

# 人参皂苷 Rb3 对大鼠实验性牙周炎的疗效研究

李华<sup>1</sup> 张康<sup>1</sup> 曲会娟<sup>2</sup> 冀洪海<sup>1,2</sup> 孙敏敏<sup>1,2</sup>

1. 山东第二医科大学口腔医学院, 潍坊 261053;

2. 山东第二医科大学附属医院口腔科, 潍坊 261000

**[摘要]** **目的** 探讨人参皂苷 Rb3 对大鼠实验性牙周炎炎症及骨吸收的疗效及作用机制。**方法** 体内实验将雄性 SD 大鼠随机分为对照组、结扎组、Rb3 组和多西环素 (Dox) 组, 采用上颌第二磨牙结扎法建立牙周炎模型, 药物处理 3 周处死取材。显微计算机断层扫描 (Micro-CT) 评估牙槽骨吸收情况; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察牙周组织和内脏组织病理学改变; 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色检测牙周组织破骨细胞形成; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清白细胞介素 (IL)-6、IL-8、免疫球蛋白 (Ig) M、IgG 水平; 定量聚合酶链式反应 (qPCR) 检测牙龈组织炎症和破骨形成相关因子表达; 免疫荧光染色检测磷酸化胞外信号调节激酶 (p-ERK) 表达; 体外实验将 RAW264.7 细胞药物预处理后加入牙龈卟啉单胞菌 (*P.gingivalis*) 脂多糖 (LPS) 刺激。qPCR 法检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 的表达; 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 Rb3 对丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 信号通路的影响。**结果** 与对照组相比, 结扎组大鼠牙周炎症及骨吸收明显; 与结扎组相比, Rb3 组大鼠牙槽骨吸收和破骨细胞形成数量减少, 牙周组织 p-ERK/ERK 比值、IL-1 $\beta$ 、IL-6、活化 T 细胞核因子 (NFATc1) mRNA 及破骨下游基因表达降低、血清 IL-6、IL-8、IgG、IgM 的含量减少; Rb3 降低 *P.gingivalis* LPS 刺激 RAW264.7 细胞引起的 IL-8、IL-1 $\beta$  mRNA 表达及 p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值。**结论** Rb3 抑制大鼠实验性牙周炎炎症及骨吸收, 且相较于 Dox, Rb3 在抑制促炎症因子、破骨基因表达等方面效果更佳, 并可能通过激活 MAPKs 信号通路发挥抗炎作用。

**[关键词]** 人参皂苷 Rb3; 实验性牙周炎; 炎症; 骨吸收; 丝裂原活化蛋白激酶信号通路

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2024448



本文链接 开放科学标识码

## Effect of ginsenoside Rb3 on experimental periodontitis in rats

Li Hua<sup>1</sup>, Zhang Kang<sup>1</sup>, Qu Huijuan<sup>2</sup>, Ji Honghai<sup>1,2</sup>, Sun Minmin<sup>1,2</sup>

1. School of Stomatology, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; 2. Dept. of Stomatology, Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China

Supported by: National Natural Science Foundation of Shandong (ZR2022QH273)

Correspondence: Ji Honghai, E-mail: sdwf\_ji@163.com; Sun Minmin, E-mail: sunminmin@sdsmu.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** This study aimed to explore the therapeutic effect and mechanism of ginsenoside Rb3 on experimental periodontitis and bone resorption in rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into a control group, a ligation group, an Rb3 group, and a doxycycline (Dox) group for *in vivo* experiments. A periodontitis model was established by ligating the maxillary second molar, and samples were collected after 3 weeks of drug treatment. Micro-CT assessment of alveolar bone resorption was performed, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in periodontal and visceral tissues. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining was applied

to detect the formation of osteoclasts in periodontal tissues, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to detect the serum levels of interleukin (IL)-6, IL-8, immunoglobulin (Ig)M, and IgG. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was employed to de-

**[收稿日期]** 2024-12-10; **[修回日期]** 2025-06-08

**[基金项目]** 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2022QH273)

**[第一作者]** 李华, 硕士, E-mail: lihua199805@163.com

**[通信作者]** 冀洪海, 副主任医师, 硕士, E-mail: sdwf\_ji@163.com;

孙敏敏, 讲师, 博士, E-mail: sunminmin@sdsmu.edu.cn

test the expression of factors related to gingival inflammation and osteoclast formation. Immunofluorescence staining was used to detect phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) expression. *In vitro* experiments were conducted by pretreating RAW264.7 cells with drugs and adding lipopolysaccharides (LPS) stimulation from *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression was detected by qPCR, and Western blot was used to detect the effect of Rb3 on the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) signaling pathway. **Results** Compared with the control group, the ligation group showed significant periodontitis and bone resorption. Compared with the ligation group, the Rb3 group showed a decrease in alveolar bone resorption and osteoclast formation; p-ERK/ERK ratio, IL-1 $\beta$ , IL-6, and nuclear factor of activated T cells (NFATc1) mRNA levels and downstream gene expression in periodontal tissues; serum IL-6, IL-8, IgG, and IgM levels. Rb3 reduced IL-8 and IL-1 $\beta$  mRNA expression levels and p-ERK/ERK and p-p38 MAPK/p38 MAPK ratios in RAW264.7 cells induced by *P. gingivalis* LPS stimulation. **Conclusion** Rb3 inhibits inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. Compared with Dox, Rb3 has better effects in inhibiting pro-inflammatory factors and osteoclast gene expression and may exert anti-inflammatory effects by activating the MAPK signaling pathway.

**[Key words]** ginsenoside Rb3; experimental periodontitis; inflammation; bone resorption; mitogen-activated protein kinases signaling pathway

牙周炎是一类以牙周组织炎症伴随牙槽骨逐渐丧失为主要临床特点的慢性炎症性疾病<sup>[1-2]</sup>。近年来的流行病学研究显示，牙周炎在人群中总体患病率高达45%~50%，是最常见的口腔疾病之一，重度牙周炎更是困扰着全球约10%的人口，不仅影响患者生活质量，也给当今社会健康发展造成沉重负担<sup>[3-5]</sup>。

牙周炎的发病机制是易感宿主对口腔菌斑微生物产生过度免疫反应<sup>[6-7]</sup>，细菌微生物及其代谢产物刺激引起牙周组织中的相关细胞分泌促炎症细胞因子，如白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 等，同时丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) /核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路也会被激活，参与牙周组织的炎症反应，长期异常的免疫炎症反应最终造成成骨/破骨失衡，发生牙槽骨吸收<sup>[8]</sup>。活化T细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFATc1) 是一类经典破骨细胞生成因子<sup>[9]</sup>，在破骨活动中发挥显著作用，MAPKs/NF- $\kappa$ B 信号通路被激活后细胞核中NFATc1水平升高，破骨细胞特异性基因的表达增强，包括基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、组织蛋白酶K (cathepsin K, CTSK)、酸性磷酸酶5 (acid phosphatase 5, ACP5) 等，影响破骨细胞的生成及成熟，促进牙槽骨破坏<sup>[10]</sup>。

目前临床上对牙周炎患者的治疗手段主要是通过洁治、刮治等方法去除牙菌斑生物膜，后期则对难以控制的严重病例采用牙周手术治疗，彻

底去除感染微生物并创造利于患者自我控制菌斑的口腔环境<sup>[11-12]</sup>。然而，单纯通过物理方法去除菌斑生物膜，在控制易感宿主炎症方面效果往往不理想，即使定期进行专业干预的牙周炎患者也可能出现继续进展的情况<sup>[13]</sup>。因此，除牙周炎常规物理治疗外，辅助进行药物免疫调控治疗是十分有必要的。目前有大量的基础研究尝试通过药物调节宿主反应来治疗牙周炎，如非甾体抗炎药、四环素类药物等<sup>[14-15]</sup>。迄今为止，仅有亚抗微生物剂量的多西环素 (Doxycycline, Dox) 被批准用于牙周治疗中宿主调节，在临床中辅助机械清创等手段可以取得不错疗效<sup>[16-18]</sup>。

近年来，随着中草药的研究逐渐深入，中药材中提取的活性成分成为研究热点。人参皂苷Rb3 (ginsenoside Rb3, Rb3) 是我国传统中药人参中含量最丰富、活性最强的成分之一，具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等诸多作用<sup>[19-21]</sup>。前期研究<sup>[22]</sup>发现Rb3具有显著的抗炎和抗破骨作用，Rb3通过调控MAPKs信号通路，抑制脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 引起的人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs) 促炎因子IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 表达<sup>[10]</sup>；并通过调控MAPKs通路中外源性信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 的活化，抑制破骨细胞分化。为了进一步明确Rb3的治疗效果，本研究在体内实验和体外实验中，通过与Dox对比，分析Rb3对牙周炎症和骨吸收的治疗作用并探讨作用机制，以期为Rb3在牙周炎免疫调控方面的治疗应用提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物和实验方案

选取24只8周龄SPF级雄性SD大鼠, 体重270~300 g, 购于济南朋悦实验动物繁育有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(鲁)20190003。将24只大鼠随机分为4组, 分别为对照组、结扎组、Rb3组和Dox组。本研究在确定样本量时, 充分考虑了预实验数据和动物伦理原则。根据预实验结果, 各组间牙周炎症差异显著, 效应量较大, 且实验条件稳定。同时, 考虑到实验过程中可能出现的自然损耗(如动物健康状况或意外情况), 预计每组损耗1只大鼠。因此, 最终确定每组设置6只大鼠。结扎组、Rb3组和Dox组大鼠在3%异戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉下于双侧上颌第二磨牙颈部结扎3-0丝线, 每隔3 d检查丝线是否脱落。牙周炎模型建立后, Rb3组、Dox组大鼠每隔1 d采用腹腔注射方式分别给予相应药物1 mL(浓度均为1 mg/L), 药物剂量及给药周期参考既往文献<sup>[23]</sup>及预实验结果确定, 预实验大鼠内脏苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色结果显示该浓度药物无组织毒性。同时对照组及结扎组大鼠注射等体积生理盐水, 3周后4组大鼠安乐死并取材。动物实验方案经潍坊医学院伦理委员会批准(实验动物伦理号: 2021SDL488)。

### 1.2 酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

大鼠处死后取新鲜心脏血液, 离心取血清, 按照ELISA试剂盒说明书提供的操作步骤进行实验, 在酶标仪450 nm处读取光密度(optical density, OD)值, 计算得到小鼠血清IL-6、IL-8、免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) M、IgG的含量。

### 1.3 显微计算机断层扫描(micro-computed tomography, Micro-CT)

取各组大鼠牙齿-上颌骨标本作Micro-CT进行三维重建并分析, 以评估牙槽骨吸收情况。

### 1.4 HE和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色

收集各实验组大鼠的肝脏、肾脏、肺脏和心脏组织, 进行固定、包埋和切片, 作HE染色, 观察Rb3和Dox对大鼠内脏组织有无毒性; 收集各实验组大鼠上颌牙齿-牙周联合组织制作石蜡切片, 行HE染色和TRAP染色, 分别观察组织病理学改变和牙槽骨吸收情况。

### 1.5 免疫荧光染色

取大鼠上颌牙齿-牙周联合组织切片, 5%山羊血清封闭切片1 h。分别以一抗磷酸化胞外信号调节激酶(phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)(1:1 000)4℃孵育过夜, 荧光二抗(1:500)37℃避光孵育1 h, 抗荧光衰减封片剂封片。在倒置荧光显微镜下观察、拍照并统计分析各组大鼠牙齿-牙周联合组织中p-ERK表达情况。

### 1.6 大鼠牙龈组织定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)

取大鼠上颌第二磨牙处牙龈组织, 按照RNA提取试剂盒提供步骤操作, 应用逆转录试剂盒进行逆转录制备cDNA。以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参进行荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增, 以检测各组小鼠牙龈组织中IL-1β、IL-6、CTSK、ACP5、MMP-9、NFATc1 mRNA的表达水平。本实验引物序列见表1。反应条件按PCR试剂盒说明书设定, 各组均设3个复孔。检测各组大鼠牙龈组织中上述基因的表达水平。

表1 本实验用于qPCR的大鼠引物序列

Tab 1 Primer sequences of rats used for qPCR in this experiment

引物	序列(5'-3')	扩增长度/bp
GAPDH	F: GACATGCCGCTGGAGAAAC R: AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	92
IL-6	F: ACTTCCAGCCAGTTGCCTTCTTG R: TGGTCTGTGTGGGTGGTATCCTC	110
IL-1β	F: AATCTCACAGCAGCATCTCGACAAG R: TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC	98
CTSK	F: TGGCTGTGGAGGCGGCTATATG R: CGGGTAAGCGTCTTCAGAGTCAATG	82
ACP5	F: ATGACGCCAATGACAAGAGGTTCC R: TTGTGCCGAGACATTGCCAAGG	125
NFATc1	F: TCCCTGCCTGCCCTTGACTG R: TGAGCCCTGTGGTGAGACTTGG	92
MMP-9	F: CTCCTGGTGCTCCTGGCTCTAG R: GCTGTGTGTCCTGAGGTTGG	112

### 1.7 CCK-8测定

RAW264.7细胞复苏扩增, 分为9组进行细胞毒性实验: 对照组、50 μmol/L Rb3组、100 μmol/L Rb3组、200 μmol/L Rb3组、400 μmol/L Rb3组、25 μmol/L Dox组、50 μmol/L Dox组、100 μmol/L Dox组、200 μmol/L Dox组。使用配制好的对应

Rb3和Dox浓度的培养基行细胞重悬,随后接种于96孔细胞培养板,此步骤按照每孔 $1 \times 10^5$ 个的细胞浓度进行接种操作,每组设6个复孔。24 h后每孔加入10  $\mu$ L CCK8试剂,培养箱中孵育1.5 h后检测450 nm处OD值。分析确定上述药物对细胞的安全浓度范围。

1.8 RAW264.7细胞RNA提取、逆转录和PCR

RAW264.7细胞分为10组:对照组、LPS组、100  $\mu$ mol/L Dox组、200  $\mu$ mol/L Rb3组、LPS+100  $\mu$ mol/L Rb3组、LPS+200  $\mu$ mol/L Rb3组、LPS+25  $\mu$ mol/L Dox组、LPS+50  $\mu$ mol/L Dox组、LPS+100  $\mu$ mol/L Dox组。细胞浓度调整为每毫升 $1 \times 10^6$ 个,接种于6孔板中,每孔1 mL,设3个复孔,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育12 h,待细胞充分贴壁后对不同分组的RAW264.7细胞加入对应浓度的药物进行预处理2 h,随后对需LPS刺激的组加入LPS,使得LPS的终浓度为1  $\mu$ g/mL,24 h后收样,后续PCR实验步骤同1.6,检测Rb3和Dox对牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis*) LPS刺激RAW264.7细胞引起的IL-1 $\beta$ 、IL-8 mRNA表达的影响。本实验引物序列见表2。

表 2 用于本实验的大鼠引物序列

Tab 2 Primer sequence information of mice used in this experiment

引物	序列 (5'-3')	扩增长度/ bp
GAPDH	F: GGTGTCTCCTGCGACTTCA	183
	R: TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	
IL-8	F: GAGACTTCCATCCAGTTGCCTTC	151
	R: TGTGTAATTAAGCCTCCGACTTGTG	
IL-1 $\beta$	F: TCGCAGCAGCACATCAACAAG	190
	R: CCAGCAGGTTATCATCATCATCCC	

1.9 蛋白质印迹 (Western blot) 分析

RAW264.7细胞分为6组:对照组、LPS组、LPS+50  $\mu$ mol/L Rb3组、LPS+100  $\mu$ mol/L Rb3组、LPS+50  $\mu$ mol/L Dox组、LPS+100  $\mu$ mol/L Dox组,按照细胞浓度为每孔 $1 \times 10^6$ 个接种于6孔板中,每孔1 mL,设3个复孔,12 h后加入相应浓度的Rb3和Dox预处理2 h,加入LPS(终浓度为1  $\mu$ g/mL),24 h后裂解细胞,超声处理并离心。BCA法检测蛋白浓度并标准化,进行电泳处理,转膜后封闭,p38、ERK、p-p38、p-ERK和GAPDH蛋白的一抗均4  $^{\circ}$ C孵育过夜,24 h后加入二抗室温下孵育1 h,洗膜,电化学发光(electrochemiluminescence, ECL),定量分析蛋白表达情况。

1.10 统计学分析

所有实验数据使用SPSS 23.0和GraphPad Prism 8.0.2软件进行统计学分析,计量数据用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较使用独立样本t检验进行分析。 $P < 0.05$ 表示有显著统计学差异。所有实验均重复3次。

2 结果

2.1 Rb3和Dox对大鼠内脏组织的毒性检测

HE染色结果(图1)显示,Rb3组和Dox组大鼠的心脏、肺脏、肾脏和肝脏组织表现正常,与对照组相比差异无统计学意义,这说明2种药物腹腔注射治疗对实验性牙周炎大鼠的主要内脏无组织毒性。

2.2 Rb3对实验性牙周炎大鼠牙周组织炎症和骨吸收的影响

结扎组大鼠牙周组织HE染色(图2A)显示出明显的牙周炎症状。与对照组相比,牙龈乳头正常结构被破坏,显示为低平状,更多的炎症细胞浸润在牙龈上皮下方,结合上皮从釉牙骨质界(cemento-enamel junction, CEJ)向根方迁移,形成明显附着丧失和牙周袋。Rb3组与结扎组相比,尽管牙龈乳头结构不明显,但炎症细胞浸润减轻,附着丧失程度较对照组同样有所减轻。

TRAP染色结果(图2B、C)显示,结扎组牙周组织的破骨细胞单位面积内平均数量明显高于对照组、Rb3组和Dox组。相较于结扎组,Rb3组和Dox组破骨细胞数量显著降低( $P < 0.05$ ),且Rb3组破骨细胞数量更接近对照组水平。Micro-CT三维重建结果可更直观观察牙槽骨吸收状况(图2D)。结扎组与对照组比较,牙槽骨不再紧贴牙根,取而代之的是严重的骨缺损,牙槽骨边缘外形连续性破坏,牙根暴露明显,切面图示上颌第二磨牙近远中牙槽骨吸收严重,宽度和高度较对照组均明显减少。Rb3组相较于结扎组,磨牙冠状切面图中无论是相邻磨牙之间亦或者第二磨牙牙根间牙槽骨的吸收情况较结扎组明显好转。进一步的CEJ-牙槽嵴顶(alveolar bone crest, ABC)距离分析结果(图2E)显示,结扎组较对照组CEJ-ABC距离显著增加,而Rb3组较结扎组CEJ-ABC距离降低明显( $P < 0.05$ ),接近对照组水平。结果表明,Rb3可抑制牙周组织炎症及炎症引起的牙槽骨吸收,在抵抗牙槽骨吸收方面,Rb3可通过减少破骨细胞形成数量发挥作用。

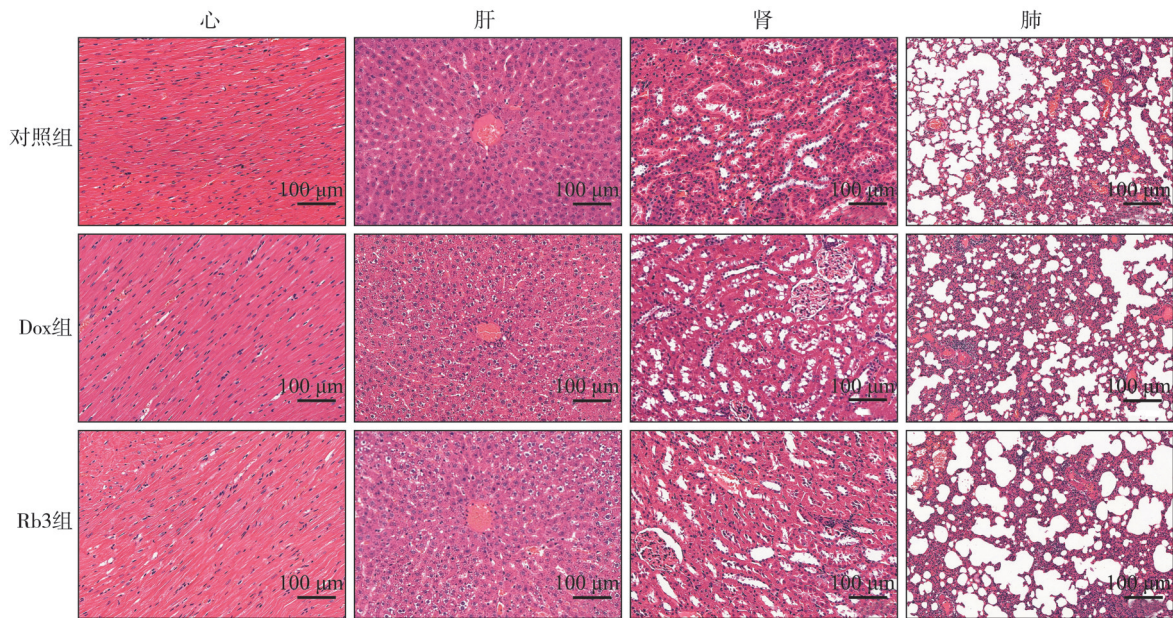


图1 大鼠心脏、肺脏、肾脏和肝脏组织的HE染色结果

Fig 1 HE staining of rat heart, lung, kidney, and liver tissue sections

### 2.3 Rb3对实验性牙周炎大鼠牙周组织和外周血液炎症因子表达的影响

牙周组织的qPCR结果(图3A)显示,Rb3和Dox抑制炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA表达水平( $P<0.05$ )。大鼠心脏血液离心后取上清,ELISA法检测血清中炎症因子含量(图3B),与对照组相比,结扎组大鼠血清中IL-6、IL-8含量显著提高( $P<0.05$ )。与结扎组相比,Rb3组和Dox组均可下调IL-6、IL-8等炎症因子的表达,恢复到和对照组接近或者更低的水平,但在下调IL-8方面,Rb3相较于Dox组表现更佳( $P<0.05$ )。因此认为Rb3和Dox可抑制实验性牙周炎大鼠牙周组织和外周血液炎症因子的表达,两者在对不同炎症因子的降低方面各有侧重。

### 2.4 Rb3对实验性牙周炎大鼠牙周组织破骨转化相关基因的影响

qPCR结果(图4)显示,牙周炎建模使得转录因子NFATc1 mRNA的表达显著上调,Rb3组和Dox组则下调NFATc1 mRNA的表达( $P<0.05$ ),但Rb3组可下调恢复至更接近健康大鼠的水平。结扎导致实验性牙周炎显著上调大鼠牙龈组织CTSK、ACP5和MMP-9 mRNA的表达,Rb3和Dox均能下调上述基因表达,相较于Dox组,Rb3降低破骨因子CTSK、ACP5和MMP-9 mRNA水平更显著( $P<0.05$ )。上述结果说明Rb3和Dox两种药物抑制破骨的机制可能是通过抑制破骨关键转录因子NFATc1 mRNA表达进而抑制其下游基因实

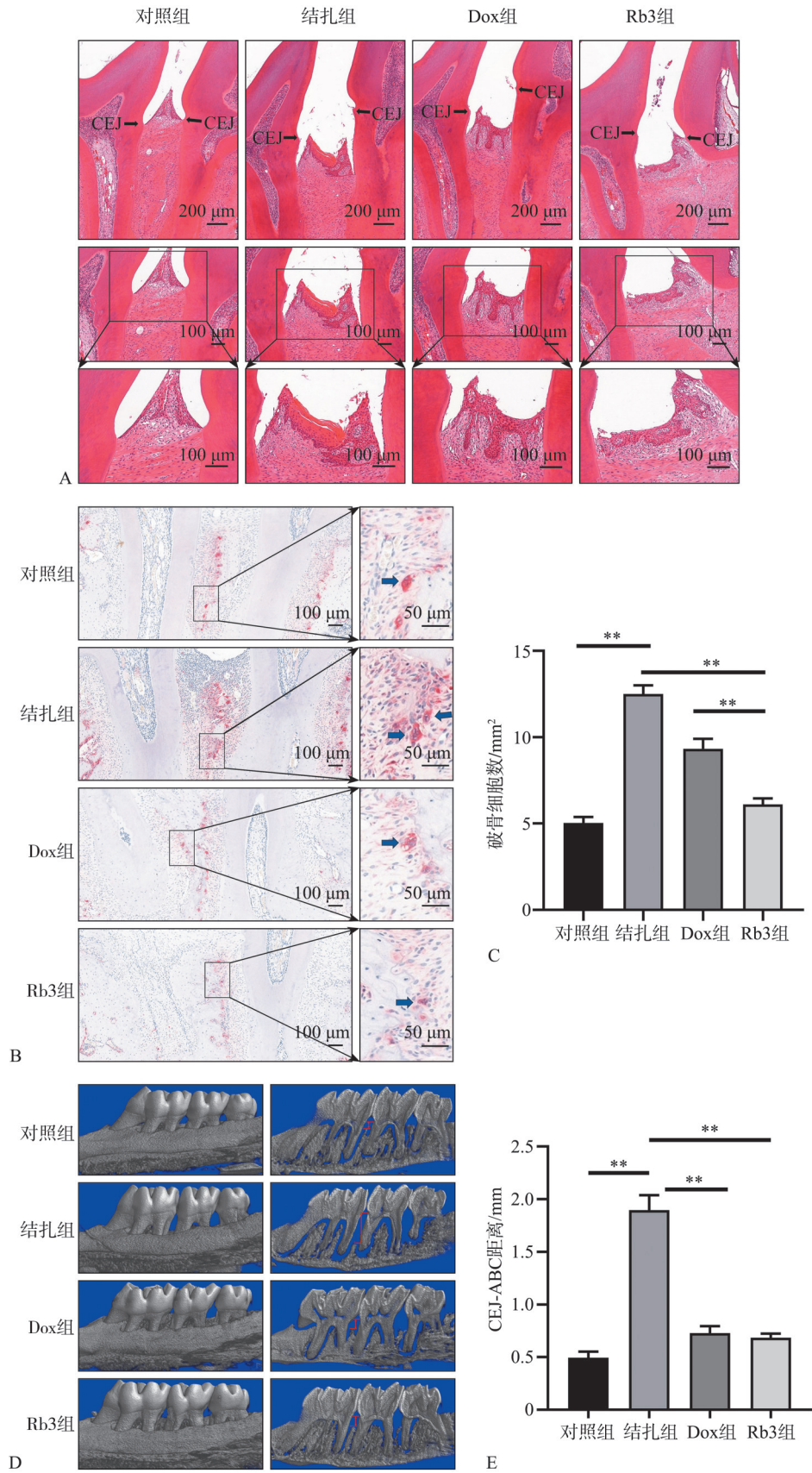
现,达到抑制破骨细胞的产生,抑制牙槽骨吸收的效果。

### 2.5 Rb3对实验性牙周炎大鼠外周血液中免疫球蛋白水平的影响

ELISA法结果(图5)显示,与对照组相比,结扎组大鼠血清中IgG、IgM含量显著增加,Rb3组、Dox组大鼠血清中IgG、IgM水平显著下降( $P<0.05$ )。结果说明Rb3和Dox两种药物或可调节免疫如通过降低外周血液中的IgG、IgM等特定抗体水平减轻牙周炎症。

### 2.6 Rb3对*P. gingivalis* LPS刺激RAW264.7细胞引起的炎症因子表达的影响

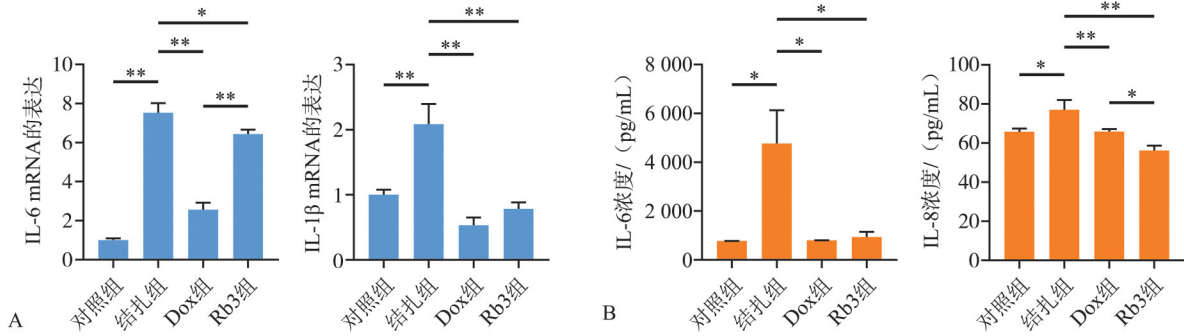
CCK-8结果(图6上)表明,50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  Rb3对RAW264.7细胞的活力相较于对照组没有差别,浓度在400  $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力下降( $P<0.05$ )。25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  Dox对RAW264.7细胞活力相较于对照组没有差别,浓度在200  $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力下降明显( $P<0.05$ )。选择浓度为1  $\mu\text{g/mL}$ 的*P. gingivalis* LPS刺激RAW264.7细胞建立炎症细胞模型。qPCR结果(图6下)显示,*P. gingivalis* LPS上调IL-8和IL-1 $\beta$  mRNA表达( $P<0.05$ )。Rb3预处理呈浓度依赖性下调IL-8和IL-1 $\beta$ 的表达( $P<0.05$ ),但浓度在100和200  $\mu\text{mol/L}$ 时,差异无统计学意义。Dox组也可下调IL-8和IL-1 $\beta$  mRNA的表达( $P<0.05$ ),但IL-1 $\beta$  mRNA表达水平的降低与浓度无明显相关联趋势呈现。



A: 牙周组织切片 HE 染色; B: 牙周组织切片 TRAP 染色; C: 破骨细胞数分析, \*\*P<0.01; D: Micro-CT 颊侧、冠状切面图像; E: CEJ-ABC 距离分析, \*\*P<0.01。

图 2 Rb3 抑制实验性牙周炎大鼠牙周组织炎症和牙槽骨吸收

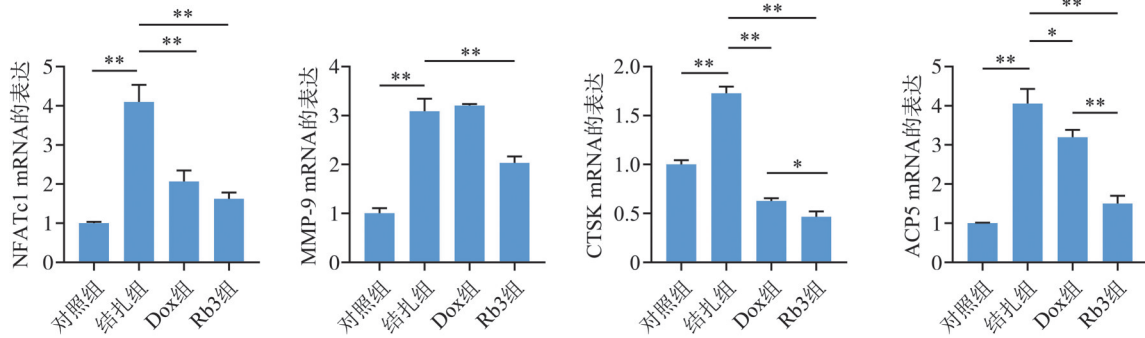
Fig 2 Rb3 inhibits periodontal tissue inflammation and alveolar bone resorption in experimental periodontitis rats



A: 牙周组织相关炎症因子的qPCR结果; B: 外周血相关炎症因子的ELISA结果。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图3 Rb3和Dox抑制大鼠牙周组织和外周血液炎症因子表达

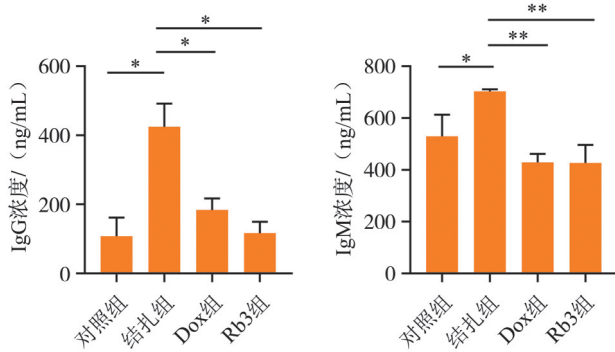
Fig 3 Rb3 and Dox inhibit the expression of inflammatory factors in rat periodontal tissue and peripheral blood



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图4 Rb3和Dox抑制大鼠牙周组织破骨因子表达

Fig 4 Rb3 and Dox inhibit the expression of osteoclast factor in rat periodontal tissue



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图5 Rb3和Dox抑制大鼠外周血液中IgG、IgM水平

Fig 5 Rb3 and Dox inhibit IgG and IgM levels in peripheral blood of rats

### 2.7 Rb3对MAPKs信号通路的影响

通过Western blot分析检测Rb3和Dox对MAPKs信号通路的影响。*P.gingivalis* LPS刺激RAW-264.7细胞,结果显示,LPS刺激可以使得MAPKs通路中的关键信号分子磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶(phospho-p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38 MAPK)/p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、p-

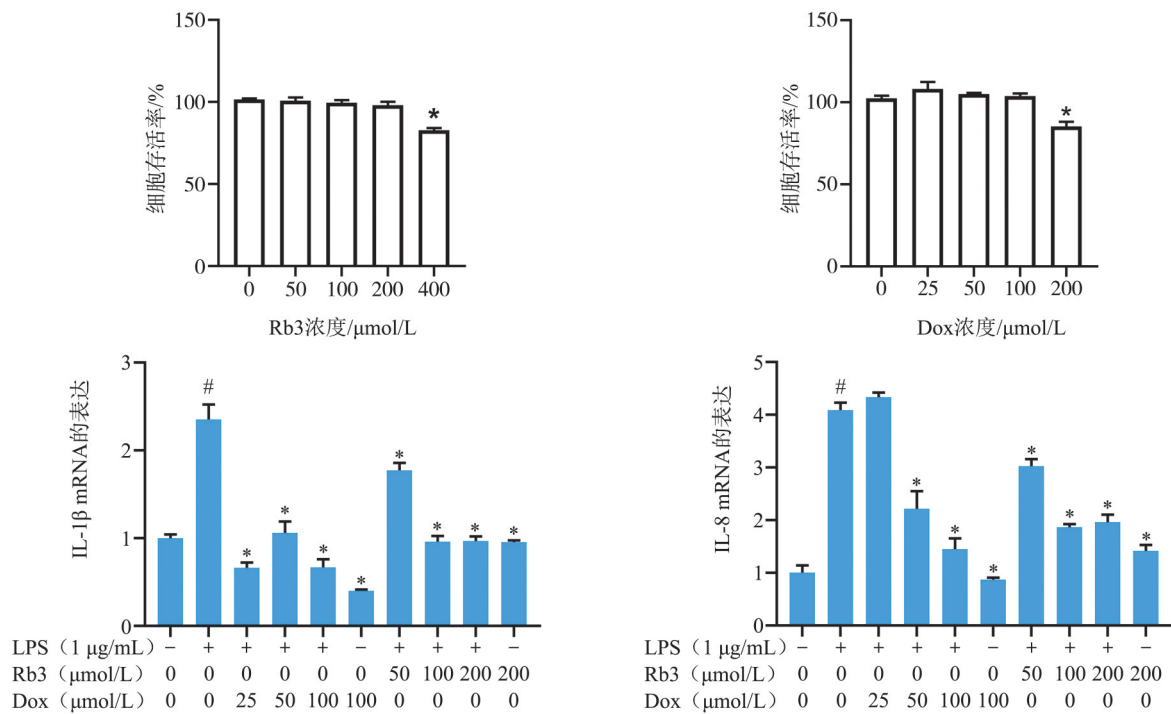
ERK/ERK的比值显著增加,Rb3处理降低了p-ERK,但在100 μmol/L浓度下p-p38 MAPK才出现显著降低( $P < 0.05$ )。Dox组未观察到对p-p38 MAPK、p-ERK有影响(图7上)。为了验证Western blot分析结果,将各个组大鼠牙周组织的切片进行MAPKs通路相关分子的免疫荧光染色。结果显示,实验性牙周炎模型组大鼠的牙周组织中牙龈乳头区及以下的结缔组织区细胞内p-ERK呈现高表达,Rb3组大鼠的同样区域的p-ERK表达水平显著下降(图7下)。

### 3 讨论

目前越来越多的研究聚焦于中草药,并尝试阐明药物在疾病进程中的具体分子机制。炎症和牙槽骨吸收作为牙周炎的主要病理基础之一,往往是衡量药物对牙周炎作用效果的指标。人参皂苷Rb3作为中药材人参中的主要活性成分之一,在一些疾病中证实具有抗炎、抗破骨、抗氧化、抗内皮损伤等多种药理作用。而近年来研究<sup>[10,22,24-25]</sup>发现Rb3在牙周炎治疗方面也具有显著作用,本

研究则探讨人参皂昔 Rb3 对大鼠实验性牙周炎骨

吸收及炎症的影响。



上：细胞活性实验结果，\*与对照组相比 P<0.05；下：IL-1β、IL-8 mRNA 表达情况，#与对照组相比 P<0.05，\*与 LPS 组相比 P<0.05。

图 6 Rb3 和 Dox 对 RAW264.7 细胞活性及炎症因子 mRNA 表达的影响

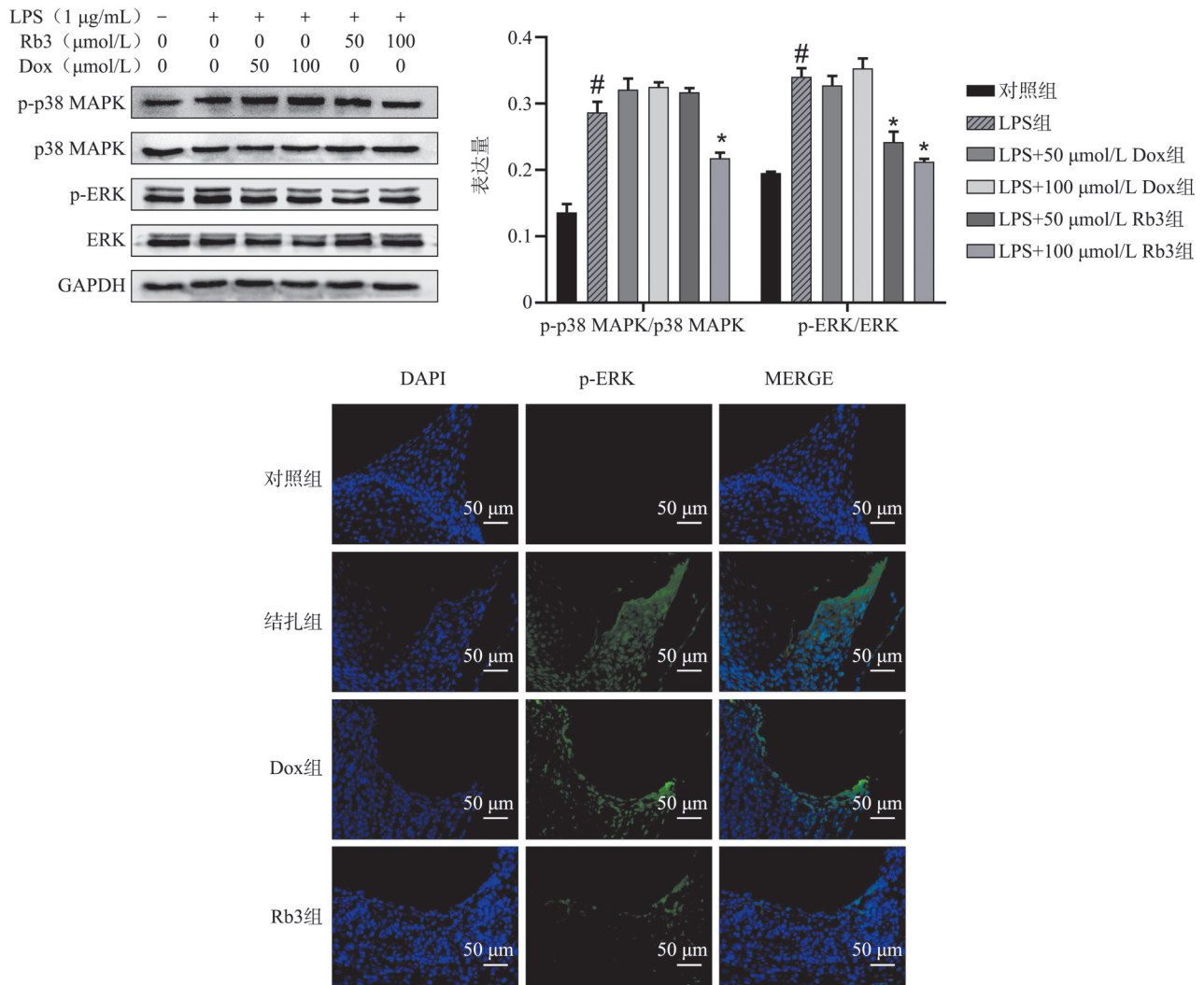
Fig 6 The effects of Rb3 and Dox on the activity and mRNA expression of inflammatory factors in RAW264.7 cells

在大鼠的结扎诱导实验性牙周炎模型中，牙周组织发生炎症和牙槽骨的快速丧失是最主要的特征<sup>[26-27]</sup>，为了更好地观察 Rb3 对大鼠实验性牙周炎的治疗效果，选择 HE 染色、TRAP 染色和 Micro-CT 等方法更直观地综合评估 Rb3 在抑制炎症和骨吸收的效果。Rb3 组虽然局部炎症较健康大鼠严重，但炎症细胞浸润可以观察到减轻，牙周炎症状较结扎组和 Dox 组明显好转。在抑制牙槽骨吸收方面，Rb3 治疗同样显示出了更明显的效果，牙周组织 TRAP 染色显示，在单位面积内 Rb3 治疗可以显著降低实验性牙周炎导致的破骨细胞数量，从而抑制破骨作用，显示出更好抑制牙槽骨吸收效果。而 Micro-CT 结果也与 TRAP 染色结果相一致，Rb3 组牙槽骨吸收程度更低，牙槽骨连续性更完整，更接近对照组骨量水平。

有学者<sup>[28]</sup>研究发现亚抗菌剂量 Dox 在结扎诱导的大鼠牙周炎中可以显著下调 PAR2、IL-17、TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达。在本研究动物实验中也出现了相似的结果，在结扎诱导大鼠实验性牙周炎模型中，牙周组织中促炎症因子 IL-1β、IL-6 mRNA 表达水平显著升高，Rb3 和 Dox 组可显著下调上述因子的表达水平；而大鼠外周血的 ELISA 检测结果显示，对比结扎组，Rb3 可明显降低 IL-

6、IL-8 的蛋白表达水平，在 IL-8 表达降低方面 Rb3 组较 Dox 组更为显著。因此认为，Rb3 可抑制实验性牙周炎大鼠牙周组织促炎症因子 mRNA 表达并可降低外周血液循环中的炎症介质水平，从而抑制牙周炎症进展。

在破骨细胞分化形成过程中，RANKL 与受体结合，激活 MAPKs/NF-κB 信号通路，启动 NFATc1 的表达，进而促进下游破骨相关基因的转录增加，导致骨破坏的发生<sup>[29-30]</sup>。本研究对大鼠牙周组织中的破骨分化过程核心转录因子 NFATc1 及相关特征基因 MMP-9、CTSK、ACP5 的 mRNA 表达进行了检测。结果显示 Rb3 能显著降低因牙周炎导致的 NFATc1 及 MMP-9、CTSK、ACP5 mRNA 表达，且与 Dox 组相比，Rb3 组降低上述基因表达的作用更为明显，特别是抑制 CTSK、ACP5 mRNA 表达方面。TRAP 染色和 Micro-CT 结果与 PCR 结果对应，无论是在破骨细胞量化数目的减少和牙周骨量的保持方面，均显示 Rb3 在抑制牙周炎破骨作用相较于 Dox 表现更出色。实验结果证明 Rb3 或可通过抑制破骨基因表达在牙周炎治疗中发挥重大作用，但尚需更具体的机制方面研究及进一步实验结果支持。



上: Rb3抑制 p38 MAPK、ERK 的活化, #与对照组相比  $P < 0.05$ , \*与 LPS 组相比  $P < 0.05$ ; 下: Rb3 抑制大鼠牙周组织中 p-ERK 的表达。

图 7 Rb3 对 MAPKs 信号通路的影响

Fig 7 The effect of Rb3 on the MAPKs signaling pathway

牙周炎的病理过程实际上是宿主机体对口腔菌斑微生物产生的过度免疫反应<sup>[6]</sup>, 在机体免疫调节过程中, 血清中的 IgG 和 IgM 等特定抗体水平可以作为反映牙周炎程度的标志<sup>[31-33]</sup>。本研究进一步讨论了大鼠实验性牙周炎模型中血清免疫球蛋白水平和牙周炎的相关性及 Rb3 是否通过调节免疫应答改善牙周状况。实验结果显示: 结扎导致牙周炎大鼠血清中的 IgG 和 IgM 含量显著提高, Rb3 给药可明显下调 IgG 和 IgM 水平, 恢复到正常或接近正常水平。

巨噬细胞在机体炎症过程中发挥重要作用, 其通过分泌炎症介质和炎症因子引发炎症级联反应, 从而导致局部稳态失衡和组织破坏<sup>[29]</sup>。 *P.gingivalis* LPS 可以导致细胞炎症因子的释放, 因此选择 *P.gingivalis* LPS 诱导 RAW 264.7 细胞作为炎症模型细胞来研究炎症作用及相关机制<sup>[34-35]</sup>。和动

物实验部分结果相似, Rb3 下调 *P.gingivalis* LPS 刺激 RAW 264.7 细胞引起的促炎症因子 mRNA 表达。MAPKs 信号通路包括磷酸化 C-Jun 氨基端激酶 (phospho-c-junn-terminal kinase, p-JNK) /C-Jun 氨基端激酶 (c-junn-terminal kinase, JNK)、p-ERK/ERK 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK, 参与调节机体多种细胞活动, 如细胞增殖、分化、凋亡、炎症等<sup>[36-37]</sup>。有研究<sup>[38]</sup>证实 p38 MAPK 活化也会诱导 NF-κB 活化, 进一步促进炎症发生, NF-κB/MAPK 信号通路在炎症过程中扮演重要角色。为了验证 Rb3 是否对该信号通路有影响, 本研究在体内、体外实验检测了相关指标, 发现 Rb3 治疗可以降低炎症细胞中 ERK 与 p38 MAPK 的磷酸化水平, 而大鼠牙周组织免疫荧光染色结果则显示 Rb3 治疗可以显著降低大鼠牙周组织中 p-ERK 表达水平。这提示 Rb3 减轻牙周炎症发生的机制之一可能是

通过抑制NF- $\kappa$ B/MAPK信号通路的激活实现。

综上所述, Rb3在牙周炎模型大鼠药物治疗中可能通过激活MAPKs信号通路、降低牙周组织促炎症因子mRNA表达、降低外周血炎症介质水平及抑制破骨基因表达、减少破骨细胞生成发挥抗炎、抗破骨作用。相较于经典用药Dox, Rb3在一些炎症、破骨指标减少方面表现较好, 展现了进一步开发利用的潜力。后续将开展Rb3对NF- $\kappa$ B/MAPK信号通路的具体调控机制及Rb3药物载体方面的研究, 以期对Rb3临床应用提供更多验证。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Yang B, Pang X, Li Z, et al. Immunomodulation in the treatment of periodontitis: progress and perspectives[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 781378.
- [2] Yang X, Liu P, Fan X, et al. Distribution and influencing factors on residual pockets of the teeth in patients with periodontitis following non-surgical periodontal treatment: a retrospective observational study[J]. *BMC Oral Health*, 2023, 23(1): 736.
- [3] Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis-a comprehensive review[J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44 Suppl 18: S94-S105.
- [4] Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: consensus report[J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47(3): 268-288.
- [5] Hajishengallis G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: evidence, mechanisms, and implications[J]. *Periodontol 2000*, 2022, 89(1): 9-18.
- [6] Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(7): 481-490.
- [7] Ren J, Fok MR, Zhang Y, et al. The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs as adjuncts to periodontal treatment and in periodontal regeneration[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 149.
- [8] Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis[J]. *Int J Oral Sci*, 2019, 11(3): 30.
- [9] Zeng XZ, Zhang YY, Yang Q, et al. Artesunate attenuates LPS-induced osteoclastogenesis by suppressing TLR4/TRAF6 and PLC $\gamma$ 1-Ca $^{2+}$ -NFATc1 signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(2): 229-236.
- [10] Sun M, Ji Y, Zhou S, et al. Ginsenoside Rb3 inhibits osteoclastogenesis via ERK/NF- $\kappa$ B signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oral Dis*, 2023, 29(8): 3460-3471.
- [11] Abdulkareem A, Abdulbaqi H, Gul S, et al. Classic vs. Novel antibacterial approaches for eradicating dental biofilm as adjunct to periodontal debridement: an evidence-based overview[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 11(1): 9.
- [12] Sanz M, Herrera D, Kebschull M, et al. Treatment of stage I - III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline[J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47 Suppl 22: 4-60.
- [13] Herrera D, Matesanz P, Martín C, et al. Adjunctive effect of locally delivered antimicrobials in periodontitis therapy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47 Suppl 22: 239-256.
- [14] Attia MS, Alblowi JA. Effect of subantimicrobial dose doxycycline treatment on gingival crevicular fluid levels of MMP-9 and MMP-13 in periodontitis stage 2, grade B in subjects with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 2807259.
- [15] Aras H, Çağlayan F, Güncü GN, et al. Effect of systemically administered naproxen sodium on clinical parameters and myeloperoxidase and elastase-like activity levels in gingival crevicular fluid[J]. *J Periodontol*, 2007, 78(5): 868-873.
- [16] Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, et al. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review[J]. *J Clin Periodontol*, 2004, 31(9): 697-707.
- [17] Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, et al. Effects of a single topical doxycycline administration adjunctive to mechanical debridement in patients with persistent/recurrent periodontitis but acceptable oral hygiene during supportive periodontal therapy[J]. *J Clin Periodontol*, 2012, 39(5): 475-482.
- [18] Gürkan A, Cinarcik S, Hüseyinov A. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline: effect on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor-beta levels in severe, generalized chronic periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2005, 32(3): 244-253.
- [19] Wang Y, Dong J, Liu P, et al. Ginsenoside Rb3 attenuates oxidative stress and preserves endothelial function in renal arteries from hypertensive rats[J]. *Br J Pharmacol*,

- 2014, 171(13): 3171-3181.
- [20] Ma CH, Chou WC, Wu CH, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates TNF- $\alpha$ -induced damage in chondrocytes through regulating SIRT1-mediated anti-apoptotic and anti-inflammatory mechanisms[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(12): 1972.
- [21] Oh H, Cho W, Park SY, et al. Ginsenoside Rb3 ameliorates podocyte injury under hyperlipidemic conditions via PPAR $\delta$ - or SIRT6-mediated suppression of inflammation and oxidative stress[J]. *J Ginseng Res*, 2023, 47(3): 400-407.
- [22] Sun M, Ji Y, Li Z, et al. Ginsenoside Rb3 inhibits pro-inflammatory cytokines via MAPK/AKT/NF- $\kappa$ B pathways and attenuates rat alveolar bone resorption in response to *Porphyromonas gingivalis* LPS[J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4815.
- [23] Buduneli E, Vardar S, Buduneli N, et al. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats[J]. *J Periodontol*, 2004, 75(11): 1516-1523.
- [24] Sun J, Yu X, Huangpu H, et al. Ginsenoside Rb3 protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via activating the antioxidation signaling pathway of PERK/Nrf2/HMOX1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 254-261.
- [25] Ma L, Liu H, Xie Z, et al. Ginsenoside Rb3 protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury via the inhibition of JNK-mediated NF- $\kappa$ B pathway: a mouse cardiomyocyte model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e-103628.
- [26] de Molon RS, Park CH, Jin Q, et al. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis[J]. *Microsc Res Tech*, 2018, 81(12): 1412-1421.
- [27] Chen MH, Wang YH, Sun BJ, et al. HIF-1 $\alpha$  activator DMOG inhibits alveolar bone resorption in murine periodontitis by regulating macrophage polarization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107901.
- [28] Castro ML, Franco GC, Branco-De-Almeida LS, et al. Downregulation of proteinase-activated receptor-2, interleukin-17, and other proinflammatory genes by subantimicrobial doxycycline dose in a rat periodontitis model [J]. *J Periodontol*, 2016, 87(2): 203-210.
- [29] Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 567-592.
- [30] Wu L, Luo Z, Liu Y, et al. Aspirin inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in dendritic cells by suppressing NF- $\kappa$ B and NFATc1 activation[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 375.
- [31] Mikuls TR, Payne JB, Reinhardt RA, et al. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(1): 38-42.
- [32] Isola G, Polizzi A, Patini R, et al. Association among serum and salivary *A. actinomycetemcomitans* specific immunoglobulin antibodies and periodontitis[J]. *BMC Oral Health*, 2020, 20(1): 283.
- [33] Damgaard C, Reinholdt J, Enevold C, et al. Immunoglobulin G antibodies against *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in cardiovascular disease and periodontitis[J]. *J Oral Microbiol*, 2017, 9(1): 1374154.
- [34] Jeong S, Kim MB, Baek S, et al. Suppression of pro-inflammatory M1 polarization of LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells by fucoxanthin-rich sargassum hemiphyllum[J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(10): 533.
- [35] Ge YT, Zhong AQ, Xu GF, et al. Resveratrol protects BV2 mouse microglial cells against LPS-induced inflammatory injury by altering the miR-146a-5p/TRAF6/NF- $\kappa$ B axis[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2019, 41(5): 549-557.
- [36] Zhou F, Mei J, Han X, et al. Ginsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF- $\kappa$ B/MAPK signaling and protecting chondrocytes[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(5): 973-985.
- [37] Liu L, Guo H, Song A, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways[J]. *BMC Immunol*, 2020, 21(1): 32.
- [38] Wang J, Feng MJ, Zhang R, et al. C-reactive protein/oxidized low density lipoprotein/ $\beta$ 2-glycoprotein I complexes induce lipid accumulation and inflammatory reaction in macrophages via p38/mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3490-3498.

(本文编辑 杜冰)