

香芹酚水凝胶对牙周炎大鼠牙槽骨保护作用研究

周露露 滕念 高甜甜 王洪斌 高翔
东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030

[摘要] **目的** 本研究旨在探究香芹酚水凝胶对牙周炎大鼠牙槽骨的保护作用及机制。**方法** 以泊洛沙姆、羟丙基甲基纤维素为基质, 制备负载香芹酚的温敏型水凝胶。SD大鼠经结扎线法造模, 随机分为空白对照组、牙周炎组、空白水凝胶组及低、中、高剂量香芹酚水凝胶组, 观察各组大鼠牙周炎症状及牙槽骨CT结构; 观察肝、脾、肾及牙周组织变化; 检测血清中骨代谢指标; Western blot检测骨保护素(OPG)及核因子- κ B(NF- κ B)通路蛋白表达; 定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测炎症因子水平。**结果** 香芹酚水凝胶具有良好缓释性、生物相容性及细胞黏附性; 香芹酚水凝胶组大鼠牙周炎症状明显减轻, 牙龈组织中OPG蛋白表达显著增加($P<0.01$), 核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)、核因子- κ B受体活化因子(RANK)、NF- κ B蛋白水平及各炎症因子水平大幅降低($P<0.01$)。**结论** 香芹酚水凝胶可调节OPG、NF- κ B通路, 减少牙槽骨吸收, 改善牙周炎症。

[关键词] 牙周炎; 香芹酚; 水凝胶; 骨保护素通路; 核因子- κ B通路; 牙槽骨吸收

[中图分类号] Q257 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2024037



本文链接 开放科学标识码

Protective effect of carvacrol hydrogel on the alveolar bone in rats with periodontitis

Zhou Lulu, Teng Nian, Gao Tiantian, Wang Hongbin, Gao Xiang

College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Supported by: 2023 "Outstanding Youth" Project of Heilongjiang Province (YQ2023C016)

Correspondence: Gao Xiang, E-mail: gam2006gx@neau.edu.com

[Abstract] **Objective** This study aimed to investigate the protective effect and mechanism of carvacrol hydrogel on the alveolar bone in rats with periodontitis. **Methods** A thermosensitive hydrogel supported by carvacrol was prepared using poloxamer and hydroxypropyl methyl cellulose as matrix. SD rats were randomly divided into blank group, periodontitis group, blank hydrogel group, and low-, medium-, and high-dose hydrogel groups. The periodontitis symptoms and the CT structure of the alveolar bone were observed. The changes in liver, spleen, kidney, and periodontal tissues were observed. The related indexes of bone metabolism in serum were detected. The expression of osteoprotegerin (OPG) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) pathway proteins was determined by Western blot. The levels of inflammatory factors were assessed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** Carvacrol hydrogel had good slow release, biocompatibility, and cell adhesion. The periodontitis of rats in the carvacrol hydrogel group was significantly alleviated, the expression of OPG protein in gingival tissue was significantly increased ($P<0.01$), and the levels of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), receptor activator of NF- κ B (RANK), NF- κ B protein, and inflammatory factors were significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Carvacrol hydrogel can regulate the OPG and NF- κ B pathways, reduce alveolar bone absorption, and improve periodontal inflammation.

[Key words] periodontitis; carvacrol; hydrogel; osteoprotegerin pathway; nuclear transcription factor- κ B pathway; alveolar bone resorption

[收稿日期] 2024-01-24; **[修回日期]** 2024-06-03

[基金项目] 2023年黑龙江省“优秀青年”项目(YQ2023C016)

[作者简介] 周露露, 硕士, E-mail: ll1728905672@163.com

[通信作者] 高翔, 副教授, 博士, E-mail: gam2006gx@neau.edu.com

com

牙周炎是人类常发的一种慢性炎症性、非传染性的疾病，主要临床表现为牙龈附着丧失、牙龈出血、牙周袋形成、牙槽骨缺失^[1]，同时伴随咀嚼紊乱、疼痛等现象，严重影响人体健康^[2]。有研究表明牙周炎与多种人类全身系统性疾病密切相关，如心脑血管疾病^[3]、类风湿性关节炎^[4]、糖尿病^[5]等。目前，临床上多通过机械清创联合抗生素治疗牙周炎^[6]，然而，频繁使用抗生素类药物，常会导致出现药物残留、耐药菌及药物不良反应等问题^[7-9]。因此，寻找一种具有低不良反应、低耐药性、低残留的天然植物药物作为抗生素的替代品，是人类牙周炎治疗领域的研究热点和临床需求。

香芹酚 (carvacrol) 是一类来源广泛、价格低廉、安全可靠的药用植物提取物^[10-12]，具有广谱抗菌、抗炎、抗氧化、低细胞毒性以及骨保护等作用^[13-14]，已将其添加至漱口水、牙科封闭剂、水门汀、凝胶、甘油等药物中，用来治疗牙本质敏感、牙周炎、牙髓炎等口腔常见疾病^[15]。但由于其具有疏水性以及不稳定性等特点^[16]，限制了其药物治疗方面的应用。因此，需要选择合适的载药系统负载香芹酚以改善其疏水性，提高稳定性及生物活性。

温敏型水凝胶作为一种具有亲水性的三维网状凝胶，因其良好的生物相容性、黏膜亲和性及生物降解性^[17-19]，常被用作药物缓释载体，在生物医学、组织工程等方面有着广泛应用。泊洛沙姆 (poloxamer, PEO-PPO-PEO) 是一种温敏型合成聚合物，常用来制备可注射水凝胶^[20]。与其他常用的水凝胶基质，如壳聚糖、透明质酸等相比，泊洛沙姆水凝胶制作工艺简单，只需混合交融即可，不需要对化学键进行修饰或者改性，同时由于其独特三嵌段结构，使其具有一定的亲油性^[21]，能够增加香芹酚的溶解性。但采用单一泊洛沙姆制备的水凝胶，普遍存在着稳定性差、功能单一、相变温度区间大等问题^[22]。因此，常将泊洛沙姆 407 (F127) 与泊洛沙姆 188 (F68) 联合使用，来提高胶凝温度^[23]。羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC) 作为悬浮剂不仅可以增加水凝胶体系的黏附性，还能升高胶凝温度，延长水凝胶在室温条件下的保存时间^[24]。本研究选择泊洛沙姆 407 (F127)、188 (F68) 和 HPMC 作为基质，制备负载香芹酚的温敏型水凝胶，以实现局部特异性给药。该给药方式不仅可以避免因肝脏首过效应而造成药效减少、多次给药或

者增大药量等问题，而且还能有助于维持和控制药物释放的时间和浓度^[25]。

研究证明，骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) /核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) /核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 信号通路及核因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 信号通路在牙周炎的发展过程中发挥着至关重要的作用，不仅参与炎症反应的调控，还涉及骨吸收等关键过程^[26-27]。然而，香芹酚对该通路的作用及机制，目前尚未有研究报道。为此，本研究拟通过构建大鼠牙周炎动物模型，观察香芹酚水凝胶对大鼠牙槽骨缺损的修复效果，并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

本实验过程中所涉及到的动物饲养、动物实验均通过了东北农业大学实验动物伦理学委员会 (SRM-11) 的认可 (编号: NEAUEC20230341)。

1.1 实验动物及分组

由辽宁长生生物科技有限公司供应 SPF 级健康雌性 SD 大鼠 100 只，周龄约 4 周，体重 180~200 g，执照编号为 SCXK (辽) 2020-0001。将大鼠集中安置于光照、温度、湿度均适宜的环境中饲养^[28]，1 周之后，进行后续实验。随机挑选出 15 只大鼠作为对照组 (control group, C)，剩余作为模型组，用于构建牙周炎模型。

1.2 主要药物和试剂

香芹酚 (纯度 99%，南京百慕达生物科技有限公司)；泊洛沙姆 407 (F127)、188 (F68)、HPMC (Sigma Aldrich 公司，美国)；牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*, BNCC-353909，北纳生物科技有限公司)；具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*, TS273-849，宁波泰斯拓生物技术有限责任公司)；肌酐 (creatinine, CRE)、谷丙转氨酶 (glutamic pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)；一抗 OPG、RANKL、RANK、p-P65、p-IK κ α 、p-IK κ α / β (沈阳万类生物科技有限公司)；二抗 β -actin (武汉塞维尔生物科技有限公司)；OPG、RANKL、RANK、白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceralde-

hyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.3 主要仪器

恒温水浴锅(上海一恒科技仪器有限公司);电泳仪(上海天能科技有限公司);转膜仪(北京百晶生物技术有限公司);Western blot全自动发光成像系统(上海天能科技有限公司);实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.4 方法

1.4.1 温敏型水凝胶的制备

采用冷溶法制备温敏型水凝胶^[29-30]。称取定量的F127、F68和HPMC,溶于适量蒸馏水中,按照F127:F68:HPMC(体积比)=7:1:1.5比例充分混匀,4℃冰箱过夜,充分溶胀后即可得空白水凝胶^[24]。移液枪精密量取25、50、100 μL香芹酚分别加入到10 mL空白水凝胶中,充分混匀,得低、中、高剂量香芹酚水凝胶。

1.4.2 水凝胶性能表征测试

采用倒置法将空白水凝胶以及载药水凝胶置于37℃恒温水浴锅中,测定其胶凝时间;pH计检测各水凝胶pH值;选用各种型号的注射器测定各水凝胶的通针性;将胶凝好的水凝胶切割为1 mm×2 mm×5 mm小块,经冷冻、喷金处理后,于场发射扫描电子显微镜下观察其空间结构。

1.4.3 傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectrum, FTIR)测定

成功制备空白水凝胶及载药水凝胶,经冷冻干燥后研磨成粉末,与溴化钾粉末1:120混合,将其进行压片处理,制成样品圆片放入傅里叶变换红外光谱仪中进行透射率测定,实验对3种样品的扫描范围为400~4 000 cm⁻¹,后续进行红外光谱分析。

1.4.4 水凝胶药物缓释测定

配制体积分数分别为0、0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5%、1.75%、2%的香芹酚溶液,在276 nm波长下检测不同体积分数香芹酚的光密度(optical density, OD)值,得到线性回归方程。无菌环境下取1 mL低、中、高剂量香芹酚水凝胶分别置于盛有9 mL 40%乙醇的离心管中,一式3份,于37℃恒温摇床中以80 r/min连续孵育。在0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h时,取出1 mL的40%乙醇作为样本,再向管中加入等体积40%乙醇,以维持恒定的液体总体积。用酶标仪在香芹酚最大吸收波长处测定OD值。用回归方程

计算各时间点40%乙醇中香芹酚的含量及累积释放率。绘制香芹酚累积释放曲线。

1.4.5 水凝胶体外降解测定

无菌环境下取1 mL低、中、高剂量香芹酚水凝胶分别置于盛有9 mL 40%乙醇的离心管中,一式3份,于37℃恒温摇床中以80 r/min连续孵育。在0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h时,倒出离心管中全部液体,用滤纸擦干净表面水分后进行称重,比较实验前后3组水凝胶的重量损失。重量损失百分比=(培养前重量-培养后重量)/培养前重量×100%。

1.4.6 药物释放动力学

采用Origin 2021对各组香芹酚水凝胶体外降解和药物释放数据根据零级、一级和Higuchi方程进行拟合,用于评估药物释放方式。

1.4.7 细菌培养及水凝胶的抑菌性

将*P. gingivalis*和*F. nucleatum*接种于哥伦比亚血琼脂平板上,37℃厌氧培养2~4 d,挑取单菌落至无菌的PBS中制作菌悬液。用麦士比浊法确定菌液浓度,用无菌PBS将菌液进行梯度稀释,最终浓度调整为10⁸ CFU/mL,4℃备用。取200 μL菌液,涂布于哥伦比亚血琼脂平板上,无菌牛津杯放置于平板表面,各加入200 μL的空白水凝胶以及低、中、高剂量香芹酚水凝胶,经37℃无氧环境培养72 h后观察其抗菌结果,并采用0.02 mm游标卡尺测量抑菌圈直径^[31]。

1.4.8 水凝胶细胞相容性及黏附性检测

采用CCK-8及结晶紫染色法检测细胞相容性及黏附性^[32-33]。将一定量胶凝之前的空白水凝胶及载药水凝胶涂覆至12板孔1/2的底面上,37℃培养箱凝胶0.5 h,待完全凝胶之后,每孔接种6×10⁵的成骨贴壁细胞ros1728,5%CO₂培养箱,37℃培养24 h。一份用于添加CCK-8试剂继续孵育1 h,酶标仪测定OD值,计算水凝胶表面黏附的活细胞数量;另一份用于结晶紫染色,观察水凝胶表面黏附的活细胞。

1.4.9 大鼠牙周炎模型的构造与药物干预

实验前对模型组大鼠空腹称重,麻醉后,将其仰卧位固定大鼠于实验台,探针分离双侧上颌第一磨牙形成人造牙周袋,开口器打开大鼠口腔,暴露双侧上颌磨牙,使用直径0.2 mm的正畸钢丝结扎双侧第一磨牙颈部,龈沟内接种*P. gingivalis*和*F. nucleatum*混合菌液20 μL,每周2次,同时饲喂10%的蔗糖水,诱导牙周炎模型形成。每周检查结扎丝线2次,若有松脱应及时重新结扎。结扎

时间为4周,以牙龈红肿、探诊出血及牙周袋形成作为牙周炎主要临床症状^[34]。随后挑选出75只造模成功的大鼠,随机分为5组,分别为牙周炎组(periodontitis group, P组)、空白水凝胶组(blank hydrogel group, B组)、低剂量香芹酚水凝胶组(low dose carvacrol hydrogel group, L组)、中剂量香芹酚水凝胶组(medium dose carvacrol hydrogel group, M组)、高剂量香芹酚水凝胶组(high dose carvacrol hydrogel group, H组),每组15只SD大鼠。结扎4周后去除正畸钢丝,除对照组外,其他5组分别在颊侧和腭侧牙周袋内注射相对应药物50 μ L,确保药物注满牙周袋并溢出。每周2次,共给药4周。

1.4.10 牙周指标检测

末次药物干预后,检测大鼠牙周相关指标,邀请东北农业大学动物医学学院外科实验室及东北农业大学教学动物医院5名临床经验丰富教师共同参与评定。

牙龈出血指数(sulcus bleeding index, SBI):取第一磨牙近中颊、颊侧、远中颊3个区域^[35],牙周探针沿着龈沟插入牙周袋,在3个区域轻刮后取出,观察出血情况^[36],并根据以下标准进行评分^[37],0分,牙龈健康,无炎症及出血;1分,牙龈轻度肿胀,色泽加深,检查无出血;2分,牙龈肿胀,探诊时龈下有点状出血;3分,探诊后有出血,沿着龈缘蔓延;4分,探诊后有出血,溢出龈沟;5分,牙龈严重溃烂,有自发性出血。

牙周袋深度(pocket depth, PD):用带刻度的牙周探针测量3个区域龈缘至牙周袋底部的距离,始终保持针尖紧贴牙面,并与牙长轴平行^[35]。

1.4.11 牙槽骨影像学检查

每组挑选2只大鼠,将其上颌牙槽骨标本进行固定处理,随后进行Micro-CT扫描。扫描参数为:射线管电流200 μ A,电压85 kV,扫描整个物体,扫描分辨率10.153 741 μ m,曝光时间384 ms,扫描角度180°。使用三维重建软件NRecon(软件版本V1.7.4.2, Bruker公司,德国)对原始图像进行重建,CT Analyser分析牙槽骨吸收情况。

1.4.12 水凝胶体内生物相容性检测

牙周指标测定后,于各组大鼠心脏采血约3 mL,静置0.5 h后离心获取血清,试剂盒检测血清中CRE、ALT和AST的含量,验证各组大鼠肾功能是否异常,剩余血清-80 $^{\circ}$ C保存备用。随后处死各组大鼠,分离获取肝脏、肾脏、脾脏,固定于4%甲醛中,24 h后,浸蜡包埋、切片,苏木

精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,显微镜观察各组脏器有无病理改变。

1.4.13 牙周组织学染色

分离大鼠上颌牙周组织,用4%甲醛固定2 h后,流水冲洗24 h,10%的EDTA脱钙液中脱钙8周,乙醇梯度脱水后,进行石蜡常规包埋,厚度调至5 μ m,连续切片。脱蜡、脱水处理后,进行HE和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色,通过显微镜观察、图像收集并分析。

1.4.14 血清中骨代谢相关指标检测

酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒检测各组大鼠血清中骨钙素(osteocalcin, OCN)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)以及TRACP5b的水平。

1.4.15 Western blot 检测牙龈组织中目的蛋白的表达

处死各组大鼠,取其上颌双侧第一磨牙约1 mm牙龈组织,置于-80 $^{\circ}$ C冰柜保存备用^[38]。取出一部分牙龈组织于玻璃研磨器中,按比例加入适量的高效裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)以及磷酸酶抑制剂,在冰盒上充分碾磨,离心取上清,用BCA试剂盒进行蛋白质含量的测定,随后加入适量的PBS及Buffer,使其浓度为3 μ g/ μ L,100 $^{\circ}$ C水浴10 min后,样品于-80 $^{\circ}$ C保存。配胶,点样,每孔加入7 μ L样品,经电泳分离蛋白后,将其转至NC膜上,封闭液封闭,一抗、二抗孵育,电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)液显色,发光成像系统曝光并保存图片^[39]。实验结果用Image J软件进行分析,最终以目的蛋白条带/内参条带灰度值来表示各目的蛋白的表达水平。

1.4.16 定量反转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测牙龈组织中OPG、RANKL、RANK及炎症因子相对表达量

TRIZOL法提取牙龈组织RNA,超微量分光光度仪测其浓度,反转录试剂盒将其转录为cDNA。以内参GAPDH作为对照,采用qRT-PCR技术,检测大鼠牙龈组织中OPG信号通路以及炎症因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6的相对表达量。实验程序设定为:95 $^{\circ}$ C、5 min,95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、20 s,共40个重复,在72 $^{\circ}$ C下检测信号^[40]。每个样本重复6次,以各样本Ct值作为基础,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值。各引物序列见表1。

表 1 qRT-PCR引物序列
Tab 1 qRT-PCR primer sequences

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
OPG	CTCACTGGCCTCCTGCTAA	TCGCACAGGGTGACATCTATT
RANKL	TTCTCAGGAGTTCCAGCTATGATG	GCCCAGCCTCGATCATGGTA
RANK	GCTCAACATCCCTTGCAAGCTC	GTCCCTTGGTGTGCTTCCAT
TNF- α	GGGTGATCGGTCCCAACAAG	GCTTGGTGGTTTGCTACGA
IL-1 β	GCTTCCTTGTGCAAGTGTC	TGGACAGCCCAAGTCAAGG
IL-6	GTTTCTCTCCGCAAGAGACTTC	TGTGGGTGGTATCCTCTGTG
GAPDH	AGTGCCAGCCTCGTCT	CCGTGGGTAGAGTCATACTGG

1.5 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.5.1 软件对实验数据进行统计学处理并绘制图表。计量资料统一采用平均数 \pm 标准差来表示,使用单因子变异数对不同组间的差异进行分析,并利用 Tukey 检验法对组内的差异进行进一步的比较^[41]。 $P<0.05$ 为具有显著性差异, $P<0.01$ 为具有非常显著性差异。

2 结果

2.1 温敏型水凝胶的合成及表征结果

经物理混合方法制得空白水凝胶以及各组香芹酚水凝胶(图1),4℃状态下空白水凝胶呈现清澈透明状,各组香芹酚水凝胶呈现乳白色。

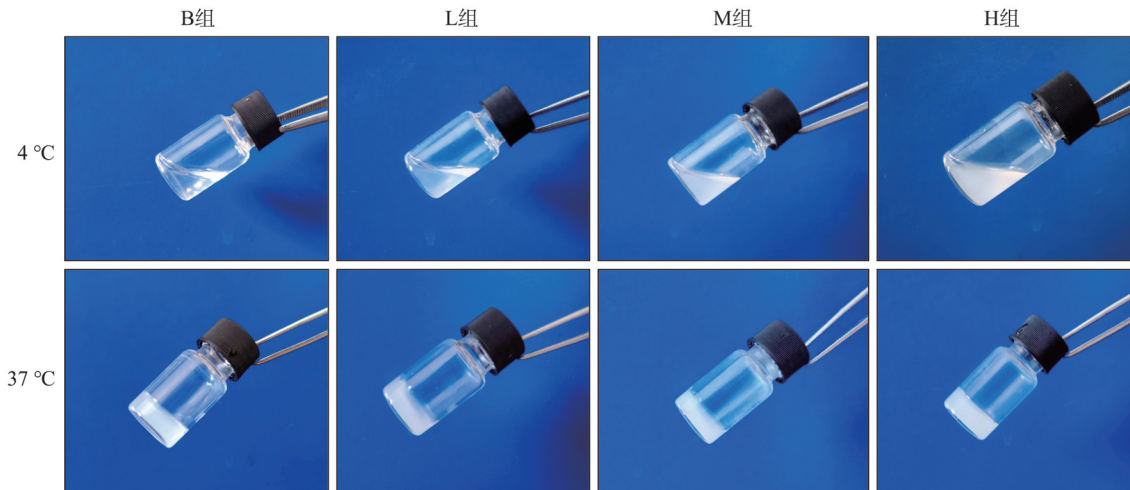


图 1 各组水凝胶的成胶图

Fig 1 Gelation diagram of each group of hydrogels

在37℃水浴条件下,空白水凝胶与各组香芹酚水凝胶的胶凝时间均为150s,其pH值为6.4~6.5,选用不同型号的注射针头,将水凝胶从针管推出,顺畅无阻力,说明通针性良好。场发射扫描电子显微镜结果显示,水凝胶均具有相同的多孔结构,且孔隙相通(图2)。在载药水凝胶中还可可见储存在孔隙中的香芹酚药物(红色圈内),表明该水凝胶能够很好地负载香芹酚,且有利于药物顺利进出。

2.2 FTIR测定结果

根据被测样品红外光谱中吸收峰的形状、位置和强度,可以得到该物质官能团信息。如图3所示,a为香芹酚红外光谱图,3200~3664 cm^{-1} 为OH基团的吸收峰,3100~2790 cm^{-1} 为 CH_3 基团的

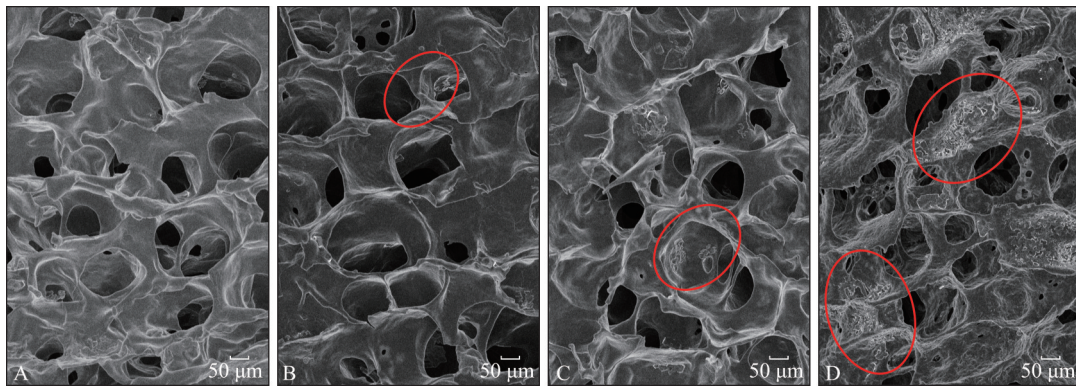
吸收峰。b为香芹酚水凝胶的红外光谱图,3000~3664 cm^{-1} 为OH基团的吸收峰,与c的空白水凝胶的红外光谱图极其相似,这是因为空白水凝胶的含量远高于香芹酚,导致香芹酚的红外吸收峰被遮盖;另一方面,b的OH基团的出峰位置(3391 cm^{-1})与c(3420 cm^{-1})相比出现右移,表明有香芹酚OH基团的引入^[42]。此外,b与c相比,峰的强度也出现不同的变化,这可能是因为香芹酚与空白水凝胶之间相互作用,出现了氢键或者范德华力^[43]。

2.3 体外药物缓释及水凝胶降解结果

在不同浓度香芹酚水凝胶中香芹酚的释放均是先快后慢,在48h内均能缓慢释放药物,且累计释放率均可达到80%,在48h后,各组水凝胶

的释放率达到平台期；水凝胶的降解也伴随着药物的释放，由此可推测香芹酚是通过溶蚀机制进

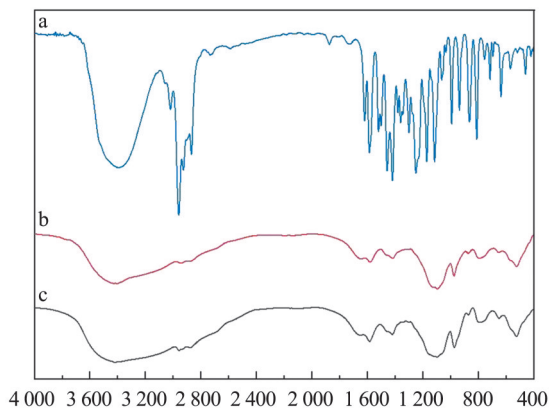
行释放的（图4）。



A: B组; B: L组; C: M组; D: H组。在载药水凝胶中见储存在孔隙中的香芹酚药物（红色圈内）。

图2 各组水凝胶扫描电子显微镜图像

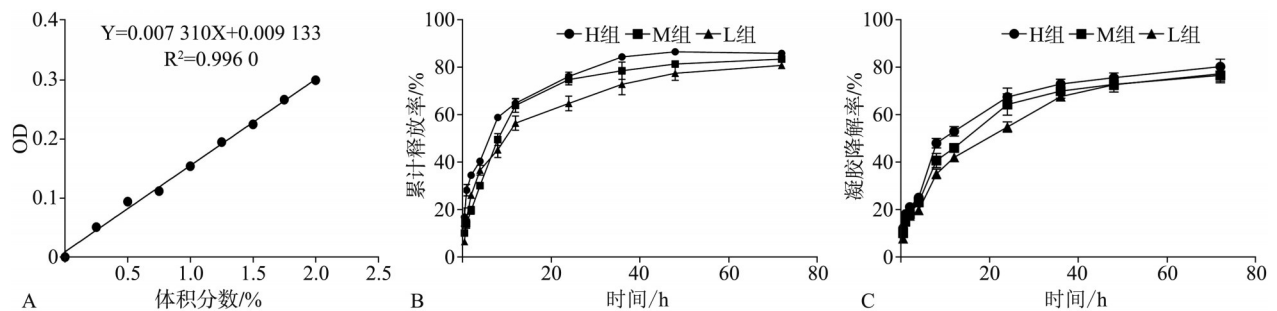
Fig 2 Scanning electron microscope image of hydrogel in each group



a: 香芹酚; b: 香芹酚水凝胶; c: 空白水凝胶。

图3 各组水凝胶FTIR测定

Fig 3 FTIR of hydrogels of each group



A: 香芹酚药物标准曲线; B: 香芹酚水凝胶缓释曲线; C: 香芹酚水凝胶降解曲线。

图4 香芹酚水凝胶的体外缓释及降解结果

Fig 4 Results of sustained release and degradation of carvacrol hydrogels in vitro

2.6 水凝胶细胞相容性及黏附性检测结果

采用结晶紫染色观察各组水凝胶对细胞黏附性，结果显示均具有良好的黏附性（图6左）。采用CCK-8法检测黏附细胞的数量，根据测得的OD值计算活细胞相对黏附率，设定空白对照组的细胞黏附率为100%。与空白对照组相比，B、L、

M、H组黏附的活细胞数量均在90%以上，表明各组水凝胶对成骨细胞均具有良好的细胞相容性，且随着药物浓度的增加，其活细胞黏附率也呈现正比例增长（图6右）。

2.7 牙周指标检测结果

与C组相比，P组大鼠的SBI和PD均显著性

2.4 药物缓释动力学结果

采用Origin 2021对香芹酚水凝胶体外降解和药物释放数据进行拟合。如果药物释放数据拟合为零级模型或一级模型，则其释放机制主要为溶蚀机制；若拟合符合Higuchi模型，其释放机制则为扩散机制^[44]。由表2可见，R²最大的为一级模型，表明药物释放机制为溶蚀机制。

2.5 细菌培养及抑菌实验结果

抑菌实验结果表明，各组香芹酚水凝胶对*P. gingivalis*、*F. nucleatum*均有抑菌性，随香芹酚浓度的增加，其抑菌圈直径明显增大，显现出更强抑菌作用（图5）。

增加 ($P<0.01$), 证明牙周炎模型构造成功。与P组相比, B组大鼠的SBI和PD无明显变化 ($P>0.05$); L、M组大鼠的SBI和PD均有所降低 ($P<0.05$); H组大鼠的SBI和PD显著降低 ($P<0.01$) (表3)。

2.8 牙槽骨影像学检查结果

如图7所示, 相比于C组, P和B组牙槽骨有相对明显的吸收, 第一、二磨牙牙根暴露面积显著增多, 上颌感兴趣区域 (region of interest, ROI) 的牙槽骨骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁数量 (Tb.N) 和骨小梁厚度 (Tb.Th) 显著低于C组, 而骨表面积/骨体积 (BS/BV)、骨小梁分离度 (Tb.Sp) 显著高于C组, 表明牙周炎模型构造成功。而随着香芹酚浓

度的增加, L、M、H组大鼠牙槽骨有不同程度的再生, 其中H组效果最为明显。

表 2 药物缓释动力学结果

Tab 2 Results of sustained release kinetics

组别	模型	累计释放率	
		模拟方程	R ²
H组	零级	Mt=28.94+1.09t	0.673 71
	一级	Mt=85.85 (1-e ^{-0.10t})	0.965 10
	Higuchi	Mt=10.87t ^{1/2} +10.49	0.858 14
M组	零级	Mt=27.30+1.06t	0.710 49
	一级	Mt=82.80 (1-e ^{-0.10t})	0.971 86
	Higuchi	Mt=10.57t ^{1/2} +9.30	0.869 72
L组	零级	Mt=24.77+1.02t	0.743 64
	一级	Mt=78.58 (1-e ^{-0.095t})	0.971 73
	Higuchi	Mt=10.16t ^{1/2} +7.68	0.892 19

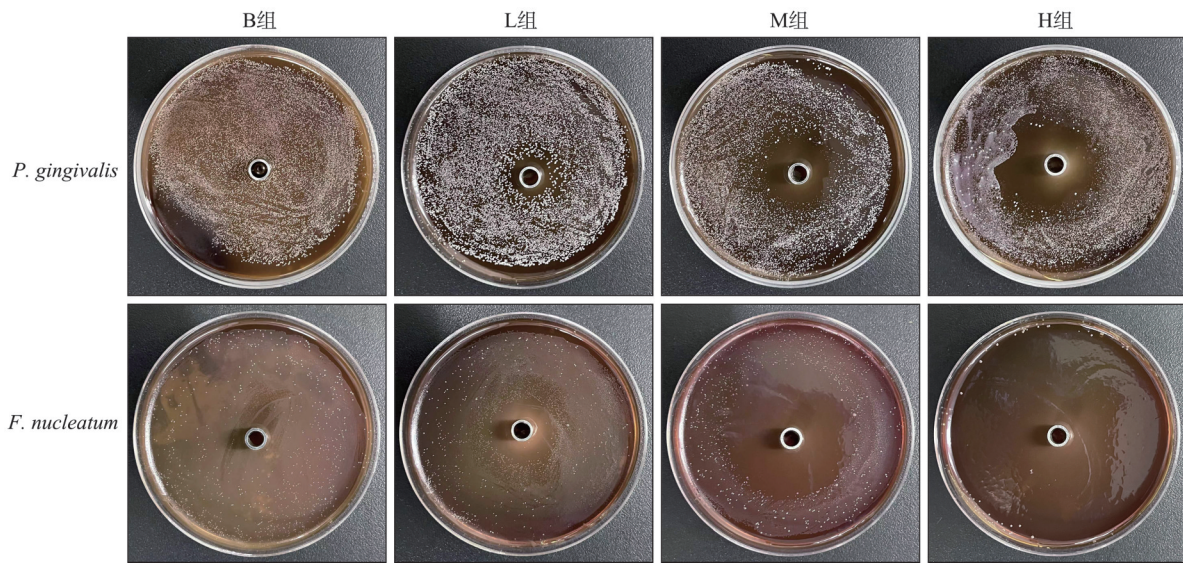
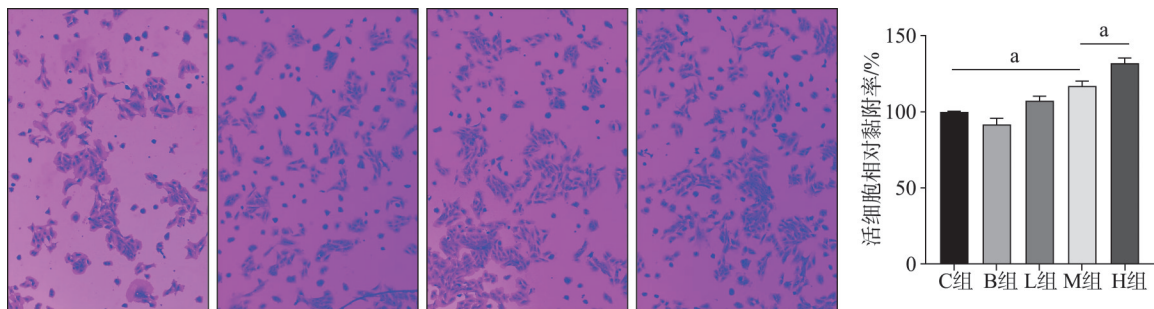


图 5 各组水凝胶对 P. gingivalis 和 F. nucleatum 的抑菌性

Fig 5 Antibacterial activity of hydrogels of each group against P. gingivalis and F. nucleatum



左: 分别为B、L、M、H组水凝胶对细胞黏附性 结晶紫染色 ×100; 右: 活细胞相对黏附率, a 为 $P<0.05$ 。

图 6 水凝胶细胞相容性及黏附性

Fig 6 Cytocompatibility and adhesion of hydrogel

2.9 水凝胶体内生物安全性检测结果

各组大鼠血清CRE、ALT和AST含量无明显差异 (图8); HE染色结果显示各组大鼠各脏器细胞形态正常, 结构清晰, 无炎性细胞浸润 (图9)。

结果均证明水凝胶对大鼠机体无毒性作用。

2.10 牙周组织学染色结果分析

HE染色显示P组和B组大鼠牙龈乳头消失, 牙龈上皮溃疡糜烂, 结合上皮向根方增殖、迁移,

形成深牙周袋，牙龈固有层炎症细胞广泛浸润，上皮钉突增生，牙槽骨吸收明显，导致牙槽嵴顶显著下移；L组大鼠的HE染色结果与B组无明显差别；M、H组大鼠的牙龈上皮结构遭到破坏，但与牙周炎相比，炎症细胞浸润显著减少，牙槽嵴顶明显上移。TRAP染色结果显示，C组没有明显的破骨细胞形成，P组和B组则显示出大量活跃的破骨细胞（黑色圆圈所示），而L、M、H组破骨细胞依次减少（图10）。

2.11 骨代谢相关指标检测结果

P、B组大鼠血清中OCN、ALP、TRACP5b水平与C组相比差异极显著 ($P<0.01$)，经载药水凝胶治疗后，L、M、H组大鼠血清中破骨相关指标TRACP5b含量逐渐降低，成骨相关指标OCN、

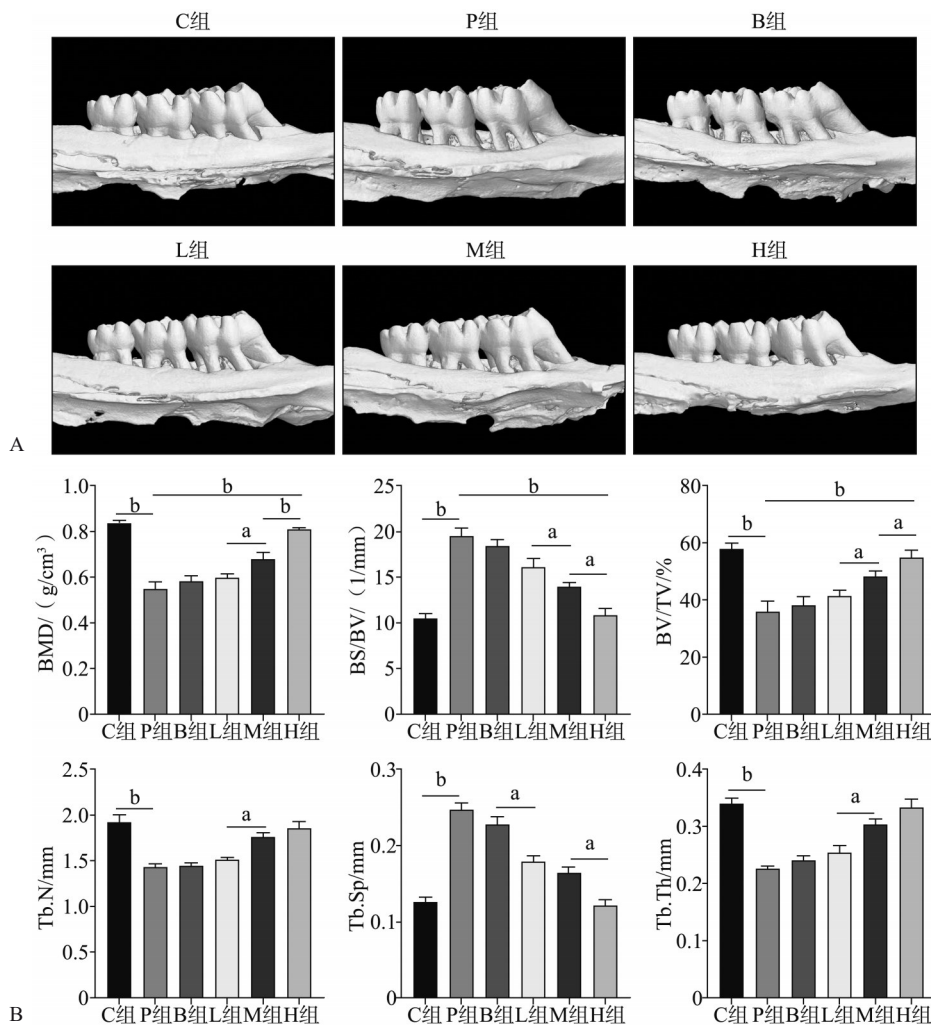
ALP水平依次升高，其中H组大鼠效果最为显著（图11）。

表 3 各组大鼠SBI和PD的比较

Tab 3 Comparison of SBI and PD in each group of rats $n=15, \bar{x}\pm s$

组别	SBI/分	PD/mm
C	0.13±0.05 ^{Bc}	0.21±0.05 ^{Bd}
P	2.50±0.29 ^{Aa}	1.04±0.04 ^{Aa}
B	2.17±0.18 ^{Aa}	0.97±0.05 ^{Aa}
L	1.38±0.23 ^{Ab}	0.76±0.08 ^{Ab}
M	0.45±0.24 ^{Ac}	0.57±0.05 ^{Ac}
H	0.19±0.07 ^{Bd}	0.24±0.04 ^{Bd}

注：Duncan法进行多重比较。在同列中，大写字母表示两组间有极显著性差异 ($P<0.01$)；小写字母表示两组间有显著性差异 ($P<0.05$)；标有相同字母的表示组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



A: 各组大鼠上颌牙槽骨Micro-CT重建图像；B: 上颌骨第一磨牙区域骨微结构，a为 $P<0.05$ ，b为 $P<0.01$ 。

图 7 各组大鼠上颌牙槽骨吸收程度

Fig 7 Maxillary alveolar bone absorption in each group

2.12 Western blot结果分析

与C组相比，P组大鼠牙龈组织中通路相关蛋白OPG表达量显著性降低 ($P<0.01$)，RANKL、

RANK、p-P65、p-IK β 、p-IKK α/β 表达量均明显增加 ($P<0.01$)；与P组相比，B组大鼠牙龈组织中通路相关蛋白OPG、RANKL、RANK、p-P65、

p-IKB α 、p-IKK α/β 表达量无明显变化 ($P>0.05$); L组大鼠牙龈组织通路相关蛋白OPG表达量均有所增加 ($P<0.05$), RANKL、RANK、p-P65、p-IKK α/β 蛋白表达量均降低 ($P<0.05$), p-IKB α 蛋白

表达量显著性降低 ($P<0.01$); M及H组大鼠牙龈组织通路相关蛋白OPG表达量均显著性增加 ($P<0.01$), RANKL、RANK、p-P65、p-IKB α 、p-IKK α/β 蛋白表达量均显著降低 ($P<0.01$) (图12)。

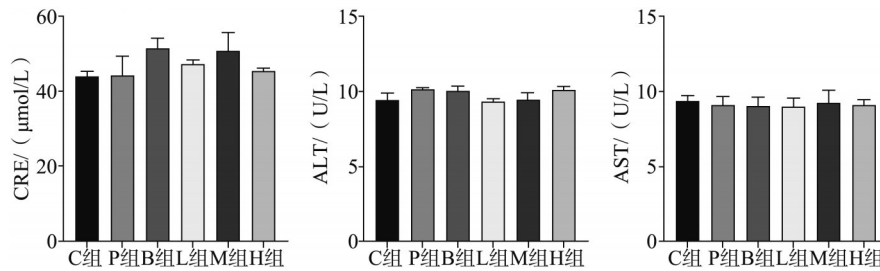


图8 各组大鼠血清中的CRE、ALT和AST含量

Fig 8 CRE, ALT, and AST contents in the serum of rats in each group

2.13 qRT-PCR结果分析

与C组相比, P组和B组大鼠牙龈组织中信号通路关键因子RANKL、RANK及炎症因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6的mRNA表达均显著性升高 ($P<0.01$), 而OPG的mRNA表达降低极为显著 ($P<0.01$); 与P组相比, L组大鼠牙龈组织中RANKL、RANK、IL-1 β 的mRNA表达水平均有所减少 ($P<0.05$), 而OPG及炎症因子TNF- α 、IL-6的mRNA表达没有明显变化 ($P>0.05$); M、H两组大鼠牙龈组织中信号通路关键因子RANKL、RANK的mRNA表达均降低, 差异极为显著 ($P<0.01$), OPG mRNA表达水平有着极其显著性的增加 ($P<0.01$), 其中M组大鼠牙龈组织中炎症因子TNF- α 、IL-6的mRNA表达仅降低 ($P<0.05$), 而IL-1 β 的mRNA水平明显下降 ($P<0.01$); 但H组大鼠牙龈组织中炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的mRNA表达水平均有明显的降低 ($P<0.01$) (图13)。

3 讨论

目前牙周炎的治疗包括去除菌斑牙石的机械疗法以及药物治疗。而药物治疗主要是使用抗生素, 如甲硝唑, 通过口服给药来达到治疗牙周炎的目的。但由于肝脏的首过效应, 使得药物进入龈沟液的浓度大幅度降低, 起不到良好的治疗效果。因此, 为提高药效, 往往会加大药物浓度或者增加给药次数, 但最终会导致机体出现肝肾损伤、全身性过敏反应等不良反应。此外, 过量应用抗生素还会导致药物残留, 细菌耐药性等问题^[45]。因此, 当前需要研发出一种新型的天然药物制剂, 以替代抗生素在人类牙周炎中的使用。

香芹酚作为多种天然植物的提取物, 具有广

谱抗菌、细胞毒性小等优点, 是近年来抗生素类药物替代物的研究热点之一^[46]。Maquera-Huacho等^[47]测定香芹酚对 *P. gingivalis* 和 *F. nucleatum* 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)、最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 分别为 0.007% 和 0.002%, 表明香芹酚在抑制口腔细菌方面效果较好, 与本实验结果一致。Ciandrini等^[48]通过采用 MIC、MBC 和生物膜抑菌浓度 (biofilm inhibitory concentration, BIC) 评价结果同样证明了香芹酚对口腔病原体具有抑制性, 并且能够抑制细菌生物膜的形成。此外, 关于香芹酚的毒性与安全性, 美国食品和药品管理局 (food and drug administration, FDA) 早已认证了香芹酚的安全性^[49]。Horváthová等^[50]的研究结果证实香芹酚不仅与细胞毒性作用和DNA损伤作用无关, 而且能够抑制H₂O₂诱导的DNA损伤水平。此外, 张子晗等^[46]也研究发现, 香芹酚不仅对MC3T3-E1细胞无明显的毒性作用, 而且能够上调Runx2和OPG等相关成骨基因的表达, 具有骨保护作用, 可用于牙槽骨等骨组织的保护。本实验通过HE和TRAP染色、细胞实验和骨代谢相关指标检测实验进一步证明了香芹酚不仅对成骨细胞无明显毒性作用, 而且可以减少破骨细胞的生成, 促进成骨细胞的分化和牙槽骨的再生。

由于香芹酚分子结构中含有大量的疏水基团, 导致其难溶于水, 严重限制了香芹酚进入动物体内的吸收和利用。而泊洛沙姆特殊的三嵌段结构, 使其具有相对亲油性, 能够很好地与香芹酚相容。本研究以F127、F68、HPMC作为水凝胶的主体成分, 按照F127:F68:HPMC (体积比)=7:1:1.5比例成功制得空白水凝胶及载药水凝胶, 结果显示, 当其处于37℃环境时, 可在150s内发生从

溶液到凝胶的相转变，形成一种黏稠的半固体状凝胶。并进行了FTIR、药物缓释和降解实验、细胞实验、体内生物相容性实验以及给药后大鼠各脏器HE染色实验，其结果显示，香芹酚成功负载至水凝胶，且各组香芹酚水凝胶均能够缓慢释放药物，累计释放率均可达到80%；细胞结果显示

各组载药水凝胶对细胞均无毒性作用且具有良好的细胞黏附性；HE染色结果显示大鼠脏器组织细胞形态均正常，结构清晰，且并未观察到有炎性细胞浸润现象。结果表明香芹酚水凝胶具有良好的药物缓释及体内外生物相容性，可用于后期动物实验。

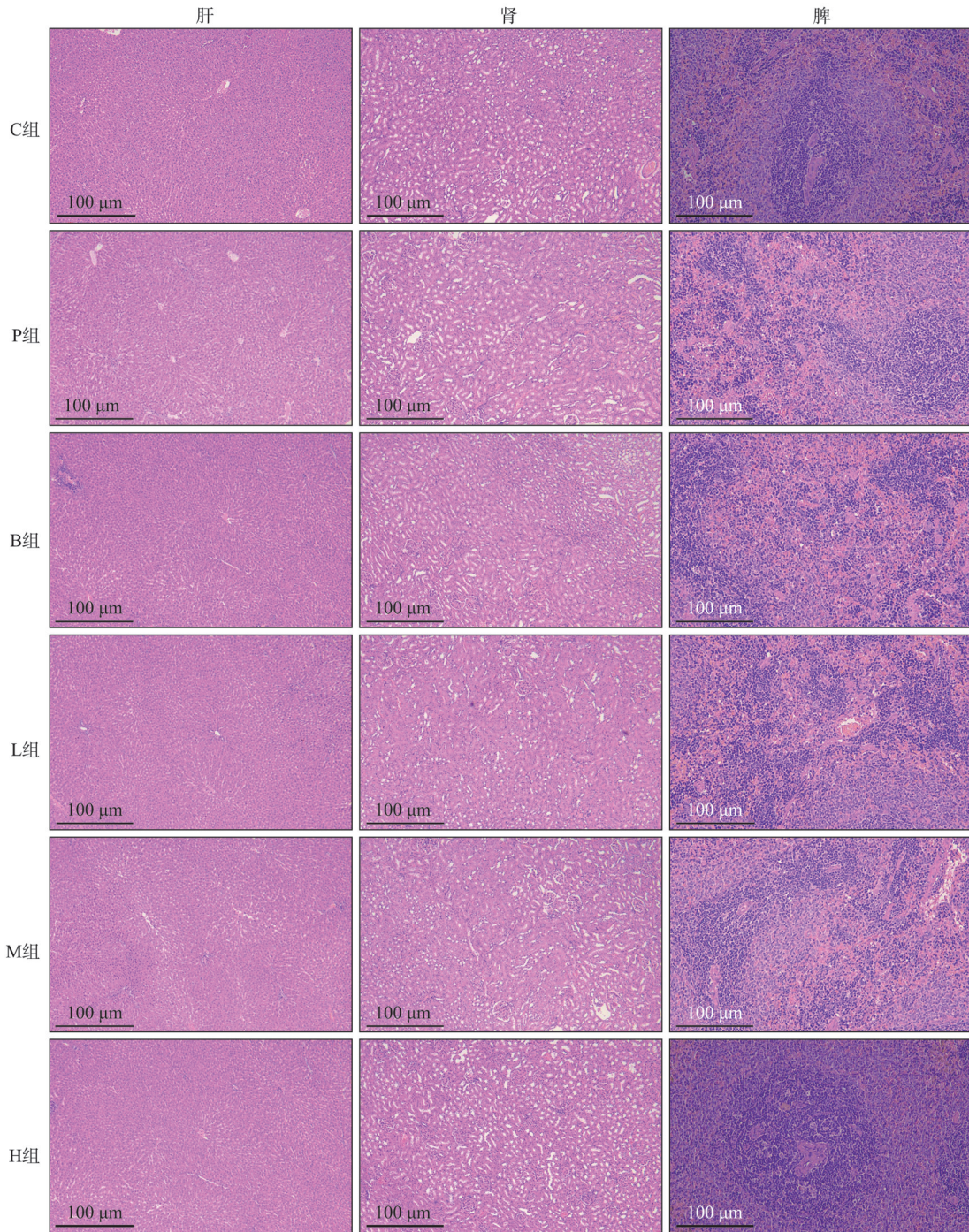


图 9 各组大鼠脏器组织HE染色切片

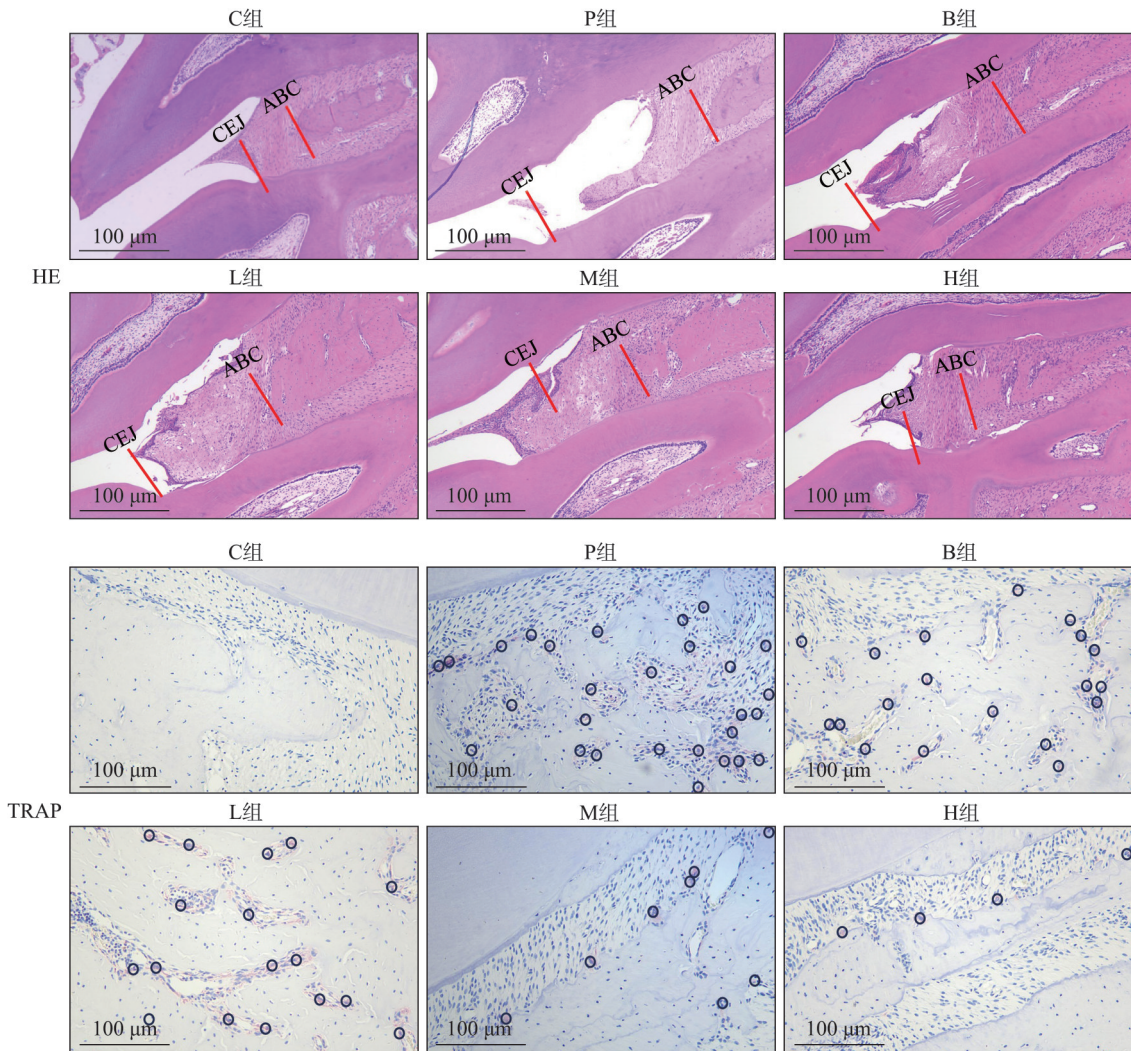
Fig 9 HE stained sections of rat organ tissues in each group

P. gingivalis 和 *F. nucleatum* 是牙周炎患者口腔中常见的致病菌^[51]，其产生的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是导致牙周炎形成的主要毒性

物质^[52]。LPS 可与 Toll 样受体结合发出信号，激活 NF-κB 促炎信号通路，诱导牙周组织发生炎症^[53]。在 RANKL 调控破骨细胞生成的 OPG 信号通路中，

NF-κB 位于其下游^[54], NF-κB 的活化可以促进炎症因子的合成, 进而促进 RANKL 的表达^[55]. RANKL 是一种关键的骨吸收刺激因子, 能够与破骨前体细胞膜上的 RANK 配体结合, 进而激活 TRAF6, 进一步正向促进 NF-κB 信号通路活化^[56], 加剧促炎因子过度释放, 进而增强 RANKL 的产生, 促进破

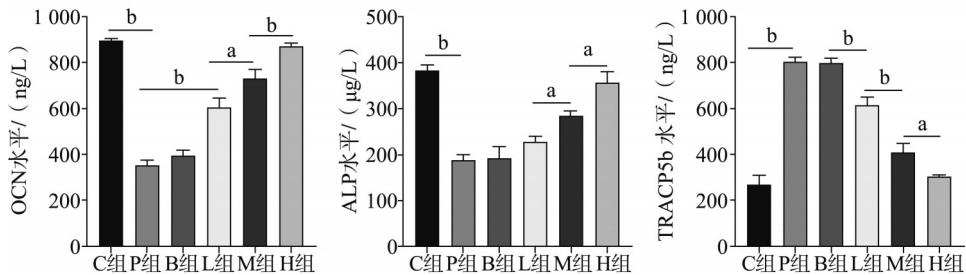
骨细胞的募集和分化, 最终导致牙槽骨的吸收^[57]. 而 OPG 作为一种分泌蛋白, 通过与 RANKL 结合进一步防止其与 RANK 结合, 从而保护牙槽骨免遭过度吸收^[58]. 因此, 调控 OPG 通路以及 NF-κB 的表达对于牙槽骨吸收和代谢至关重要.



CEJ为釉牙骨质界, ABC为牙槽嵴顶, 二者之间的距离为牙槽骨吸收情况。黑色圆圈示破骨细胞。

图 10 各组大鼠牙周组织 HE、TRAP 染色结果观察

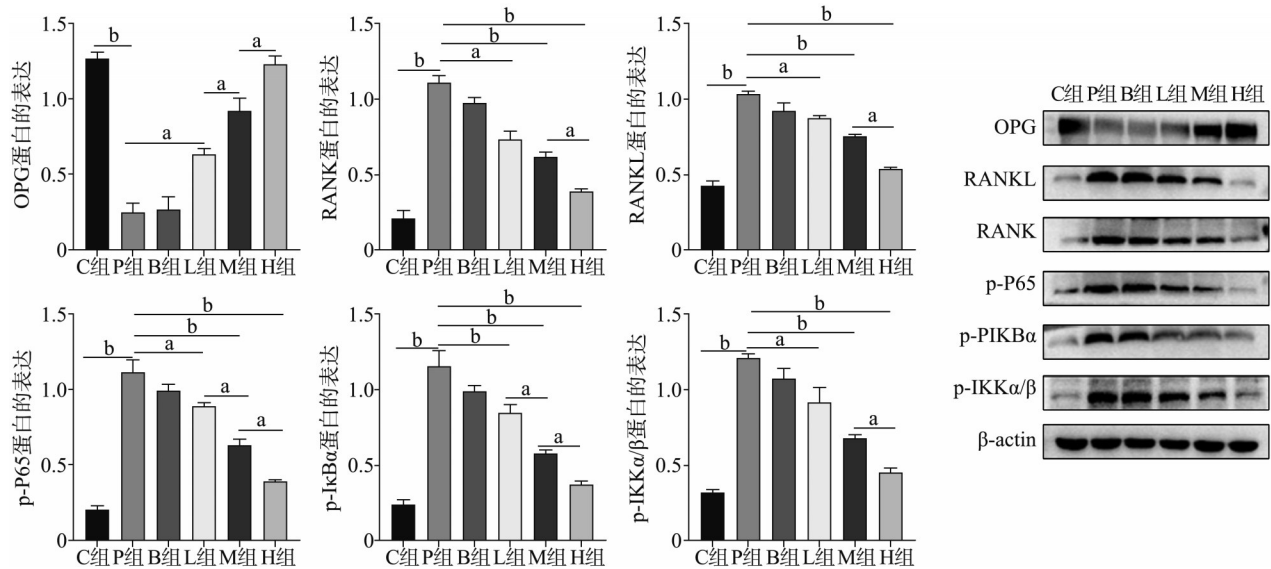
Fig 10 Observation of HE and TRAP staining results in periodontal tissue of rats in each group



a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$ 。

图 11 各组大鼠血清中骨代谢相关指标水平

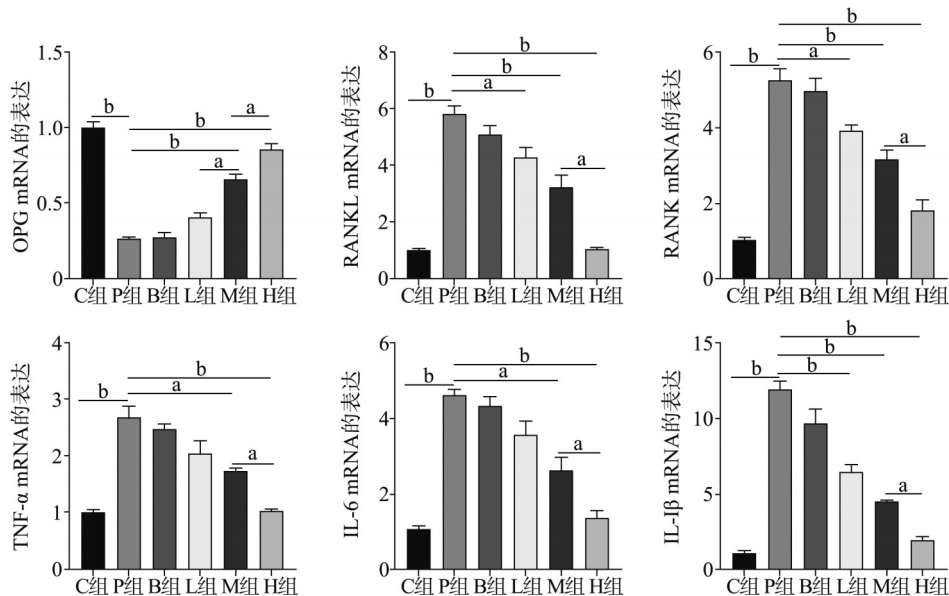
Fig 11 Levels of serum bone metabolism related indexes in each group



左：各组大鼠牙龈组织中通路相关蛋白表达量，a为P<0.05，b为P<0.01；右：各组大鼠牙龈组织中通路相关蛋白表达水平。

图 12 各组大鼠牙龈组织中通路相关蛋白表达量

Fig 12 Pathway-related protein expression in gingival tissue of rats in each group



a为P<0.05，b为P<0.01。

图 13 各组大鼠牙龈组织中的相关通路及炎症因子相对表达量

Fig 13 Relevant pathways and relative expression levels of inflammatory factors in gingival tissue of rats in each group

实验结果显示，P组大鼠牙周组织中RANKL、RANK、p-P65、p-IκBα、p-IKKα/β的蛋白水平显著升高，RANKL、RANK、TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA水平显著增加，牙周组织中OPG的蛋白以及mRNA水平显著降低。经载药水凝胶治疗4周后，大鼠牙周炎临床症状得到改善，P组大鼠牙周组织中RANKL、RANK、p-P65、p-IκBα、p-IKKα/β的蛋白水平显著降低，RANKL、RANK、TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA水平大幅降低，OPG的蛋白以及mRNA水平显著升高，且呈现出剂量

依赖性，随香芹酚浓度增高而效果更显著。该研究表明香芹酚可通过上调OPG表达，下调RANKL表达，调控OPG通路以及抑制NF-κB通路激活，进而抑制牙周炎大鼠牙槽骨吸收，改善其临床症状。

综上所述，本研究成功制备香芹酚水凝胶，且具有良好的生物相容性及药物缓释性能；在牙周炎的保护机制方面，香芹酚水凝胶可以通过调节RANKL/RANK/OPG通路，抑制NF-κB的活化，阻断炎症因子对RANKL的诱导作用，减少RAN-

KL与RANK的结合,进而抑制破骨细胞的分化,同时提高成骨相关蛋白OPG、OCN、ALP含量,促进牙槽骨再生,在牙周组织再生方面具有良好的研究价值和应用前景。但药物对牙槽骨具体的保护作用机制方面研究尚浅,后续应从更多角度设计并开展进一步的研究。同时,还需设计体外实验进行对比,以便更好地验证研究结果的准确性与科学性。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions[J]. *J Periodontol*, 2018, 89(Suppl 1): S173-S182.
- [2] Dannewitz B, Holtfreter B, Eickholz P. Periodontitis-therapy of a widespread disease[J]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2021, 64(8): 931-940.
- [3] 林莉,李兆榕,晋伊宁,等.伴全身系统疾病牙周炎患者的诊疗策略[J].*华西口腔医学杂志*, 2023, 41(5): 502-511.
Lin L, Li ZR, Jin YN, et al. Treatment strategies for periodontitis patients with systemic disease[J]. *West China J Stomatol*, 2023, 41(5): 502-511.
- [4] 袁思尧,张亮,刘佳,等.慢性牙周炎与全身系统性疾病关系的研究进展[J].*实用临床医学*, 2023, 24(3): 122-128, 138.
Yuan SR, Zhang L, Liu J, et al. Research progress on the relationship between chronic periodontitis and systemic diseases[J]. *Pract Clin Med*, 2023, 24(3): 122-128, 138.
- [5] Shinjo T, Nishimura F. The bidirectional association between diabetes and periodontitis, from basic to clinical [J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2024, 60: 15-21.
- [6] 欧阳明,王国华.载锌基沸石咪唑的疏基化海藻酸钙复合水凝胶治疗大鼠牙周炎的实验研究[J].*上海口腔医学*, 2022, 31(4): 379-383.
Ouyang M, Wang GH. Application of sulfylated calcium alginate composite hydrogel loaded with zinc-based zeolite imidazole for the treatment of periodontitis[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2022, 31(4): 379-383.
- [7] Ramachandran P, Rachuri NK, Martha S, et al. Implications of overprescription of antibiotics: a cross-sectional study[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2019, 11(Suppl 2): S434-S437.
- [8] 王茜,张永明,刘建慧,等.抗生素替代物饲料添加剂的研究应用进展[J].*现代畜牧科技*, 2023(11): 71-75.
Wang Q, Zhang YM, Liu JH, et al. Progress in the research and application of antibiotic substitute feed additives[J]. *Modern Anim Sci Technol*, 2023(11): 71-75.
- [9] Khattri S, Kumbargere Nagraj S, Arora A, et al. Adjunctive systemic antimicrobials for the non-surgical treatment of periodontitis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 11(11): CD012568.
- [10] Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, et al. Carvacrol and human health: a comprehensive review[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(9): 1675-1687.
- [11] Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of thymus vulgaris l. essential oil, on the inflammatory response[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 657026.
- [12] De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, et al. Constituents of aromatic plants: carvacrol[J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(7/8): 801-804.
- [13] 葛超悦,吕雨杰,吴澈池,等.香芹酚的生理功能及其在家禽生产中的应用研究进展[J].*中国畜牧杂志*, 2024, 60(2): 46-51.
Ge CY, Lü YJ, Wu LC, et al. Research progress on the physiological function of carvacrol and the application in poultry production[J]. *Chin J Anim Sci*, 2024, 60(2): 46-51.
- [14] Trzaskowska M, Vivcharenko V, Kazimierzczak P, et al. *In Vitro* screening studies on eight commercial essential oils-derived compounds to identify promising natural agents for the prevention of osteoporosis[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(4): 1095.
- [15] Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria[J]. *Microb Pathog*, 2017, 112: 156-163.
- [16] 孙韬,王璞,王军,等.香芹酚纳米脂质体的制备及抑菌性能[J].*中国兽医科学*, 2023, 53(5): 649-657.
Sun T, Wang P, Wang J, et al. Preparation and antibacterial properties of carvacrol nanostructured lipid carriers [J]. *Chin Vet Sci*, 2023, 53(5): 649-657.
- [17] Zhang Y, Cai Z, Shen Y, et al. Correction to: hydrogel-load exosomes derived from dendritic cells improve car-

- diac function via Treg cells and the polarization of macrophages following myocardial infarction[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 294.
- [18] 胡修波, 王事捷, 刘雪婷, 等. 温敏性水凝胶在医用方面的研究进展[J]. *广州化工*, 2023, 51(6): 12-14, 26.
Hu XB, Wang SJ, Liu XT, et al. Research progress on thermosensitive hydrogels in medical field[J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2023, 51(6): 12-14, 26.
- [19] 甄艳丽, 张发星, 王东凯. 泊洛沙姆在原位凝胶制剂中的应用[J]. *中国药剂学杂志(网络版)*, 2023, 21(3): 175-181.
Zhen YL, Zhang FX, Wang DK. Application of poloxamer in in-situ gel preparations[J]. *Chin J Pharm (Online Edit)*, 2023, 21(3): 175-181.
- [20] 崔烨璇, 仝雅娜, 刘伟东, 等. 纤维素基水凝胶的构建及其应用[J]. *材料工程*, 2023, 51(9): 37-51.
Cui YX, Tong YN, Liu WD, et al. Construction and application of cellulose-based hydrogel[J]. *J Mater Eng*, 2023, 51(9): 37-51.
- [21] 陈丽嫚, 汪涛, 李康. 壳聚糖/羟丙基甲基纤维素温敏水凝胶的制备[J]. *高分子材料科学与工程*, 2016, 32(11): 156-161, 167.
Chen LM, Wang T, Li K. Preparation of chitosan/hydroxypropyl methyl cellulose thermo-sensitive hydrogel [J]. *Polym Mater Sci Eng*, 2016, 32(11): 156-161, 167.
- [22] Liu H, Zhao Y, Zou Y, et al. Heparin-poloxamer hydrogel-encapsulated rhFGF21 enhances wound healing in diabetic mice[J]. *FASEB J*, 2019, 33(9): 9858-9870.
- [23] 史建俊, 李伟伟. 泊洛沙姆在药剂应用中的研究进展[J]. *科技信息(学术研究)*, 2008(36): 397, 399.
Shi JJ, Li WW. Research progress of Poloxam in pharmaceutical applications[J]. *Sci Technol Inf (Acad Res)*, 2008 (36): 397, 399.
- [24] 黄永娜, 宣德春, 梁荣, 等. 一种注射用温敏型水凝胶的制备及特征分析[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(4): 120-124.
Huang YN, Xuan DC, Liang R, et al. Preparation and characterization of an injectable temperature-sensitive hydrogel[J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2021, 49(4): 120-124.
- [25] 樊天明. 牙周局部给药的缓释制剂的研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(15): 33-34.
Fan TM. Research progress of sustained-release preparations for local periodontal administration[J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2010, 19(15): 33-34.
- [26] 邹林洪, 胡丹, 张琳林, 等. OPG/RANKL/RANK 调节系统与大鼠慢性牙周炎发展的相关性分析[J]. *重庆医学*, 2016, 45(31): 4334-4336.
Zou LH, Hu D, Zhang LL, et al. Analysis on correlation between OPG/RANKL/RANK regulation system and chronic periodontitis progress[J]. *Chongqing Med Sci*, 2016, 45(31): 4334-4336.
- [27] 王月昊, 王小琴, 苗伟, 等. 间歇性低氧对牙周炎大鼠牙周组织中NF- κ B、IL-6及PGE₂含量的影响[J]. *实用口腔医学杂志*, 2016, 32(1): 28-31.
Wang YH, Wang XQ, Miao W, et al. NF- κ B, IL-6 and PGE₂ expression in periodontal tissue of rats with periodontitis under chronic intermittent hypoxia[J]. *J Pract Stomatol*, 2016, 32(1): 28-31.
- [28] 刘瑞杰. 糖皮质激素受体与脊髓小胶质细胞参与神经病理性疼痛的机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
Liu RJ. The mechanism of glucocorticoid receptor and spinal microglia involved in neuropathic pain[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016.
- [29] 刘玲秀, 胡帼颖, 刘欣, 等. 温敏型可注射水凝胶的制备研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2010, 29(6): 901-908.
Liu LX, Hu GY, Liu X, et al. Study on preparation of temperature-sensitive injectable hydrogel[J]. *Chin J Biomed Eng*, 2010, 29(6): 901-908.
- [30] Sheshala R, Quah SY, Tan GC, et al. Investigation on solution-to-gel characteristic of thermosensitive and mucoadhesive biopolymers for the development of moxifloxacin-loaded sustained release periodontal in situ gels[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2019, 9(2): 434-443.
- [31] 方芷昱. 人 β 防御素-3对牙龈卟啉单胞菌抑制作用的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
Fang ZY. Inhibitory effect of human β -defensin-3 on *Porphyromonas gingivalis*[D]. Shenyang: China Medical University, 2022.
- [32] 陈晖娟. 胶原模拟多肽及其对成纤维细胞黏附作用的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
Chen HJ. Study on collagen mimicking polypeptides and their adhesion to fibroblasts[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2012.
- [33] Merghni A, Ben Nejma M, Dalle I, et al. High potential of adhesion to biotic and abiotic surfaces by opportunistic *Staphylococcus aureus* strains isolated from orthodontic appliances[J]. *Microb Pathog*, 2016, 91: 61-67.
- [34] Aydinyurt HS, Sancak T, Taskin C, et al. Effects of injectable platelet-rich fibrin in experimental periodonti-

- tis in rats[J]. *Odontology*, 2021, 109(2): 422-432.
- [35] 马涛, 时婧, 徐彬. 清浊曲比亲艾拉蜜膏对大鼠牙周炎进展及血清炎症细胞因子表达的影响研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2023, 23(3): 308-311, 316.
- Ma T, Shi J, Xu B. Progress of Qingzhuo Qubiqin Ailami paste on periodontitis and its effects on expression of serum inflammatory cytokines in rats[J]. *Eval Anal Drug-use Hosp Chin*, 2023, 23(3): 308-311, 316.
- [36] da Silva HEC, Stefani CM, de Santos Melo N, et al. Effect of intra-pregnancy nonsurgical periodontal therapy on inflammatory biomarkers and adverse pregnancy outcomes: a systematic review with meta-analysis[J]. *Syst Rev*, 2017, 6(1): 197.
- [37] 武扬, 李丽. 阿托伐他汀对牙周炎大鼠的影响及可能机制[J]. *长春中医药大学学报*, 2023, 39(10): 1101-1105.
- Wu Y, Li L. Effects and possible mechanisms of atorvastatin in the treatment of periodontitis rats[J]. *J Changchun Univ Chin Med*, 2023, 39(10): 1101-1105.
- [38] 马遥, 姜兆伟, 靳云轶, 等. 大鼠牙周炎正畸牙移动初期 TNF 信号通路的基因本体分析[J]. *口腔疾病防治*, 2019, 27(11): 695-702.
- Ma Y, Jiang ZW, Jin YY, et al. Gene ontology analysis of the TNF signaling pathway in early orthodontic tooth movement of rats with periodontitis[J]. *J Prevent Treat Stomatol Dis*, 2019, 27(11): 695-702.
- [39] 姜丽媛. 大黄素对慢性牙周炎大鼠牙槽骨重建、炎症反应及 RANKL/OPG 蛋白表达的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2022, 44(6): 845-849.
- Jiang LY. Effects of emodin on alveolar bone reconstruction, inflammatory response and RANKL/OPG protein expression in rats with chronic periodontitis[J]. *J Youjiang Med Univ Nat*, 2022, 44(6): 845-849.
- [40] 张黎, 刘育菘, 吴芸菲, 等. 壳寡糖对牙周炎大鼠牙槽骨吸收及 Th17/Treg 平衡和 OPG/RANKL/RANK 通路的影响[J]. *上海口腔医学*, 2021, 30(3): 237-242.
- Zhang L, Liu YS, Wu YF, et al. Effects of chitosan oligosaccharide on alveolar bone resorption, Th17/Treg balance and OPG/RANKL/RANK pathway in periodontitis rats[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2021, 30(3): 237-242.
- [41] 王玉雪, 周歆, 郑钧元, 等. 人 β -防御素 3 水凝胶治疗大鼠牙周炎[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(17): 2690-2695.
- Wang YX, Zhou X, Zheng JY, et al. Human beta-defensin 3 hydrogel for treatment of periodontitis in rats[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2024, 28(17): 2690-2695.
- [42] 詹俊杰, 周星海, 张晋豪, 等. 香芹酚/ β -环糊精包合物制备及熏蒸防治白菜根肿病的研究[J]. *江西农业大学学报*, 2023, 45(3): 663-672.
- Zhan JJ, Zhou XH, Zhang JH, et al. Study on preparation of carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex and fumigation to control cabbage clubroot[J]. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2023, 45(3): 663-672.
- [43] Łopusiewicz Ł, Kwiatkowski P, Drożdowska E, et al. Preparation and characterization of carboxymethyl cellulose-based bioactive composite films modified with fungal melanin and carvacrol[J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(4): 499.
- [44] 张永香. 透明质酸交联的泊洛沙姆 407 口腔用抑菌抗炎温敏凝胶的设计及评价[D]. 太原: 山西医科大学, 2023.
- Zhang YX. Design and evaluation of hyaluronic acid crosslinked Poloxam 407 antibacterial and anti-inflammatory thermosensitive gel for oral use[D]. Tianyuan: Shanxi Medical University, 2023.
- [45] 唐彩金, 曾启新, 方梅飞, 等. 消退素 D1 治疗实验性大鼠牙周炎的研究[J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(12): 1270-1273.
- Tang CJ, Zeng QX, Fang MF, et al. Curative effect of endogenous resolvin D1 on periodontitis in rats[J]. *J Oral Sci Res*, 2017, 33(12): 1270-1273.
- [46] 张子晗, 王文丽, 李金诺, 等. 香芹酚对成骨细胞及口腔常见致病菌的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(11): 1765-1771.
- Zhang ZH, Wang WL, Li JN, et al. Effects of carvacrol on osteoblasts and common oral pathogens[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(11): 1765-1771.
- [47] Maquera-Huacho PM, Tonon CC, Correia MF, et al. *In vitro* antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces[J]. *Biofouling*, 2018, 34(6): 699-709.
- [48] Ciandrini E, Campana R, Federici S, et al. *In vitro* activity of carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures[J]. *Clin Oral Investig*, 2014, 18(8): 2001-2013.
- [49] Tufekci E, Casagrande ZA, Lindauer SJ, et al. Effectiveness of an essential oil mouthrinse in improving oral health in orthodontic patients[J]. *Angle Orthod*, 2008, 78(2): 294-298.
- [50] Horváthová E, Sramková M, Lábaj J, et al. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selec-

- ted plant essential oils on human cells cultured *in vitro* [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27(Suppl 2): 44-47.
- [51] Romero-Castro NS, Vázquez-Villamar M, Muñoz-Valle JF, et al. Relationship between TNF- α , MMP-8, and MMP-9 levels in gingival crevicular fluid and the subgingival microbiota in periodontal disease[J]. Odontology, 2020, 108(1): 25-33.
- [52] Kim EN, Nabende WY, Jeong H, et al. The marine-derived natural product epiloliolide isolated from *Sargassum horneri* regulates NLRP3 via PKA/CREB, promoting proliferation and anti-inflammatory effects of human periodontal ligament cells[J]. Mar Drugs, 2021, 19(7): 388.
- [53] Diomedede F, Zingariello M, Cavalcanti MFXB, et al. MyD88/ERK/NF κ B pathways and pro-inflammatory cytokines release in periodontal ligament stem cells stimulated by *Porphyromonas gingivalis*[J]. Eur J Histochem, 2017, 61(2): 2791.
- [54] Ilchovska DD, Barrow DM. An overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(2): 102741.
- [55] 杜沿林. NF- κ B 信号通路对正畸牙周组织改建影响的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- Du YL. Effect of NF- κ B signaling pathway on orthodontic periodontal tissue remodeling[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2017.
- [56] 赵娇阳, 时静, 李文晋. OPG/RANKL/RANK 信号通路在牙槽骨代谢中研究进展[J]. 临床军医杂志, 2022, 50(2): 214-217.
- Zhao JY, Shi J, Li WJ. Research progress of OPG/RANKL/RANK signaling pathway in alveolar bone metabolism[J]. Clin J Med Offic, 2022, 50(2): 214-217.
- [57] Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis[J]. J Immunol Res, 2015, 2015: 615486.
- [58] Tong W, Wang Q, Sun D, et al. Curcumin suppresses colon cancer cell invasion via AMPK-induced inhibition of NF- κ B, uPA activator and MMP9[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 4139-4146.

(本文编辑 杜冰)

《自体牙移植手术图谱》出版发行

书籍名称：自体牙移植手术图谱

主编：侯锐

出版日期：2024年2月

出版社：人民卫生出版社

内容简介：书中采用大量临床病例图片，附以详细注解说明，对自体牙移植手术进行了科学阐述。通过阅读本书，读者可以充分了解自体牙移植手术的术前评估、手术操作步骤和注意事项、术中和术后并发症、后期根管治疗的操作步骤和注意事项、不同类型手术的预后情况以及自体牙移植手术与口腔其他专业的相互关系等，所附病例的随访结果为口腔临床医师确定手术效果提供了可靠依据。本书内容包括：1) 自体牙移植简介；2) 自体牙移植术前评估及处理；3) 自体牙移植的手术步骤；4) 自体牙移植术并发症的原因及防治；5) 自体牙移植的预后及影响因素；6) 自体牙移植和其他牙科治疗的关系。

