

缝隙连接蛋白43通过调控凋亡参与大鼠牙周炎相关肾损伤

辛雨¹ 傅若冰¹ 辛禧瑞¹ 商雅琦¹ 刘歆婵² 于维先^{1,3,4}

1. 吉林大学口腔医院牙周病科, 长春 130021; 2. 吉林大学口腔医院种植科, 长春 130021;

3. 吉林大学口腔医院老年口腔科, 长春 130021;

4. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室, 长春 130021

[摘要] 目的 本研究旨在探讨缝隙连接蛋白43 (Cx43) 在大鼠牙周炎诱导慢性肾损伤模型中的作用。方法 按照完全随机数字表法将12只SPF级Wistar雄性大鼠分为对照组和牙周炎组, 每组6只。对照组大鼠不做处理, 牙周炎组大鼠采用钢丝结扎大鼠双侧上颌第一磨牙的颈部, 构建牙周炎模型。建模8周后检查大鼠牙周临床指标。显微CT (micro-CT) 扫描大鼠上颌骨重建其三维结构并分析牙槽骨吸收情况; 组织病理学检测牙周及肾组织的病理改变; MitoSOX red试剂检测肾组织中活性氧 (ROS) 含量; 生化试剂盒检测血清氧化应激生物标志物; 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测肾组织中Cx43、核因子- κ B (NF- κ B)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、BCL2-Associated X的蛋白质 (Bax)、B淋巴细胞瘤-2基因 (Bcl-2) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3 (Caspase-3) mRNA表达水平, 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测肾组织中Cx43、NF- κ B、IL-1 β 、Bax、Bcl-2和Caspase-3蛋白表达水平。**结果** micro-CT三维重建结果显示, 牙周炎组大鼠第一磨牙牙槽骨骨质吸收明显, 牙槽嵴高度降低, 且釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离显著大于对照组。组织病理学结果显示, 牙周炎组大鼠牙周组织内可见大量炎症细胞浸润和牙槽骨明显吸收; 牙周炎组大鼠肾组织中肾小球基底膜轻度增厚, 鲍曼氏囊腔扩张, 肾小管刷状缘破坏。MitoSOX red染色结果显示牙周炎组肾组织中ROS含量明显升高。生化检测结果显示, 牙周炎组大鼠血清中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽水平降低, 丙二醛水平升高。qRT-PCR和Western blot结果显示, 牙周炎组肾组织中Cx43、IL-1 β 、IL-6、Bax和Caspase-3 mRNA及Cx43、IL-1 β 、NF- κ B、Bax和Caspase-3蛋白表达水平较对照组上升, 而Bcl-2 mRNA及蛋白表达水平下降。

结论 牙周炎可能通过上调大鼠肾组织中Cx43的表达激活NF- κ B信号分子, 引起大鼠肾脏组织中炎症水平和凋亡水平升高, 最终诱导肾脏损伤的发生。

[关键词] 牙周炎; 肾损伤; 缝隙连接蛋白43; 大鼠; 凋亡

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023352



本文链接 开放科学标识码

Role of connexin 43 in a rat model of periodontitis-induced renal injury

Xin Yu¹, Fu Ruobing¹, Xin Xirui¹, Shang Yaqi¹, Liu Xinchan², Yu Weixian^{1,3,4}

1. Dept. of Periodontics, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Dept. of Dental Implantology, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 3. Dept. of Geriatric Stomatology, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 4. Jilin Provincial Key Laboratory of Tooth Development and Bone Remodeling, Changchun 130021, China

Supported by: International Cooperation Project of Jilin Provincial Department of Science and Technology (20220402-069GH)

Correspondence: Yu Weixian, E-mail: ywx@jlu.edu.cn

[收稿日期] 2023-10-21; **[修回日期]** 2024-02-26

[基金项目] 吉林省科技厅国际合作项目 (20220402069GH)

[作者简介] 辛雨, 医师, 硕士, E-mail: xin_yu21@mail.jlu.edu.cn

[通信作者] 于维先, 教授, 博士, E-mail: ywx@jlu.edu.cn

[Abstract] **Objective** This study aims to investigate the role of gap junction mediated by connexin 43 (Cx43) in renal injury induced by periodontitis in rats. **Methods**

Twelve SPF-grade Wistar male rats were divided into a control group and a periodontitis group by using a completely random number table method, with six rats in each group. The control group rats were not treated, while the periodontitis group rats were subjected to wire ligation of the neck of their bilateral maxillary first molars to construct a periodontitis model. After 8 weeks of modeling, the rats were examined for clinical indicators of the periodontium. micro-CT scanning of the maxilla reconstructed its 3D structure and analyzed the absorption of alveolar bone. Histopathological changes in periodontal and renal tissues were detected. MitoSOX red reagent was used to determine reactive oxygen species (ROS) content in renal tissues. A biochemical reagent kit was used to detect serum oxidative stress biomarkers. Real-time fluorescent quantitative-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to determine Cx43, nuclear factor kappa-B (NF- κ B), interleukin (IL)-1 β , IL-6, BCL2-Associated X (Bax), B-lymphomatoma-2 gene (Bcl-2), and Caspase-3 mRNA were determined. Western blot analysis was used to detect Cx43, NF- κ B, IL-1 β , Bax, Bcl-2 and Caspase-3 protein. **Results** micro-CT 3D reconstruction showed significant bone resorption of the first molar alveolar bone in the periodontitis group rats and decreased height of the alveolar ridge. The distance from the enamel cementum boundary to the top of the alveolar ridge in the periodontitis group was significantly higher than that in the control group. The histopathological results showed a large number of inflammatory cells that infiltrated the periodontal tissue of the periodontitis group, and the alveolar bone was significantly absorbed. Rats in the periodontitis group also exhibited mild thickening of the glomerular basement membrane, dilation of the Bowman's capsule, and destruction of the brush-like edge of the renal tubules in the renal tissue. The MitoSOX red staining results showed a significant increase in ROS content in the renal tissue of the periodontitis group. The biochemical test results showed that the levels of superoxide dismutase and glutathione in the serum of rats with periodontitis decreased, while that of malondialdehyde increased. The results of qRT-PCR and Western blot showed that the expression levels of Cx43, IL-1 β , IL-6, Bax, Caspase-3 mRNA and Cx43, IL-1 β , NF- κ B, Bax, Caspase-3 proteins in the periodontitis group significantly increased compared with those in the control group, while the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein decreased. **Conclusion** Periodontitis may activate NF- κ B signaling molecules by upregulating the expression of Cx43 in rat kidney tissues, leading to increased levels of inflammation and apoptosis and ultimately inducing kidney injury.

[Key words] periodontitis; renal injury; connexin 43; rat; apoptosis

牙周炎是一种微生物驱动的慢性炎症性疾病,表现为牙周支持组织的渐进性破坏,是世界上第六大流行疾病,约10%的成人受其折磨^[1]。牙周炎不仅损害局部牙周组织,还与2型糖尿病、类风湿性关节炎和阿尔茨海默病等多种系统性疾病的发生和发展密切相关^[2-3]。慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)是一种进展性疾病,无法治愈,发病率和死亡率高,影响着9.1%的世界人口^[4-5]。近些年来,牙周炎与肾脏疾病之间的关系引起了学术界的广泛关注^[6-8]。一方面,牙周炎患者中CKD的患病率是牙周健康者的1.73倍;另一方面,局部牙周治疗可有效减缓CKD进程,但其中的联系仍有待进一步探索^[9]。

缝隙连接是目前认为细胞之间唯一能直接进行物质和信息交换的通道,其在肾脏组织中分布广泛,对维持肾功能起重要作用,近年来许多研究^[10]发现肾脏疾病的发生与缝隙连接功能异常有关。缝隙连接蛋白(connexin, Cx)是构成缝隙连接通道基本结构和功能的蛋白,Cx43是其家族中

最重要的蛋白^[11]。缝隙连接由6个连接蛋白亚基构成六聚体聚集在细胞膜表面,相邻细胞膜的2个半通道相互锚定组成完整的跨膜通道^[12]。在生理条件下,由Cx43构成的半通道主要呈关闭状态,然而,损伤或疾病等病理条件下则驱动其开放^[13]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是可以透过缝隙连接的信号分子之一,病理条件下过量的ROS对宿主细胞具有细胞毒性作用^[14-15]。研究^[16]发现,ROS大量积累可触发核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号分子的激活,进而引起一系列细胞反应。NF- κ B可调节多种基因的表达并控制多种细胞功能,在炎症信号和细胞凋亡的传导中发挥着重要作用^[17-18]。Cx43允许ROS等应激信号在细胞间传递,被认为是组织损伤进一步放大的生物学基础,但其具体机制尚不清楚。

目前针对CKD的防治仍旧缺乏有效的措施,期待以牙周炎为靶点为减缓CKD的进展提供一种新的干预措施。因此,探讨牙周炎诱导CKD的具体机制,对于CKD的防治具有重要意义。综上,

本研究旨在探讨Cx43介导的缝隙连接在牙周炎诱导肾损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

Cx43抗体、NF- κ B抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3 (Caspase-3) 抗体 (Cell Signaling Technology公司, 美国), 白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 抗体、BCL2-Associated X的蛋白质 (Bax) 抗体、B淋巴细胞瘤-2基因 (B-lymphomatoma-2, Bcl-2) 抗体、 β -actin抗体 (Proteintech公司, 美国), 显微CT (micro-CT) 系统 (SCANCO公司, 瑞士), 过碘酸雪夫 (periodic acid-schiff stain, PAS) 染色液试剂盒 (北京酷莱博科技有限公司), 反转录试剂盒 (TaKaRa公司, 日本), 引物由TaKaRa公司设计合成。低温高速离心机 (Thermo公司, 美国), 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 MX3005P (Agilent公司, 美国), 光学显微镜 (Olympus公司, 日本), 酶标检测仪 (Bio-TEK公司, 美国), 放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液、BCA增强型蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 全自动化学发光凝胶成像显影仪 (北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠牙周炎模型的构建

本实验由吉林大学实验动物福利伦理委员会审核通过 (SY202210200), 在吉林大学实验动物中心开展, 按照完全随机数字表法将12只SPF级Wistar雄性大鼠 (体质量200~230 g) 分为对照组和牙周炎组, 每组6只。参照本课题组前期实验方法构建牙周炎动物模型, 牙周炎组大鼠通过腹腔注射2%戊巴比妥钠 (0.2 mL/100 g) 行全身麻醉, 采用0.2 mm正畸钢丝结扎大鼠双侧上颌第一磨牙的颈部, 持续8周; 对照组不做处理。8周后, 检查2组大鼠牙周临床指标, 随后行安乐死, 并迅速采集上颌骨和肾脏用于后续实验。

1.2.2 2组大鼠牙周组织临床指标检查

探查2组大鼠上颌第一磨牙颊侧牙龈情况, 检查并记录牙周组织临床指标, 具体如下。1) 出血指数 (bleeding index, BI): 将牙周探针轻探入龈沟或袋底, 取出探针30 s后, 观察有无出血及出血程度。以Mazza出血指数为评价标准, 0: 牙龈

健康, 无炎症和出血; 1: 牙龈轻度水肿, 探诊后不出血; 2: 探诊后有点状出血; 3: 探诊后出血并沿龈缘扩展; 4: 探诊后出血并溢出龈沟; 5: 自发性出血^[19]。2) 探诊深度 (probing depth, PD): 采用牙周探针于大鼠上颌第一磨牙颊侧近中、中央和远中6个点测量牙周袋深度, 取平均值记录PD。3) 牙齿松动度 (tooth mobility, TM): < I度, 生理动度; I度松动, 仅颊侧向松动; II度松动, 颊侧及近远中向松动; III度松动, 颊侧向、近远中向及垂直向均松动。

1.2.3 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察2组大鼠牙周组织病理表现

取上颌骨置于10%中性甲醛固定液中固定48 h, 经10%乙二胺四乙酸脱钙2个月后, 乙醇梯度脱水, 二甲苯溶液透明, 浸蜡, 包埋, 组织切片 (5 μ m), 二甲苯脱蜡后, 梯度乙醇水化, 苏木素10 min, 冲洗, 1%盐酸乙醇分化, 氨水返蓝, 1%伊红5 min, 染色后, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 最后中性树胶封片。封片后显微镜下观察2组大鼠牙周组织结合上皮完整性、附着丧失水平和牙槽骨吸收情况。

石蜡块5 μ m切片, 二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后, 按照Masson染色试剂说明进行Masson染色, 封片后显微镜下观察牙周组织破坏情况。

1.2.4 micro-CT评价2组大鼠牙槽骨吸收情况

采用micro-CT扫描大鼠上颌骨, 将扫描参数设置为70 kV、200 mA、300 ms。采用micro-CT评估软件程序 (Scanco公司, 瑞士) 进行图像处理并重建牙槽骨三维结构。使用Image J软件 (Java 1.6.0_20, National Institutes of Health, 美国) 分析大鼠上颌第一磨牙近中、中央及远中釉质牙骨质界至牙槽嵴顶距离 (cemento-enamel junction to alveolar bone crest, CEJ-ABC) 并取平均值。

1.2.5 HE染色观察2组大鼠肾组织病理表现

将右侧肾组织按照1.2.3中步骤进行包埋、切片和染色。显微镜下观察2组大鼠肾组织中肾小球和肾小管结构变化。

1.2.6 PAS染色观察2组大鼠肾组织病理表现

5 μ m肾组织切片经二甲苯充分脱蜡后, 水洗2 min, 置于氧化剂中室温孵育7 min, 冲洗后滴加Schiff试剂染色15 min, 0.5%偏重亚硫酸钠浸洗分化2 min, 苏木素复染2 min, 盐酸乙醇分化后自来水冲洗12 min, 反蓝, 常规梯度脱水及透明, 封片。镜下观察肾组织中肾小球及肾小管结构完整性。

1.2.7 MitoSOX red染色

4%多聚甲醛固定肝脏冰冻切片, 冲洗后滴加MitoSOX red试剂。在37℃黑暗环境中孵育30 min, Hoechst染液对细胞核进行染色, 最后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.8 生化试剂盒检测血清氧化应激生物标志物

取1 g大鼠肾组织, 加入9 mL生理盐水, 置于冰上匀浆, 离心后取上清, 采用生化试剂盒检测2组大鼠肾组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。

1.2.9 qRT-PCR检测

取大鼠新鲜肾组织迅速匀浆, 采用Trizol法提取肾组织中总RNA, 测定RNA浓度及纯度, 逆转录为cDNA后采用SYBRPrime-Script-TM qRT-PCR Kit试剂盒进行qRT-PCR反应, 检测Cx43、IL-1β、

IL-6、Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA表达情况, 引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.10 蛋白免疫印迹(Western blot)检测

将新鲜大鼠肾组织置于RIPA裂解液中进行组织匀浆, 冰上静置30 min, 离心取上清液, BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液。10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, TBST洗膜后加入抗体Cx43(1:2 000)、NF-κB(1:2 000)、IL-1β(1:2 000)、Caspase-3(1:2 000)、Bax(1:8 000)、Bcl-2(1:2 000)、β-actin(1:8 000) 4℃孵育过夜, TBST洗膜3次, 用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:8 000)室温孵育1 h, TBST洗涤后使用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)显色, 采集图片并使用Image J软件分析灰度值。

表 1 基因序列

Tab 1 Genetic sequence

基因	引物序列(5'-3')	碱基数/bp	基因号
Cx43	F: ACTGAGCCCATCCAAAGACT	20	NM_010288.3
	R: GCTGTAATTCGCCAGTTTT	20	
IL-1β	F: GCAACTGTTCTGAACTCAAC	21	NM_008361.4
	R: ATCTTTTGGGGTCCGTCACCT	21	
IL-6	F: ATTGTATGAACAGCGATGATGCAC	20	NM_012489.2
	R: CCAGGTAGAAACGGAACCTCCAGA	20	
Bax	F: CCACCAAGAAGCTGAGCGA	19	NM_017059.2
	R: GCTGCCACACGGAAGAAGA	19	
Bcl-2	F: CTCTGTGGATGACTGAGTACCTG	23	NM_016993.2
	R: GAGCAGCGTCTCAGAGACAG	21	
Caspase-3	F: GGGGAGCTTGGAACGCTAAG	20	NM_009810.3
	R: CACACACACAAAGCTGCTCC	20	
β-actin	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	23	NM_031144.3
	R: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	24	

注: F: 上游引物; R: 下游引物。

1.3 统计学分析

利用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析, 所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 来表示, 组间比较采用t检验分析, $P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

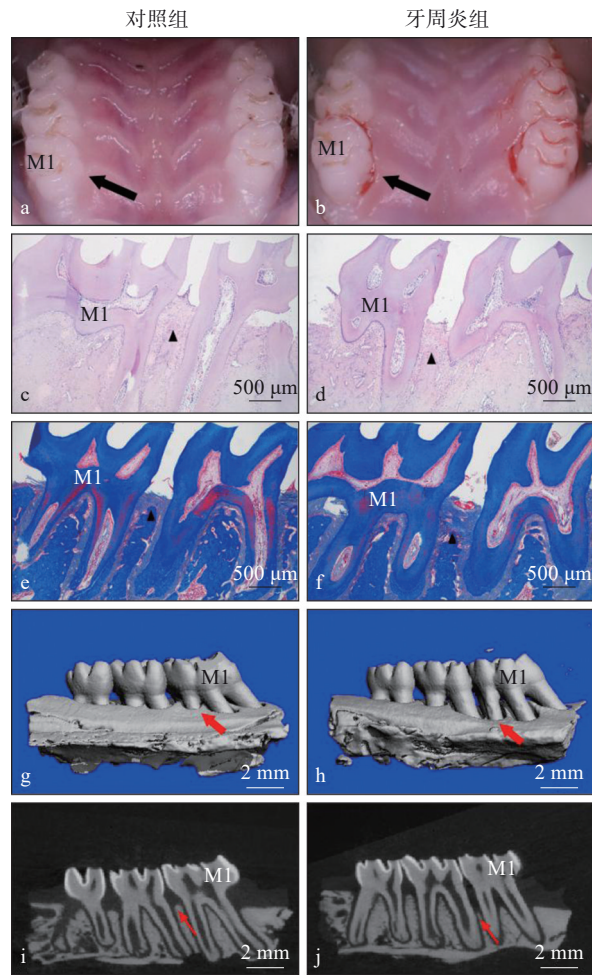
2 结果

2.1 成功构建牙周炎模型

肉眼观察各组大鼠双侧上颌第一磨牙牙周组织情况可见, 对照组牙龈呈粉红色, 龈缘紧贴牙面, 质地韧; 牙周炎组牙龈充血肿胀, 质地松软, 龈缘肥厚(图1a、b)。2组大鼠牙周组织切片HE染色结果显示, 与对照组相比, 牙周炎组的牙周

组织上皮连续性破坏, 固有层中有大量炎症细胞浸润, 牙槽嵴可见明显吸收(图1c、d)。Masson染色结果显示牙周炎组大鼠牙周组织胶原纤维明显破坏(图1e、f)。micro-CT显示牙周炎组牙槽骨较对照组吸收明显(图1g~j), 牙周炎组CEJ-ABC(1.18 mm±0.07 mm)高于对照组(0.69 mm±0.02 mm)($t=3.944, P=0.016$)。

2组大鼠牙周临床指标检查结果见表2。对照组大鼠无牙周袋及附着丧失, 无探诊出血, 牙齿无松动移位; 牙周炎组大鼠可探及较深牙周袋, 附着丧失明显, 探诊易出血, 牙齿未见明显松动。以上结果表明, 本研究成功构建牙周炎模型。



a、b: 大鼠口内照; c、d: 牙周组织HE染色结果; e、f: 牙周组织Masson染色结果 ×40; g、h: 牙槽骨腭侧micro-CT三维重建图; i、j: 牙槽骨矢状面micro-CT图。M1: 上颌第一磨牙; 黑色箭头示第一磨牙牙龈状况; 黑色三角示牙槽嵴顶; 红色箭头示牙槽骨吸收情况。

图 1 成功构建牙周炎模型

Fig 1 Successful establishment of the periodontitis model

表 2 大鼠牙周临床指标

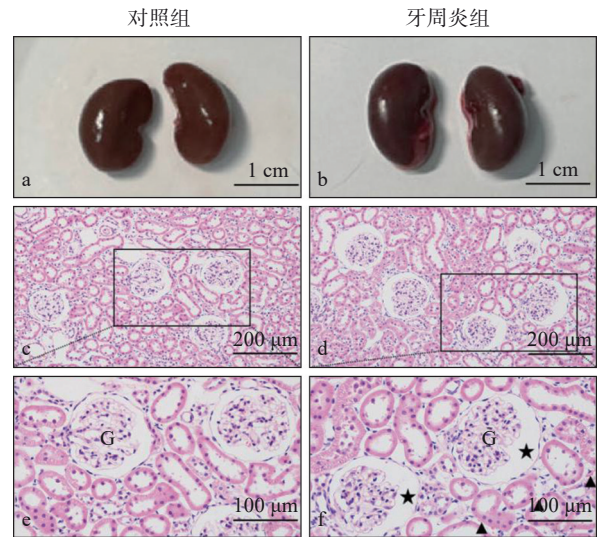
牙周临床指标	对照组	牙周炎组
PD/mm	0.20±0.02	2.45±0.08***
BI	0.19±0.20	2.54±0.24***
TM	0.00±0.00	1.00±0.27*

注: 牙周炎组与对照组相比差异具有统计学意义, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

2.2 肾大体照及组织病理学检测结果

肉眼观察牙周炎组肾脏较对照组颜色、体积无明显变化 (图2a、b)。肾组织切片HE染色结果显示, 对照组肾小球鲍曼氏囊腔正常, 无明显扩张, 牙周炎组肾小球鲍曼氏囊腔明显扩张, 肾小管间质充血明显 (图2c~f)。PAS染色结果显示,

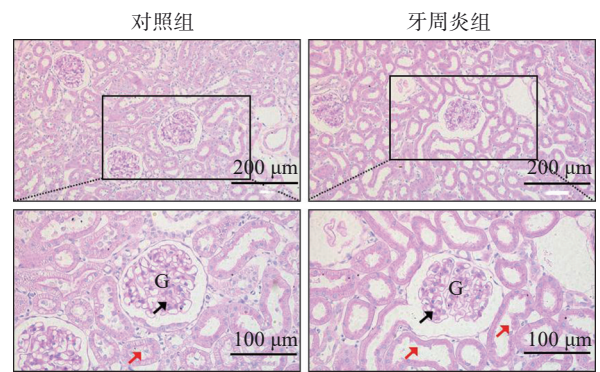
对照组肾小球基底膜正常, 肾小管刷状缘结构正常; 牙周炎组基底膜增厚, 肾小管刷状缘破坏及系膜基质扩张 (图3)。以上结果表明牙周炎可诱导肾组织发生结构改变。



a、b: 大鼠肾大体照; c~f: 肾组织HE染色。G: 肾小球; 黑色五角星示鲍曼氏囊腔增宽; 黑色三角示肾小管间质充血。

图 2 肾大体照及HE染色结果

Fig 2 Kidney gross imaging and HE staining results



G: 肾小球; 黑色箭头示肾小球基底膜; 红色箭头示肾小管刷状缘。

图 3 肾组织PAS染色

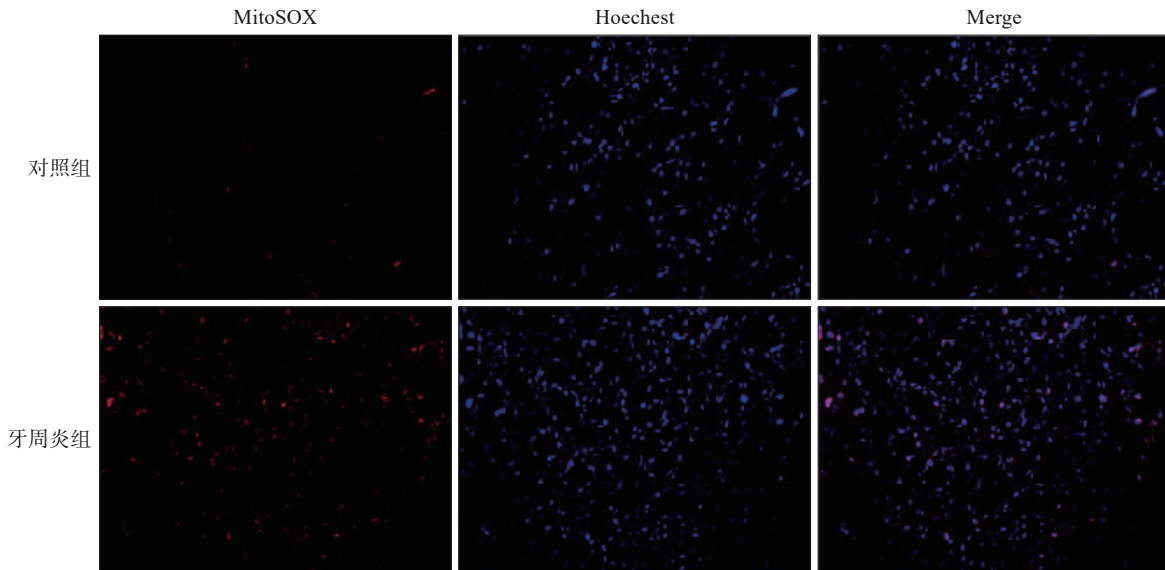
Fig 3 PAS staining of renal tissues

2.3 MitoSOX red 染色结果

MitoSOX red 是一种线粒体的超氧化物荧光染料, 可以被线粒体内的ROS氧化反应所激发并呈现红色荧光, 从而靶向检测细胞内ROS含量。牙周炎组肾组织中红色荧光强度较对照组明显增强, 表明牙周炎组肾组织中ROS含量升高 (图4)。

2.4 血清氧化应激标志物检测结果

牙周炎组血清中SOD、GSH水平降低, MDA水平明显升高表明牙周炎可引起机体发生氧化应激反应, 导致氧化/抗氧化失衡 (表3)。



MitoSOX染料呈红色荧光标记肾细胞内ROS; Hoechst染料呈蓝色荧光标记肾细胞细胞核; Merge表示将肾细胞内ROS和细胞核两者进行共定位。

图4 MitoSOX red染色结果 ×400

Fig 4 The results of MitoSOX red staining ×400

表3 生化指标检测结果

生化指标	对照组	牙周炎组
SOD/ (U/mL)	188.67±8.65	145.3±5.27**
GSH/ (U/L)	10.14±0.98	4.99±0.42**
MDA/ (nmol/mL)	6.19±0.87	8.83±0.72*

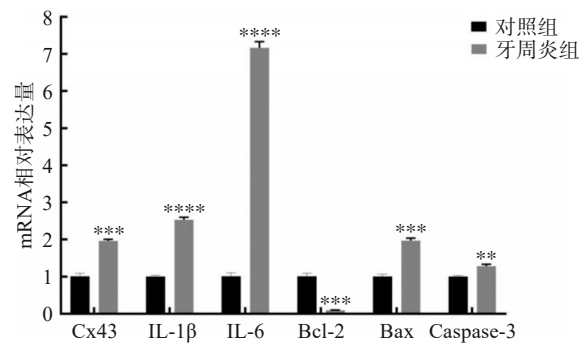
注: 牙周炎组与对照组相比差异具有统计学意义, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.5 qRT-PCR 检测结果

qRT-PCR检测肾组织中Cx43、IL-1 β 、IL-6、Bax、Bcl-2和Caspase-3 mRNA表达水平。结果显示, 与对照组相比, 牙周炎组肾组织中Cx43、IL-1 β 、IL-6、Bax和Caspase-3 mRNA表达水平升高, Bcl-2 mRNA表达水平下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。以上结果表明牙周炎组肾组织中炎症介质和凋亡相关mRNA表达水平较对照组升高(图5)。

2.6 Western blot 检测结果

提取肾组织总蛋白, Western blot检测肾组织中Cx43、NF- κ B、IL-1 β 、Caspase-3、Bax和Bcl-2表达水平。与对照组相比, 牙周炎组肾组织中的Cx43、NF- κ B、IL-1 β 、Bax、Caspase-3表达水平升高, Bcl-2表达水平降低, Bax/Bcl-2比值升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。以上结果表明, 与对照组相比, 牙周炎组肾组织中NF- κ B信号分子被激活, 炎症因子水平升高明显, 且凋亡相关蛋白表达水平升高(图6)。



牙周炎组与对照组相比差异有统计学意义, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图5 qRT-PCR 检测结果

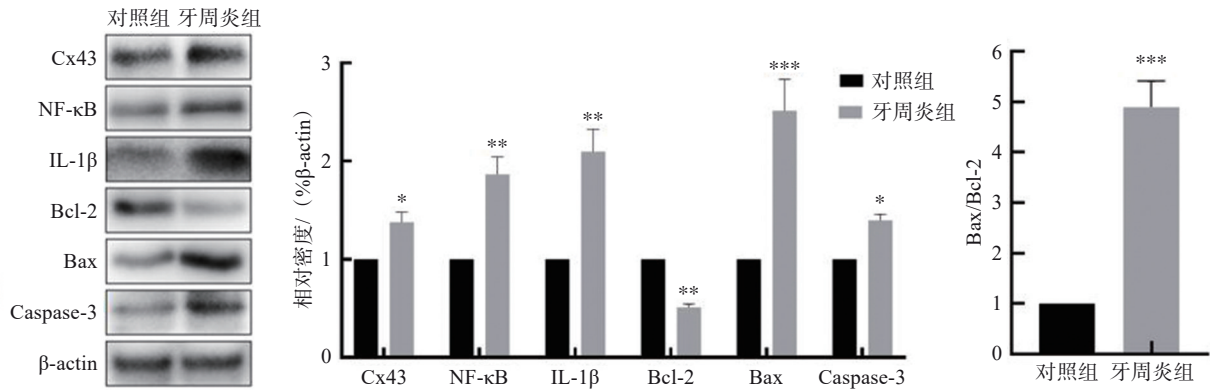
Fig 5 qRT-PCR test results

3 讨论

牙周炎与CKD都是常见的慢性疾病, 流行病学和动物实验研究表明二者之间存在紧密相关性, 但其具体机制尚不明确。Kose等^[20]发现: 结扎诱导的慢性牙周炎大鼠肾组织出现肾小囊腔扩张、肾小管坏死和周围毛细血管充血等病理表现。因此本研究采用结扎法建立大鼠牙周炎模型, 通过上颌第一磨牙及牙周组织HE染色、Masson染色、牙周临床检测指标及micro-CT结果证明大鼠牙周炎模型成功建立^[21]。在此模型基础上, 大鼠肾组织行HE和PAS染色发现, 牙周炎组大鼠肾组织的肾小球基底膜增厚, 鲍曼氏囊腔间隙增宽, 肾小

管空泡化及肾小管刷状缘结构损伤，这表明牙周炎可诱导肾组织发生形态学改变，证实了牙周炎

相关肾损伤的发生。在此模型基础上，本研究初步探讨了Cx43参与牙周炎诱导肾损伤的机制。



左: Western blot检测结果; 中: Western blot灰度值分析结果; 右: Bax/Bcl-2比值结果。牙周炎组与对照组相比差异具有统计学意义, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 Western blot检测结果及分析

Fig 6 Western blot detection results and analysis

França 等^[22]证实: 结扎诱导的慢性牙周炎可通过氧化应激引起大鼠肾组织损伤。在牙周炎期间, 淋巴细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞等防御细胞通过在牙周组织中产生 ROS 来应对致病菌的攻击, 但 ROS 很可能进入血液并移动到器官, 最终导致氧化—抗氧化失衡。Yuan 等^[23]证实 Cx43 是构成缝隙连接通道基本结构和功能的最重要的蛋白, 其介导的缝隙连接为 ROS 的扩散提供有利条件。本研究发现牙周炎大鼠肾脏内 Cx43 表达升高, 并通过 MitoSOX red 染色和检测牙周炎大鼠血清中氧化应激生物标志物水平, 结果显示, 牙周炎组肾组织中 ROS 含量升高, 氧化应激生物标志物 SOD 和 GSH 水平降低, MDA 水平升高, 证实了猜想。

与对照组比较, 牙周炎组大鼠肾组织中 IL-1β 和 NF-κB 蛋白表达水平升高, 这表明牙周炎可引起大鼠肾组织中氧化应激和炎症水平升高。Tien 等^[24]发现 Cx43 下调会引起 NF-κB 失活, 导致炎症介质释放减少, 提示了 Cx43 对 NF-κB 的调控作用。Cao 等^[25]的研究也表明大鼠牙周组织中 Cx43 的过表达不仅增加了细胞间的通信能力, 还激活了 NF-κB 通路, 并且两者都能导致细胞凋亡水平升高。本研究中抗凋亡介质 Bcl-2 的活性降低, 促凋亡介质 Bax 的表达升高, 进而激活凋亡驱动因子 Caspase-3, 最终导致细胞凋亡。当凋亡水平上升时, 巨噬细胞无法清除过多的凋亡细胞, 未清除的凋亡细胞可加剧体内炎症反应, 形成“恶性循环”。上述结果表明牙周炎可能通过上调肾组织内 Cx43 的表达, 激活 NF-κB 信号分子, 从而引起大鼠肾脏组织中的炎症水平和细胞凋亡水平升高,

不断诱导肾损伤的发生。

综上所述, 本研究发现 Cx43 介导的缝隙连接可能在牙周炎诱导肾损伤过程中发挥了重要作用, 未来可使用 Cx43 靶向药物做进一步研究, 期待从缝隙连接的角度, 以牙周炎为靶点, 为慢性肾脏病的防治开辟新思路。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Hajishengallis G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: evidence, mechanisms, and implications[J]. *Periodontol* 2000, 2022, 89(1): 9-18.
- [2] Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(7): 426-440.
- [3] 刘笑梦, 曹牛奔, 邓愉, 等. 脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1 在大鼠牙周炎诱导肝损伤模型中的作用研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2022, 57(10): 1048-1056.
Liu XM, Cao NB, Deng Y, et al. Role of brain and muscle ARNT-like protein 1 in the rat periodontitis-induced liver injury model[J]. *Chin J Stomatol*, 2022, 57(10): 1048-1056.
- [4] Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, et al. Chronic kidney disease[J]. *Lancet*, 2021, 398(10302): 786-802.
- [5] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2020, 395(10225):

- 709-733.
- [6] Hickey NA, Shalamanova L, Whitehead KA, et al. Exploring the putative interactions between chronic kidney disease and chronic periodontitis[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2020, 46(1): 61-77.
- [7] Hirano K, Shimbo T, Komatsu Y, et al. Frequency of tooth brushing as a predictive factor for future kidney function decline[J]. *J Nephrol*, 2022, 35(1): 191-199.
- [8] Miyata Y, Obata Y, Mochizuki Y, et al. Periodontal disease in patients receiving dialysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3805.
- [9] Li L, Liu X, Li S, et al. Tetrahydrocurcumin protects against sepsis-induced acute kidney injury via the SIRT1 pathway[J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1): 1028-1040.
- [10] Leithe E, Mesnil M, Aasen T. The connexin 43 C-terminus: a tail of many tales[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(1): 48-64.
- [11] Totland MZ, Rasmussen NL, Knudsen LM, et al. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(4): 573-591.
- [12] Niemann P, Schiffer M, Malan D, et al. Generation and characterization of an inducible Cx43 overexpression system in mouse embryonic stem cells[J]. *Cells*, 2022, 11(4): 694.
- [13] Turovsky EA, Varlamova EG, Turovskaya MV. Activation of Cx43 hemichannels induces the generation of Ca^{2+} oscillations in white adipocytes and stimulates lipolysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8095.
- [14] Li Y, Zhang Y, Dong Y, et al. Ablation of gap junction protein improves the efficiency of nanozyme-mediated catalytic/starvation/mild-temperature photothermal therapy[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(22): e2210464.
- [15] An Y, Zhang H, Wang C, et al. Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis[J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12515-12527.
- [16] 曹牛奔, 刘笑梦, 邓愉, 等. 活性氧/c-Jun 氨基末端激酶/核因子- κ B 信号分子通过调控凋亡参与牙周炎诱导肝损伤[J]. *华西口腔医学杂志*, 2022, 40(5): 532-540.
- Cao NB, Liu XM, Deng Y, et al. Reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase/nuclear factor kappa-B signaling molecules are involved in periodontitis-induced liver injury by regulating apoptosis[J]. *West China J Stomatol*, 2022, 40(5): 532-540.
- [17] Kaltschmidt C, Greiner JFW, Kaltschmidt B. The transcription factor NF- κ B in stem cells and development[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2042.
- [18] Himaya SW, Ryu B, Qian ZJ, et al. Paeonol from Hippocampus kuda Bleeler suppressed the neuro-inflammatory responses *in vitro* via NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(6): 878-887.
- [19] 夏博园, 李艳, 丁旭, 等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α 在牙周炎诱发大鼠肝损伤中的作用研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2021, 39(5): 518-523.
- Xia BY, Li Y, Ding X, et al. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α on liver injury induced by periodontitis in rats[J]. *West China J Stomatol*, 2021, 39(5): 518-523.
- [20] Kose O, Kurt Bayrakdar S, Unver B, et al. Melatonin improves periodontitis-induced kidney damage by decreasing inflammatory stress and apoptosis in rats[J]. *J Periodontol*, 2021, 92(6): 22-34.
- [21] Li X, Liu XC, Ding X, et al. Resveratrol protects renal damages induced by periodontitis via preventing mitochondrial dysfunction in rats[J]. *Oral Dis*, 2023, 29(4): 1812-1825.
- [22] França LFC, Vasconcelos ACCG, da Silva FRP, et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation[J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44(6): 568-576.
- [23] Yuan D, Li X, Luo C, et al. Inhibition of gap junction composed of Cx43 prevents against acute kidney injury following liver transplantation[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 767.
- [24] Tien TY, Wu YJ, Su CH, et al. Reduction of connexin 43 attenuates angiogenic effects of human smooth muscle progenitor cells via inactivation of Akt and NF- κ B pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(2): 915-930.
- [25] Cao N, Liu X, Hou Y, et al. 18- α -glycyrrhetic acid alleviates oxidative damage in periodontal tissue by modulating the interaction of Cx43 and JNK/NF- κ B pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1221053.