

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1250-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240508

美沙拉嗪对 RAW264.7 细胞中促炎因子和过氧化物的抑制作用 及其对牙周炎模型大鼠的治疗作用

王浩宇¹, 王宇琪¹, 王冰倩¹, 聂瑾涵¹, 闫嘉晴², 胡敏¹

(1. 吉林大学口腔医院正畸科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学口腔医院牙周科, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨美沙拉嗪 (MSZ) 在 RAW264.7 细胞模型中的抗炎和抗氧化作用, 阐明其对大鼠牙周炎的治疗效果。**方法:** 采用 CCK-8 法检测不同浓度 (0、62.5、125.0、250.0、500.0、1000.0 和 2000.0 mg·L⁻¹) MSZ 刺激的 RAW264.7 细胞增殖率, 确定 MSZ 处理细胞的最佳浓度。采用牙龈卟啉单胞菌脂多糖 (*P. g*-LPS) 和 MSZ 处理 RAW264.7 细胞, 并将细胞分为对照组、*P. g*-LPS 组和 MSZ+*P. g*-LPS 组。采用 DCFH-DA 荧光探针法检测各组细胞中活性氧 (ROS) 水平, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组细胞中丙二醛 (MDA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 8 (IL-8) mRNA 表达水平。采用结扎法结合 *P. g* 菌液注射建立牙周炎大鼠模型, 18 只大鼠随机分为对照组 (不作处理)、模型组 (构建牙周炎模型) 和给药组 (构建牙周炎模型并给予 MSZ), 每组 6 只。采用微型 CT 评估各组大鼠牙槽骨破坏情况, 采用 HE 染色观察各组大鼠牙周组织病理形态表现。**结果:** 与对照组比较, 500.0 mg·L⁻¹ MSZ 组细胞增殖率明显升高 ($P < 0.01$), 因此后续选用 500.0 mg·L⁻¹ MSZ 处理细胞。与对照组比较, *P. g*-LPS 组细胞中 ROS 和 MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$), GSH 水平和 SOD 活性明显降低 ($P < 0.01$), IL-1 β 和 IL-8 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与 *P. g*-LPS 组比较, MSZ+*P. g*-LPS 组细胞中 ROS 和 MDA 水平明显降低 ($P < 0.01$), GSH 水平和 SOD 活性明显升高 ($P < 0.01$), IL-1 β 和 IL-8 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。微型 CT 检测, 与对照组比较, 模型组大鼠釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离 (CEJ-ABC) 明显升高 ($P < 0.01$), 骨体积分数 (BV/TV) 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 给药组大鼠 CEJ-ABC 明显降低 ($P < 0.01$), BV/TV 明显升高 ($P < 0.05$)。HE 染色, 与模型组比较, 给药组大鼠牙周组织炎症细胞浸润减轻, 上皮附着恢复。**结论:** MSZ 能有效抑制 *P. g*-LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中促炎因子和过氧化物的产生, 提高细胞抗炎和抗氧化能力, 在牙周炎大鼠模型中抑制牙槽骨吸收, 缓解牙周组织炎症。

[关键词] 美沙拉嗪; 牙龈卟啉单胞菌脂多糖; 牙周炎; 炎症因子; 氧化应激

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A

Inhibitory effect of mesalazine on pro-inflammatory factors and peroxides in RAW264.7 cells and its therapeutic effect on periodontitis model rats

WANG Haoyu¹, WANG Yuqi¹, WANG Bingqian¹, NIE Jinhan¹, YAN Jiaqing², HU Min¹

(1. Department of Orthodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

[收稿日期] 2023-11-07

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目 (YDZJ202201ZYTS082, 20200201416JC)

[作者简介] 王浩宇 (1998—), 男, 安徽省淮北市人, 在读硕士研究生, 主要从事牙周炎相关的基础方面的研究

[通信作者] 闫嘉晴, 讲师, 主治医师 (E-mail: yjq@mail.jlu.edu.cn);

胡敏, 教授, 主任医师, 博士研究生导师 (E-mail: humin@jlu.edu.cn)

2. Department of Periodontology, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the anti-inflammatory and antioxidant effect of mesalazine (MSZ) in the RAW264.7 cell model, and to elucidate its therapeutic effect on periodontitis in the rats. **Methods:** The proliferation rates of RAW264.7 cells stimulated by different concentrations (0, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0, 1 000.0, and 2 000.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of MSZ were detected by CCK-8 method to determine the optimal concentration of MSZ for cell treatment. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (*P. g*-LPS) and MSZ were used to treat the RAW264.7 cells, and the cells were divided into control group, *P. g*-LPS group, and MSZ+*P. g*-LPS group. The levels of reactive oxygen species (ROS) in the cells in various groups were detected by the DCFH-DA fluorescent probe assay; the malondialdehyde (MDA) levels, glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD) activities in the cells in various groups were detected by ELISA method; the expression levels of inflammatory factors interleukin-8 (IL-8) and interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA in the cells in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. The periodontitis rat model was established by the ligation method combined with the injection of *P. g* bacterial fluid. A total of 18 rats were randomly divided into control group (without treatment), model group (making periodontitis model), and drug administration group (making periodontitis model and given MSZ), and there were 6 rats in each group. Micro-CT was used to assess the alveolar bone destruction of the rats in various groups; HE staining was used to observe the morphology of periodontal tissue of the rats in various groups. **Results:** Compared with control group, the proliferation rate of the cells in 500.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MSZ group was significantly increased ($P<0.01$), so 500.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MSZ was subsequently selected to treat the cells. Compared with control group, the levels of ROS and MDA in the cells in *P. g*-LPS group were significantly increased ($P<0.01$), and the level of GSH and activity of SOD were significantly decreased ($P<0.01$), and the expression levels of IL-1 β and IL-8 mRNA were significantly increased ($P<0.01$); compared with *P. g*-LPS group, the levels of ROS and MDA in the cells in MSZ+*P. g*-LPS group were significantly decreased ($P<0.01$), the level of GSH and activity of SOD were significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of IL-1 β and IL-8 mRNA were significantly decreased ($P<0.01$). The micro-CT assay results showed that compared with control group, the distance from the cemento-enamel junction to alveolar bone crest (CEJ-ABC) of the rats in model group was significantly increased ($P<0.01$), and the bone volume fraction (BV/TV) was significantly decreased ($P<0.05$); compared with model group; the CEJ-ABC of the rats in drug administration group was decreased ($P<0.01$), and the BV/TV was increased ($P<0.05$). The HE staining results showed that the inflammatory cell infiltration in periodontal tissue of the rats in drug administration group was reduced, and epithelial attachment was restored. **Conclusion:** MSZ effectively inhibits the production of pro-inflammatory factors and peroxides in the *P. g*-LPS-induced RAW264.7 cells, improves the cellular anti-inflammatory and antioxidant capacity, inhibits the alveolar bone resorption, and alleviates the inflammation of periodontal tissues in the periodontitis rats.

KEYWORDS Mesalazine; *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide; Periodontitis; Inflammatory factor; Oxidative stress

牙周炎是一种由口腔微生物群引起的炎症性疾病, 也是最常见的口腔疾病之一^[1], 可导致牙龈和牙周膜中的胶原纤维溶解和牙槽骨吸收, 最终导致牙齿松动。牙周炎也与多种全身系统性疾病, 包括心血管疾病、糖尿病、类风湿关节炎、癌症和阿尔茨海默病等有关联^[2]。目前认为牙周炎的致

病因素是多方面的, 包括细菌、病毒、免疫反应、不良环境和遗传易感性等。牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*) 是一种厌氧杆菌, 能在血琼脂上形成黑色菌落, 与牙周炎的严重程度有关, 已被确定为牙周炎主要病原体之一^[3], 可以诱导巨噬细胞分泌多种炎症因子进而调节宿主

免疫反应^[4]。此外有研究^[5-6]显示:炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)与牙周炎有密切关联,IBD患者的牙周炎患病率升高,牙周炎也可诱发肠道菌群失调和肠道上皮细胞屏障功能障碍,二者发病机制均与局部微生物和免疫稳态失衡有关,即致病菌产生致病因子如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),激活宿主产生炎症反应,募集巨噬细胞和T淋巴细胞等炎性细胞分泌炎症细胞因子,并产生过量活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[7-8]。目前治疗IBD的常规药物是美沙拉嗪(mesalazine, MSZ)。该药具有多种作用,如抗氧化、抗炎、抗细菌、抗真菌、抗淀粉样蛋白和胃保护作用等^[9]。同时,MSZ作为一种非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)能够抑制环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)产生。COX-2能催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)转化为前列腺素E2(prostaglandin, PGE2)^[10],而PGE2已被证明是促进牙槽骨吸收的重要炎症介质^[11]。白细胞介素(interleukin, IL)-8与牙周炎严重程度呈正相关关系,在牙周组织破坏阶段有加重炎症作用。MSZ对牙周炎的治疗效果尚未见报道。基于IBD和牙周炎发病机制的相似性及MSZ良好的药理学特性,本课题组采用*P. g*-LPS诱导的RAW264.7细胞模型和结扎诱导的牙周炎大鼠模型,探讨MSZ对牙周炎的疗效,为牙周炎的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物和主要试剂 小鼠RAW264.7巨噬细胞(上海市中国科学院上海生命科学研究院细胞生物学研究所)。雄性SD大鼠(辽宁长生生物技术股份有限公司),动物生产许可证号:SCXK(辽)2022-0001。动物实验经吉林大学动物实验伦理委员会批准,动物使用许可证号:SYXK(吉)2018-0001。CCK-8细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)(苏州新赛美公司),MSZ(上海Aladdin公司),DMEM培养基(北京亿奥邦公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(武汉普诺赛公司),*P. g*-LPS(美国InvivoGen公司),2,7-二氯荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-

DA)(北京百奥莱博科技有限公司),总RNA提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司),0.9%生理盐水(辽宁民康制药有限公司),乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙液(合肥白鲨生物科技有限公司),4%多聚甲醛溶液(北京索莱宝科技有限公司),*P. g*-ATCC33277(美国Med Chem Express公司)。倒置荧光显微镜(IX71,日本奥林巴斯公司),微型CT(瑞士Scanco医疗股份公司),实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪,酶标仪(美国伯乐公司),培养箱(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 不同浓度MSZ作用后RAW264.7细胞增殖率 为了确定*P. g*-LPS刺激前RAW264.7细胞的MSZ预处理浓度,将处于对数生长期的RAW264.7细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于96孔细胞培养板,将细胞分为对照组(不进行任何处理)和不同浓度(62.5、125.0、250.0、500.0、1000.0和2000.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)MSZ组,同时设置空白孔。培养24 h后每孔加入10 μL CCK-8试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h后采用酶标仪检测波长450 nm处的各孔吸光度(A)值,计算各组细胞增殖率。细胞增殖率=(样本孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

1.3 DEFH-DA荧光探针法检测各组RAW264.7细胞中ROS水平 将细胞以每孔 5×10^5 个的密度接种于6孔细胞培养板,分为对照组、*P. g*-LPS组和MSZ+*P. g*-LPS组。MSZ+*P. g*-LPS组细胞先采用500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MSZ预处理2 h,随后在*P. g*-LPS组和MSZ+*P. g*-LPS组细胞中加入5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ *P. g*-LPS处理24 h。每组3个复孔,弃去孔板内培养液,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后加入10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA荧光探针1 mL置于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, PBS缓冲液洗涤后在荧光显微镜下观察细胞并获得图像。采用Image J软件分析各组细胞中ROS水平,以荧光显微镜下ROS荧光强度作为各组细胞中ROS水平。

1.4 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测各组RAW264.7细胞中MDA和GSH水平及SOD活性

分组和处理同“1.3”。培养24 h后采用PBS缓冲液洗涤细胞,随后采用巴氏吸管将细胞吹下,在冰浴状态下超声破碎,充分裂解后12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$

离心 10 min。取上清, 按照相应 ELISA 试剂盒说明书检测细胞中 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性。

1.5 RT-qPCR 法检测各组 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 和 IL-8 mRNA 表达水平 分组和处理同“1.3”, 引物序列见表 1。采用总 RNA 提取试剂盒从细胞中提取 RNA, 逆转录合成 cDNA, 采用 Magic SYBR Mixture 进行 RT-qPCR 反应。总反应体系为 20 μ L, 在冰上操作。反应程序为 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 共计 40 个循环。以 β -肌动蛋白为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中 IL-1 β 和 IL-8 mRNA 表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Sequence of primer (5'-3')
IL-1 β	F: GTTGACGGACCCCAAAAGAT
	R: CCTCATCCTGGAAGGTCCAC
IL-8	F: TTGCGAGCCTTCTCGATTTC
	R: TCTTTAGCACTCCTTGGCAAAAC
β -actin	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	R: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG

1.6 实验动物分组、造模和干预 选取 18 只 8 周龄健康 SD 雄性大鼠, 饲养于光暗交替暗循环的温控室 (23 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C), 每日供水。将大鼠随机分为对照组、模型组和给药组, 每组 6 只。采用异氟烷吸入麻醉, 对照组大鼠不进行手术以排除麻醉的影响, 其余 2 组大鼠均手术构建牙周炎模型。麻醉后在大鼠上颌第一和第二磨牙之间将正畸结扎丝 (直径为 0.2 mm) 穿过颊侧到腭侧围绕第一磨牙, 打结, 使其完全进入龈沟内。将密度为 1×10^9 CFU \cdot mL $^{-1}$ 的 20 μ L *P. g* 菌液接种于造模区周围, 隔日 1 次。此后, 每 3 d 检查 1 次, 如有松动脱落, 及时重新结扎。结扎期为 6 周。通过牙周探诊深度判断牙周炎模型是否造模成功, 造模成功后拆除结扎丝。模型组大鼠不作处理, 给药组大鼠采用胰岛素注射器将 20 μ L MSZ (500.0 mg \cdot L $^{-1}$) 分别从上颌第一磨牙颊侧和腭侧中点处注射到黏骨膜下组织中, 注射过程中黏膜呈白色, 无明显渗出。每周给药 3 次, 疗程 3 周。3 周后将大鼠全部处死, 分离上颌牙槽骨, 冲洗后固定于 4% 多聚甲醛溶液中。

1.7 微型 CT 评估各组大鼠牙槽骨吸收情况 取出固定后的各组大鼠上颌骨组织块, 采用生理盐水

冲洗, 随后进行微型 CT (70 kV, 114 mA, 0.3 s) 扫描, 层厚 18 μ m, 采用图像处理语言 (image processing language, IPL) 软件三维重建图像, 调整图像三维位置, 使大鼠上颌牙的牙尖均处于同一平面, 确保测量标准的一致性^[12]。选择不同角度具有代表性的矢状位微型 CT 三维重建图像, 且尽可能包含上颌第二磨牙近中根和上颌第一磨牙远中根。随后测量每个样本的釉牙骨质界 (cemento-enamel junction, CEJ) 到牙槽嵴顶 (alveolar bone crest, ABC) 的距离 (CEJ-ABC)。采用 Image J 软件分别测量上颌第一磨牙腭侧近端、中部和远端 3 个点, 并取其平均值。将上颌第一磨牙周围的牙槽骨选定为感兴趣区域, 采用 Skyscan 软件评价此区域内骨体积分数 (bone volume/tissue volume, BV/TV)。

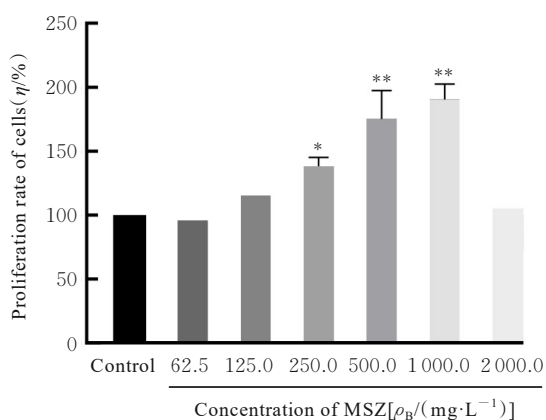
1.8 HE 染色观察各组大鼠牙周组织病理形态表现 将各组大鼠上颌骨组织块置于 10% 多聚甲醛固定 48 h, 10% EDTA 脱钙 3 个月, 1 周更换 3 次脱钙液, 脱钙后在流动水下清洗 20 min, 去除多余的组织并切成适当大小的块, 常规脱水和石蜡包埋后, 沿牙齿长轴在近中和远中侧均匀切片, 厚度约为 5 mm, 最后采用中性树胶封片, HE 染色, 显微镜下观察各组大鼠第一磨牙和第二磨牙处牙周组织病理形态表现。

1.9 统计学分析 采用 Graphpad Prism 9.0 统计软件进行统计学分析。MSZ 处理后各组细胞增殖率, 各组细胞中 ROS 水平, 各组细胞中 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性, 各组细胞中 IL-1 β 和 IL-8 mRNA 表达水平, 各组大鼠 CEJ-ABC 和 BV/TV 值, 均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖率 与对照组比较, 62.5、125.0 和 2 000.0 mg \cdot L $^{-1}$ MSZ 组细胞增殖率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 250.0、500.0 和 1 000.0 mg \cdot L $^{-1}$ 组细胞增殖率升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1。根据细胞增殖率的变化, 后续实验选用 500.0 mg \cdot L $^{-1}$ MSZ 处理细胞。

2.2 各组细胞中 ROS 水平 对照组细胞中几乎未检测到绿色荧光。与对照组比较, *P. g*-LPS 组细胞中产生大量 ROS, 绿色荧光强度明显增强, 细胞中 ROS 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与 *P. g*-LPS 组比较,



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图1 各组细胞增殖率

Fig. 1 Proliferation rates of cells in various groups

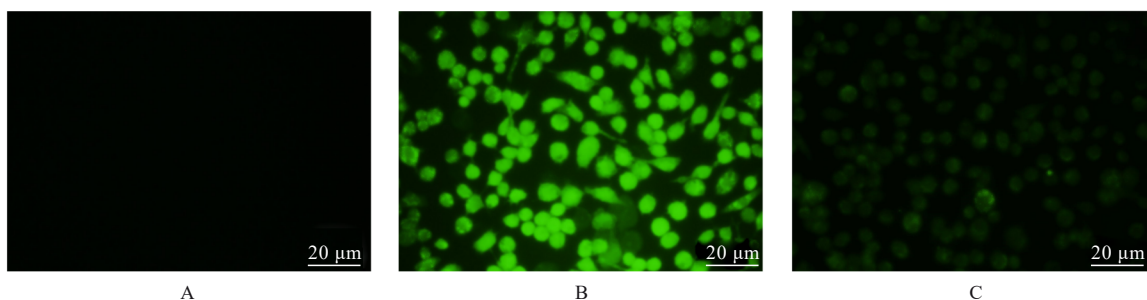
MSZ+*P. g*-LPS组细胞中荧光强度明显降低, 细胞中ROS水平明显降低 ($P < 0.01$)。见图2和3。

2.3 各组细胞中MDA和GSH水平及SOD活性

与对照组比较, *P. g*-LPS组细胞中MDA水平明显升高 ($P < 0.01$), GSH水平和SOD活性明显降低 ($P < 0.01$); 与*P. g*-LPS组比较, MSZ+*P. g*-LPS组细胞中MDA水平明显降低 ($P < 0.01$), GSH水平和SOD活性明显升高 ($P < 0.01$)。见表2。

2.4 各组细胞中IL-1 β 和IL-8 mRNA表达水平

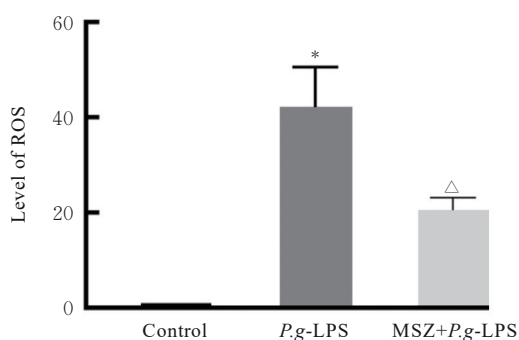
与对照组比较, *P. g*-LPS组细胞中IL-1 β 和IL-8 mRNA表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与*P. g*-LPS组比较, MSZ+*P. g*-LPS组细胞中IL-1 β 和IL-8 mRNA表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。见图4。



A: Control group; B: *P. g*-LPS group; C: MSZ+*P. g*-LPS group.

图2 DCFH-DA荧光探针法检测各组细胞中ROS荧光强度

Fig. 2 ROS fluorescence intensities in cells in various groups detected by DCFH-DA fluorescence probe method



* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.01$ vs *P. g*-LPS group.

图3 各组细胞中ROS水平

Fig. 3 Levels of ROS in cells in various groups

2.5 各组大鼠牙槽骨吸收情况 微型CT测量结果显示: 与对照组比较, 模型组大鼠CEJ-ABC值升高 ($P < 0.01$), 表明大鼠上皮附着丧失, 牙槽骨吸收, 牙周炎模型建立成功。与模型组比较, 给药组大鼠CEJ-ABC值明显降低 ($P < 0.01$)。与对

照组比较, 模型组大鼠BV/TV明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给药组大鼠BV/TV明显升高 ($P < 0.05$)。见图5和6。

2.6 各组大鼠牙周组织病理形态表现

HE染色结果显示: 对照组大鼠牙龈乳头完整, 结合上皮与釉质表面紧密黏附, 无糜烂、溃疡和炎症细胞浸润, 牙周膜内纤维排列整齐, 一端嵌入牙槽骨, 另一端嵌入牙骨质, 纤维完整无破坏, 牙骨质表面光滑, 表明无骨吸收。模型组大鼠牙龈乳头糜烂, 结合上皮向根方增殖, 牙槽骨吸收, 牙骨质中可见吸收陷窝, 牙周组织中可见大量炎症细胞, 类似于人类慢性牙周炎, 表明牙周炎模型成功建立。与模型组比较, 给药组大鼠牙槽骨破坏程度减弱, 牙周组织中仅见少量炎症细胞浸润, 牙周组织破坏有所减轻。见图7。

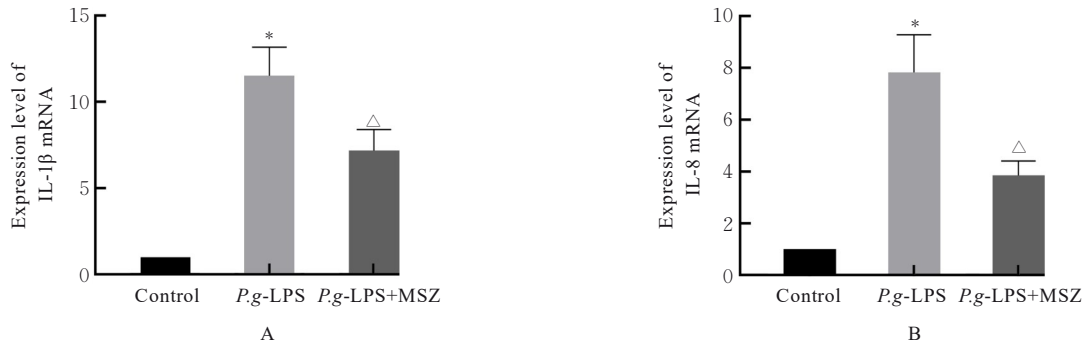
3 讨论

牙周炎是一种慢性炎症性疾病, 可造成牙齿软

表 2 各组细胞中 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性
Tab. 2 Levels of MDA and GSH and activities of SOD in cells in various groups

Group	MDA [$m_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$]	GSH [$w_B/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$]	SOD [$\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$]
Control	5.504 ± 0.841	24.935 ± 1.947	20.491 ± 3.044
<i>P.g.</i> -LPS	16.167 ± 1.35*	11.619 ± 1.579*	9.051 ± 1.706*
MSZ + <i>P.g.</i> -LPS	8.711 ± 0.472 Δ	19.396 ± 1.543 Δ	14.496 ± 2.626 Δ

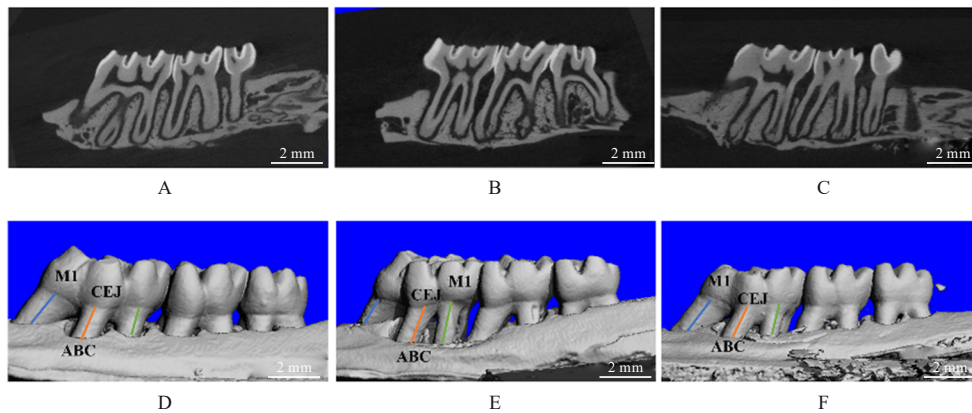
* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.01$ vs *P.g.*-LPS group.



* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.01$ vs *P.g.*-LPS group.

图 4 各组细胞中 IL-1β(A) 和 IL-8(B) mRNA 表达水平

Fig. 4 Expression levels of IL-1β(A) and IL-8(B) mRNA in cells in various groups



A, D: Control group; B, E: Model group; C, F: Drug administration group. M1: Maxillary first molar.

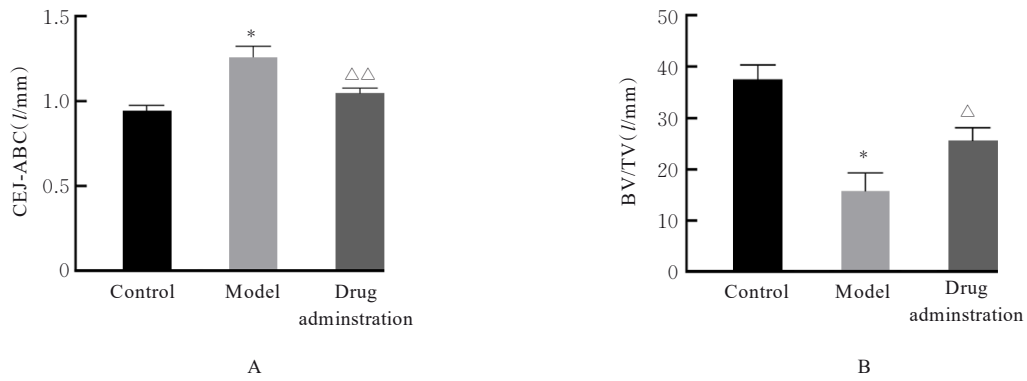
图 5 各组大鼠上颌牙槽骨微型 CT 矢状位图像(A~C)与三维重建图像(D~F)

Fig. 5 Sagittal images (A–C) and three-dimensional reconstruction images (D–F) on micro-CT of maxillary alveolar bone of rats in various groups

硬组织的损伤^[13]。目前, 口腔健康指导、龈上洁治和龈下刮治仍然是治疗牙周炎最重要的方法。然而, 受限于牙齿解剖条件, 牙根分叉病变和牙周袋深度, 单独使用这些方法通常无法消除菌斑微生物, 治疗失败也很大程度上源于无法控制相关炎症^[14-15]。因此, 药物降低炎症反应和 ROS 水平可能是减轻牙周炎引起的牙周组织破坏, 最大限度保存牙齿的有效途径。在众多抗炎药物中, NSAIDs 可通过抑制 PGE2 合成和调节机体免疫应答反应,

控制牙周炎症^[16]。MSZ 作为 NSAIDs 的一种, 是 IBD 的临床一线用药, 具有良好的抗氧化和抗炎活性^[17]。本研究尝试将 MSZ 用于牙周炎的体内和体外模型, 观察其对牙周炎的治疗效果。

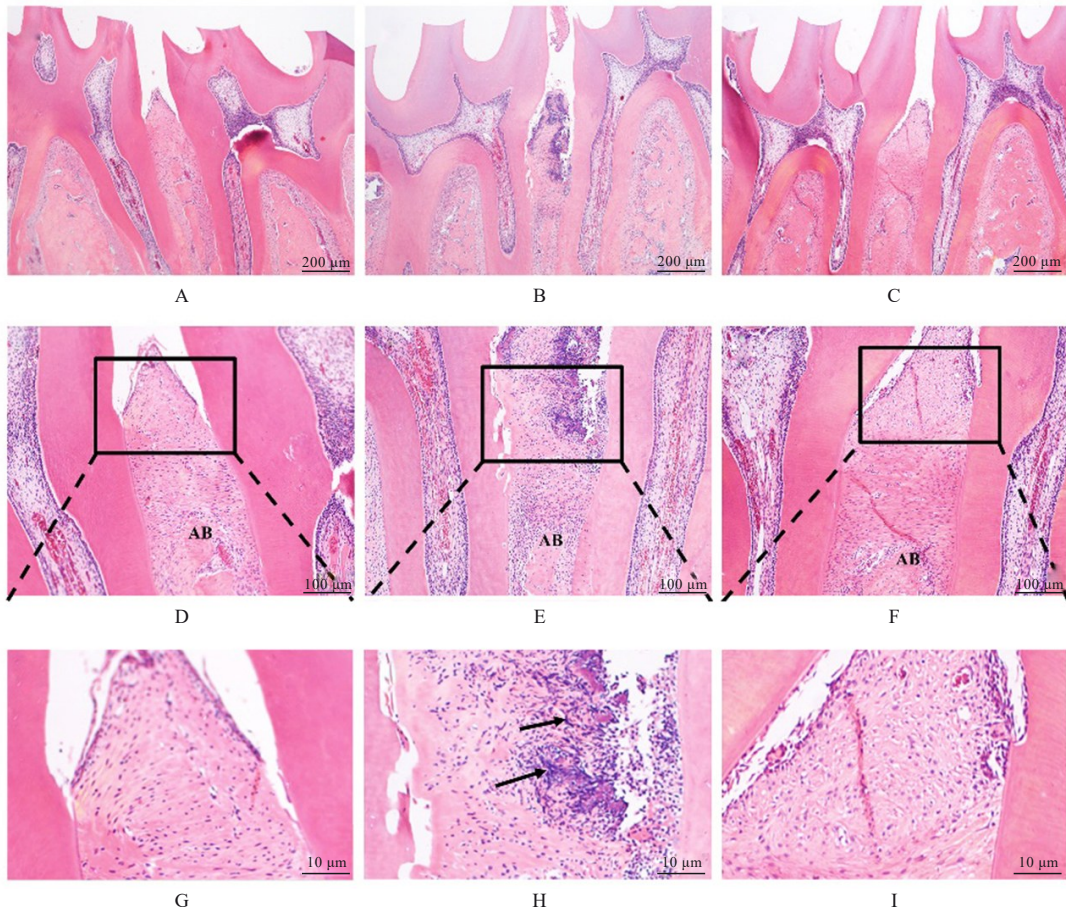
巨噬细胞在先天免疫中起重要作用, 是宿主抵御微生物的第一道防线。在 *P.g.*-LPS 诱导的牙周炎中, 巨噬细胞通过产生多种促炎介质如 IL-8 和 IL-1β 等来调节炎症反应, 上述细胞因子对于加剧牙周炎症反应至关重要^[18]。IL-8 在多形核白细胞



* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs administration group.

图6 各组大鼠CEJ-ABC(A)和BV/TV(B)

Fig. 6 CEJ-ABC(A) and BV/TV(B) of rats in various groups



A, D, G: Control group; B, E, H: Model group; C, F, I: Drug administration group. Black arrows indicated inflammatory cells.

图7 HE染色观察各组大鼠牙周组织形态表现

Fig. 7 Morphology of periodontium tissue of ras in various groups detected by HE staining

的募集和功能激活中发挥作用,与牙周炎严重程度呈正相关关系,在牙周组织破坏阶段具有加重炎症的作用^[19]。IL-1 β 是一种有效的炎症介质和促进骨吸收的细胞因子,一旦在组织累积就会触发一系

列炎症反应,导致白细胞募集和中性粒细胞浸润^[20]。本研究结果显示:*P. g*-LPS可明显提高IL-8和IL-1 β mRNA表达水平,说明*P. g*-LPS能促进RAW264.7细胞炎症;MSZ处理后细胞中IL-8和

IL-1 β mRNA 表达水平明显降低, 说明 MSZ 能在一定程度上抑制炎症进展, 发挥抗炎作用。

牙周炎患者的牙龈组织中会产生大量 ROS, 导致局部氧化还原失衡, 最终引起牙龈组织破坏。*P. g*-LPS 可引起细胞中 ROS 和自由基大量积累, 引发氧化应激。细胞产生氧化应激会加重炎症反应并扰乱细胞内环境, 导致细胞病变或危及细胞存活。MDA 是不饱和脂肪酸脂质过氧化的产物, 也是确定氧化应激最常用的指标^[21]; GSH 可以直接或间接有效地清除自由基, 是细胞中主要的非酶抗氧化剂, 在抗氧化防御过程中起重要调节作用^[22]; SOD 是一种具有抗氧化作用的活性酶, 可将有害的超氧自由基转化为毒性较低的过氧化氢, 进而被分解, 具有重要的生理意义^[23]。ROS 是巨噬细胞经典的促炎介质, 未被清除的 ROS 加剧细胞炎症反应, 降低细胞中 GSH 水平和 SOD 活性。本研究结果显示: MSZ 能明显提高 *P. g*-LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 GSH 水平和 SOD 活性, 降低细胞中 ROS 和 MDA 水平, 减弱细胞氧化应激反应, 缓解细胞损伤。

HE 染色和微型 CT 结果显示: 模型组大鼠牙槽骨吸收, 结合上皮向根方增殖, 炎症细胞浸润, 牙周膜纤维结构紊乱, 说明牙周炎大鼠模型成功建立; 局部注射 MSZ 能够部分恢复上皮附着, 减少炎症细胞浸润, 对牙周破坏有一定的改善作用, 牙槽骨丢失减少可能与 PGE2 合成受到抑制有关。本研究结果表明: MSZ 可以改善牙周炎大鼠模型中局部炎症微环境, 抑制牙槽骨吸收。MSZ 治疗牙周炎的作用机制和给药方式还需要进一步探索。此外, 本研究为动物实验, 未来尚需临床试验进一步验证。

综上所述, MSZ 在 *P. g*-LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模型中具有抗氧化和抗炎作用, 定期局部注射 MSZ 减少牙周炎大鼠模型的上皮附着丧失和炎症细胞浸润, 对牙槽骨吸收具有一定的抑制作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王浩宇参与文献收集、整理和论文撰写, 王宇琪、王冰倩、聂瑾涵、闫嘉晴和胡敏参与文献收集、整理及论文审校。

[参考文献]

- [1] HAJISHENGALLIS G, LAMBRIS J D. Complement and dysbiosis in periodontal disease[J]. Immunobiology, 2012, 217(11): 1111-1116.
- [2] HU S S, WANG L P, LI J, et al. Catechol-modified and MnO₂-nanozyme-reinforced hydrogel with improved antioxidant and antibacterial capacity for periodontitis treatment[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2023, 9(9): 5332-5346.
- [3] XU W Z, ZHOU W, WANG H Z, et al. Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2020, 120: 45-84.
XU W Z, ZHOU W, WANG H Z, et al. Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2020, 120: 45-84.
- [5] LIRA-JUNIOR R, FIGUEREDO C M. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(35): 7963-7972.
- [6] 吕宗凯, 郑杨灿, 杜胜男, 等. 牙周炎与炎症性肠病相关性研究的 Meta 分析[J]. 口腔医学, 2021, 7(11): 1011-1015.
- [7] LI X M, ZHOU R Q, HAN Y, et al. Silibinin attenuates experimental periodontitis by downregulation of inflammation and oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2023, 2023: 5617800.
- [8] 张馨艺, 李萌, 隋秉东, 等. 氧化应激及抗氧化防御系统在慢性牙周炎中的作用[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(1): 52-56.
- [9] BEIRANVAND M. A review of the biological and pharmacological activities of mesalazine or 5-aminosalicylic acid (5-ASA): an anti-ulcer and anti-oxidant drug[J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(5): 1279-1290.
- [10] VANE J R, BOTTING R M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action[J]. Inflamm Res, 1998, 47(Suppl 2): S78-S87.
- [11] YAN M M, NOGUCHI K, RUWANPURA S M, et al. Cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin (PG) E2 downregulates matrix metalloproteinase-3 production via EP2/EP4 subtypes of PGE2 receptors in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1 α [J]. J Periodontol, 2005, 76(6): 929-935.
- [12] 李鑫, 丁旭, 刘笑梦, 等. 沉默信息调节因子1对

- 慢性牙周炎模型大鼠肾损伤的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 8(5): 1200-1208.
- [13] KINANE D F, STATHOPOULOU P G, PAPAPANOU P N. Periodontal diseases [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17038.
- [14] DRISKO C H. Nonsurgical periodontal therapy: Nonsurgical periodontal therapy [J]. Periodontology 2000, 2001, 25(1): 77-88.
- [15] VAN DYKE T E, SIMA C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? [J]. Periodontol 2000, 2020, 82(1): 205-213.
- [16] 蔡盈可, 潘亚萍. 非甾体抗炎药物在牙周炎治疗中应用研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2020, 6(5): 314-317.
- [17] MAÑOSA M, DOMÈNECH E. Mesalazinas viejas, mesalazinas nuevas [J]. Gastroenterol Y Hepatol, 2011, 34: 25-29.
- [18] NĘDZI-GÓRA M, KOWALSKI J, GÓRSKA R. The immune response in periodontal tissues [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017, 65(5): 421-429.
- [19] LAGDIVE S S, MARAWAR P P, BYAKOD G, et al. Evaluation and comparison of interleukin-8 (IL-8) level in gingival crevicular fluid in health and severity of periodontal disease: a clinico-biochemical study [J]. Indian J Dent Res, 2013, 24(2): 188-192.
- [20] 陈东, 周焱祎. 甲硝唑羧甲基壳聚糖凝胶治疗大鼠牙周炎过程中白介素-1 β 的变化[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2022, 25(5): 453-461.
- [21] FAROOQ U, PAN Y J, LIN Y F, et al. Structure characterization and action mechanism of an antiaging new compound from *Gastrodia elata* blume [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 5459862.
- [22] ZHU Y J, ZENG T, ZHU Y B, et al. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat [J]. Neurochem Res, 2008, 33(11): 2310-2317.
- [23] 杨健, 郭增旺, 刁静静, 等. 绿豆肽对RAW264.7巨噬细胞增殖及免疫活性物质的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(8): 22-30.