

柚皮素调节 cGAS/STING 信号通路对牙周炎大鼠的治疗作用

叶莲妹¹, 齐雪^{2*}

1. 福建省南平市第一医院 口腔科, 福建 南平 353000

2. 同济大学附属上海市第四人民医院 口腔科, 上海 200434

摘要: 目的 探讨柚皮素调节 GMP-AMP 合成酶 (cGAS) /干扰素基因刺激因子 (STING) 信号通路对牙周炎大鼠的治疗作用。方法 取 SD 大鼠通过双侧上颌第一磨牙颈部结扎法建立牙周炎模型, 随机分为模型组、柚皮素 50、100 mg/kg 组及柚皮素 100 mg/kg+ 槲皮素 (RocA) 0.67 mg/kg 组, 每组各 10 只, 另取 10 只正常大鼠不做处理设为对照组。观察大鼠牙周炎症状并以 Micro-CT 扫描其牙槽骨, 评测各组探诊深度 (PD)、龈沟出血指数 (SBI)、牙槽骨吸收量、骨密度、骨体积分数与骨小梁数目; 以苏木精-伊红 (HE) 与抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色分别检测大鼠牙周组织病理形态、炎性细胞数与牙槽骨破骨细胞数; 以酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测量各组大鼠血清与牙周组织炎症因子 C 反应蛋白 (CRP)、白细胞介素 (IL)-6、IL-8 水平; 以免疫印迹法检测各组大鼠牙周组织 cGAS/STING 通路蛋白表达。结果 与对照组相比, 模型组大鼠 PD、SBI、牙槽骨吸收量、炎性细胞数、破骨细胞数、血清与牙周组织 CRP、IL-6、IL-8 水平、cGAS 与 STING 蛋白表达显著升高, 骨密度、骨体积分数与骨小梁数目显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 柚皮素各剂量组大鼠 PD、SBI、牙槽骨吸收量、炎性细胞数、破骨细胞数、血清与牙周组织 CRP、IL-6、IL-8 水平、cGAS 与 STING 蛋白表达均显著降低, 牙槽骨骨密度、骨体积分数与骨小梁数目均升高 ($P<0.05$), 且呈剂量相关性。与柚皮素 100 mg/kg 组比较, 柚皮素+RocA 组大鼠 PD、SBI、牙槽骨吸收量、炎性细胞数、破骨细胞数、血清与牙周组织 CRP、IL-6、IL-8 水平、cGAS 与 STING 蛋白表达显著升高, 牙槽骨骨密度、骨体积分数与骨小梁数目降低 ($P<0.05$)。结论 柚皮素可通过减弱 cGAS/STING 信号活性而抑制牙周炎大鼠炎症, 进而减轻其牙周组织损伤, 缓解其牙槽骨吸收并修复其骨微结构, 最终改善其临床症状。

关键词: 柚皮素; 牙周病; GMP-AMP 合成酶; 干扰素基因刺激因子; C 反应蛋白; 白细胞介素-6

中图分类号: R285; R988.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)08-1954-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.08.003

Effect of naringenin on periodontitis rats by regulating cGAS/STING signaling pathway

YE Lianmei¹, QI Xue²

1. Department of Stomatology, Nanping First Hospital of Fujian Province, Nanping 353000, China

2. Department of Stomatology, The Shanghai Fourth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200434, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of naringenin on periodontitis in rats by regulating the cyclic GMP-AMP synthetase (cGAS)/stimulator of interferon genes (STING) signaling pathway. **Methods** Periodontitis model was established by ligation of bilateral maxillary first molars in SD rats, and the rats were randomly divided into model group, naringin 50, 100 mg/kg groups, and naringin 100 mg/kg + RocA 0.67 mg/kg group, with 10 rats in each group, and 10 normal rats were selected as control group without treatment. The symptoms of periodontitis in rats were observed and their alveolar bone was scanned with Micro CT. The probing depth (PD), gingival sulcus bleeding index (SBI), alveolar bone resorption, bone density, bone volume fraction, and trabecular bone number were evaluated in each group. HE and TRAP stainings were applied to detect the pathological morphology, inflammatory cell count, and alveolar bone osteoclast count of rat periodontal tissue, respectively. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to measure the levels of inflammatory factors C reactive protein (CRP), IL-8 and, IL-6 in serum and periodontal tissue of rats in each group. Immunoblotting was applied to detect the expression of cGAS/STING pathway proteins in the periodontal

收稿日期: 2024-05-09

基金项目: 福建省卫生健康委员会健康科研项目[闽卫中医函 2019 (202) 号]

作者简介: 叶莲妹, 女, 副主任医师, 研究方向为口腔医学。E-mail: yearcony@163.com

*通信作者: 齐雪, 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向为口腔内科龋病。E-mail: Zzb_Sh@163.com

tissues of rats in each group. **Results** Compared with control group, the PD, SBI, alveolar bone resorption, inflammatory cell count, osteoclast count, serum and periodontal tissue CRP, IL-6, IL-8 levels, cGAS and STING protein expression in the model group were obviously increased, but the bone density, bone volume fraction, and number of trabeculae were obviously decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the PD, SBI, alveolar bone resorption, inflammatory cell count, osteoclast count, serum and periodontal tissue CRP, IL-6, IL-8 levels, cGAS and STING protein expression in the each dose of naringenin groups were all reduced, while the alveolar bone density, bone volume fraction, and number of trabeculae were increased ($P < 0.05$), and it was dose-dependent. Compared with naringenin 100 mg/kg group, naringenin + RocA group showed an increase in PD, SBI, alveolar bone resorption, inflammatory cell count, osteoclast count, serum and periodontal tissue CRP, IL-6, IL-8 levels, cGAS and STING protein expression, and a decrease in alveolar bone density, bone volume fraction, and number of trabeculae ($P < 0.05$). **Conclusion** Naringenin can inhibit inflammation in periodontitis rats by reducing cGAS/STING signaling activity, thereby reducing periodontal tissue damage, alleviating alveolar bone resorption, repairing bone microstructure, and ultimately improving clinical symptoms.

Key words: naringenin; periodontal disease; cGAS; STING; CRP; IL-6

牙周炎是口腔科常见的慢性感染性牙周疾病,病理特征以结缔组织丧失、牙骨质破坏与牙槽骨吸收为主,不及时治疗会造成牙齿病变、脱落^[1-2]。口腔卫生环境差引发的菌斑和牙石堆积是牙周炎发生的主要原因,免疫细胞活化及炎症因子过量分泌引发的炎症反应是牙周炎发生的主要病理机制,降低炎症因子表达并抑制炎症可明显缓解牙周炎临床症状^[3-4]。环状 GMP-AMP 合成酶(cGAS)/干扰素基因刺激因子(STING)是一种可识别宿主异常 DNA 和微生物的免疫信号通路,当感染或细胞损伤发生时,该信号激活并促使炎症细胞因子释放,进而介导感染性炎症疾病和自身免疫性疾病发生发展^[5],研究显示,牙龈卟啉单胞菌感染可激活 cGAS/STING,进而导致牙周炎的发生,STING 抑制剂可降低炎症因子表达并抑制破骨细胞形成,进而缓解牙周炎症状^[6],由此可知 Cgas/STING 可能是牙周炎的有效治疗靶点。柚皮素是具有广泛抗炎、免疫调节、抗肿瘤等生物活性的一种天然黄酮类化合物,可减轻脂多糖刺激的人牙周膜干细胞炎症反应,并促进其增殖、迁移、血管形成和成骨分化,在牙槽骨重建再生中发挥积极作用^[7-8],因而推测柚皮素可能通过抑制 cGAS/STING 通路而治疗牙周炎。本研究通过建立牙周炎大鼠,探究柚皮素调节 cGAS/STING 信号通路对其的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 健康清洁级大鼠,购自北京北方艾特生物科技有限公司[SCXK(京)2020-0005],大鼠均为雄性、周龄 6~7 周、体质量 180~210 g,饲养在室温 22~25 °C、12 h/12 h 交替明暗照明、湿度 50%~60%的屏障环境独立动物房中,试验符

合 3R 原则。本实验获得福建省南平市第一医院伦理委员会审批通过(批件号 2022-08)。

1.1.2 主要试剂与仪器 柚皮素(质量分数 99.2%,批号 S-014-210908)购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 槲酰胺(RocA,质量分数 99.40%,货号 M06995)购自北京百奥莱博科技有限公司; 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒购自无锡菩禾生物医药技术有限公司; 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、大鼠白细胞介素(IL)-6、IL-8 与 C-反应蛋白(CRP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自上海沪震实业有限公司; 兔源抗大鼠 anti-cGAS、anti- β -actin、anti-STING 一抗和酶标二抗(HRP,山羊抗兔)购自美国 CST 公司。

SKYSCAN 1276 活体 Micro-CT(北京布鲁克科技有限公司); LD-3060V 冷冻切片机(山东莱恩德智能科技有限公司); CX23 生物显微镜(山东博科再生医学有限公司); 680 酶标仪、Mini Trans-Blot® Cell 转印系统、1708270 凝胶成像仪、Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳系统、PowerPac™ 基础电泳仪电源(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 牙周炎大鼠模型建立及分组 取 SD 健康大鼠禁食 24 h 后采用双侧上颌第 1 磨牙颈部结扎法建立牙周炎模型^[9]: 大鼠按 2 μ L/g ip 2%戊巴比妥钠进行麻醉,然后在大鼠龈沟处放置 4.0 丝线结扎左侧上颌第 1 磨牙,同时割破此处牙龈 1 mm,1 周后观察大鼠牙周组织症状,若出现深牙周袋、牙龈红肿且探诊出血现象,提示牙周炎模型建立成功。将模型大鼠随机分为柚皮素 50、100 mg/kg 组以及柚皮素+RocA 组,每组 10 只,另取 10 只 SD 正常大鼠不做处理设为对照组。

柚皮素、RocA 溶解于 0.9%氯化钠溶液中，配制为 5、10 mg/mL 柚皮素药液和 0.067 mg/mL RocA 药液，柚皮素 50、100 mg/kg 组 ig 50、100 mg/kg 柚皮素，柚皮素+RocA 组大鼠 ig 100 mg/kg 柚皮素，同时 ip 0.67 mg/kg RocA^[10-11]，各组均 1 次/d 给药，模型组、对照组大鼠以 0.9%氯化钠溶液干预处理，各组大鼠均处理 2 周。

1.2.2 大鼠牙周炎症状和牙槽骨微结构检测标本采集 2 周药物干预完成后 24 h 用圆头探针（尖端直径 0.3 mm）检测各组大鼠探诊深度（PD），然后评测其龈沟出血指数（SBI）：牙龈健康且龈沟探诊无出血，评 0 分；牙龈轻度发炎且龈沟探诊轻微出血，评 1 分；牙龈轻度发炎、颜色改变且龈沟探诊点状出血，评 2 分；牙龈中度发炎、颜色改变、水肿轻微且探诊出血，评 3 分；牙龈发炎严重、颜色改变、水肿明显且探诊出血，评 4 分；牙龈发炎严重、颜色改变、水肿明显、出现溃疡且自发性出血，评 5 分^[12]。

以 1.2.1 项下方法麻醉各组大鼠后自其腹主动脉中采血、离心，收集上清，所得血清存在-80℃冰柜内；过量吸入 CO₂ 处死各组大鼠，分离取出其下颌第一磨牙牙周和牙槽骨组织，对左侧牙槽骨清洗后用活体 Micro-CT 进行三维扫描，分析其牙槽骨骨密度、骨小梁数目、骨体积分数，并测量其牙槽嵟顶到釉牙骨质界的距离作为牙槽骨吸收量。将右侧牙周组织剪下约 300 mg 存在液氮中，剩余牙周和牙槽骨组织清洗后放入 10%甲醛中固定，24 h 后放入乙二胺四乙酸中脱钙，以 30%蔗糖脱水 48 h，然后以 OCT 包埋后冷冻并做冷冻病理切片（厚 4 μm）备用。

1.2.3 HE 与 TRAP 染色分别检测大鼠牙周组织病理形态、炎性细胞数与牙槽骨破骨细胞数 将 1.2.2 项下的牙周和牙槽骨组织冷冻切片取出后室温下静置 5 min 进行复温，以冷丙酮固定后分别孵育 HE 和 TRAP 染液，遵循 HE 和 TRAP 染色试剂盒说明

书中方法进行染色，清洗、封片、显微镜下观察并拍摄，用图像分析软件 Image-pro plus 6.0 量化视野内牙槽骨组织破骨细胞（被染成粉红至深红色）数和牙槽骨嵟上方 500 μm×300 μm 结缔组织中炎症细胞数。

1.2.4 ELISA 测量各组大鼠血清与牙周组织炎症因子水平 取出 1.2.2 项下存在液氮中的牙周组织，在冰水浴中用组织匀浆机碾碎、匀浆、离心，收集上清得组织样品液，按 BCA 法测量其中蛋白浓度，每组取 200 μL 按 ELISA 试剂盒说明书中方法测量其中炎症因子 CRP、IL-6 水平；取出 1.2.2 项下的血清，在冰水浴中解冻，每组取 200 μL 按同样方法测量其中炎症因子 CRP、IL-6、IL-8 水平。

1.2.5 免疫印迹法检测各组大鼠牙周组织 cGAS/STING 通路蛋白表达 取 1.2.4 项下剩余的牙周组织样品液，根据蛋白浓度测量结果每组取 40 μg 蛋白样本进行电泳、电转、封闭，孵育兔源抗大鼠 anti-cGAS、anti-β-actin、anti-STING 一抗（均稀释 2 000 倍、4℃、13 h），充分漂洗后孵育酶标二抗（稀释 1 000 倍、室温、3 h），充分漂洗后按增强化学发光法显色，凝胶成像仪中采集各组蛋白图像并以 Image-pro plus 6.0 软件量化其相对表达。

1.3 数据分析

实验数据用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析，同时以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示，采用单因素方差分析比较多组间差异，两两之间差异进一步比较进行 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 柚皮素对大鼠牙周炎临床指标的影响

与对照组相比，模型组大鼠 PD、SBI、牙槽骨吸收量均显著升高（ $P < 0.05$ ）；与模型组比较，柚皮素各剂量组大鼠 PD、SBI、牙槽骨吸收量均显著降低（ $P < 0.05$ ），且呈剂量相关性；与柚皮素 100 mg/kg 组比较，柚皮素+RocA 组大鼠 PD、SBI、牙槽骨吸收量均显著升高（ $P < 0.05$ ），见表 1。

表 1 各组大鼠 PD、SBI 与牙槽骨吸收量（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 10$ ）

Table 1 PD, SBI and alveolar bone absorption of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	SBI	PD/mm	牙槽骨吸收量/mm
对照	—	0.00±0.00	0.24±0.03	0.22±0.04
模型	—	4.10±0.83*	1.20±0.12*	0.91±0.10*
柚皮素	50	2.30±0.67#	0.71±0.09#	0.62±0.06#
	100	0.60±0.49#&	0.28±0.05#&	0.25±0.03#&
柚皮素+RocA	100+0.67	3.90±0.76@	1.17±0.11@	0.87±0.08@

与对照组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ；与柚皮素 50 mg kg⁻¹组比较：& $P < 0.05$ ；与柚皮素 100 mg kg⁻¹组比较：@ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs naringenin 50 mg kg⁻¹ group; @ $P < 0.05$ vs naringenin 100 mg kg⁻¹ group.

2.2 柚皮素对牙槽骨超微结构的影响

与对照组相比,模型组大鼠牙槽骨骨密度、骨体积分数、骨小梁数目均显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,柚皮素各剂量组大鼠牙槽骨骨密度、

骨体积分数、骨小梁数目均显著升高 ($P<0.05$),且呈剂量相关性;与柚皮素 100 mg/kg 组比较,柚皮素+RocA 组大鼠牙槽骨骨密度、骨体积分数、骨小梁数目显著降低 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠牙槽骨骨密度、骨体积分数、骨小梁数目 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Bone density, bone volume fraction and trabecular number of alveolar bone of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	骨密度/(mg cm ⁻³)	骨体积分数/%	骨小梁数目/(1 mm ⁻¹)
对照	—	930.48±39.86	98.05±4.12	5.56±0.21
模型	—	419.15±25.37*	75.21±2.83*	3.71±0.13*
柚皮素	50	668.32±30.61 [#]	86.13±3.35 [#]	4.60±0.14 [#]
	100	917.65±34.95 ^{#&}	95.30±3.64 ^{#&}	5.49±0.15 ^{#&}
柚皮素+RocA	100+0.67	431.14±31.75 [@]	78.01±2.91 [@]	3.76±0.12 [@]

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: [#] $P<0.05$;与柚皮素 50 mg kg⁻¹组比较: [&] $P<0.05$;与柚皮素 100 mg kg⁻¹组比较: [@] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs naringenin 50 mg kg⁻¹ group; [@] $P<0.05$ vs naringenin 100 mg kg⁻¹ group.

2.3 柚皮素对大鼠牙周组织病理形态的影响

对照组大鼠牙周组织形态清晰、完整,正常且无病理损伤;与对照组相比,模型组大鼠牙周组织发生明显病理损伤现象:牙周上皮破裂且膜纤维排列紊乱,牙槽嵴有明显吸收且牙槽骨内可见骨吸收陷窝,牙周组织有明显炎性细胞浸润,炎性细胞数

均显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,柚皮素各剂量组大鼠牙周组织病理损伤减轻,炎性细胞数均降低 ($P<0.05$),且呈剂量相关性;与柚皮素 100 mg/kg 组比较,柚皮素+RocA 组大鼠牙周组织病理损伤加重,炎性细胞数显著升高 ($P<0.05$),见图 1、表 3。

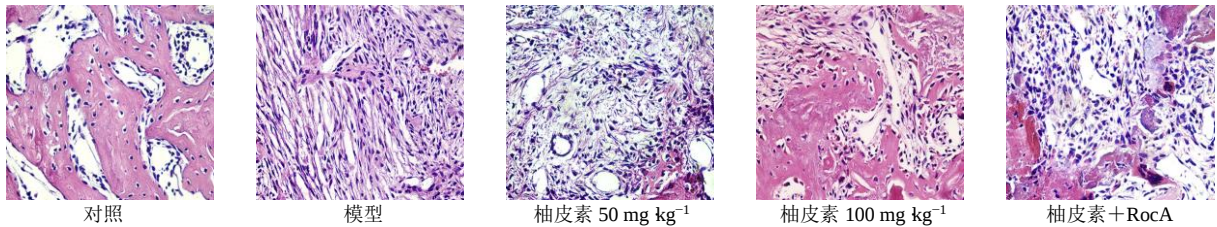


图 1 HE 染色检测各组大鼠牙周组织病理形态 ($\times 400$)

Fig. 1 HE staining to detect the pathological morphology of periodontal tissue of rats in each group ($\times 400$)

表 3 各组大鼠炎性细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Number of inflammatory cells in rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	炎症细胞数/个
对照	—	41.82±12.25
模型	—	294.13±23.31*
柚皮素	50	172.95±18.76 [#]
	100	49.60±11.95 ^{#&}
柚皮素+RocA	100+0.67	278.96±21.65 [@]

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: [#] $P<0.05$;与柚皮素 50 mg kg⁻¹组比较: [&] $P<0.05$;与柚皮素 100 mg kg⁻¹组比较: [@] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs naringenin 50 mg kg⁻¹ group; [@] $P<0.05$ vs naringenin 100 mg kg⁻¹ group.

2.4 柚皮素对大鼠牙槽骨破骨细胞数的影响

与对照组相比,模型组大鼠牙槽骨破骨细胞数显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,柚皮素各剂量组大鼠牙槽骨破骨细胞数均显著降低 ($P<0.05$),且呈剂量相关性;与柚皮素 100 mg/kg 组比较,柚皮素+RocA 组大鼠牙槽骨破骨细胞数显著升高 ($P<0.05$),见图 2、表 4。

2.5 柚皮素对大鼠血清与牙周组织炎症因子水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清与牙周组织 CRP、IL-6、IL-8 水平均显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,柚皮素各剂量组大鼠血清与牙周组织 CRP、IL-6、IL-8 水平均显著降低 ($P<0.05$),且呈剂量相关性;与柚皮素 100 mg/kg 组比较,柚皮素+

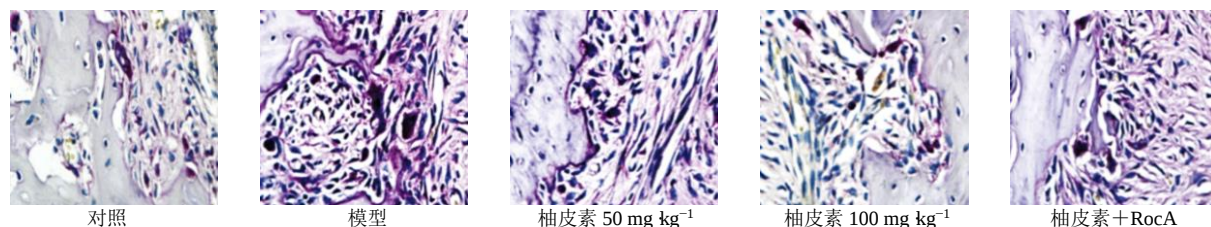


图 2 TRAP 染色检测各组大鼠牙槽骨破骨细胞 (×400)

Fig. 2 TRAP staining detection of alveolar osteoclasts of rats in each group (×400)

表 4 各组大鼠破骨细胞数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Number of osteoclasts in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	破骨细胞数/个
对照	—	0.16 ± 0.05
模型	—	3.50 ± 0.24*
柚皮素	50	1.91 ± 0.16 [#]
	100	0.43 ± 0.13 ^{#&}
柚皮素+RocA	100+0.67	3.24 ± 0.20 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与柚皮素 50 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与柚皮素 100 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs naringenin 50 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs naringenin 100 mg kg⁻¹ group.

表 5 各组大鼠血清与牙周组织 CRP、IL-6、IL-8 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Levels of CRP, IL-6 and IL-8 in serum and periodontal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	血清/(μg mL ⁻¹)			牙周组织/(pg mL ⁻¹)		
		CRP/(μg mL ⁻¹)	IL-6/(pg mL ⁻¹)	IL-8/(pg mL ⁻¹)	CRP/(μg mL ⁻¹)	IL-6/(pg mL ⁻¹)	IL-8/(pg mL ⁻¹)
对照	—	40.63 ± 11.38	51.67 ± 14.18	40.63 ± 12.17	74.63 ± 18.39	80.14 ± 21.15	71.76 ± 15.03
模型	—	151.72 ± 20.95*	193.49 ± 26.37*	213.45 ± 21.39*	246.59 ± 30.12*	279.43 ± 34.56*	263.48 ± 26.12*
柚皮素	50	98.31 ± 15.63 [#]	127.53 ± 20.95 [#]	129.52 ± 17.94 [#]	162.35 ± 23.61 [#]	188.72 ± 27.32 [#]	167.56 ± 20.13 [#]
	100	46.80 ± 12.24 ^{#&}	58.02 ± 15.64 ^{#&}	45.01 ± 13.60 ^{#&}	81.73 ± 20.12 ^{#&}	87.63 ± 23.04 ^{#&}	78.01 ± 14.95 ^{#&}
柚皮素+RocA	100+0.67	143.15 ± 19.72 [@]	182.98 ± 25.86 [@]	204.14 ± 20.83 [@]	235.97 ± 29.18 [@]	265.87 ± 35.13 [@]	254.80 ± 25.31 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与柚皮素 50 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与柚皮素 100 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs naringenin 50 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs naringenin 100 mg kg⁻¹ group.

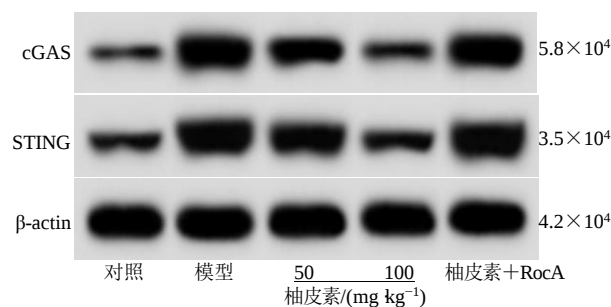


图 3 免疫印迹检测各组大鼠牙周组织 cGAS/STING 通路蛋白表达

Fig. 3 Western blot detection of cGAS/STING pathway protein expression in periodontal tissues of rats in each group

RocA 组大鼠血清与牙周组织 CRP、IL-6、IL-8 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.6 柚皮素对大鼠牙周组织 cGAS/STING 通路相关蛋白的影响

与对照组相比, 模型组大鼠牙周组织 cGAS 与 STING 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 柚皮素各剂量组大鼠牙周组织 cGAS 与 STING 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性 ($P < 0.05$); 与柚皮素 100 mg/kg 组比较, 柚皮素+RocA 组大鼠牙周组织 cGAS 与 STING 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$), 见图 3、表 6。

表 6 各组大鼠牙周组织 cGAS 与 STING 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Expression of cGAS and STING in periodontal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	cGAS/β-actin	STING/β-actin
对照	—	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.06
模型	—	1.08 ± 0.12*	1.16 ± 0.14*
柚皮素	50	0.62 ± 0.07 [#]	0.70 ± 0.09 [#]
	100	0.18 ± 0.04 ^{#&}	0.25 ± 0.07 ^{#&}
柚皮素+RocA	100+0.67	1.05 ± 0.11 [@]	1.13 ± 0.12 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与柚皮素 50 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与柚皮素 100 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs naringenin 50 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs naringenin 100 mg kg⁻¹ group.

3 讨论

祛除牙结石、牙菌斑并辅助应用抗菌药是目前临床中治疗牙周炎的主要方法,但长期应用会导致致病菌耐药性增强,进而导致疗效明显减弱,因此还需探索疗效更好且耐用的新型治疗药物^[13-14]。本研究采用双侧上颌第一磨牙颈部结扎法建立牙周炎模型,结果显示造模大鼠血清与牙周组织炎症因子CRP、IL-6、IL-8水平相比对照组大鼠明显升高,引发牙周组织炎症,引发牙周上皮破裂且膜纤维排列紊乱,牙槽骨吸收明显且出现骨吸收陷窝,炎性细胞明显浸润牙周组织,导致牙周组织破损及牙槽骨丢失,造成大鼠牙龈红肿、探诊出血并形成深牙周袋,揭示牙周炎模型建立成功。

致病菌入侵可诱导宿主免疫激活,诱发炎症因子过量表达分泌,进而引发牙周炎症,最终造成牙周组织破坏和牙槽骨丢失等牙周炎症状,通过调控免疫限制、减轻炎症是治疗牙周炎的有效策略^[15-16]。柚皮素是广泛存在于柑橘类水果中黄酮类物质,作为一种天然抗炎与免疫调节剂,可通过抑制炎症而抑制脂多糖诱导的人牙周膜干细胞凋亡并促使其成骨分化^[7],还可促进骨髓间充质干细胞、人牙髓干细胞迁移和成骨成牙分化,在牙组织工程和牙槽骨重建中具有广大应用潜力^[17]。本研究以不同剂量柚皮素干预治疗牙周炎大鼠,结果显示,相比模型组大鼠,经柚皮素治疗后的牙周炎大鼠PD、SBI、牙槽骨吸收量、炎性细胞数、破骨细胞数、血清与牙周组织CRP、IL-6、IL-8水平均降低,牙槽骨骨密度、骨体积分数与骨小梁数目均升高,且100 mg/kg柚皮素对上述病理指标的影响更强,表明柚皮素可降低炎症因子表达分泌水平,阻止炎症反应发生与发展,进而减轻牙周炎大鼠牙周组织炎性损失及牙槽骨吸收,最终减轻其牙周炎临床症状,且呈现剂量相关性,提示柚皮素具有明显的牙周炎治疗潜力。

cGAS/STING是机体重要的先天免疫信号通路,在微生物感染引发的炎症性疾病中过度激活,进而引发炎症因子过度表达释放,并与炎症疾病一系列复杂的病理过程密切相关^[18],Yang等^[19]的研究表明cGAS在根尖牙周病变组织中的表达水平显著升高,并参与炎症因子表达,是根尖牙周炎的病因之一,而Liu等^[20]的研究显示柚皮素可通过阻止cGAS/STING信号通路激活而抑制炎症因子释放,进而减轻顺铂诱导的急性肾组织炎性损伤,因而预测柚皮素治疗牙周炎大鼠的作用机制可能是抑

制cGAS/STING信号通路激活。本研究结果显示,相比对照组大鼠,模型组大鼠牙周组织cGAS与STING蛋白表达显著升高,以柚皮素治疗后其蛋白变化趋势被逆转,表明cGAS/STING信号通路参与调控柚皮素对牙周炎大鼠的治疗作用;以柚皮素和cGAS/STING信号激活剂RocA联合干预牙周炎大鼠,可减弱柚皮素单独干预对牙周炎大鼠炎症因子表达的降低作用,拮抗其对牙周炎大鼠炎症的抑制作用,削弱其对牙周炎大鼠牙周组织炎性损失及牙槽骨吸收的减轻作用,最终逆转其对牙周炎大鼠牙周炎临床症状的改善作用,提示柚皮素是通过抑制cGAS/STING信号通路激活而治疗牙周炎大鼠的。

综上所述,柚皮素可明显降低cGAS与STING蛋白的相对表达,进而降低牙周炎大鼠牙周炎症因子水平,妨碍大鼠炎症产生与进展,减轻其牙周组织炎性损失及牙槽骨吸收,最终显著改善其牙周炎临床症状,阻止cGAS/STING信号通路激活能是其药理机制之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nasiri K, Masoumi S M, Amini S, et al. Recent advances in metal nanoparticles to treat periodontitis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 283.
- [2] Cao J W, Zhang Q, Yang Q Y, et al. Epigenetic regulation of osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in periodontitis [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(7): 2529-2537.
- [3] Alghamdi B, Jeon H H, Ni J, et al. Osteoimmunology in periodontitis and orthodontic tooth movement [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2023, 21(2):128-146.
- [4] Li S Y, Su L, Luan Q X, et al. Regulatory B cells induced by interleukin-35 inhibit inflammation and alveolar bone resorption in ligature-induced periodontitis [J]. *J Periodontol*, 2023, 94(11): 1376-1388.
- [5] Hong Z, Ma T C, Liu X, et al. cGAS-STING pathway: Post-translational modifications and functions in sterile inflammatory diseases [J]. *FEBS J*, 2022, 289(20): 6187-6208.
- [6] Bi R, Yang Y L, Liao H W, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces an inflammatory response via the cGAS-STING signaling pathway in a periodontitis mouse model [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1183415.
- [7] 李胜鸿, 彭世元, 罗小玲, 等. 柚皮素通过基质细胞衍生因子1/趋化因子受体4信号轴对脂多糖作用下人牙周膜干细胞抗炎、成血管和成骨分化能力的影响 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2023, 41(2): 175-184.
- [8] 王丹, 彭莉, 周燕红. 柚皮素抗肿瘤作用的研究进展

- [J]. 中草药, 2021, 52(10): 3151-3156.
- [9] 王知刚, 胡聪, 张波. 木犀草素调控 OPG 对牙周炎大鼠干预效果及作用机制 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(24): 6025-6028.
- [10] 黄浦洋, 江强, 黄巧霞, 等. 基于 TLR4/MAPK 信号通路探讨柚皮素对类风湿关节炎大鼠的治疗作用 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(15): 3769-3774.
- [11] 张士伟, 程慎令, 邢启峰. 茯苓酸通过抑制 cGAS-STING 信号通路减轻溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞损伤 [J]. 免疫学杂志, 2023, 39(8): 672-680.
- [12] 任百洁, 姚红英. 雷公藤多苷抗大鼠实验性牙周炎的研究 [J]. 现代口腔医学杂志, 2022, 36(1): 10-14.
- [13] Huang Z Y, Zhao Q T, Jiang X R, *et al.* The mechanism of efferocytosis in the pathogenesis of periodontitis and its possible therapeutic strategies [J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 113(4): 365-375.
- [14] Trindade D, Carvalho R, Machado V, *et al.* Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies [J]. *J Clin Periodontol*, 2023, 50(5): 604-626.
- [15] Branco-de-Almeida L S, Velsko I M, de Oliveira I C V, *et al.* Impact of treatment on host responses in young individuals with periodontitis [J]. *J Dent Res*, 2023, 102(5): 473-488.
- [16] Li J X, Mehrabian M, Mivehchi H, *et al.* The homeostasis and therapeutic applications of innate and adaptive immune cells in periodontitis [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(7): 2552-2564.
- [17] Kim Y, Park H J, Kim M K, *et al.* Naringenin stimulates osteogenic/odontogenic differentiation and migration of human dental pulp stem cells [J]. *J Dent Sci*, 2023, 18(2): 577-585.
- [18] Elmanfi S, Yilmaz M, Ong W W S, *et al.* Bacterial cyclic dinucleotides and the cGAS-cGAMP-STING pathway: A role in periodontitis? [J]. *Pathogens*, 2021, 10(6): 675.
- [19] Yang F, Liu L, Wang L, *et al.* The expression of cyclic GMP-AMP synthase in human apical periodontitis: A laboratory investigation [J]. *Int Endod J*, 2023, 56(6): 710-721.
- [20] Liu S, Gao X T, Yin Y L, *et al.* Silk fibroin peptide self-assembled nanofibers delivered naringenin to alleviate cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting mtDNA-cGAS-STING pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 177: 113844.

[责任编辑 高源]