论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1378-04

益气滋肾合剂对牙周炎大鼠外周血 TNF-α、IL-1β 含量及牙槽骨微观形态的影响

杨 霞,向学熔,李丛华,黄孝庆 (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院口腔内科教研室)

【摘要】 **目的** 观察益气滋肾合剂对牙周炎大鼠外周血 TNF-α 和 IL-1β 水平的影响,探讨其治疗牙周炎的机制。**方法** 选用80只牙体牙列完整,无龋坏及牙周病的5月龄 Wistar 大鼠,雌雄各半,体质量200~250 g,随机分为5组:正常对照($n=10$,N)组;模型对照($n=15$,A)组,采用"牙颈部钢丝结扎+高糖饮食+激素"局部与全身因素相结合的方法,建立牙周炎动物模型;益气滋肾合剂(灌胃)高剂量[20 g/(kg·d),B1]、中剂量[10 g/(kg·d),B2]、低剂量[500 mg/(kg·d),B3]组($n=15$)。12周后通过对大鼠一般状态、牙齿松动度、大鼠外周血中 IL-1β、TNF-α 含量的变化和大鼠牙槽骨微观形态分析,评价不同浓度的益气滋肾合剂治疗大鼠牙周炎的效果。**结果** 大鼠外周血中 TNF-α、IL-1βA 组[(4.909±0.505),(0.318±0.086)]显著高于 B1[(4.051±0.463),(0.253±0.193)]、B2[(4.085±0.374),(0.266±0.062)]组($P<0.05$);Micro-CT 成像分析得出骨小梁数量和骨小梁分离度值 A 组[(1.24±0.22),(789.3±157.0)]显著低于 B1[(1.95±0.34),(362.3±62.7)]、B2[(1.88±0.39),(396.2±58.2)]组($P<0.05$)。**结论** 益气滋肾合剂可以降低大鼠外周血中 IL-1β、TNF-α 的水平,增加牙槽骨密度,对大鼠牙周炎具有治疗作用。

【关键词】 慢性牙周炎;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-1β;益气滋肾合剂
【中图法分类号】 R780.2;R781.42;R285 【文献标志码】 A

Effect of Tonifying Qi Nourishing Kidney Mixture on peripheral levels of TNF-α and IL-1β and morphological changes of alveolar bone in periodontitis rats

Yang Xia, Xiang Xuerong, Li Conghua, Huang Xiaoqing (Department of Oral Internal Medicine, Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

【**Abstract**】 **Objectives** To determine the effect of Tonifying Qi Nourishing Kidney Mixture on the level of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and cytokine interleukin-1β (IL-1β) in the peripheral blood and on morphological changes of alveolar bone during experimental periodontitis. **Methods** Eighty 5-months-old Wistar rats were divided into 5 groups at random. The rats of Group N was killed at the beginning of the experiment and used as the normal control. And the animals of Group A, B1, B2 and B3 were inflicted to be periodontitis models by ligating dental cervix with steel wire, high-glucose feeding and topical hormone treatemnt. The rats in group A were killed at the end of periodontitis establishment to assess the features of the model. The rats fo Group B1, B2 and B3 received an intragastrical injection of the mixture at 20, 10 and 5 g/(kg·d) respectively for 12 weeks and then were killed after general evaluation and blood sampling. The levels of TNF-α and IL-1β in the peripheral blood were measured with enzyme-linked immunosorbent assay. Morphological changes of alveolar bone was observed by microcomputed tomography (micro-CT). **Results** The levels of TNF-α and IL-1β in treated group B1 (4.909±0.505 and 0.318±0.086) and group B2 (4.085±0.374 and 0.266±0.062) were significantly lower than those in the control group A (4.909±0.505 and 0.318±0.086, $P<0.01$). At the same time, trabecular number and trabecular separateion in the experimental group B1 (1.95±0.34 and 362.3±62.7) and group B2 (1.88±0.39 and 396.2±58.2) were significantly better than those in the control group A (1.24±0.22 and 789.3±157.0, $P<0.01$). **Conclusion** Tonifying Qi Nourishing Kidney Mixture reduces the levels of TNF-α and IL-1β in the peripheral blood, and enhances the density of alveolar bone, thus exerting therapeutic effect on periodontitis.

【**Key words**】 periodontitis; tumor necrosis factor-α; interleukin-1β; Tonifying Qi Nourishing Kidney Mixture

Corresponding author: Li Conghua, Tel: 86-23-89035821; E-mail: liconghua1@163.com

【通信作者】 李丛华,电话:(023)89035821,E-mail:liconghua1@163.com

慢性牙周炎是人类最常见的疾病之一,它是多因素疾病,是造成我国中老年人牙齿丧失的最主要原因[1-2]。菌斑细菌是其发病的始动因素;同时宿主的防御反应(炎症和免疫反应)也与宿主组织的破坏有着密切的关系[3-4]。齿为骨之余,按照中医理论,中老年牙周炎多与肾虚有关,应该以益气滋肾,补肾固齿为主。中草药在调节宿主全身防御反应方面有着独特的功效。本实验通过比较治疗前后大鼠一般状态、牙齿松动度、外周血 IL-1β 和 TNF-α 的水平的变化以及牙槽骨微观形态的改变,从细胞因子水平来探讨中药制剂治疗牙周炎的机制,为进一步的临床实验提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及药品

益气滋肾合剂以黄柏、菟丝子、熟地黄、麦门冬、当归、白芍等组成(重庆医科大学中医药学院药理教研室提供),加水 1 000 ml,文火慢熬约 10 h,浓缩至 200 ml,过滤,密封保存备用。测定大鼠外周血中的 IL-1β、TNF-α 的 ELISA 试剂盒(中国人民解放军总医院放射免疫研究所,批号 200810)。

1.2 动物实验分组

选取 80 只牙体牙列完整,无龋坏及牙周病的 5 月龄 Wistar 中年大鼠,雌雄各半,体质量 200 ~ 250 g;采用"牙颈部钢丝结扎 + 高糖饮食 + 激素"局部与全身因素相结合的方法造模:腹腔注射 5 g/100 ml 水合氯醛 1 ml/kg 麻醉后,0.2 mm 正畸钢丝结扎左上颌第一磨牙牙颈部;每天 10% 糖水喂饲 50 ml 替代饮水。结扎后第 2 天开始每只大鼠股四头肌注射稀释 5 倍醋酸泼尼松龙混悬液 1 ml/kg,2 d 给药 1 次总共 10 次。20 d 后通过拍摄数码 X 线片和病理切片的观察来确定牙周炎动物模型建立成功,拟进行药物实验。模型建立成功后,动物正常饲养 2 周,2 周后去除结扎丝,随机选取大鼠并分组,不同实验组开始灌胃给药:正常对照(N)组 10 只,实验开始时处死。建模对照(A)组 15 只,自来水灌胃,1 ml/(100 g · d),于合剂治疗前处死;B1 益气滋肾合剂高剂量组 15 只,20 g/(kg · d) 合剂液灌胃;B2 益气滋肾合剂中剂量组 15 只,10 g/(kg · d) 合剂液灌胃;B3 益气滋肾合剂低剂量组 15 只,500 mg/(kg · d) 合剂液灌胃。给药治疗 12 周后处死各组所有大鼠。

1.3 指标观测

1.3.1 大鼠一般情况 分别于实验前和实验后每周观测大鼠的状态、毛发等一般情况,测各组动物的体质量。光镜观察建模前后的组织变化情况。

1.3.2 牙周炎动物模型建立成功标准 大鼠第一、二磨牙间牙槽嵴明显垂直吸收明显;组织病理切片观察到牙周袋形成,牙龈纤维排列不规则,有慢性炎症细胞浸润,牙槽嵴吸收明显,这提示牙周炎动物模型建立成功。

1.3.3 大鼠牙齿松动度变化计分 颊舌向松动者为 1;颊舌向、近中远中向均松动者 2;颊舌向、近中远中向和垂直向均松动者为 3。

1.3.4 血浆中炎性因子的改变 5% 水合氯醛全麻各大鼠,将全部大鼠经腹主动脉取血 5 ml(加抗凝剂 EDTA-2Na 70 μl),1 000 r/min 离心 10 min,吸取上清 0.5 ml,装管标记后,用 IL-1β、TNF-α 试剂盒测定其浓度。

1.3.5 数码 X 线观测评价 从牙周膜间隙、硬骨板变化、牙槽骨吸收程度等 3 个方面综合分析,将其分为 4 级。0 级:牙周膜间隙均匀一致,硬骨板存在、边缘齐,牙槽骨无吸收;1 级:牙周膜间隙均匀增宽,硬骨板存在、边缘不齐,牙槽骨吸收至根上 1/3;2 级:牙周膜间隙楔形增宽,硬骨板消失、外形齐,牙槽骨吸收至根中 1/3;3 级:牙周膜间隙楔形增宽,硬骨板缺如,牙槽骨吸收至根尖 1/3。

1.3.6 Microcomputed tomography(Micro-CT)三维影像学观察 Micro-CT 像素 1024 × 1024,切片层面厚度 20 μm,切片数目 500 幅,放大率 ×8,电压 60 kV,电流 0.13 mA。各组大鼠处死待取血后,取大鼠上颌骨,借助 Micro-CT 对不同分组实验大鼠样本进行检测,然后用甲基丙烯酸甲酯包埋样本,用不脱钙骨切片的方法获取图像,根据获取的图像用 CT-analyser 进行分析骨小梁数量(Trabecular Number)Tb. N 和骨小梁分离度(Trabecular Separateion),评价药物对各组大鼠牙槽骨的作用。

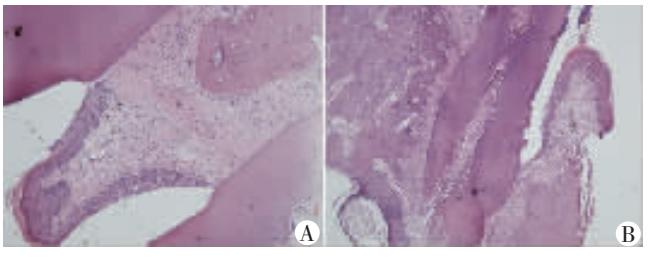
1.4 统计学分析

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

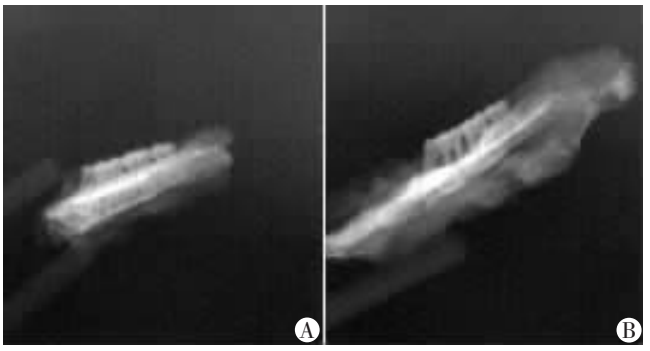
2.1 一般情况

造模成功前死亡 7 只,A、B1、B3 组大鼠因病死亡各 1 只,其余大鼠均存活至处死。N 组大鼠毛发光滑,饮食活动正常。造模后大鼠摄食减少,体质量与未造模组比较降低明显,少动,食欲缺乏,毛发粗糙。中药治疗后摄食增加,体质量增加,毛发逐渐变得光滑。各组实验大鼠处死前观察,B1 组大鼠全身状态基本恢复至正常大鼠水平。光镜观察示:N 组第一、二磨牙间牙间乳头正常,上皮附着位于釉牙骨质界处;牙周组织中结缔组织中可见少量中性粒细胞浸润,牙槽骨表面光滑,无骨吸收改变(图 1A)。建模后 20 天,A 组牙间乳头上皮溃疡、坏死,牙周袋形成;牙龈纤维排列不规则,有慢性炎症细胞浸润;牙槽嵴吸收明显,有的吸收达到根中部,且表面成蚕食状;牙槽骨多处离断,呈骨质疏松状态(图 1B)。X 线片示:正常对照组(A 组),大鼠第一磨牙和第二磨牙间牙槽嵴顶及颌骨骨小梁密度无异常改变,无明显骨吸收(图 2A);牙周炎模型对照组(N 组),大鼠第一、二磨牙间牙槽嵴明显垂直吸收、牙周膜间隙呈楔形、硬骨板消失缺如(图 2B)。



A:N 组;B:A 组

图 1 益气滋肾合剂对牙周炎大鼠各组治疗后组织学观察(HE ×100)



A:N组;B:A组

图2 益气滋肾合剂对牙周炎大鼠各组治疗后X线表现

2.2 松动度变化

与治疗前相比,治疗后的B1、B2、B3组大鼠牙齿松动度明显减轻(表1)。

表1 益气滋肾合剂对牙周炎大鼠各组治疗前后牙齿松动度的评分结果(分,$\bar{x} \pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后
N组	40	0.00±0.00	0.00±0.00
A组	56	2.22±0.35	2.31±0.44
B1组	56	2.28±0.35	1.42±0.32[a]
B2组	60	2.25±0.35	1.56±0.24[a]
B3组	56	2.19±0.35	1.77±0.45[a]

a:$P<0.05$,与治疗前比较

2.3 外周血中炎性因子的改变

外周血中TNF-α和IL-1β含量:A组显著高于N组($P<0.05$);B1、B2组显著低于A组($P<0.01$);B3组外周血中TNF-α和IL-1β含量较A组有所升高,但差别无统计学意义($P>0.05$)(表2)。

表2 益气滋肾合剂治疗前后各组大鼠外周血中TNF-α和IL-1β的含量($\bar{x} \pm s$,pg/ml)

组别	n	TNF-α	IL-1β
N组	10	3.968±0.533	0.115±0.060
A组	14	4.909±0.505[a]	0.318±0.086[a]
B1组	14	4.051±0.463[b]	0.253±0.193[b]
B2组	15	4.085±0.374[b]	0.266±0.062[b]
B3组	14	4.949±0.628	0.312±0.102

a:$P<0.05$,与N组比较;b:$P<0.01$,与A组比较

2.4 数码X线观测评价

与A组相比,B1、B2组牙周膜间隙、硬骨板情况和牙槽骨吸收度均有显著改善,差别有统计学意义($P<0.05$)。B3组牙周膜间隙、硬骨板情况和牙槽骨吸收度有改善,差别无统计学意义($P>0.05$)(表3)。

表3 益气滋肾合剂治疗前后各组大鼠数码X线评分及Micro-CT分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	数码X线评分(分)	骨小梁数量(个/mm)	骨小梁分离度(μm)
N组	10	0.125±0.35	2.77±0.33	277.3±55.0
A组	14	2.143±0.69	1.24±0.22	789.3±157.0
B1组	14	1.250±0.87[a]	1.95±0.34[a]	362.3±62.7[a]
B2组	15	1.625±0.74[a]	1.88±0.39[a]	396.2±58.2[a]
B3组	14	2.000±0.76	1.49±0.46	593.7±82.3

a:$P<0.05$,与A组比较

2.5 Micro-CT成像分析

根据实验各组Micro-CT成像图进行分析得出:A组和N组的骨小梁数量和骨小梁分离度值比较,差别有统计学意义($P<0.05$);实验组与A组相比,B1、B2、组骨小梁数量显著增加,骨小梁分离度显著缩小($P<0.05$),B3组较A组骨小梁数量和骨小梁分离度值有所升高,但无统计学意义($P>0.05$)。见图3、表3。

3 讨论

牙周炎的发生是局部因素和全身因素的共同作用的结果;国内外建立牙周炎动物模型的方法多是通过以上两个方面单独作用或两个方面的联合作用来完成。不同方法建立的模型所需要的时间不同,所造成的牙周组织破坏程度也是不同的,所引起的牙周组织破坏的类型也不尽相同的。使用单一因素诱导牙周炎的发生、发展需要较长的时间,而多种方法联合使用能在较短的时间内获得牙周炎模型,如在结扎的同时或配以高糖食谱或给予其他方法,不仅能缩短建立动物模型的时间,而且可加重病情[5]。本实验采用"钢丝结扎+高糖水+注射醋酸泼尼松龙混悬液"的方法,以期快速成功的建立牙周炎动物模型。本实验通过牙周组织病理切片的显微镜观察和拍摄X线片的放射学检查确定牙周炎的建立,为后续实验做好了准备。

牙周炎是由革兰阴性厌氧菌、鞭毛菌、螺旋体等微生物引起的发生在牙齿支持组织的炎症性感染性疾病。细菌及其毒性产物如细菌内毒素和细菌酶可直接损伤牙周上皮及结缔组织,同时又可激活宿主的防御细胞,释放多种炎症介质细胞因子,如TNF-α和IL-1β等,这些产物激活淋巴细胞并作用于许多靶细胞,介导的炎症反应又导致牙周组织的继发性损伤。IL-1β是多功能的细胞因子,在炎症、免疫及骨代谢中的作用极为活跃。IL-1β促进骨吸收,且其水平与牙周附着丧失



A:N组;B:A组;C:B1组;D:B2组;E:B3组

图3 益气滋肾合剂对牙周炎大鼠治疗后各组Micro-CT成像观察

显著相关。TNF-α 通过刺激胶原酶介导组织破坏,诱导破骨细胞的前体细胞增生、分化,并间接作用于成熟的破骨细胞刺激骨吸收,从而在牙周组织破坏中起着重要作用[6-7]。故有效地抑制 IL-1β、TNF-α 的分泌和合成,对牙周炎的治疗有一定意义。本实验中实验组 B1、B2 组牙周炎大鼠外周血中 TNF-α 和 IL-1β 的含量低于对照组 A 组,差别有统计学意义($P<0.01$),表明一定浓度的益气滋肾合剂能有效地抑制 IL-1β、TNF-α 的分泌和合成;但实验组 B3 组牙周炎大鼠外周血中 TNF-α 和 IL-1β 的含量比对照组高,差别无统计学意义($P>0.05$),说明低浓度的中药合剂在有效地抑制 IL-1β、TNF-α 的分泌和合成不理想。

中医中药作为我国的传统国粹,对牙周炎的研究表明:牙周炎的发生除与局部因素有关外,还与全身因素密切相关,这与西医的观点一致。认为牙周病病因的内因是由于七情所伤,脏腑功能失调,特别与肾气有关[8]。肾虚除先天素质外,久病累肾,劳倦过度或生育过多都可造成肾气虚损。肾虚是牙周炎发病的主要因素,肾主骨生髓,齿为骨之余,肾衰则齿豁,精固则齿坚。此观点是近代中医用补肾法治疗牙周病的理论基础,益气滋肾中药治疗牙周炎弥补了西药治疗牙周炎出现的诸多副作用。益气滋肾涉及免疫系统、内分泌系统、自主神经系统、肾上腺等系统,药物作用于这些系统,使其功能得到改善,从而消除或减轻疾病。

益气滋肾合剂的主要成分为黄柏,菟丝子,熟地黄,麦门冬,当归,甘草等,具有抗炎、抗菌、提高机体免疫力和抗骨质疏松的作用,可以从全身方面对牙周炎进行多靶点多功能调节治疗。菟丝子为常用补益中药,现代研究表明菟丝子浸提物具有调节内分泌、抗衰老、抗氧化等活性,对金黄色葡萄球菌有一致作用。地黄为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根,地黄的主要成分为苷类、糖类及氨基酸,并以苷类为主,在苷类中又以环烯醚萜苷为主;地黄具有补肾益气,调节免疫,改善骨质疏松等作用[9]。中医中药认为单味药可能不会产生很好的治疗牙周炎的效果。本实验证明,经过合理的配伍组方后,动物实验表明较高剂量的中药合剂对牙周炎有较好的治疗效果。

益气滋肾合剂治疗大鼠牙周炎的可能机制为:①通过抑制细菌和调节炎症介质的分泌控制炎症。②通过调节免疫控制炎症。研究表明地黄苷 A 具有明显升高白细胞作用,增强 B 淋巴细胞抗体产生和刺激 T 淋巴细胞转化成致敏淋巴细胞,具有增强体液免疫和细胞免疫功能;且地黄合剂对异常细胞免疫功能具有良好的调节作用[10]。③促进骨形成。Oh 等[11]研究发现地黄提取物能提高成骨细胞的增殖及成骨细胞中碱性磷酸酶的活性,抑制破骨细胞的生成及溶骨活性,还可抑制由卵巢切除术诱导的骨质疏松小鼠的骨密度降低,提示地黄提取物含有某种活性成分能改善骨质疏松症中的骨代谢。本实验借助 Micro-CT 也证实该合剂实验组 B1、B2 组中骨小梁数量增加,骨小梁分离度变小,与实验对照组 A 组相比差别有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述,益气滋肾合剂对大鼠牙周炎具有治疗作用。其对大鼠因牙周炎导致的松动牙齿的松动度有改善作用,可以降低大鼠外周血中 IL-1β、TNF-α 的水平,并可一定程度上增加牙槽骨密度;但其临床治疗牙周炎的具体机制有待进一步研究。本结果也为进一步研制开发益气滋肾合剂在治疗牙周病方面的应用提供了理论和实验基础。但由于该中药药物之间相互作用,药物成分复杂,所以还需结合药效动力学实验,进一步纯化提取加工其活性成分。

参考文献:

[1] 谢昊. 牙周病的分类和流行病学[M]//孟焕新. 牙周病学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:20-31.
[2] Cobb C M, Williams K B, Gerkovitch M M. Is the prevalence of periodontitis in the USA in decline?[J]. Periodontal 2000, 2009, 50:13-24.
[3] Holtfreter B, Schwahn C, Biffar R, *et al*. Epidemiology of periodontal diseases in the Study of Health in Pomerania[J]. J Clin Periodontal, 2009, 36(2):114-123.
[4] 冯希平. 牙周病基本流行情况[M]//卞金有. 预防口腔医学. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2006:30-31.
[5] 史凤芹, 于世凤, 庞淑珍. 牙周炎动物模型初步研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1994, 29(1):50-52.
[6] Lohr G, Beikler T, Podbielski A, *et al*. Polyphenols from Myrothamnus flabellifolia Welw. inhibit in vitro adhesion of Porphyromonas gingivalis and exert anti-inflammatory cytoprotective effects in KB cells[J]. J Clin Periodontol, 2011, 38(5):457-469.
[7] Gaibani P, Caroli F, Nucci C, *et al*. Major surface protein complex of Treponema denticola induces the production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and matrix metalloproteinase 9 by primary human peripheral blood monocytes[J]. J Periodontal Res, 2010, 45(3):361-366.
[8] 徐治鸿. 实用中医口腔病学[M]. 天津:天津科技翻译出版公司, 1991:91-93.
[9] 张伟华, 杨桂生. 地黄药理作用研究现状[J]. 中国临床医药研究杂志, 2003, (104):10872-10874.
[10] 蒋丽霞, 高敏, 高聪, 等. 地黄合剂对多发性硬化患者外周血及脑脊液中 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(6):49-51.
[11] Oh K O, Kim S W, Kim J Y, *et al*. Effect of Rehmannia glutinosa Libosch extracts on bone metabolism[J]. Clin Chim Acta, 2003, 334(1/2):185-195.

(收稿 2011-02-14 修回 2011-03-30)
(编辑 栾 嘉)