $\beta$ 1 protein ( $P < 0.05$ ) was increased, levels of Samd6 and E-cadherin protein were inhibited in kidney of High+NCPre group and High+Pre group ( $P < 0.05$ ). Compared with those in High+NCPre group, total protein and albumin in High+Pre group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); inflammatory factor levels of TNF- $\alpha$  and IL-6, MMP-2 and MMP-9 protein expression decreased; serum creatinine, TGF- $\beta$ 1 and TIMP-1 proteins in kidney increased ( $P < 0.05$ ); expression of Samd6 and E-cadherin proteins in kidney decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Periodontitis aggravates the renal injury of obese mice,

**[基金项目]** 常州市卫生和计划生育委员会项目资金资助(WZ201704);常州市卫计委青年人才科技项目(QN201708)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: gumin106@163.com

which may promote renal fibrosis, inhibit the degradation of extracellular matrix, and promote the process of epithelial-mesenchymal transition by regulating TGF- $\beta$ 1/Samd6 signaling pathway.

[Key words] periodontitis; obese mice; EMT; TGF- $\beta$ 1/Samd6

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1383-1388]

牙周炎是一种常见的口腔疾病,导致患者牙龈红肿,组织完整性受到破坏,是促进牙齿松动、脱落的主要原因之一,甚至会破坏患者发音、面部形象等<sup>[1-3]</sup>。牙周炎病灶内含有大量细菌、炎性因子,这些炎症物质可促进血管通透性增强,影响远端器官的病变<sup>[4-5]</sup>。近年来,肥胖人群日益扩大,肥胖及其诱发的疾病成为危害人类健康的重要问题。研究显示,肥胖是糖尿病等多种慢性疾病的重要诱导因素。研究发现,牙周炎可诱导机体产生慢性炎症,而慢性炎症是机体糖尿病、肥胖等多种免疫代谢异常疾病的病理基础,因此肥胖与牙周炎的发生发展密切相关<sup>[6]</sup>,但具体作用机制尚未完全阐释清楚。本研究通过构建肥胖合并牙周炎的小鼠模型,应用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测炎性因子水平的变化,免疫印迹试验(Western blot)检测基质金属蛋白酶以及纤维化相关蛋白水平,初步探索肥胖与牙周炎小鼠炎性因子、肾纤维化间的可能作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

10%的低脂饲料、60%高脂饲料(Research Diets公司,美国),血清总蛋白、白蛋白、血清肌酐检测试剂盒(南京建成生物公司),转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)抗体、Samd6抗体、钙黏蛋白E(E-cadherin)抗体(Abcam公司,美国),基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2抗体、MMP-9抗体、金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)抗体(武汉博士德生物工程有限公司),白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA检测试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )ELISA检测试剂盒(TSZ公司,美国),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、二抗HRP标记的IgG(上海威奥生物公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠模型的制备及取样

SPF级C57/6J雄性小鼠购自广东医学实验动物

中心,经过常规免疫3 d,检验合格后称重,根据体重随机分为2组,分别使用高脂含量(60 kcal%)以及低脂含量(10 kcal%)的饲料饲喂小鼠,饲喂20周后<sup>[7]</sup>,将高脂、低脂饲喂小鼠分别随机分为高脂牙周炎组(High+Pre)、高脂非牙周炎组(High+NCPre)、低脂牙周炎组(Low+Pre)、低脂非牙周炎组(Low+NCPre)。牙周炎组小鼠采用丝线结扎5 d的方法诱导产生<sup>[8]</sup>。每组小鼠10只。假性结扎组作为对照。在牙周炎小鼠的制备过程中,5-0无菌丝线首先浸泡于有菌肉汤(牙龈卟啉单胞菌)中培养24 h,然后系于上颌第二磨牙区域,使细菌聚集在结扎区域,促进牙周炎形成,假性结扎组使用无菌丝线进行处理。

实验结束前12 h,禁食,自由饮水,称取小鼠体重,10%水合氯醛经腹腔注射麻醉小鼠,仰卧固定于鼠板夹中,摘取小鼠眼球,取血,分离血清,用于后续实验。剖开腹部,暴露小鼠胸腹腔,剪开胸腹腔,取双肾,置于液氮中。动物实验均遵循“3R”原则。

#### 1.2.2 模型小鼠血清蛋白和肌酐的检测

根据检测试剂盒说明书检测各组小鼠血清中白蛋白、总蛋白、肌酐的含量变化。白蛋白的检测:置于酶标仪中检测各管628 nm的吸光度值。白蛋白含量(g/L)=(测定吸光度值-空白吸光度值)/(标准吸光度值-空白吸光度值) $\times$ 白蛋白标准品浓度(34.8 g/L)。总蛋白的检测:酶标仪中检测各管595 nm的吸光度值。总蛋白含量(g/L)=(测定吸光度值-空白吸光度值)/(标准吸光度值-空白吸光度值) $\times$ 蛋白标准品浓度(0.563 g/L)。肌酐的检测:置于酶标仪中检测各管510 nm的吸光度值。血清肌酐( $\mu$ mol/L)=(测定吸光度值-空白吸光度值)/(标准吸光度值-空白吸光度值) $\times$ 标准品浓度(50  $\mu$ mol/L) $\times$ 11。

#### 1.2.3 模型小鼠纤维化相关蛋白以及基质金属蛋白酶的检测

Western blot检测蛋白的表达水平。选取各组小鼠的等量肾组织,加入RIPA组织裂解液,冰浴中裂解15 min,离心,将上清转移至EP管中,使用96孔板进行蛋白浓度的测定。常规配置分离胶和浓缩胶,灌注分离胶成型后加入浓缩胶,插入梳子,静置至凝胶固定。将适量蛋白样品与上样缓冲液混

匀,沸水加热 10 min;吸取等量蛋白样品加入上样孔中,进行蛋白电泳,剪取与凝胶大小相同的 PVDF 膜,转膜,置于脱脂奶粉溶液中进行封闭;根据 TGF- $\beta$ 1、Samd6、E-cadherin、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 抗体说明书稀释抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,经洗脱后,加入二抗,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, TBST 溶液进行洗脱,避光,加入化学发光剂,凝胶成像仪中拍照,Quantity One 分析灰度值,结果以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值表示,每个样品蛋白重复测量 6 次。

#### 1.2.4 模型小鼠中炎症因子的检测

根据检测试剂盒说明书,检测各组小鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  的水平变化。将标准品及各组小鼠血清 100  $\mu\text{L}$  加入酶标板的样品孔中。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 120 min,弃去溶液,加入洗涤液清洗 5 次,每次 1 min。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  一抗,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min,清洗 5 次,每次 1 min;各孔加入 100  $\mu\text{L}$  酶标二抗工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,清洗 5 次,每次 1 min;各孔加入 100  $\mu\text{L}$  底物工作液,避光 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min,加入 100  $\mu\text{L}$  终止液。30 min 内置于酶标仪检测 450 nm 处吸光值,绘制标准曲线,计算 IL-6、TNF- $\alpha$  浓度。

#### 1.2.5 qPCR 实验

肾组织剪碎,加入 TRIzol 试剂冰上裂解 5 min,提取组织中总 RNA。目的基因的扩增引物由 primer 5.0 软件设计并由上海生工生物合成。MMP-2 引物上游序列为 5'-TCTAACGGTCGGGAAACA-3',下游序列为 5'-CCAACAGTGGACATAGCG-3';MMP-9 引物上游序列为 5'-GAGATGCGTGAGAGTTCGA-3',下游序列为 5'-CGAGTTGGAACCACGACGC-3';TIMP-1 引物上游序列为 5'-CATACTACCTTGTAC-CAGCG-3',下游序列为 5'-TAGAGAGCTGTCTGTC-CACA-3'; $\beta$ -actin 上游序列为 5'-GGGAAATCGTGC-GTGACA-3',下游序列为 5'-TCAGGAGGAGCAAT-GATC-3'。反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,57  $^{\circ}\text{C}$  10 s,72  $^{\circ}\text{C}$  10 s,40 个循环。实验重复 3 次,结果以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因的相对表达量。

#### 1.3 统计学方法

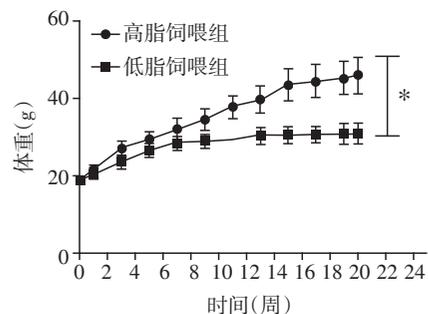
采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,实验结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间差异比较使用 LSD- $t$  检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高脂和低脂饲喂小鼠体重汇总

高脂和低脂饲喂小鼠 20 周,经统计学分析显示

(图 1),与低脂饲喂小鼠比较,高脂饲喂小鼠的体重显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),以体重超过低脂饲喂小鼠 20% 作为显著肥胖的标准,高脂饲喂小鼠第 20 周已达显著肥胖[(46.0 $\pm$ 4.5)g vs. (30.9 $\pm$ 2.4)g],可用于后续实验。



与低脂饲喂组相比,\* $P < 0.05$ 。

图 1 高脂饲喂组和低脂饲喂组小鼠体重比较

Figure 1 Comparison of mice weight between high-fat-diet group and low-fat-diet group

### 2.2 牙周炎对肥胖小鼠血清蛋白、肌酐的影响

低脂饲喂的 Low+NCPre 组和 Low+Pre 组小鼠血清中总蛋白、白蛋白、血清肌酐间无显著差异,与 Low+NCPre 组、Low+Pre 组相比,High+NCPre 组、High+Pre 组血清中总蛋白、白蛋白显著降低、血清肌酐显著增加( $P$  均  $< 0.05$ );与 High+NCPre 组相比,High+Pre 组间血清中总蛋白和白蛋白显著降低、血清肌酐明显增加( $P$  均  $< 0.05$ , 表 1)。

### 2.3 牙周炎对肥胖小鼠血清中炎症因子的影响

低脂饲喂的 Low+NCPre 组和 Low+Pre 组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );与 Low+NCPre 组相比,High+NCPre 组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 显著增加( $P$  均  $< 0.05$ ),High+Pre 组血清 TNF- $\alpha$  差异不显著、IL-6 显著增加( $P$  均  $< 0.05$ );与 Low+Pre 组相比,High+NCPre 组和 High+Pre 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 均增加,差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );与 High+NCPre 组相比,High+Pre 组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 显著降低( $P$  均  $< 0.05$ , 表 2)。

### 2.4 牙周炎对肥胖小鼠肾组织中 MMP 水平的影响

与 Low+NCPre 组相比,Low+Pre 组小鼠肾组织中 MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白显著降低( $P$  均  $< 0.05$ ),TIMP-1 mRNA 和蛋白显著升高( $P$  均  $< 0.05$ );High+NCPre 组肾组织中 MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白较 Low+NCPre 组显著降低( $P$  均  $< 0.05$ ),TIMP-1 mRNA 和蛋白显著升高( $P$  均  $< 0.05$ );High+Pre 组、High+NCPre 组肾组织中 MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋

表1 各组小鼠血清蛋白、肌酐水平的变化

Table 1 Changes of serum total protein, albumin and creatinine in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	总蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)	肌酐( $\mu$ mol/L)
Low+NCPre组	82.569 $\pm$ 5.341	55.214 $\pm$ 3.780	8.254 $\pm$ 1.258
Low+Pre组	85.685 $\pm$ 6.672	53.652 $\pm$ 3.421	8.598 $\pm$ 1.102
High+NCPre组	64.153 $\pm$ 4.753 <sup>#</sup>	42.158 $\pm$ 2.963 <sup>#</sup>	11.287 $\pm$ 1.453 <sup>#</sup>
High+Pre组	43.287 $\pm$ 5.857 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	30.427 $\pm$ 3.120 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	19.587 $\pm$ 0.895 <sup>#<math>\Delta</math></sup>

与Low+NCPre组相比, \* $P < 0.05$ ; 与Low+Pre组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与High+NCPre组相比,  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ 。

表2 各组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6水平的比较

Table 2 Comparison of serum TNF- $\alpha$  and IL-6 in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
Low+NCPre组	8.295 $\pm$ 1.236	7.633 $\pm$ 0.785
Low+Pre组	6.356 $\pm$ 0.894 <sup>*</sup>	9.851 $\pm$ 1.267 <sup>*</sup>
High+NCPre组	12.238 $\pm$ 1.152 <sup>#</sup>	16.389 $\pm$ 2.656 <sup>#</sup>
High+Pre组	8.864 $\pm$ 1.518 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	12.587 $\pm$ 1.369 <sup>#<math>\Delta</math></sup>

与Low+NCPre组相比, \* $P < 0.05$ ; 与Low+Pre组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与High+NCPre组相比,  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ 。

白较Low+Pre组显著降低( $P$ 均 $< 0.05$ )、TIMP-1 mRNA和蛋白显著增加( $P$ 均 $< 0.05$ );与High+NCPre组相比,High+Pre组MMP-2、MMP-9 mRNA和蛋白显著降低( $P$ 均 $< 0.05$ ),TIMP-1 mRNA和蛋白显著增加( $P$ 均 $< 0.05$ ,图2,表3)。

### 2.5 牙周炎对肥胖小鼠肾组织中TGF- $\beta$ 1/Samd6信号通路蛋白水平的影响

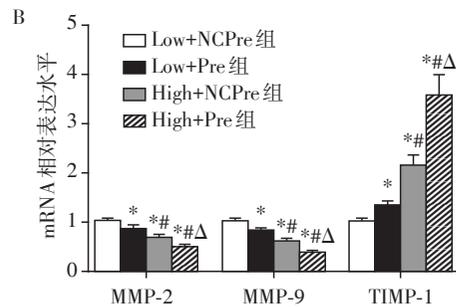
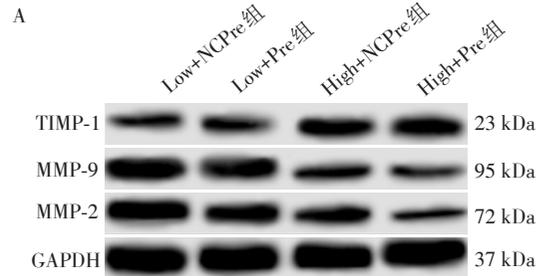
与Low+NCPre组相比,Low+Pre组小鼠肾组织中Samd6、E-cadherin蛋白显著降低( $P$ 均 $< 0.05$ ),TGF- $\beta$ 1蛋白显著升高( $P < 0.05$ );High+NCPre组肾组织Samd6、E-cadherin蛋白较Low+NCPre组显著降低( $P$ 均 $< 0.05$ ),TGF- $\beta$ 1蛋白显著升高( $P < 0.05$ );High+Pre组肾组织中Samd6、E-cadherin蛋白较Low+Pre组显著降低( $P$ 均 $< 0.05$ )、TGF- $\beta$ 1蛋白显著增加( $P < 0.05$ );与High+NCPre组相比,High+Pre组Samd6、E-cadherin蛋白显著降低( $P$ 均 $< 0.05$ ),TGF- $\beta$ 1蛋白显著增加( $P < 0.05$ ,图3,表4)。

表3 各组小鼠肾组织中MMP水平的定量分析

Table 3 Quantitative analysis of MMPs protein expression in mice kidney of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	MMP-2	MMP-9	TIMP-1
Low+NCPre组	0.785 $\pm$ 0.082	0.836 $\pm$ 0.085	0.212 $\pm$ 0.025
Low+Pre组	0.657 $\pm$ 0.068 <sup>*</sup>	0.674 $\pm$ 0.069 <sup>*</sup>	0.365 $\pm$ 0.038 <sup>*</sup>
High+NCPre组	0.531 $\pm$ 0.052 <sup>#</sup>	0.483 $\pm$ 0.051 <sup>#</sup>	0.572 $\pm$ 0.058 <sup>#</sup>
High+Pre组	0.312 $\pm$ 0.035 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.298 $\pm$ 0.030 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.798 $\pm$ 0.081 <sup>#<math>\Delta</math></sup>

与Low+NCPre组相比, \* $P < 0.05$ ; 与Low+Pre组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与High+NCPre组相比,  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ 。



A: 牙周炎对肥胖小鼠肾组织中MMP水平的影响; B: 牙周炎对肥胖小鼠肾组织中MMP mRNA的影响。与Low+NCPre组相比, \* $P < 0.05$ ; 与Low+Pre组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与High+NCPre组相比,  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ 。

图2 各组小鼠肾组织中MMP mRNA和蛋白表达的比较  
Figure 2 Comparison of MMPs mRNA and protein expression in mice kidney of each group

### 3 讨论

肾脏是机体重要的代谢器官,肾功能低下主要表现为肾功能单位滤过和回收功能降低。血清中的总蛋白、白蛋白、肌酐是评价肾功能的重要指标<sup>[9-11]</sup>。血

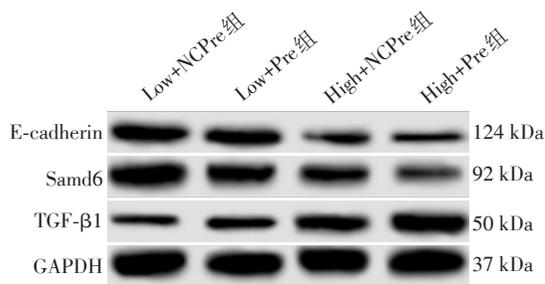


图3 各组小鼠肾组织中TGF-β1/Samd6信号通路蛋白水平  
Figure 3 Expression of proteins related to TGF-β1/Samd6 pathway in mice kidney of each group

表4 各组小鼠肾组织中TGF-β1/Samd6信号通路蛋白定量分析

Table 4 Quantitative analysis of proteins related to TGF-β1/Samd6 pathway in mice kidney of each group

组别	TGF-β1	Samd6	E-cadherin
Low+NCPre组	0.356 ± 0.032	0.698 ± 0.062	0.758 ± 0.083
Low+Pre组	0.487 ± 0.049*	0.574 ± 0.049*	0.623 ± 0.065*
High+NCPre组	0.625 ± 0.068**	0.423 ± 0.040**	0.432 ± 0.051**
High+Pre组	0.898 ± 0.075**Δ	0.251 ± 0.028**Δ	0.306 ± 0.042**Δ

与Low+NCPre组相比,\* $P < 0.05$ ;与Low+Pre组相比,\*\* $P < 0.05$ ;与High+NCPre组相比,Δ $P < 0.05$ 。

小鼠相比,低脂饲养小鼠血清总蛋白、白蛋白含量差异不显著,高脂饲养小鼠间差异显著,即肥胖合并牙周炎小鼠血清中总蛋白、白蛋白含量显著下降,血清肌酐显著上调,表明牙周炎对肥胖小鼠的肾脏损伤具有一定作用。

既往研究表明,肥胖以及牙周炎患者体内炎症因子水平在一定程度上上调<sup>[13-14]</sup>。牙周致病菌可刺激牙龈上皮特定受体激发牙龈的自身免疫反应,分泌大量炎性细胞因子,诱发相关炎性信号通路,上调局部炎症因子水平,造成牙龈组织发生免疫性损伤,相关炎性因子随着全身血液进入循环系统中,对全身以及远端组织产生影响。脂肪组织能分泌多种炎性因子,导致机体产生慢性炎症<sup>[15-16]</sup>。因此推测牙周炎可能通过炎症因子损伤肥胖小鼠的肾脏。TNF-α是一种促炎因子,在正常体液中含量较低,可调节炎症信号通路以及免疫反应,是机体参与炎症反应的重要因子<sup>[17]</sup>。IL-6在炎症反应过程中也发挥着重要作用<sup>[18]</sup>。为研究牙周炎对肥胖小鼠肾脏损伤的作用机制,本研究检测了炎症因子TNF-α、IL-6水平的变化,与低脂饲养的小鼠相比,肥胖高脂饲养的小鼠TNF-α、IL-6水平升高,表明肥胖促进机体炎症水平增加;与非牙周炎小鼠相比,牙周炎小鼠血清中TNF-α水平显著降低;肥胖伴随牙周炎的小鼠血清中TNF-α、IL-6水平显著低于单纯肥胖小鼠,表明牙周炎降低了肥胖小鼠的

血清中总蛋白是血清中含量最多的物质,包括白蛋白,对血管内环境稳态的维持具有重要作用,血清总蛋白以及白蛋白水平主要反映肾脏实质性损伤的情况。血清肌酐是肾小球滤过功能的重要指标,其表达量增加表示肾小球滤过功能下降,肾脏受损,是一种能较准确反映肾脏受损的指标<sup>[12]</sup>。在本实验中,高脂饲养小鼠体重第20周已达显著肥胖,可进行后续实验;高脂饲养的小鼠血清中总蛋白和白蛋白水平较低脂饲养小鼠显著降低,血清肌酐显著增加,表明肥胖导致小鼠肾脏受损。与非牙周炎

炎症因子水平,抑制机体的炎症反应,可能与肥胖小鼠体内低度炎症状态有关。

肾损伤的重要病理变化是肾小管间质纤维化,其中肾小管上皮细胞间充质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)发挥重要作用<sup>[19]</sup>。EMT的主要特征为失去上皮间质细胞标志物E-cadherin从而获得间质细胞特性。TGF-β1/Samd6信号通路与肾小管上皮细胞EMT过程密切相关<sup>[20-21]</sup>。MMP-2、MMP-9以及抑制因子TIMP-1对肾脏细胞外基质以及基底膜的降解具有重要作用<sup>[22]</sup>。本研究中肥胖小鼠肾组织中MMP-2、MMP-9显著降低,TIMP-1显著增加,TGF-β1显著上调,Samd6以及上皮细胞标志物E-cadherin显著下调,肥胖合并牙周炎的小鼠MMP-2、MMP-9、Samd6、E-cadherin进一步降低,TIMP-1、TGF-β1显著增加,表明牙周炎可能是通过调控TGF-β1/Samd6信号通路抑制细胞外基质的降解,促进EMT过程,进一步加重肾损伤。

综上所述,牙周炎对肥胖小鼠的免疫反应出现一定耐受性,可能通过影响TGF-β1/Samd6信号通路的活化,调控肾纤维化过程,阻碍细胞外基质降解,诱导细胞EMT过程,导致肾损伤程度加重。

[参考文献]

[1] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation [J]. Nat Rev Immu-

- nol, 2015, 15(1):30-44
- [2] Merchant A, Pitiphat W, Douglass CW, et al. Oral hygiene practices and periodontitis in health care professionals [J]. *J Periodontol*, 2015, 73(5):531-535
- [3] Eke PI, Wei L, Borgnakke WS, et al. Periodontitis prevalence in adults  $\geq 65$  years of age, in the USA [J]. *Periodontol 2000*, 2016, 72(1):76-95
- [4] Mota DJ, Huuonen S, Molander A, et al. Computed tomography (CT) in the selection of treatment for root-filled maxillary molars with apical periodontitis [J]. *Dentomaxillofac Radiol*, 2016, 45(5):20150391
- [5] Cortellini P, Buti J, Prato GP. Periodontal regeneration compared with access flap surgery in human intra-bony defects 20-year follow-up of a randomized clinical trial: tooth retention, periodontitis recurrence and costs [J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44(1):58-66
- [6] Lee HJ, Ha JE, Bae KH. Synergistic effect of maternal obesity and periodontitis on preterm birth in women with preeclampsia: a prospective study [J]. *J Clin Periodontol*, 2016, 43(8):646-651
- [7] 王轶雄, 余挺, 谢宝仪, 等. 肥胖伴牙周感染小鼠体内 B-1a 细胞的表达初探 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2017, 33(3):287-291
- [8] Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice [J]. *J Immunol Methods*, 2013, 394(1/2):49-54
- [9] Doig GS, Simpson F, Bellomo R, et al. Intravenous amino acid therapy for kidney function in critically ill patients: a randomized controlled trial [J]. *Intensive Care Med*, 2015, 41(7):1197-1208
- [10] Murata N, Gonzalez-Cuyar LF, Murata KA, et al. Macrocyclic and other non-group 1 gadolinium contrast agents deposit low levels of Gadolinium in brain and bone tissue: preliminary results from 9 patients with normal renal function [J]. *Invest Radiol*, 2016, 51(7):447-453
- [11] Costello-White R, Ryff CD, Coe CL. Aging and low-grade inflammation reduce renal function in middle-aged and older adults in Japan and the USA [J]. *Age*, 2015, 37(4):75
- [12] Wilkins LM, Kaye EK, Wang HY, et al. Influence of obesity on periodontitis progression is conditional on interleukin-1 inflammatory genetic variation [J]. *J Periodontol*, 2017, 88(1):59-68
- [13] 朱亭, 谢宇, 刘娟, 等. BVT.2733 对肥胖小鼠胰岛素抵抗及炎症指标的影响 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2008, 28(8):968-972
- [14] 章小梅, 任静. 牙周炎基础治疗对龈沟液中炎症因子水平影响 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37(5):623-625
- [15] Sattiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1):1-4
- [16] Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, et al. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2016, 118(11):1786-1807
- [17] Chingcuanco F, Segal JB, Kim SC, et al. Bioequivalence of biosimilar tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors compared with their reference biologics: a systematic review of biosimilar TNF- $\alpha$  inhibitors compared with reference biologics [J]. *Ann Intern Med*, 2016, 165(8):565-574
- [18] Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(5):448-457
- [19] Lopez-Soler RI. Vimentin regulates  $\beta$ -catenin translocation during epithelial to mesenchymal transition in renal fibrosis [J]. *P R Health Sci J*, 2017, 36(2):119-120
- [20] Liu L, Wang Y, Yan R, et al. Oxymatrine inhibits renal tubular EMT induced by high glucose via upregulation of SnoN and inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0151986
- [21] 孙雪, 梅峰. TGF- $\beta$ /Smad 信号通路诱导肾上皮细胞间充质转化机制的研究进展 [J]. *山东医药*, 2017, 57(30):102-104
- [22] Tu SH, Chiou YS, Kalyanam N, et al. Garcinol sensitizes breast cancer cells to Taxol through the suppression of caspase-3/iPLA (2) and NF- $\kappa$ B/Twist1 signaling pathways in a mouse 4T1 breast tumor model [J]. *Food Funct*, 2017, 8(3):1067-1079

[收稿日期] 2019-01-29