

## 白芍对牙周炎小鼠血清IgG的调节和治疗效果研究\*

宋宁<sup>1#</sup> 邝亦元<sup>1</sup> 廖志清<sup>1</sup> 周铸民<sup>1</sup> 丁桂聪<sup>1</sup> 黄世光<sup>2</sup>

(1 广东省深圳市儿童医院口腔科 深圳 518026; 2 暨南大学医学院口腔医学系 广东广州 510632)

**摘要:**目的:观察白芍水提取物对治疗牙周炎小鼠血清 IgG 水平的调节作用及其治疗小鼠牙周炎的效果。方法:将 48 只清洁级昆明小鼠按随机数字表法分为三组:正常对照组;实验性牙周炎组;参照 Kimura 等方法建立小鼠实验性牙周炎模型,并从建模后第 5 周起用蒸馏水灌胃;白芍治疗组:同上法建立牙周炎模型,从第 5 周起用白芍水提取物灌胃治疗。各组小鼠于建模后第 4、6、8、10 周分批处死,处死前测量牙龈指数,制作牙体牙周组织联合切片观察其组织病理学改变。采用摘眼球法取血液并分离血清,用 ELISA 法检测其血清 IgG 水平的变化。结果:组织学观察:实验性牙周炎组可见大量炎性细胞浸润,牙槽骨进行性吸收,并见大量破骨细胞。与实验性牙周炎组比较,白芍治疗组牙周组织炎症程度明显减轻,在建模后第 8、10 周牙龈指数均明显降低( $P<0.05$ )。实验性牙周炎组和白芍治疗组在建模后血清 IgG 水平均明显高于正常对照组( $P<0.01$ ),实验性牙周炎组在建模后第 10 周血清 IgG 水平明显低于第 4 周( $P<0.05$ ),白芍治疗组在建模后第 6、8、10 周血清 IgG 水平均明显高于实验性牙周炎组( $P<0.01$ )。结论:白芍水提取物能够提高小鼠实验性牙周炎的血清 IgG 水平,对牙周炎有一定的治疗效果。

**关键词:**牙周炎;白芍;IgG;小鼠

## Effect of Aqueous Extracts of Radix Paeoniae Alba on the Level of Serum IgG in an Experimental Mouse with Periodontitis

SONG Ning<sup>1</sup>, KUANG Yi-yuan<sup>1</sup>, LIAO Zhi-qing<sup>1</sup>, ZHOU Zhu-min<sup>1</sup>, DING Gui-cong<sup>1</sup>, HUANG Shi-guang<sup>2</sup>

(1 Department of Stomatology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026;

2 Department of Stomatology, the Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632)

**Abstract:** Objective: To explore the effect aqueous extracts of Radix Paeoniae Alba on periodontitis mice and compare the influence on the level of serum IgG. Methods: 48 SPF 12-week-old male Kunming mice were selected and randomly divided into three groups: control group, experimental periodontitis group, and Radix Paeoniae Alba treatment group. The experimental mouse periodontitis model was induced with Kimura's method, the mice were gavaged with distilled water from the beginning of the 5th weeks. The mice in the Radix Paeoniae Alba treatment group were induced by the same method, and were gavaged with the aqueous extracts of Radix Paeoniae Alba. Four mice were sacrificed at the end of 4, 6, 8 and 10 weeks in each group, the Gingival Index (GI) of the mice had been measured before the mice were killed, the level of serum IgG was measured by ELISA. The histopathological changes of periodontal tissue were observed under microscope with haematoxylin-eosin staining. Results: A serious inflammatory cell infiltration, alveolar progressive absorption and a large number of osteoclasts were observed in the experimental periodontitis group. However, the inflammation in periodontal tissue was significantly decreased in Paeoniae Alba Radix treatment group. GI in Radix Paeoniae Alba treatment group was lower than that in experimental periodontitis group ( $P<0.05$ ). The level of serum IgG in experimental periodontitis group and Radix Paeoniae Alba treatment group was significantly higher than that in control group ( $P<0.01$ ), the level of serum IgG in Radix Paeoniae Alba treatment group was significantly higher than that in experimental periodontitis group at 6, 8, 10 weeks ( $P<0.01$ ), the level of serum IgG in Experimental periodontitis group at 10 week was significantly lower than that at 4 week. Conclusions: Aqueous extracts of Radix Paeoniae Alba have therapeutic effect on periodontitis mice, can improve the level of serum IgG.

**Key words:** Periodontitis; Radix Paeoniae Alba; IgG; Mice

中图分类号: R781.4

文献标识码: B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.04.001

牙周炎是一种由细菌引起的免疫炎症性疾病,是导致牙齿缺失的主要原因。牙周炎时,牙周免疫反应所产生的炎症介质如细胞因子等,对牙周组织损伤的炎症反应具有关键的作用<sup>[1]</sup>。白芍(Radix Paeoniae Alba)是毛茛科植物芍药的干燥根,其有效成分总称为白芍总苷(Total glucosides of paeony, TGP),在药理及临床的研究中发现其具有多种途径调节自身免疫的能力。研究表明 TGP 在类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肾炎和强直性脊柱炎等疾病

的治疗中具有镇痛、抗炎和抗氧化等功效,可以通过降低 T 细胞 RANKL 表达量及 CD1a 因子、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等细胞因子的水平,起到免疫调节的作用<sup>[2-4]</sup>。本研究从中药白芍的抗炎及免疫调节的思路出发,通过检测小鼠血清抗体 IgG 水平的变化,结合牙周组织的病理变化评价白芍对小鼠实验性牙周炎的治疗效果,并从免疫学角度探讨其可能的治疗机制。

## 1 材料与方法

1.1 材料 清洁级 12 周雄性昆明小鼠(中山大学

\* 基金项目:广东省深圳市卫生计生系统科研项目(编号:201401048)

# 通讯作者:宋宁, E-mail: songningaa@126.com

实验动物中心);白芍水提物由香港大学中医药学院陈建萍副教授惠赠;辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IgG 抗体购自北京博雷德公司;脑心浸液(Brain Heart Infusion Broth, BHI)血琼脂培养基购自温州康泰生物科技有限公司。

1.2 方法 小鼠实验性牙周炎模型建立:参照 Kimura 等<sup>[9]</sup>的方法使实验性牙周炎组和白芍治疗组小鼠患实验性牙周炎。10%水合氯醛 5 ml/kg 麻醉小鼠,固定、消毒,用尖探针探至上颌第一磨牙龈沟底并分离牙龈组织,非吸收医用丝线嵌入第一磨牙颈部于近中牙龈处缝合结扎,结扎线尽量置于龈沟内。收集慢性牙周炎病变区龈下菌斑,置 1.0 ml 硫乙醇酸盐溶液小瓶混匀,生理盐水稀释至 10<sup>-3</sup>,取 1.0 ml 滴入 BHI 血琼脂培养基厌氧培养 5 d,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)溶液洗脱离心收集(4 000 r/min, 5 min),用麦氏比浊法使菌悬液为 1.0×10<sup>8</sup> CFU/ml;结扎当天每只小鼠结扎部位滴加 0.2 ml 菌悬液,每 48 小时追加 1 次,共 3 次。4 周后,小鼠第一磨牙牙周均出现深牙周袋,牙槽骨吸收和牙齿松动;处死 4 只小鼠,组织学观察发现牙周炎症破坏明显,结合上皮与牙面分离向根方增殖,可见大量炎症细胞浸润及牙槽骨的破坏,小鼠牙周炎模型建立成功。对照组:正常饮食,无特殊处置。第 5 周起对照组和牙周炎组 0.2 ml/d 蒸馏水灌胃;白芍组用 0.6 g/kg 白芍水提物 0.2 ml/d 混悬液灌胃。各组分别在第 4、6、8、10 周分批处死小鼠 4 只。

1.3 观察指标

1.3.1 牙龈指数(gingival index, GI)的测量 采用

乙醚吸入法麻醉,取仰卧位,采用钝头牙周探针进行探查,参照 L δ e<sup>[6]</sup>的方法测量牙龈指数,分为 4 级:0 级表示牙龈健康;1 级表示牙龈轻度炎症:牙龈的颜色有轻度改变并轻度水肿,探诊不出血;2 级表示牙龈中等炎症:牙龈色红,水肿光亮,探诊出血;3 级表示牙龈严重炎症:牙龈明显红肿或有溃疡,并有自动出血倾向。每颗实验牙测量近中龈乳头、正中颊缘、远中腭乳头和舌侧龈缘共 4 个点,记分为 4 个测量点的平均值。

1.3.2 组织学观察 切取小鼠上颌第一磨牙区牙周组织,制成近远中向 5 μm 厚的牙体、牙周组织联合切片,HE 染色,光镜下观察。

1.3.3 血清标本的采集及抗体的检测 小鼠静脉血收集采用摘眼球法,取 1 ml 置于无菌不含抗凝剂试管中,室温下放置 2 h,4 000 r/min 离心 5 min 收集血清,-20 °C 冰箱保存待测。ELISA 法检测血清抗体 IgG 水平。用 Bio-Rad 550 型酶标仪测量 OD450 值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,各组方差齐性时,多个样本均数间的两两比较采用 LSD 法检验;各组方差不齐时,采用 Tamhane's T2 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牙龈指数变化 与正常对照组比较,实验性牙周炎组和白芍治疗组在建模后第 4、6、8、10 周牙龈指数均明显升高( $P < 0.05$ );与实验性牙周炎组比较,白芍治疗组在建模后第 8、10 周牙龈指数均明显降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组小鼠不同治疗时期牙龈指数的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周
正常对照组	4	0.188± 0.125	0.250± 0.000	0.313± 0.125	0.313± 0.125
实验性牙周炎组	4	1.938± 0.125*	2.188± 0.125*	2.438± 0.125*	2.500± 0.204*
白芍治疗组	4	1.875± 0.144*	1.625± 0.144*	1.313± 0.239**	1.063± 0.125**

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与实验性牙周炎组比较,\*\* $P < 0.05$ 。

2.2 组织学改变 正常对照组牙龈上皮结构完整,结合上皮、沟内上皮结构正常,牙周膜纤维排列整齐,牙槽骨形态结构完整。见图 A、图 B。实验性牙周炎组牙周炎症破坏明显,结合上皮与牙面分离,上皮向根方增殖,组织深部可见大量炎症细胞浸润,血管扩张充血,牙周纤维水肿、变性,牙槽骨表面可见活跃的破骨细胞和骨吸收,牙槽嵴顶高度降低。见图 C、图 D。白芍治疗组牙周组织炎性细胞浸润比牙周炎组明显减少,结缔组织小血管增生,成纤维细胞增生活跃,骨吸收陷窝内可见大量成纤维细胞,偶见成骨细胞。见图 E、图 F。

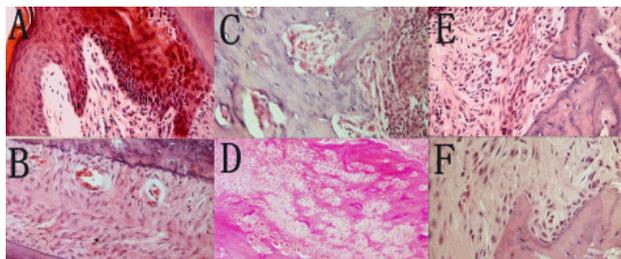


图 A:正常对照组,结合上皮附着在牙齿表面( $\times 20$ );图 B:正常对照组,牙槽骨平整,牙周纤维排列有序,血管内容未见炎性细胞( $\times 20$ )。图 C:牙周炎组 6 周,牙槽骨吸收破坏,出现骨吸收陷窝,其内可见破骨细胞( $\times 20$ )。图 D:牙周炎组 10 周,牙槽骨吸收破坏严重,骨

小梁稀疏呈蜂窝状( $\times 10$ )。图 E:白芍治疗组 6 周,牙周组织内炎症细胞浸润减少,血管增生( $\times 20$ )。图 F:白芍治疗组 10 周,成骨细胞成排排列,新骨形成( $\times 40$ )。

2.3 血清 IgG 水平变化 实验性牙周炎组和白芍治疗组在建模后第 4、6、8、10 周血清 IgG 水平均明显高于正常对照组( $P<0.01$ ),实验性牙周炎组在建

模后第 10 周血清 IgG 水平明显低于建模后第 4 周( $P<0.05$ ),白芍治疗组在建模后第 10 周血清 IgG 水平明显高于建模后第 4 周( $P<0.01$ ),白芍治疗组在治疗后第 6、8、10 周血清 IgG 水平均明显高于实验性牙周炎组( $P<0.01$ )。见表 2。

表 2 各组小鼠血清 IgG 水平的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周
正常对照组	4	0.339 $\pm$ 0.012	0.358 $\pm$ 0.006	0.361 $\pm$ 0.004	0.372 $\pm$ 0.009
实验性牙周炎组	4	0.715 $\pm$ 0.039 <sup>▲</sup>	0.688 $\pm$ 0.012 <sup>▲</sup>	0.657 $\pm$ 0.013 <sup>▲</sup>	0.648 $\pm$ 0.005 <sup>▲**</sup>
白芍治疗组	4	0.709 $\pm$ 0.046 <sup>▲</sup>	0.854 $\pm$ 0.009 <sup>▲*</sup>	1.031 $\pm$ 0.009 <sup>▲**</sup>	1.088 $\pm$ 0.025 <sup>▲**</sup>

注:与正常对照组比较,▲ $P<0.01$ ;与实验性牙周炎组比较,\* $P<0.01$ ;与同组建模后第 4 周比较,\*\* $P<0.01$ ,\*\* $P<0.05$ 。

### 3 讨论

牙周炎是以牙菌斑为始动因子的多因素疾病,具有复杂的免疫病理机制,由牙周致病菌引起的免疫反应,可分泌大量的细胞因子及酶等,如 iNOS、COX-2 酶、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 PGE2 等,它们既可以抑制细菌微生物的入侵,又引发牙周组织的炎症,造成牙周组织的持续破坏。

在细菌抗原的作用下,浆细胞合成特异性抗体,抗体以 IgG 为主。IgG 的功能主要表现在中和抗原、免疫调理、补体依赖的细胞毒作用和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)等,对机体起保护作用<sup>[7]</sup>。有研究表明体液免疫的缺乏可导致严重的牙周病变<sup>[8]</sup>。IgG 是血清中含量最高的免疫球蛋白,它是反映机体免疫水平的重要指标之一。

白芍在临床上主要运用于免疫调节和抗炎镇痛等方面,大量的研究证实其临床疗效。文洪林等<sup>[9]</sup>在比较白芍及丹皮中药煎剂对牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌(Pg)及具核梭杆菌(Fn)的体外抑菌活性实验中观察到:白芍对 Pg、Fn 的 MIC 均为 1:256,较丹皮的抗菌力强 2~3 倍。贾敏等<sup>[2]</sup>采用流式细胞术检测 RA 患者及健康志愿者 T 细胞表达 RANKL 的情况,观察白芍总苷对 RA 患者 T 细胞表达 RANKL 的影响,结果发现:与健康志愿者组相比,活动期 RA 患者 T 细胞 RANKL 表达率显著增高;体外培养的 RA 患者外周血细胞被白芍总苷 50、100  $\mu$ g/ml 剂量作用,可使 T 细胞 RANKL 表达量明显下降,从而认为白芍总苷可通过抑制 T 细胞表达 RANKL,减慢由 RANKL 介导的破骨细胞活化及骨质破坏。常景芝等<sup>[3]</sup>观察到白芍总苷能降低大鼠胶原性关节炎足爪组织基质金属蛋白酶 9 表达和血清中炎症细胞因子

IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等水平,对大鼠胶原性关节炎有明显抑制作用。白芍对一系列致炎因子的调控作用,理论上会对牙周炎的治疗起着积极的作用。

有关中药在牙周炎治疗方面的研究,国内外均有报道,但白芍对牙周炎的治疗是否有效及其相关的免疫调节机制研究报道较少。本研究观察到,经由白芍水提取物治疗后,小鼠实验性牙周炎的炎症状况趋于好转,牙龈指数得到明显改善,组织学观察到牙周组织可见修复反应,炎症细胞浸润减少,小鼠血清的抗体 IgG 水平得到显著提高,可见白芍水提取物对牙周炎有一定的治疗效果。结果提示白芍对牙周炎的免疫反应具有可调节的作用,可提高宿主的免疫能力,缓解牙周炎的炎症状况,为白芍推广至临床治疗牙周炎具有一定的理论基础。

#### 参考文献

- [1]Han X,LaRosa KB,Kawai T,et al.DNA-based adaptive immunity protect host from infection-associated periodontal bone resorption via recognition of Porphyromonas gingivalis virulence component[J]. Vaccine,2014,32(2):297-303
- [2]贾敏,张寒.白芍总苷对 RA 患者 T 细胞表达 RANKL 的影响[J].中药药理与临床,2011,27(6):36-38
- [3]常景芝,王琛,陈剑,等.白芍总苷对大鼠胶原性关节炎足爪组织基质金属蛋白酶 9 及血清中炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  表达的影响[J].时珍国医国药,2012,23(9):2187-2189
- [4]欧阳勇.白芍醇提液抗炎镇痛作用研究[J].数理医药学杂志,2008,21(5):600-601
- [5]Kimura S,Nagai A,Onitsuka T,et al.Induction of experimental periodontitis in mice with porphyromonas gingivalis-adhered ligature [J].J Periodontol,2000,71(7):1167-1173
- [6]L ò e H.The Gingival Index, the plaque index and the retention index systems[J].J Periodontol,1967,38(6):610-616
- [7]何维.医学免疫学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2010:69-70
- [8]Steinsvoll S.A 35-year-old man with aggressive periodontitis [J]. Tidsskr Nor Laegeforen,2006,126(5):613-614
- [9]文洪林,桂红,贺红.丹皮、白芍对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌的体外抑菌活性研究[J].临床和实验医学杂志,2012,11(18):1469-1471

(收稿日期:2014-12-04)