

β-隐黄素对大鼠牙槽骨吸收的影响

轩亚茹¹, 卫晓霞², 崔晓宇¹, 李小红¹, 李冬雪¹, 王国芳¹

摘要 目的 评估 β-隐黄素对大鼠牙槽骨吸收的影响并探讨其在体内的作用机制。方法 30 只雄性 SD 大鼠随机分为三组: 正常组(N 组)、牙周炎组(P 组)、β-隐黄素干预组(E 组)。P 组、E 组双侧上颌磨牙用结扎加注射内毒素的方法诱导牙周炎模型。E 组用 β-隐黄素(12 μg/大鼠)进行干预, 每 48 h 注射一次, 共 3 次。动物在第 8 天被处死, 取双侧上颌骨。右侧样本进行形态学分析, 测量釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离。左侧样本进行组织学和免疫组织化学分析, 检测牙槽嵴顶附近核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)的表达。用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)检测破骨细胞(OC)。结果 E 组与 P 组相比牙槽骨丧失(ABL)减少, 炎症细胞浸润减少, RANKL 免疫标记细胞及 TRAP 阳性多核细胞减少($P < 0.05$), OPG 表达增加($P < 0.05$)。而 E 组与 N 组相比, ABL 值和 OC 数目差异无统计学意义。结论 β-隐黄素可通过上调 OPG/RANKL 的比值, 减少成熟 OC 的数目从而预防牙槽骨的吸收。

关键词 牙周炎; 大鼠; 骨吸收; β-隐黄素

中图分类号 R 781.4+2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0076-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.017

牙周炎的主要症状是牙周袋形成和牙槽骨吸收。牙槽骨吸收是导致牙齿松动和脱落的主要原因。预防牙槽骨的吸收, 促进牙槽骨的修复和再生是治愈牙周炎的关键。

β-隐黄素, 一种发现于水果和蔬菜中的类胡萝卜素, 可以在体内转化成维生素 A。其有一些重要的生理功能: 通过促进成骨细胞骨形成, 抑制破骨细胞(osteoclast, OC)功能来预防骨质疏松; 在体外是一种抗氧化剂^[1]; 有可能用于预防肺癌^[2]。近年来, 一些关于 β-隐黄素与牙周炎关系的研究开始出现。Nishigaki et al^[3]发现 β-隐黄素可以抑制牙周致

病菌或脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的牙周膜细胞中炎症因子的产生, 上调骨保护素/核因子-κB 受体活化因子配基(osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-κB ligand, OPG/RANKL)的比值。Matsumoto et al^[4]发现注射 β-隐黄素可以抑制 LPS 诱导的小鼠牙槽骨密度的降低。这些研究表明, β-隐黄素可能有望用于牙周疾病的预防和治疗。该研究的目的是通过检测 β-隐黄素对实验性牙周炎牙周组织、牙槽骨、OC 及 OPG/RANKL 比值的影响, 探讨其体内作用的机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及器械 β-隐黄素、LPS(美国 Sigma 公司); 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、RANKL、OPG 抗体、DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 显微照相系统(日本 Olympus 公司); 显微外科器械。β-隐黄素溶于玉米油中, 配成 1 mg/ml 的溶液, LPS 用生理盐水稀释成 1 mg/ml。

1.2 实验动物及分组 SD 大鼠 30 只购自河南省实验动物中心, SPF 级, 8 周龄, 雄性, 体质量 300 g 左右, 分笼饲养, 自由摄食、饮水。室温保持在 22 ~ 24℃, 湿度 50% ~ 60%, 每 12 h 变换昼夜节律。实验开始前, 动物适应性喂养 1 周。随后, 随机分为 3 组, 每组 10 只: ① 正常组(N 组); ② 牙周炎组(P 组); ③ β-隐黄素干预组(E 组)。P 组大鼠诱导牙周炎, E 组大鼠诱导牙周炎同时用 β-隐黄素进行干预。

1.3 实验操作 7% 的水合氯醛按 3 ml/kg 体重的剂量对大鼠进行麻醉。P 组、E 组实验性牙周炎的诱导: 选取 ϕ 0.2 mm 的正畸结扎丝环绕在双侧上颌第二磨牙牙颈部, 并在腭侧打结压向牙齿舌面防止钩挂舌及口腔其他软组织。同时在颊侧牙龈沟内注射 LPS(30 μl/鼠)^[5], 每 48 h 注射 1 次, 共 3 次。作为对照, N 组注射等量的生理盐水。E 组在注射 LPS 后在相同位点注射 β-隐黄素(12 μl/鼠)^[4], 每 48 h 一次, 共 3 次。N 组、P 组注射等量的玉米油代替 β-隐黄素。实验第 8 天, 大鼠腹腔注射过量的

2017-09-20 接收

基金项目: 河南省科技厅重点科技攻关项目(编号: 142102310332);
河南省高等学校重点科研项目(编号: 16A320058)

作者单位: 郑州大学第一附属医院¹ 牙周科、² 正畸科, 郑州 450000

作者简介: 轩亚茹, 女, 硕士研究生;

王国芳, 女, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wgf dxz2003@163.com

10%水合氯醛处死,取双侧上颌组织(含牙齿、牙龈、牙槽骨)。

1.4 形态学分析 右侧上颌骨去除结扎丝,固定在10%的福尔马林中48 h。机械方法去净牙槽骨上的软组织,浸泡在1%的亚甲蓝溶液中5 min^[6]。用连接光学显微镜的数码相机在图像放大40倍的情况下进行拍照。在图像上选择上颌第二磨牙颊舌侧近中、中央、远中6个位点,测量釉牙骨质界到牙槽嵴顶,取6个位点的平均值作为样本的最后值,数值精确到mm。

1.5 组织学和免疫组织化学分析 左侧上颌骨去除结扎丝,脱钙,脱水,二甲苯清洗,石蜡包埋。沿近远中方向切成4 μm的切片^[7],每个样本收集12张切片。3张用HE溶液染色,进行组织学和形态学的分析。9张用于免疫组织化学分析,检测RANKL、OPG及TRAP的特异表达。一抗分别选用山羊抗鼠RANKL、OPG、TRAP多克隆抗体,抗体以1:100的浓度稀释,按试剂盒的说明进行操作。以PBS代替一抗做阴性对照。

1.5.1 标准判读 免疫组织化学阳性着色为棕黄色颗粒。

1.5.2 定量测量 使用显微镜和相机在每张切片的牙槽嵴顶附近选取5个区域。应用Image Pro Plus 6.0图像分析系统,将图像变为灰度数码图像,检测总的光密度及区域的面积。然后用总光密度/区域面积得出平均光密度值(mean optical density, MOD)。应用PhotoshopCS6软件计算区域内TRAP阳性,细胞核≥3的总细胞数目,总细胞数目/区域面积得出成熟OC数目/mm²^[8]。

1.6 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件包进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间数据对比采用方差分析,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

整个实验过程中,实验动物健康状况良好,未出现死亡;结扎丝未脱落。三组样本之间的牙槽骨丧失量,OC数目,RANKL与OPG MOD值的比较见表1。

2.1 形态学分析 亚甲蓝染色图片如图1。三组ABL值不全相等($P < 0.05$)。N组和P组差异有统计学意义($P < 0.05$),牙周炎造模成功。E组和P组差异有统计学意义($P < 0.05$),β-隐黄素可以预

表1 三组样本之间的比较($n = 10, \bar{x} \pm s$)

项目	N组	P组	E组	F值	P值
牙槽骨丧失(mm)	0.78 ± 0.12	1.50 ± 0.14*	0.80 ± 0.12#	110.61	<0.001
细胞核≥3, TRAP+细胞个数(个)/mm ²	1.90 ± 1.85	8.50 ± 2.22*	2.60 ± 2.22#	29.62	<0.001
RANKL平均光密度值	49.76 ± 6.00	93.70 ± 7.42*	74.33 ± 5.28*#	122.31	<0.001
OPG平均光密度值	37.96 ± 17.55	58.71 ± 7.38*	71.35 ± 5.47*#	83.64	<0.001

与N组比较: * $P < 0.05$; 与P组比较: # $P < 0.05$

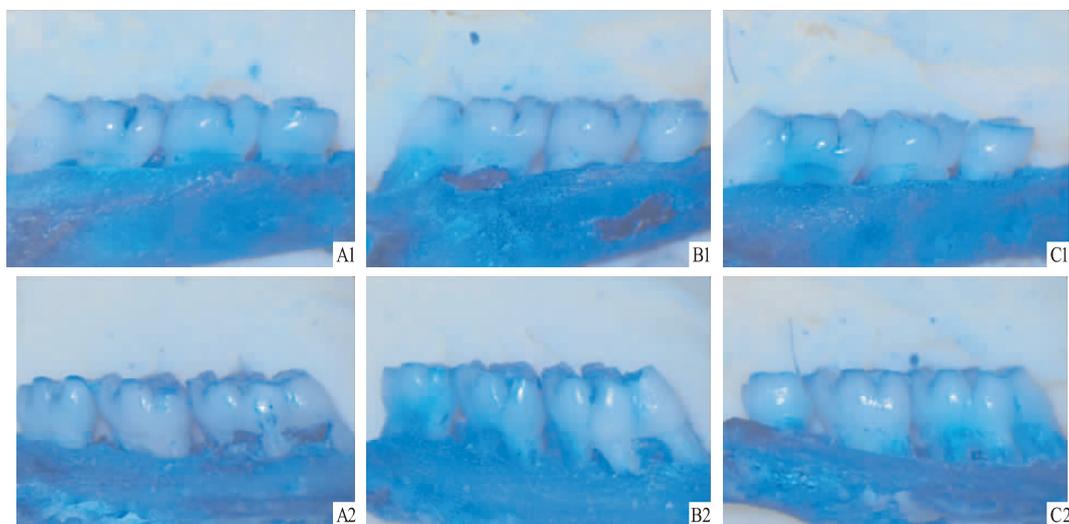


图1 牙齿和牙槽骨的亚甲蓝染色 ×40

A: N组; B: P组; C: E组; 1: 颊侧牙槽骨; 2: 舌侧牙槽骨

防牙周炎牙槽骨的吸收。

2.2 组织学分析 图像放大 40 倍,可以看到 N 组龈乳头充满邻间隙,结合上皮最顶端位于釉牙骨质界。P 组结合上皮向根方迁移,有深牙周袋形成,牙槽骨吸收明显。E 组结合上皮略向根方迁移,有浅牙周袋,牙槽嵴顶未见明显吸收。图像放大 100 倍,可以看到 N 组和 P 组牙龈组织有少量炎症细胞浸润,牙周膜纤维排列正常。P 组牙龈组织有大量炎症细胞浸润,牙周膜纤维排列紊乱,并可见大量成熟的 OC。HE 染色图片如图 2。

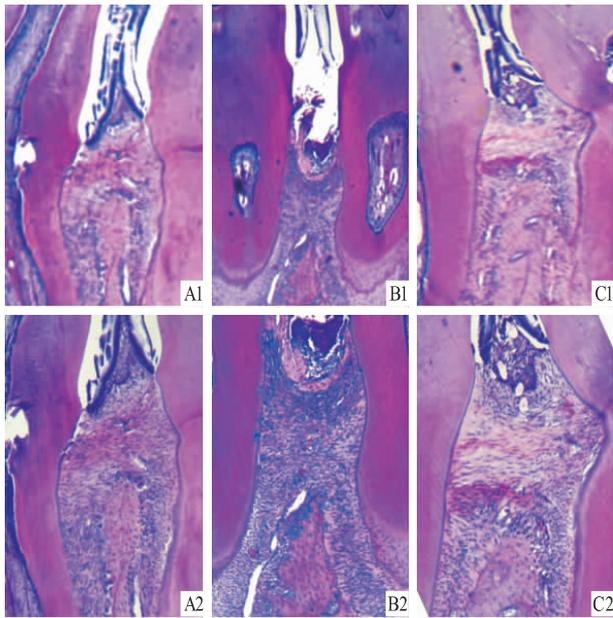


图 2 牙齿和牙周组织 HE 染色

A: N 组; B: P 组; C: E 组; 1: $\times 40$; 2: $\times 100$

2.3 TRAP 染色分析 TRAP 表达阳性且细胞核 ≥ 3 是成熟的 OC,其位于牙槽骨表面,靠近吸收陷窝。如图 3 所示。N 组、E 组可见少量的 TRAP 阳性的多核细胞,P 组 TRAP 阳性多核细胞数量显著增加($P < 0.05$)。

2.4 RANKL 和 OPG 的免疫组织化学分析 N 组、P 组及 E 组牙周组织均可看到 RANKL 和 OPG 特异性免疫标记(棕黄色),N 组 RANKL 和 OPG 表达呈弱阳性,P 组 RANKL 表达呈强阳性,OPG 表达呈阳性。E 组 RANKL 表达呈阳性,OPG 表达呈强阳性。免疫标记的光学显微照片如图 4、5。三组 RANKL、OPG 数值不全相等($P < 0.05$),P 组 RANKL 的表达明显高于 E 组($P < 0.05$),OPG 表达显著低于 E 组($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究用大鼠进行牙周炎模型的诱导,因为大鼠易于操作、成本低、且生物学反应与人类相似。实验中采用结扎联合注射 LPS 的方法建立牙周炎模型。正畸结扎丝结扎及注射 LPS 可以促进菌斑堆积,诱导炎症反应,导致牙槽嵴顶渐进性骨丢失,此反应类似于人类牙周炎的发生发展。本实验形态学及组织学结果都显示,联合造模的方法成功诱导了牙周炎的发生。

牙周炎发展过程中结合上皮根方迁移,结缔组织和牙槽骨被破坏。本研究组织学及形态学结果显示,与 N 组相比,P 组牙槽骨丧失明显,牙周组织炎

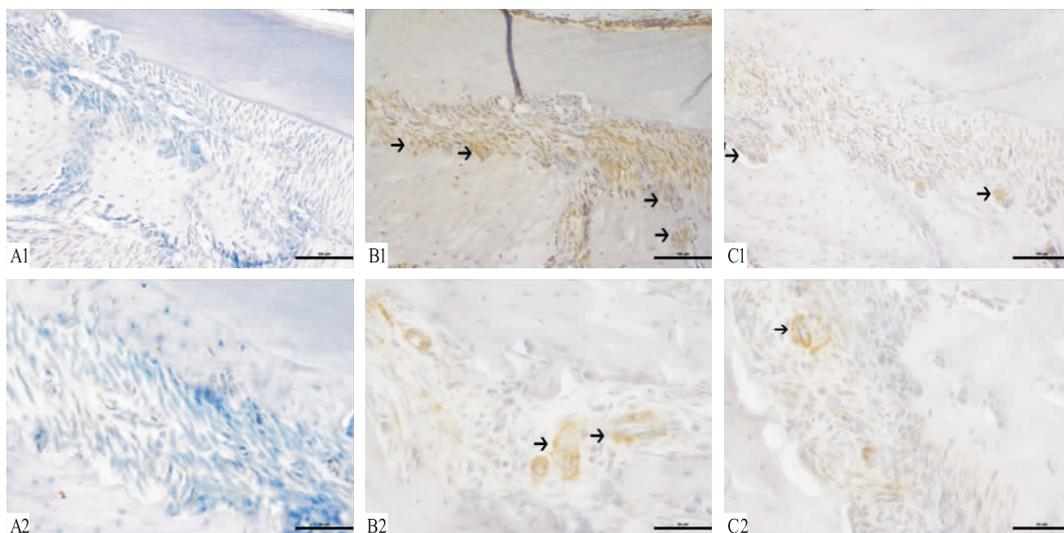


图 3 TRAP 免疫组织化学染色

A: N 组; B: P 组; C: E 组; 1: $\times 200$; 2: $\times 400$ 注:箭头所指即为 OC

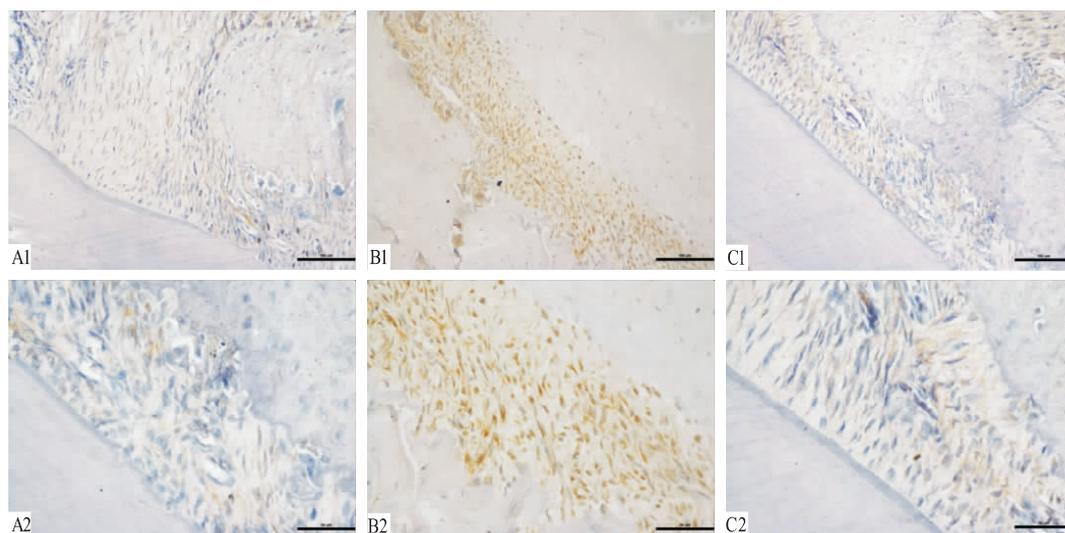


图4 免疫组化染色检测 RANKL 在牙周组织中的表达

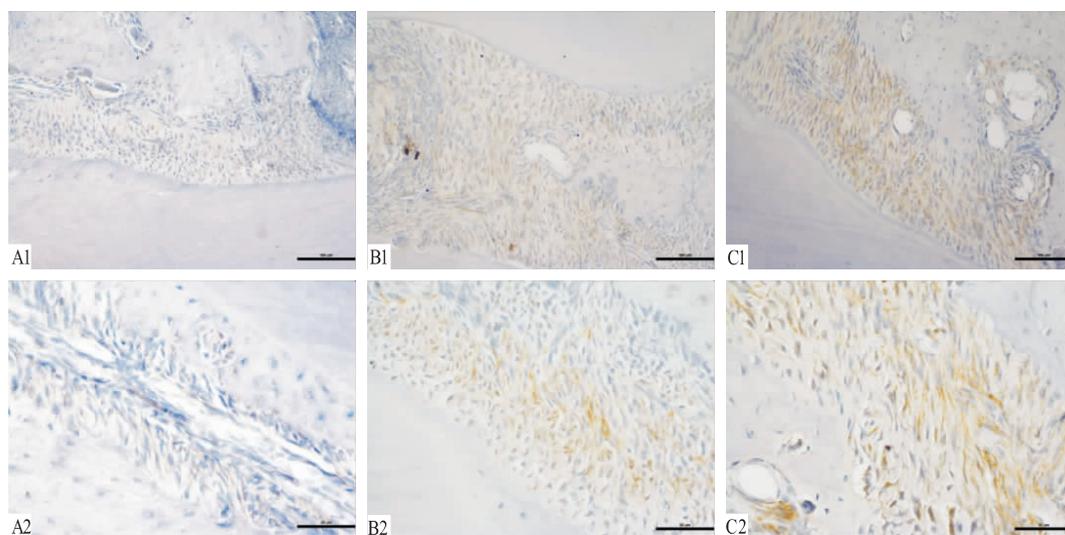
A: N 组; B: P 组; C: E 组; 1: $\times 200$; 2: $\times 400$ 

图5 免疫组化染色检测 OPG 在牙周组织中的表达

A: N 组; B: P 组; C: E 组; 1: $\times 200$; 2: $\times 400$

症反应程度重。而 E 组,用 β -隐黄素干预后炎症反应减轻,牙槽骨丧失量及结合上皮根方迁移距离都明显减少。此结果与 Matsumoto et al^[4] 的研究结果一致,进一步表明注射 12 μg 的 β -隐黄素可以有效抑制牙周炎牙槽骨的吸收。

众所周知, RANKL 与 OC 前体细胞表面的 RANK 受体结合,可以刺激 OC 分化从而导致骨吸收。另一方面, OPG 对 RANKL 有高度的亲和性,可以作为一种可溶性的诱受体,抑制 RANKL 与 RANK 的结合。RANKL/OPG 比值已成为骨吸收的重要参数。RANKL / OPG 比值升高,促进 OC 的产生和活

化,导致骨吸收。在当前的研究中,与 P 组相比, E 组牙周组织中 OPG 的表达升高, RANKL 表达下降, RANKL/OPG 比值降低。此发现与 Nishigaki et al^[3] 的研究结果一致,其先前在体外探索了 β -隐黄素防止骨丢失的机制,发现了 β -隐黄素对牙周膜细胞中 RANKL 和 OPG 表达的影响。这些发现表明 β -隐黄素可通过下调 RANKL/OPG 的比值,减少成熟 OC 的数目来预防牙槽骨的吸收。

牙周炎发生过程中脂质过氧化物水平升高,氧化应激反应增强。近来, Liu et al^[9] 又发现应用 β -隐黄素可以显著抑制镉诱导的脂质过氧化物及丙二

醛水平的升高。 β -隐黄素是否可以通过抑制脂质过氧化物的产生及氧化应激反应来抑制牙周炎的发生发展需要进一步的实验来探索。

β -隐黄素在体内有很高的生物利用度,作为食物来源的成分,其生物安全性已被认证。 β -隐黄素未来有望用于牙周炎的预防和治疗中,但仍需更多的实验来进一步验证。

参考文献

- [1] Chisté R C, Freitas M, Mercadante A Z, et al. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes [J]. *Life Sci*, 2014, 99(1-2): 52-60.
- [2] Min K B, Min J Y. Serum carotenoid levels and risk of lung cancer death in US adults [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(6): 736-43.
- [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): 880-6.
- [4] 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): 860-2.
- [5] Moradi J, Abbasipour F, Zaringhalam J, et al. Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β in a rat model of LPS-induced periodontitis [J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(4): 1319-25.
- [6] Kim M H, Choi Y Y, Lee H J, et al. Topical application of herbal formula for the treatment of ligature-induced periodontitis [J]. *J Periodontal Implant Sci*, 2015, 45(4): 145-51.
- [7] Garcia V G, Longo M, Gualberto Júnior E C, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats [J]. *J Periodontal Res*, 2014, 49(5): 584-94.
- [8] Zhu L, Baczyk D, Lye S J, et al. Preeclampsia is associated with low placental transthyretin levels [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2016, 55(3): 385-9.
- [9] Liu X R, Wang Y Y, Fan H R, et al. Preventive effects of β -cryptoxanthin against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis [J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(6): 920-4.

Effect of β -cryptoxanthin on alveolar bone resorption in rats

Xuan Yaru¹, Wei Xiaoxia², Cui Xiaoyu¹, et al

(¹ Dept of Periodontal, ² Dept of Orthodontic, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

Abstract Objective To evaluate whether β -cryptoxanthin interferes with the alveolar bone resorption of induced periodontitis in rat and explore its possible mechanism *in vivo*. **Methods** Thirty sprague dawley male rats were randomly divided into three groups: normal (N), periodontitis (P), β -cryptoxanthin intervention (E). Periodontitis was induced by ligature placement combined with injection of lipopolysaccharide in bilateral maxillary molars in group P and group E. β -cryptoxanthin (12 μ g/rat) was administered once every 48 hours in group E, a total of three times. The animals were sacrificed on the eighth day and bilateral maxillary bone were removed. Morphological analysis was performed to evaluate the distance between alveolar bone crest (ABC) and enamel-cemental junction on right maxillary specimens. On left maxillary samples, histological and immunohistochemical analyses were performed for the detection of the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) nearby the ABC. The osteoclast (OC) was detected by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). **Results** Group E presented reduced alveolar bone loss (ABL), inflammatory cells, RANKL immunolabeling and TRAP-positive multinucleated cells compared to group P ($P < 0.05$). β -cryptoxanthin treatment increased the genic expression of OPG ($P < 0.05$). Meanwhile, there were no differences about ABL and number of OC between group E and group N. **Conclusion** β -cryptoxanthin may prevent the absorption of alveolar bone by decreasing the number of mature OC by increasing the ratio of OPG/RANKL.

Key words periodontitis; rat; bone resorption; β -cryptoxanthin