

黄芪多糖对实验性牙周炎骨吸收的影响

韩亚琨, 于程程

吉林医药学院附属医院 口腔科, 吉林 吉林 132013

摘要:目的 分析黄芪多糖对实验性牙周炎大鼠模型骨吸收的影响, 评估黄芪多糖对牙槽骨炎性吸收的保护作用。方法 SD大鼠随机分为对照组、模型组、黄芪多糖(100、200、500 mg/kg)组。除对照组外, 其余各组大鼠采用引菌法制备右上磨牙牙周炎模型, 黄芪多糖组分别ig给予黄芪多糖 100、200、500 mg/kg, 对照组和模型组ig给予等量生理盐水。4周后处死大鼠, 测量右上牙槽骨吸收状况及血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)水平, 同时测量血清总抗氧化态(TOS)、总还原态(TAS)水平, 并计算氧化应激指数(OSI)。结果 随黄芪多糖剂量的增加, 大鼠牙槽骨吸收量、TOS、OSI明显下降, TAS、RANKL、RANKL/OPG明显上升, 差异显著($P < 0.05$); 各组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、OPG水平差异无显著性($P > 0.05$)。结论 黄芪多糖可通过下调OSI及RANKL/OPG抑制牙周炎性骨吸收。

关键词: 黄芪多糖; 牙周炎; 骨代谢; 氧化应激指数; 核因子- κ B受体活化因子配体

中图分类号: R781.4, R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0423-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.022

Effect of astragalus polysacharin on bone resorption in experimental periodontitis

HAN Ya-kun, YU Cheng-cheng

Dental Department, Affiliated Hospital of Jilin Medical University, Jilin 132013, China

Abstract: Objective To analyze the effect of astragalus polysacharin (APC) on bone resorption in experimental periodontitis, and evaluate its protective function of inflammatory resorption of alveolar bone in periodontitis. **Methods** SD rats were randomly divided into five equal groups: control group, model group, and APC low [LD: 100 mg/(kg·d)], medium [MD: 200 mg/(kg·d)], and high dose [HD: 500 mg/(kg·d)] treatment groups. The periodontitis models were established through *Porphyromonas gingivalis* attracting. APC [LD: 100 mg/(kg·d); MD: 200 mg/(kg·d); HD: 500 mg/(kg·d)] gavage was given to treatment groups, and the same amount of normal saline was given to control and model groups. The rats executed after four weeks, their CEJ-ABC distance (CAD) and expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , TOS, TAS, RANKL, OPG in their serum was evaluated, and the oxidative stress index (OSI) was calculated. **Results** As APC amount increased, CAD, TOS, and OSI levels were declined significantly; While TAS, RANKL, RANKL/OPG levels were improved significantly; There was no significantly change on IL-1 β , IL-6, TNF- α , and OPG levels among groups. **Conclusion** APC prevents alveolar bone from oxidative stress and inflammatory damage by down-regulating OSI and RANKL/OPG.

Key words: astragalus polysacharin; periodontitis; bone metabolism; oxidative stress index; RANKL

牙周炎是牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌等牙周致病菌感染所造成的牙周支持组织疾病, 其临床表现主要为牙龈炎症、牙槽骨吸收、牙周袋形成及牙齿松动^[1]。晚期牙周炎是造成患者失牙的主要原因。除可影响口腔功能外, 牙周炎还被证实与心脑血管疾病、糖尿病及肿瘤等多种系统性疾病密切相关^[2]。因此, 牙周炎得到了越来越多的关注。

黄芪多糖(astragalus polysacharin)是黄芪的主要活性成分, 具有抗炎、抗衰老、抗肿瘤及提高免疫力等多重功效^[3-4]。由于黄芪可入肾经, 且中医理论认为肾主骨生髓, 因此黄芪多糖也被应用于骨代谢相关疾病的研究与治疗中^[5-6]。本研究拟通过分析黄芪多糖对实验性牙周炎动物模型骨吸收状况、血清中骨代谢相关炎症因子及氧化应激状态等病理指

收稿日期: 2018-06-04

基金项目: 吉林省中医药科技项目(2018127)

作者简介: 韩亚琨(1986—), 男, 黑龙江鸡东人, 博士, 主治医师, 主要从事牙周疾病基础与临床研究。E-mail: 84665842@qq.com

标的影响,来评价黄芪多糖对牙周炎性骨吸收的抑制作用,以期为后续研究提供参考。

1 材料

健康SD大鼠,8周龄,体质量200~220 g,辽宁长生生物技术有限公司,许可证号SCXK(辽)2015-0001;黄芪多糖(质量分数98%,上海源叶生物科技有限公司,批号ZD1219LA13);白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)的ELISA试剂盒(武汉优尔生商贸技术有限公司);血清总氧化态(TOS)、总还原态(TAS)检测试剂盒(Rel Assay Diagnostics公司);牙龈卟啉单胞菌(广东省微生物菌种保藏中心)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

50只SD大鼠随机分为5组,分别为对照组、模型组、黄芪多糖(100、200、500 mg/kg)组,每组10只大鼠。除对照组外,其余各组采用引菌法制备右上磨牙牙周炎模型。具体方法如下:将含2%羧甲基纤维素的牙龈卟啉单胞菌W83(1×10^{10} CFU/mL)菌液使用牙周探针均匀涂抹于磨牙区各牙龈沟内,每只1 mL,连续7 d。于引菌后次日开始给药,黄芪多糖各组分别ig给予黄芪多糖100、200、500 mg/kg,对照组、模型组ig给予等量生理盐水。连续给药4周后,10%水合氯醛麻醉取腹主动脉血,血液样本3 200 $\times$ g离心10 min后取上清,-80 $^{\circ}$ C保存备用。然后处死大鼠,分离其右上颌骨。

2.2 指标检测

采用ELISA试剂盒分析各组大鼠血清样本中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、RANKL、OPG的量;采用检测试剂盒检测血清中TOS、TAS,并计算血清氧化应激指数(OSI, OSI=TOS/TAS);测量右上第1、2、3磨牙釉牙骨质界(cemento-enamel junction,

CEJ)与牙槽嵴顶(alveolar bone crest, ABC)间距离(CEJ-ABC distance, CAD),用以评估牙槽骨吸收情况。测量方法示意图见图1。

$$CAD=[\text{颊侧}(a+b+c+d)+\text{舌侧}(a+b+c+d)]/2$$

2.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行分析,组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠牙槽骨吸收情况

与对照组相比,模型组及黄芪多糖各组大鼠均表现出一定程度的牙槽骨吸收现象,但黄芪多糖各组,随着黄芪多糖剂量的增加,骨吸收情况有所减轻,与模型组比较,CAD显著降低($P<0.05$)。说明黄芪多糖可有效降低牙周炎大鼠的骨破坏程度。结果见表1及图2。

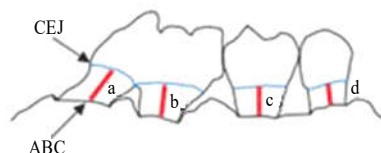


图1 牙周骨吸收率检测示意图

Fig. 1 Diagrammatic sketch of evaluating alveolar bone resorption

表1 各组大鼠CAD测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Total CAD of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg $\cdot$ kg $^{-1}$)	CAD/ μ m
对照	—	491.56 $\pm$ 82.43
模型	—	1 276.33 $\pm$ 299.05*
黄芪多糖	100	1 199.45 $\pm$ 205.91*
	200	1 121.83 $\pm$ 217.68**
	500	957.38 $\pm$ 174.26**

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: ** $P<0.05$, 下同

* $P<0.05$ vs control group; ** $P<0.05$ vs model group, same as below

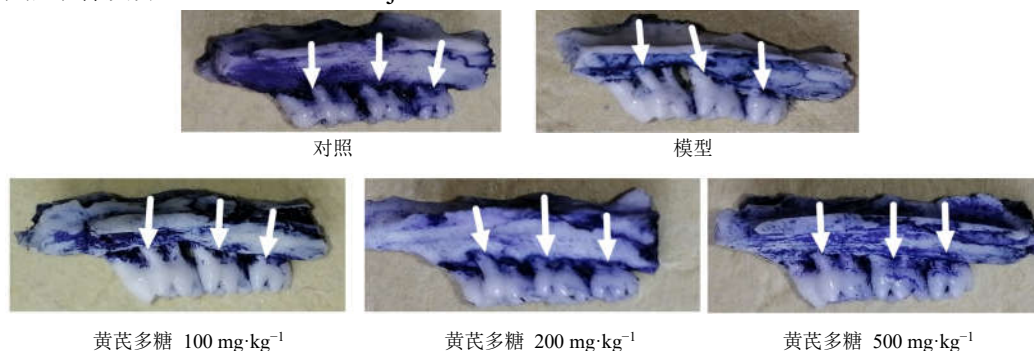


图2 各组大鼠牙槽骨吸收情况

Fig. 2 Alveolar bone resorption of each group

3.2 各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较

模型组及黄芪多糖各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著高于对照组 ($P<0.05$)。与模型组比较,黄芪多糖各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平无明显变化 ($P>0.05$),且 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平与黄芪多糖剂量无关。结果见表 2。

3.3 各组大鼠血清 TOS、TAS 及 OSI 水平

与对照组相比,模型组大鼠血清 TOS 显著上升、TAS 显著下降、OSI 显著上升 ($P<0.05$);在黄芪多糖组中,低、中剂量组各指标均明显异于对照组 ($P<0.05$),而高剂量组大鼠血清中仅 TAS 表

现出显著下降 ($P<0.05$),TOS、OSI 虽有上升,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较,除黄芪多糖低剂量组 TAS 外,其余 TOS、TAS 及 OSI 水平均差异显著 ($P<0.05$)。此外,黄芪多糖剂量与 TOS、TAS 及 OSI 水平呈明显的线性相关,其中 TOS、OSI 为负相关,TAS 为正相关。见表 3。

3.4 各组大鼠血清 RANKL、OPG 水平

各组大鼠血清中 OPG 水平无显著差异。与对照组相比,模型组大鼠血清中 RANKL 及 RANKL/OPG 均升高 ($P<0.05$)。黄芪多糖组中,大鼠血清 RANKL 及 RANKL/OPG 随剂量增加表现出下降趋势,指标逐渐回复至对照组水平。见表 4。

表 2 各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	4.8 $\pm$ 1.9	13.6 $\pm$ 4.3	43.7 $\pm$ 8.1
模型	—	8.0 $\pm$ 3.6*	23.2 $\pm$ 8.5*	62.4 $\pm$ 9.9*
黄芪多糖	100	7.7 $\pm$ 2.9*	20.7 $\pm$ 7.0*	59.5 $\pm$ 7.3*
	200	7.9 $\pm$ 6.3*	19.5 $\pm$ 4.4*	63.3 $\pm$ 8.9*
	500	7.4 $\pm$ 1.6*	21.8 $\pm$ 9.5*	56.4 $\pm$ 10.1*

表 3 各组大鼠血清中 TOS、TAS 及 OSI 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Levels of TOS, TAS, and OSI in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TOS/(μ mol·L ⁻¹)	TAS/(mmol·L ⁻¹)	OSI($\times$ 100)
对照	—	15.88 $\pm$ 5.34	1.12 $\pm$ 0.28	1.42 $\pm$ 0.47
模型	—	24.02 $\pm$ 4.26*	0.60 $\pm$ 0.26*	4.00 $\pm$ 0.63*
黄芪多糖	100	21.68 $\pm$ 6.71* [#]	0.64 $\pm$ 0.37*	3.38 $\pm$ 0.79* [#]
	200	20.13 $\pm$ 5.55* [#]	0.75 $\pm$ 0.34* [#]	2.68 $\pm$ 0.71* [#]
	500	17.95 $\pm$ 4.47 [#]	0.91 $\pm$ 0.23* [#]	1.56 $\pm$ 0.38 [#]

表 4 各组大鼠血清中 RANKL、OPG 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Levels of RANKL and OPG in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	RANKL/(pg·mL ⁻¹)	OPG/(pg·mL ⁻¹)	RANKL/OPG
对照	—	74.71 $\pm$ 12.01	133.39 $\pm$ 25.67	0.56 $\pm$ 0.21
模型	—	85.93 $\pm$ 18.77*	126.17 $\pm$ 39.89	0.68 $\pm$ 0.15*
黄芪多糖	100	83.44 $\pm$ 20.09*	129.97 $\pm$ 31.55	0.64 $\pm$ 0.29*
	200	80.71 $\pm$ 21.63	132.66 $\pm$ 24.21	0.61 $\pm$ 0.18
	500	73.99 $\pm$ 15.48 [#]	135.10 $\pm$ 21.82	0.55 $\pm$ 0.13 [#]

4 讨论

黄芪多糖是黄芪的主要有效成分,其由葡萄糖、果糖、半乳糖等多种单糖结合而成^[7]。基于中医理论,黄芪多糖被广泛应用于骨代谢相关疾病的研究与治疗。骨代谢平衡主要由成骨细胞及破骨细

胞维持,当二者功能异常时,则出现骨代谢紊乱^[8]。在牙周炎病理过程中,牙周致病菌的作用及自身免疫反应均导致局部破骨细胞大量的分化增殖,使得骨吸收速度及量高于骨形成,从而导致牙槽骨吸收^[9]。在本研究中,黄芪多糖各组大鼠牙槽骨

吸收程度显著轻于模型组,说明黄芪多糖对牙槽骨炎性吸收有一定的保护作用。

黄芪多糖可有效地促进成骨细胞的增殖与分化,并提高骨碱性磷酸酶的活性,增加骨形成量。研究发现,黄芪多糖可上调骨形成蛋白(BMP)的表达^[10]。BMP是成骨活动中重要的调节因子,它可单独诱导间充质干细胞定向分化为成骨细胞^[11]。BMP通过Smad及P38-MAPK信号通路来调节成骨细胞^[12]。首先,BMP与其受体BMPR结合并使之磷酸化,活化的BMPR作用于R-Smad进而促进干细胞成骨向分化^[13];其次,BMP-BMPR复合体还可通过骨桥蛋白作用于TAK1,从而激活P38-MAPK信号通路,并促骨钙素、骨涎蛋白等骨形成因子的表达,加速骨形成^[14]。

此外,黄芪多糖还可抑制破骨细胞的活性,减少破骨活动。破骨细胞的分化、增殖与活化主要由RANKL/OPG通路调节^[15]。在本研究中,黄芪多糖虽然未影响OPG水平,但可显著下调牙周炎模型大鼠血清中RANKL水平,进而下调RANKL/OPG值。RANKL及OPG均为肿瘤坏死因子超家族成员,二者可竞争性地与破骨前体细胞表面的核因子 κ B受体活化因子(RANK)相结合^[16]。当RANKL与RANK相结合时,破骨前体细胞分化为破骨细胞行使功能,当OPG与RANK结合时,破骨细胞不能生成,破骨活动减弱^[17]。研究证实,黄芪多糖可有效抑制RANKL表达并同时促进OPG表达,下调RANKL/OPG值,从而抑制破骨细胞活动,预防骨质疏松^[18],这与本研究结果一致。

OSI是机体氧化应激状态的有效评价指标。有研究发现,氧化应激损伤是牙槽骨损伤的原因之一^[19]。本研究中模型组大鼠TOS、OSI均显著高于对照组,也再次证实了这一机制在牙周炎病理进程中的作用。当体内OSI升高时,活性氧簇(ROS)作用于骨髓间充质干细胞(BMSCs)膜表面的Wnt/ β -catenin通路,阻碍 β -catenin入核从而导致其下游的转录因子TCF/LEF无法结合,进而使得成骨细胞分化基因Runx2表达受阻,BMSCs不能分化为成骨细胞^[20]。除抑制其分化外,OSI升高还可引起成骨细胞凋亡。ROS可激活蛋白激酶C- β (PKC- β),促使调节蛋白p66shc磷酸化,并进一步引发I- κ B磷酸化,将NF- κ B释放入核,诱导成骨细胞凋亡^[21]。本研究结果显示,黄芪多糖组的TOS、OSI均显著低于模型组,且与对照组数据无统计学差异,说明

黄芪多糖可有效调节机体氧化应激状态,维持血清TOS、OSI趋于正常水平同时保护牙槽骨。虽然其作用机制仍有待于进一步明确,但黄芪多糖对组织氧化应激损伤的保护作用是肯定的。在本研究中,黄芪多糖并未影响血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平变化,表明黄芪多糖并非通过调节炎症因子来干预骨代谢。综上所述,黄芪多糖可有效降低牙槽骨炎性破坏程度,保护牙周组织的完整性,其确切机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Hajishengallis G, Moutsopoulos N M. Role of bacteria in leukocyte adhesion deficiency-associated periodontitis [J]. *Microb Pathog*, 2016, 94(5): 21-26.
- [2] Yu Y H, Chasman D I, Buring J E, et al. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease [J]. *J Clin Periodontol*, 2015, 42(1): 21-28.
- [3] 李珍一, 杨关林, 闫承慧, 等. 黄芪多糖应用的相关研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(7): 1553-1555.
- [4] 张莹, 王蕾, 杜梦楠. 注射用黄芪多糖治疗肿瘤的临床研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(6): 1092-1094.
- [5] 刘豫蓉, 张朝良, 孔祥丽, 等. 黄芪多糖对成骨细胞增殖分化和结构的影响 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2010, 37(2): 133-137.
- [6] 伍志伟, 刘丹, 薛娜, 等. 黄芪多糖对低氧环境中BMSCs成骨分化的影响 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(6): 732-738.
- [7] 刘珂, 邱炳勋, 邹利, 等. 黄芪及其有效成分对内皮细胞及其连接的保护作用及机制研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(21): 3912-3917.
- [8] Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in bone: Self-eating to stay in balance [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 24(2): 206-217.
- [9] Hienz S A, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 615486.
- [10] 孔祥鹤, 牛银波, 王婷梅, 等. 黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞的影响及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2065-2069.
- [11] Moon J S, Kim S H, Oh S H, et al. Relaxin augments BMP-2-induced osteoblast differentiation and bone formation [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(7): 1586-1596.
- [12] Zhang Y D, Zhao S C, Zhu Z S, et al. Cx43-and Smad-mediated TGF- β /BMP signaling pathway promotes cartilage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and inhibits osteoblast differentiation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1277-1293.

- [13] Katakawa Y, Funaba M, Murakami M. Smad8/9 is regulated through the BMP pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(8): 1788-1796.
- [14] Lu D G, Qu J N, Lei J L, *et al.* LPS-stimulated inflammation inhibits BMP-9-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between BMP/MAPK and Smad signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 341(1): 54-60.
- [15] Walsh M C, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond [J]. *Front Immunol*, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00511.
- [16] Takegami N, Akeda K, Yamada J, *et al.* RANK/RANKL/OPG system in the intervertebral disc [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, doi: org/10.1186/s13075-017-1332-y.
- [17] Zhang H W, Peng L, Li W B, *et al.* The role of RANKL/RANK/OPG system in the canine model of hip periprosthetic infection osteolysis [J]. *Int J Artif Organs*, 2017, 39(12): 619-624.
- [18] Huo J, Sun X. Effect of *Astragalus* polysaccharides on ovariectomy-induced osteoporosis in mice [J]. *Genet Mol Res*, 2016, doi: 10.4238/gmr15049169.
- [19] Oktay S, Chukkapalli S S, Rivera-Kweh M F, *et al.* Periodontitis in rats induces systemic oxidative stress that is controlled by bone-targeted antiresorptives [J]. *J Periodontol*, 2015, 86(1): 137-145.
- [20] Zhang D Y, Pan Y, Zhang C, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through promoting the ROS production [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 374(1/2): 13-20.
- [21] Monturiol-Gross L, Flores-Díaz M, Pineda-Padilla M J, *et al.* Clostridium perfringens phospholipase C induced ROS production and cytotoxicity require PKC, MEK1 and NF κ B activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86475.