

• 牙周病学专栏 •

大麻二酚联合米诺环素对牙周炎治疗作用的实验研究

漆美瑶 祁星颖 周欣奕 谭震 袁泉

口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心
四川大学华西口腔医院种植科 成都 610041

[摘要] **目的** 通过体内外实验探索大麻二酚 (CBD) 联合米诺环素 (MINO) 对小鼠实验性牙周炎的治疗作用。**方法** 丝线结扎法建立小鼠牙周炎模型, 口腔局部分别给予 CBD、MINO 及二者联用, 通过定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测牙周炎小鼠用药后外周血炎症因子变化, Micro CT、免疫印迹 (WB) 及苏木精-伊红 (HE) 染色分析局部位点炎症改善情况; 牙龈卟啉单胞菌抑菌实验检测联用药物体外抗菌性能; 体外诱导巨噬细胞及牙龈成纤维细胞炎症, 通过 qRT-PCR 检测炎症相关 mRNA 表达, 划痕实验探索药物对细胞迁移的影响, 并通过酶联免疫吸附 (ELISA) 测定探究药物对于胶原生成的作用。**结果** 联用 CBD 与 MINO 后, 与单独用药相比, 小鼠全身炎症指标下降, 局部附着丧失减轻、组织炎症水平降低、牙周软硬组织破坏得到改善; 体外抑菌实验结果表明联用药物表现出良好的抗菌性能; 体外细胞实验证明联用药物降低巨噬细胞多种炎症因子的表达水平, 促进炎症状态下人牙龈成纤维细胞增殖、迁移, 提升胶原形成功能。**结论** 相较单一用药方式法, 局部应用 CBD 联合 MINO 对小鼠实验性牙周炎有着显著疗效。

[关键词] 牙周炎; 大麻二酚; 米诺环素; 抗生素

[中图分类号] R781.4⁺2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2024078



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Therapeutic effect of cannabidiol combined with minocycline on periodontitis

Qi Meiyao, Qi Xingying, Zhou Xinyi, Tan Zhen, Yuan Quan

State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Implantology, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Supported by: West China Hospital of Stomatology Sichuan University Interdisciplinary Innovation Project (RD-03-202010); Sichuan Province International Science and Technology Cooperation Project (2021YFH0015)

Correspondence: Yuan Quan, Email: yuanquan@scu.edu.cn

[Abstract] **Objective** The therapeutic effect of cannabidiol combined with minocycline on experimental periodontitis in mice was studied *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The mouse periodontitis model was established by thread ligation. The oral area was treated with cannabidiol, minocycline, and both. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the changes in inflammatory factors in peripheral blood of mice with periodontitis. Micro CT, western blot (WB), and hematoxylin-eosin (HE) staining were used to analyze the improvement in local inflammation. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) bacteriostatic assay was used to detect the antibacterial properties of the combined drugs *in vitro*. Inflammation of macrophages and gingival fibroblasts was induced *in vitro*, and mRNA

expression related to inflammation was detected by qRT-PCR. The effect of drugs on cell migration was explored by wound-healing assay, and the effect of drugs on collagen production was explored by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** After combined administration of cannabidiol and minocycline, the systemic in-

[收稿日期] 2023-03-25; **[修回日期]** 2023-06-29

[基金项目] 四川大学华西口腔医院交叉学科创新项目 (RD-03-202010);
四川省国际科技合作项目 (2021YFH0015)

[作者简介] 漆美瑶, 医师, 博士, Email: 727198073@qq.com

[通信作者] 袁泉, 教授, 博士, Email: yuanquan@scu.edu.cn

inflammation index of mice decreased, the local attachment loss was alleviated, the tissue inflammation level was reduced, and the destruction of periodontal soft and hard tissues improved compared with single administration. The results of the antibacterial experiment *in vitro* showed that the combined drugs had good antibacterial properties. *In vitro* cell experiments proved that the combination of drugs reduced the expression levels of various inflammatory factors in macrophages, promoted the proliferation and migration of human gingival fibroblasts in inflammatory states, and improved the collagen formation function. **Conclusion** Compared with the single medication method, the local application of cannabidiol combined with minocycline has a significant effect on experimental periodontitis in mice.

[Key words] periodontitis; cannabidiol; minocycline; antibiotic

牙周炎以牙菌斑为始动因子,以逐渐加重、感染性牙周软硬组织破坏为特点^[1],是造成成年人失牙的重要因素^[2-4],与全身健康联系紧密^[5-9]。因而,寻找牙周炎治疗更高效的方案并探究其内在机制迫在眉睫。大麻二酚(cannabidiol, CBD)是植物大麻叶提取物中唯一安全、非精神作用类成分,可与体内多种受体发生结合,在抗肿瘤、免疫调节、止痛、神经保护、抗抑郁焦虑等多方面具有良好的药用价值^[10]。CBD强效的抗炎特性已在不同组织器官中得到验证,可影响多种疾病的发展进程,包括风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、银屑病、糖尿病等^[11-15]。本课题组前期研究^[16]发现:局部外用CBD可明显减轻口腔溃疡的炎症程度,缓解溃疡疼痛,促进溃疡愈合。

米诺环素(minocycline, MINO)是第2代四环素类抗生素,对需氧和厌氧革兰阴性细菌均有抑菌效果^[17]。前期研究^[18]表明:MINO对牙菌斑生物膜中细菌的抑制效果明显优于多种其他抗生素。此外,MINO还具有抑制细胞凋亡和自噬、神经保护、抗抑郁、抗血管生成和肿瘤转移等非抗生素性质^[19-22]。然而,MINO作为目前牙周炎治疗的常规药物,缺陷也日渐凸显——其治疗周期较长,在长期的较高浓度用药过程中很容易出现耐药菌株所导致的疗效下降问题,如若继续应用则可能导致口腔菌群及肠道菌群紊乱,产生多种不良反应^[23]。

本研究拟探索MINO与CBD联用是否能在降低传统MINO用量的同时,对于牙周炎相关细胞同时保有抗菌、抗炎、保护胶原组织和促进愈合等综合性作用,为牙周炎治疗提供新的思路。

鉴于CBD的安全性及多领域的生物学作用,联合MINO广谱抗菌作用及其非抗生素性质,本研究拟用牙周局部给药方式^[24-25],探究联用CBD与MINO对牙周炎的疗效。针对这一目标,本研究采用机械结扎法^[26-27]构建小鼠牙周炎模型,联用药物开展了一系列体内外实验,现将结果汇报如下。

1 材料和方法

1.1 材料

CBD(云南汉盟制药有限公司,中国)、MINO(Sigma公司,美国)、SPF级C57BL雄性小鼠(12周龄)、ATCC 33277牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)菌株、RAW 264.7小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系(mouse mononuclear macrophages cell,百特生物公司,中国)、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染液试剂盒(碧云天公司,中国)、5×蛋白上样缓冲液(碧云天公司,中国)、蛋白浓度测定试剂盒(凯基生物公司,中国)、胰蛋白胍大豆肉汤培养基粉末(默克生物公司,中国)、Dulbecco's改良高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)(HyClone公司,美国)、分散酶(Sigma公司,美国)、II型胶原酶(Sigma公司,美国)、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(云克隆公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 栓丝法构建小鼠牙周炎模型、给药及取材
对50只6~8周龄C57BL雄性小鼠(20~30 g)进行为期1周的检疫,将动物置于塑料笼中正常喂养5 d适应动物实验中心环境。随机将小鼠分为5组,每组各10只。将6-0手术用无菌丝线穿过小鼠上颌第一磨牙及第二磨牙之间,并于第一磨牙远中颊侧打结,建立小鼠牙周炎模型。对照处理组(Sham)在造模后随即剪断并移除丝线。实验组分别给予10 mg/mL的CBD、1 mg/mL的MINO及10 mg/mL的CBD+1 mg/mL的MINO口腔喷剂,对照组则给予等量(每次喷剂用量均为1 mL)辅料口腔喷剂(Vehicle),从造模后7 d开始,连续7 d每天给予口腔喷剂1次,给药7 d后(即造模后

14 d) 取材检测。

分组如下: 1) 对照处理组 (Sham) + 溶剂 (Vehicle), 记为Control组; 2) 牙周炎+溶剂 (Vehicle), 记为Ligated组; 3) 牙周炎+ CBD (10 mg/mL溶于溶剂), 记为CBD组; 4) 牙周炎+ MINO (1 mg/mL溶于溶剂), 记为MINO组; 5) 牙周炎+ CBD (10 mg/mL) + MINO (1 mg/mL), 记为DUAL组。

1.2.2 Micro CT扫描和分析 将小鼠上颌骨组织放入19 mm样本管, 置于 μ CT 80系统 (Scanco Medical公司, 瑞士), 设置5 μ m精度, 按500 proj/180°分辨率逐层扫描 (55 kV、114 mA、500 ms)。三维重建后测量丝线穿入位置即第一、第二磨牙最大近远中径界面的邻接点至牙槽嵴顶 (alveolar bone crest, ABC) 的距离, 以模拟牙周炎的牙槽嵴吸收。圈定上颌第一磨牙及第二磨牙之间评分ABC的位置, 骨小梁分析的参数为骨体积分数 (bone volume fraction, BV/TV) (%)。

1.2.3 外周血RNA提取、逆转录及定量反转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 实验 提取小鼠外周血RNA, 进行逆转录 (Takara公司, 日本), 反应完成后获得20 μ L cDNA样本, 稀释5倍后用于下一步实验或冻存于-20 °C冰箱备用。配制qRT-PCR体系, 以cDNA作为扩增模板, 每样本设3个复孔进行反应, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量计算。

1.2.4 石蜡切片制取及染色 配制20% 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 脱钙液, 将扫描完毕的上颌骨样本浸泡于脱钙液中4周。脱水、透明、浸蜡和包埋, 获得组织蜡块。理想切片位置为: 上颌第一磨牙与第二磨牙间ABC最大近远中径截面。将切片在45 °C水浴锅中充分铺展, 再用黏附性载玻片捞片, 充分干燥4 °C保存备用。石蜡切片脱蜡至水, 苏木精染细胞核、伊红染细胞质, 脱水封片后使用显微镜观察切片, 镜下进行图像处理 and 比较。

1.2.5 蛋白免疫印迹 (western blot, WB) 实验 提取小鼠牙龈组织蛋白, 分装后保存于-80 °C冰箱, 需避免反复冻融; 配制1×电泳缓冲液、配制转膜缓冲液; 制备聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel, PAGE) 凝胶和电泳; 转膜、封闭、抗体孵育; 遵照化学发光试剂盒的说明, 按1:1比例配制化学发光底物 (electrochemiluminescence, ECL) 显影液。同显影液于室温避光孵育2 min。

调整曝光时间, 观察各条带结果并拍照。

1.2.6 抗菌药敏实验 1) 不同浓度CBD及MINO溶液的配制及最佳组合浓度探索。将CBD及MINO分别溶解于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液中, 配制成20 g/L储存溶液, 再将其稀释为对应组合浓度梯度溶液备用。2) 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定。将处于对数生长期菌悬液 [每毫升 1.5×10^8 菌落形成单位 (colony forming units, CFU)] 加入96孔板中 (每孔100 μ L), 分别加入不同浓度的CBD及MINO溶液100 μ L和溶剂100 μ L。培养48 h后, 黑色背景下肉眼观察菌液无浑浊出现的最低药物浓度组合为两药联用的MIC。3) 细菌生长曲线测定。取相应浓度的CBD+MINO溶液和对数生长期菌悬液 (1.5×10^3 CFU/mL) 各2.5 mL混合均匀, 将CBD+MINO终浓度分别为1/4 MIC、1/2 MIC、MIC作为实验组; 将DMSO溶液与对数生长期菌悬液 (1.5×10^8 CFU/mL) 各2.5 mL混合均匀后作为对照组。于培养0、4、8、12、16、20、24 h后, 加入细菌悬液, 通过酶标仪检测于600 nm波长下各小孔吸光度 (光密度值), 并绘制生长曲线。

1.2.7 细胞炎症诱导及划痕实验 将6孔板中各孔原液吸净丢弃, 更换为含1 μ g/mL *P. gingivalis*来源脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的无双抗培养基, 本实验LPS处理时间节点设置为6 h, 而后加入各组药物处理12 h, 在收样前30 min加入腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP), 使其在溶液中浓度为2 mg/mL。将牙龈成纤维细胞以每孔 6×10^4 个细胞的密度接种于6孔板中, 诱导炎症, 更换为无血清且含1%双抗的DMEM继续培养24 h后, 使用20 μ L枪尖垂直于孔板划痕, 采图后计算划痕面积。

1.2.8 数据分析 所有实验均已重复3次。采用单因素方差分析确定各变量的显著性影响, 然后进行Tukey's多重比较检验。

2 结果

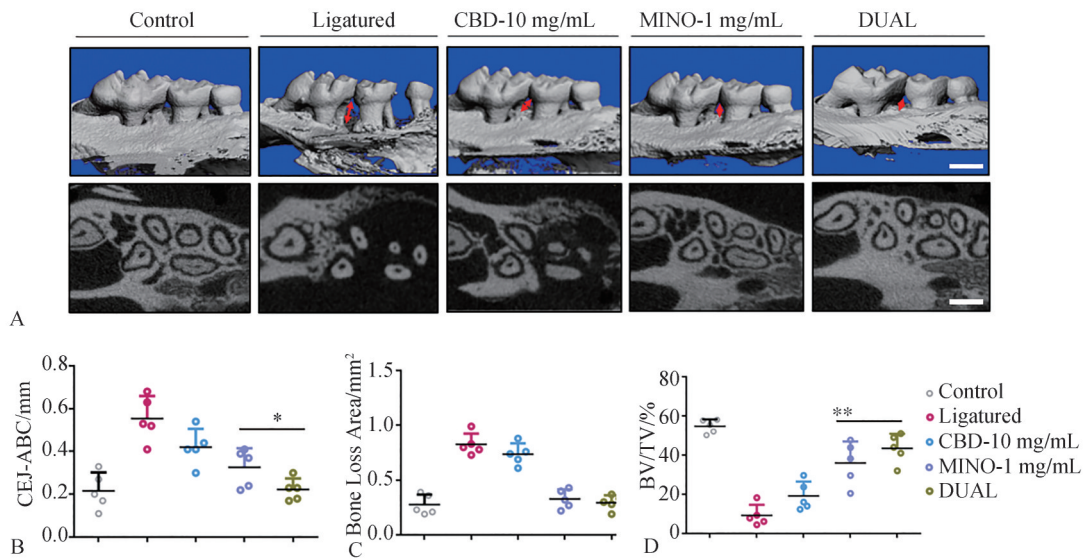
2.1 CBD与MINO联用有效减轻小鼠牙槽骨破坏

通过对上颌第一、二磨牙舌侧面的Micro CT扫描重建, 观察到牙周炎造模后, 牙槽骨的破坏尤为显著 (图1A)。其中, Control组从上颌第一磨牙釉牙骨质界 (enamel cementum junction, CEJ) 起、到小鼠上颌第一、二磨牙间ABC止的

距离(CEJ-ABC)远大于所有给药组小鼠,提示第一磨牙栓丝建模造成严重的牙槽骨吸收;而CBD+MINO处理组小鼠的牙槽骨吸收略低于CBD/MINO单独处理组($P<0.05$),为所有实验组中最低的,提示CBD+MINO的口腔局部应用有效减轻小鼠患牙周周围牙槽骨的炎性破坏(图1B)。

此外,本实验还通过ImageJ定量比较了各组小鼠上颌第一、二磨牙牙根近远中轴面所围成的横截面积差异,溶剂组小鼠牙槽骨破坏面积最大,而这一指标在CBD+MINO组显著降低,且低于传

统单独应用MINO组(图1C)。同时对各骨小梁参数进行了定量分析(图1D),结果趋势符合上述观察。各组间BV/TV的分析结果与CEJ-ABC距离变化趋势意义一致,结果表明牙周炎栓丝模型的建立对于患牙牙周骨小梁分数具有负面影响,而应用CBD+MINO对这一现象有所逆转。造模后7 d给予CBD+MINO联合喷剂后,相较于对照组及单独应用其中一种药物而言,小鼠牙周硬组织破坏的进展减慢、破坏程度减轻。



A: 小鼠颌骨三维重建图及横断面展示(舌侧观),所示依次为5组小鼠上颌第一、二磨牙牙槽骨丧失高度标记及横断面骨量丧失情况,红色箭头所示为CEJ-ABC距离,标尺为500 μm; B: 小鼠上颌第一磨牙远中CEJ-ABC的垂直高度; C: 小鼠上颌第一、二磨牙牙根近远中轴面所围成的横截面积; D: 小鼠上颌第一、二磨牙间牙槽骨BV/TV值。*示 $P<0.05$, **示 $P<0.01$ 。

图 1 给药后的小鼠颌骨Micro CT三维重建与分析

Fig 1 Micro CT 3D reconstruction and analysis of mouse jaw after administration

2.2 CBD与MINO联用降低牙周炎小鼠局部和全身炎症水平

造模后14 d收取小鼠牙周组织样本进行HE组织染色。机械栓丝法造模后给药7 d,仅栓丝组可见患牙近远中牙槽嵴处骨质破坏严重,主要表现为图2A中标注所示ABC向根方退缩、以及G所示的龈乳头处炎症细胞大量浸润。而CBD组与联用组ABC高度保留较好,龈乳头处炎症细胞浸润较少,仅可见少许淋巴细胞,且CBD+MINO组淋巴细胞浸润程度进一步降低。进一步收集局部牙龈组织行免疫印迹实验,其结果可证实,CBD+MINO的组合在减轻局部炎症状态上的效果优于单独使用CBD或MINO(图2B)。考虑到牙周炎的持续状态在人体能够引发全身性的低度炎症改变,本实验取小鼠外周血检测了各组小鼠血清中基因的

转录水平表达。结果显示:与单独用药相比,联用CBD+MINO可抑制全身白细胞介素(interleukin, IL)-1β及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α炎症因子的表达(图2C)。

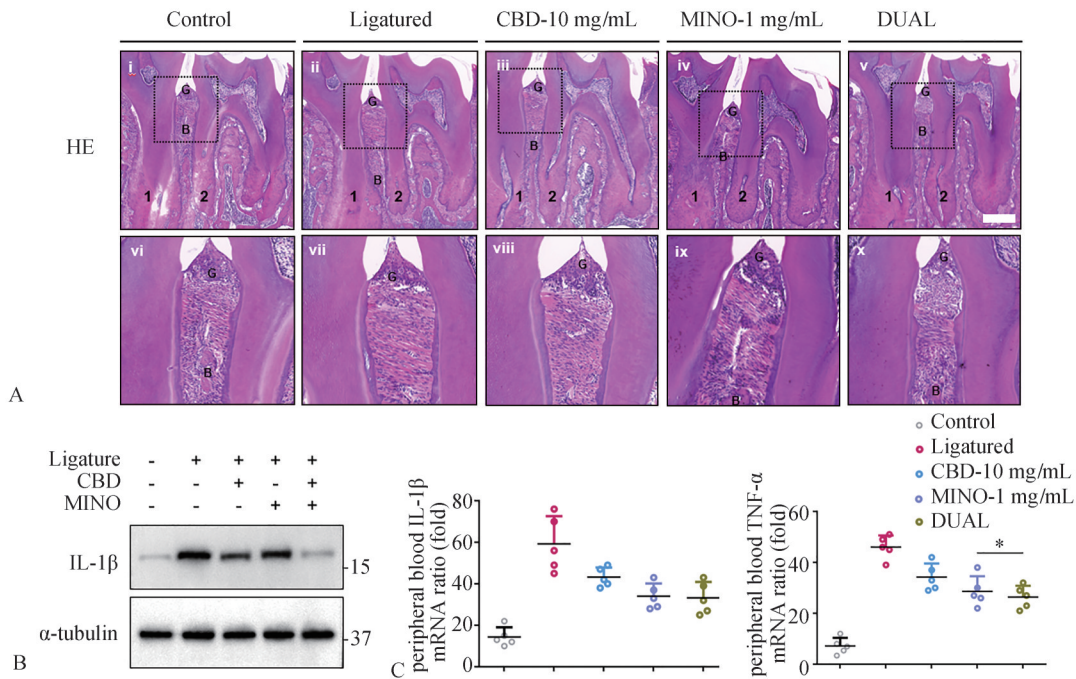
2.3 CBD与MINO联用抑制P. gingivalis增殖

回顾文献发现:目前暂无CBD与MINO联合抗菌用药的浓度探究,因此本实验通过设计2种药物连续浓度梯度并进行组合,以探究最适宜的用药浓度。选择*P. gingivalis*作为牙周炎致病菌代表菌种,分别施以不同浓度梯度的组合药物,将微生物悬液吸光度作成热图形式,蓝色越深代表组合药物对于该种微生物抑制作用越强。如图3A所示,可以初步将1 μg/mL CBD+0.06 μg/mL MINO作为联合用药MIC。

组合药物对和*P. gingivalis*生长曲线的影响见

图3B。与对照组相比，各浓度组合药物实验组对其生长均有不同程度的抑制，且该抑制作用呈浓度依赖性。1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC组细菌生长呈缓慢增长趋势，而MIC组细菌的增长几乎完全受到抑制，证明实验所得出组合药物MIC浓度

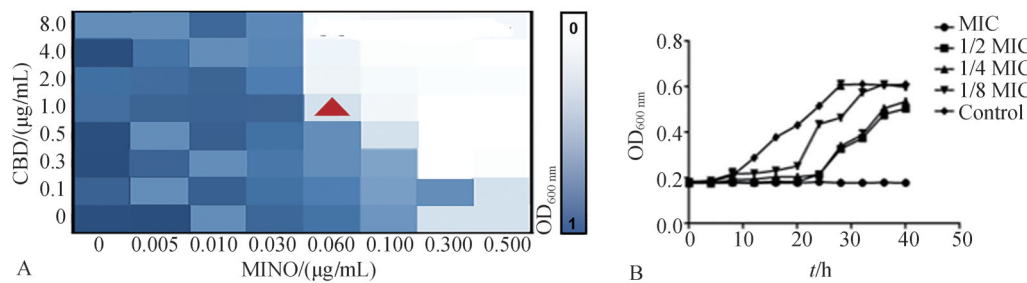
可靠。值得一提的是，常用于抑菌的MINO浓度一般为0.1~1 μg/mL。本实验显示：CBD+MINO组合中MINO有效浓度可进一步降低至0.06 μg/mL，降低抗生素用量对减小细菌耐药风险具有重要意义。



A: 小鼠牙周组织石蜡切片的HE染色结果，所框选截面为放大倍率扫描结果，G是牙龈乳头，B是ABC，1是小鼠上颌第一磨牙，2是小鼠上颌第二磨牙，标尺为50 μm；B: 小鼠牙龈组织蛋白的免疫印迹检测；C: 小鼠外周血中全身炎症相关蛋白转录水平检测。*示P≤0.05。

图 2 给药后小鼠牙周局部及全身炎症水平变化

Fig 2 Changes in local and systemic inflammation levels in periodontal mice after drug administration



A: 有效抑制*P. gingivalis*的组合药物浓度探索，红色三角示最低抗菌组合浓度；B: 不同浓度组合药物对*P. gingivalis*生长曲线的影响，用光密度值 (optical density, OD) 表征。

图 3 CBD+MINO体外抑菌作用探索

Fig 3 *In vitro* bacteriostatic effect of CBD+MINO

2.4 CBD与MINO联用降低巨噬细胞炎症因子分泌

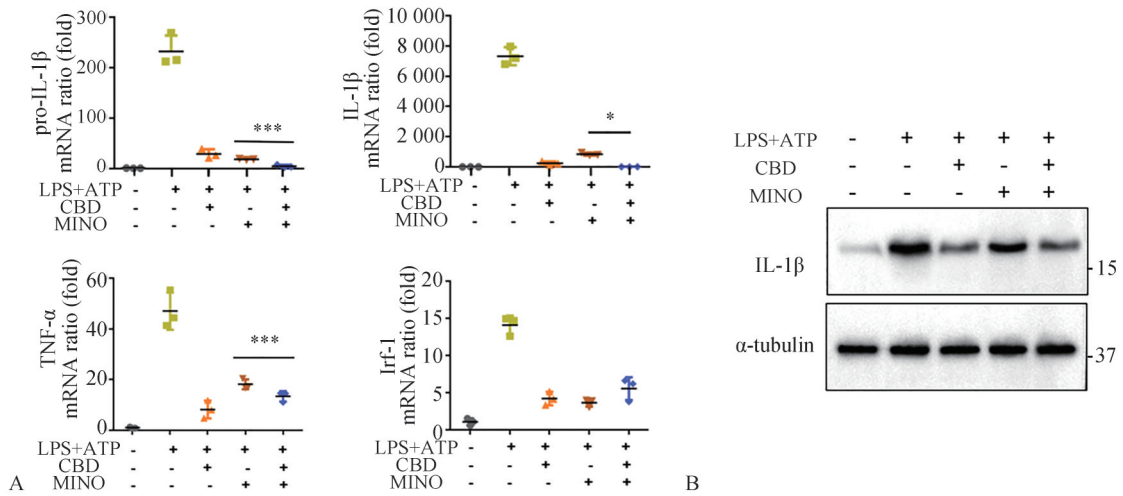
炎症诱导的RAW264.7给予不同药物处理后进行qRT-PCR实验，结果显示：给予CBD+MINO处理后，RAW264.7中pro-IL-1β、IL-1β、TNF-α和Irf-1基因转录水平均发生显著下调，且联用药物

组pro-IL-1β、IL-1β、TNF-α下调程度均大于单独使用MINO (P<0.05)，进一步验证了CBD与MINO联用对小鼠巨噬细胞中炎症相关通路基因的抑制作用 (图4A)。

同时提取不同组药物处理的炎症巨噬细胞裂解液蛋白，进行WB实验，结果如图4B所示，

CBD+MINO处理后巨噬细胞分泌IL-1β蛋白水平较其他组有所下降,提示在体外抗炎作用方面,联

用CBD及MINO达到了比单用CBD更强的抗炎作用。



A: qRT-PCR 检测不同药物处理的炎症 RAW264.7 细胞, pro-IL-1β、IL-1β、TNF-α、Irf-1 mRNA 水平, *示 $P < 0.05$, ***示 $P < 0.001$; B: WB 检测不同药物处理的炎症 RAW264.7 细胞中炎症因子的表达水平。

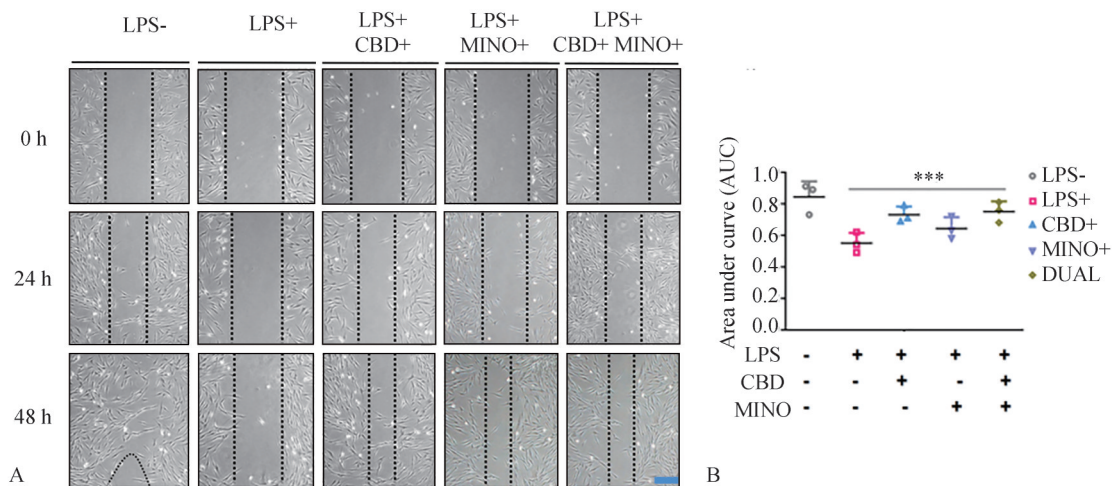
图 4 CBD+MINO 处理影响炎症下 RAW264.7 细胞炎症因子分泌

Fig 4 CBD+MINO treatment affected the secretion of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells

2.5 CBD 与 MINO 联用促进炎症状态下人牙龈成纤维细胞迁移

划痕实验结果显示: CBD 与 MINO 单独使用和联用均能改善炎症状态下人牙龈成纤维细胞迁移(图 5A)。24 h 时间点, 与对照组毫无迁移迹象相比, CBD+MINO 组已能观察到细胞迁移, 即

两药联用在早期就能促进炎症状态下人牙龈成纤维细胞 (human gingival fibroblast, HGF) 的迁移。48 h 时间点, 与对照组相比, 定量、定性结果均显示: CBD 联用 MINO 能显著改善炎症下 HGF 的迁移能力 (图 5B, $P < 0.001$)。



A: 划痕实验结果, 标尺为 200 μm; B: 48 h 划痕实验定量结果, ***示 $P < 0.001$ 。

图 5 HGF 细胞划痕实验结果

Fig 5 HGF cell wound-healing test results

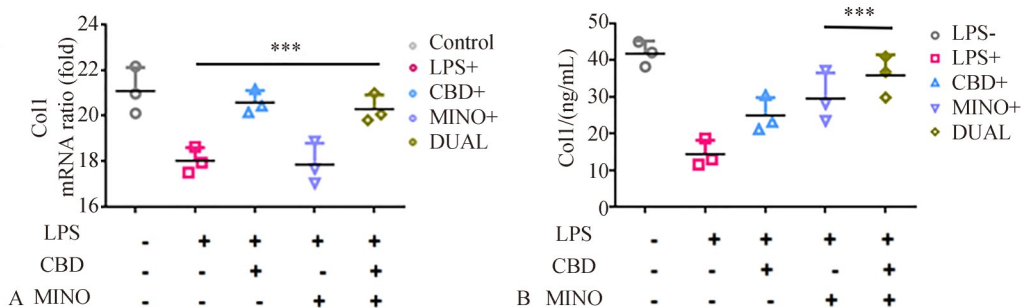
2.6 CBD 与 MINO 联用提高人牙龈成纤维细胞胶原生成

qRT-PCR 结果显示: 与对照组相比, 炎症状

态下各组 HGF 细胞产生胶原能力减弱, 而 CBD 与 MINO 联用处理组可显著提升炎症状态下人牙龈成纤维细胞产生胶原能力, 从而基本恢复 HGF 正常

生理功能，ELISA定量进一步验证了该结果，且与单独应用MINO组相比差异具有统计学意义 ($P <$

0.001) (图6A、B)。



A: qRT-PCR 实验结果; B: ELISA 实验结果。***示 $P < 0.001$ 。

图 6 联用药物提升炎症下 HGF 细胞胶原生成

Fig 6 Combination of drugs to enhance collagen production in HGF cells under inflammation

3 讨论

作为最常见的口腔慢性感染性疾病，牙周炎严重影响患者口腔及全身健康。位于牙周袋内的牙菌斑生物膜是牙周炎致病因素中最重要的一环，研究^[2-4]显示：定植于牙周袋内的微生物群落所包含细菌种属数已逾百种，由革兰阳性和革兰阴性细菌共同构成^[28-29]，而临床通常采用的龈上/龈下洁刮治的治疗方式常常未能深入到根分叉病变部位和牙周袋内底部^[30]，无法有效地控制细菌感染及继发的宿主免疫反应，治疗效果难以保证^[31-33]。

CBD强大的生物学效应已在众多体内外研究中得到证实，包括：抗癌、抗炎、止痛、神经保护、抗抑郁焦虑五大主要方面^[10]；其中，CBD良好的抗炎、免疫调节特性已在体内多种组织器官及相关炎症性疾病模型中得到验证。鉴于CBD对在口腔炎症性疾病中发挥的良好抗炎及抑菌等功效，相关组织已研制出含CBD的口腔护理产品^[34]，对牙周炎、牙龈炎、口腔溃疡等口腔问题有良好效果，并申请了相关发明专利。但目前针对CBD治疗口腔疾病的组织验证研究甚少，尤其是CBD抗菌的作用机制目前尚无研究报告，因此在推广其临床应用之前仍需进一步体外抗菌实验探索。

MINO为一种新型广谱抗生素，因渗透性好、脂溶性高的特点被用于牙周炎的治疗，该药局部用药可变硬形成薄膜，其中一部分薄膜可与硬组织整合之后缓慢释放以维持局部的高浓度^[35]。MINO虽作为广谱抗生素，抑制多种细菌增殖能力早已被证实，但近期研究发现，其改善炎症反应的

效果非常局限^[36]，牙周炎患者局部软硬组织受细菌毒力因子刺激产生较强的破坏性炎症反应，导致牙龈色形质改变、探诊出血、牙周纤维结缔组织破坏、骨组织破坏乃至牙松动甚至脱落，MINO未能从抑制炎症方面改善牙周炎^[37]，因而在抗菌治疗的同时改善局部炎症反应也是治疗牙周炎的目标之一。因此，为在抗菌治疗的同时加强对局部炎症的控制，本研究在上述传统MINO抗菌治疗牙周炎的基础上加以CBD进行抗炎治疗。

*P. gingivalis*是牙周炎主要致病菌之一，直接参与牙菌斑生物膜的形成^[38]。本研究筛选出了CBD及MINO的组合药物MIC组合，并绘制不同浓度药物组合下*P. gingivalis*的生长曲线，观察到组合药物的抑制作用有一定的浓度依赖性，该抑制作用在较通常单一使用MINO时所用浓度更低的MINO用量下，效果强于单独应用CBD或MINO的传统抗生素疗法。联合应用CBD及MINO对多种细菌具有较强的体外抑菌活性，有望成为新型的牙周炎辅助治疗药物。

本实验选取小鼠巨噬细胞，并使用LPS对其进行炎症诱导，这也是体外炎症实验常用的细胞模型。联用药物在体内对于炎症状态下巨噬细胞促炎作用具有强于单独用药的效果。牙龈成纤维细胞参与胶原与细胞外基质合成，因此对牙周组织愈合至关重要^[39]。牙龈成纤维细胞向缺陷间处迁移并关闭创口是软组织再生的第一步，其迁移速度影响牙周组织的再生和重塑过程^[40]。而在本实验中选取的MINO浓度分别为0.06 $\mu\text{g/mL}$ ，低于推荐的血清水平浓度，依然达到治疗目的，且在MINO的有效抑菌浓度内，联用药物可促进炎症状

态下人牙龈成纤维细胞增殖和胶原合成。

综上所述,本课题揭示了局部联合应用CBD及MINO对牙周炎的显著疗效,明确了二者联用在牙周炎发生过程中、通过抗菌及抗炎双重机制保护牙周组织,为牙周炎高效治疗药物研发提供新思路。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

4 参考文献

- [1] Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis[J]. *Int Dent J*, 2021, 71(6): 462-476.
- [2] Fischer RG, Lira Junior R, Retamal-Valdes B, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: treatment of periodontitis[J]. *Braz Oral Res*, 2020, 34(suppl 1): e026.
- [3] Simpson TC, Clarkson JE, Worthington HV, et al. Treatment of periodontitis for glycaemic control in people with diabetes mellitus[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2022, 4(4): CD004714.
- [4] Lin HB, Chen HS, Zhao XT, et al. Advances of exosomes in periodontitis treatment[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 279.
- [5] GBD Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1789-1858.
- [6] 台保军. 中国居民口腔健康状况及防控策略: 第四次全国口腔健康流行病学调查结果解读[C]//第十三次全国老年口腔医学学术年会论文汇编. 武汉, 2018: 16-17.
Tai BJ. Oral health status of Chinese residents and prevention and control strategies: interpretation of the results of the fourth national oral health epidemiological survey[C]//The 13th National Annual Conference of Geriatric Stomatology. Wuhan, 2018: 16-17.
- [7] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 30-44.
- [8] Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(7): 426-440.
- [9] Genco RJ, Sanz M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: an overview[J]. *Periodontol 2000*, 2020, 83(1): 7-13.
- [10] Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, et al. Cannabidiol: state of the art and new challenges for therapeutic applications[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 175: 133-150.
- [11] Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, et al. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 3713-3724.
- [12] Wroński A, Jaročka-Karpowicz I, Stasiewicz A, et al. Phytocannabinoids in the pharmacotherapy of psoriasis[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1192.
- [13] Ramer R, Hinz B. Cannabinoid compounds as a pharmacotherapeutic option for the treatment of non-cancer skin diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(24): 4102.
- [14] Casares L, García V, Garrido-Rodríguez M, et al. Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1[J]. *Redox Biol*, 2020, 28: 101321.
- [15] Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(17): 9561-9566.
- [16] Qi X, Lin W, Wu Y, et al. CBD promotes oral ulcer healing via inhibiting CMPK2-mediated inflammation[J]. *J Dent Res*, 2022, 101(2): 206-215.
- [17] Singh S, Khanna D, Kalra S. Minocycline and doxycycline: more than antibiotics[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2021, 14(6): 1046-1065.
- [18] Asadi A, Abdi M, Kouhsari E, et al. Minocycline, focus on mechanisms of resistance, antibacterial activity, and clinical effectiveness: back to the future [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 22: 161-174.
- [19] Afshari AR, Mollazadeh H, Sahebkar A. Minocycline in treating glioblastoma multiforme: far beyond a conventional antibiotic[J]. *J Oncol*, 2020,

- 2020: 8659802.
- [20] Derfuss T, Mehling M, Papadopoulou A, et al. Advances in oral immunomodulating therapies in relapsing multiple sclerosis[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(4): 336-347.
- [21] Dogaru IA, Puiu MG, Manea M, et al. Current perspectives on pharmacological and non-pharmacological interventions for the inflammatory mechanism of unipolar depression[J]. *Brain Sci*, 2022, 12(10): 1403.
- [22] Morris G, Walker AJ, Berk M, et al. Cell death pathways: a novel therapeutic approach for neuroscientists[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(7): 5767-5786.
- [23] Shankar C, Nabarro LEB, Anandan S, et al. Minocycline and tigecycline: what is their role in the treatment of carbapenem-resistant gram-negative organisms[J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(4): 437-446.
- [24] Franco V, Gershkovich P, Perucca E, et al. The interplay between liver first-pass effect and lymphatic absorption of cannabidiol and its implications for cannabidiol oral formulations[J]. *Clin Pharmacokinetics*, 2020, 59(12): 1493-1500.
- [25] Kim EK, Jang SH, Choi YH, et al. Effect of an oral hygienic care program for stroke patients in the intensive care unit[J]. *Yonsei Med J*, 2014, 55(1): 240-246.
- [26] de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice[J]. *Clin Oral Investig*, 2016, 20(6): 1203-1216.
- [27] Polak D, Wilensky A, Shapira L, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response[J]. *J Clin Periodontol*, 2009, 36(5): 406-410.
- [28] Chen WP, Chang SH, Tang CY, et al. Composition analysis and feature selection of the oral microbiota associated with periodontal disease[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 3130607.
- [29] Teles F, Collman RG, Mominkhan D, et al. Viruses, periodontitis, and comorbidities[J]. *Periodontol* 2000, 2022, 89(1): 190-206.
- [30] Xu WZ, Zhou W, Wang HZ, et al. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 120: 45-84.
- [31] Herrera D, Sanz M, Kerschull M, et al. Treatment of stage IV periodontitis: the EFP S3 level clinical practice guideline[J]. *J Clin Periodontol*, 2022, 49 (Suppl 24): 4-71.
- [32] West N, Chapple I, Claydon N, et al. BSP implementation of European S3-level evidence-based treatment guidelines for stage I - III periodontitis in UK clinical practice[J]. *J Dent*, 2021, 106: 103562.
- [33] Oh TJ, Yu SH. Evidence-based clinical practice guideline for treatment of stage III periodontitis[J]. *J Evid Based Dent Pract*, 2021, 21(4): 101638.
- [34] Stahl V, Vasudevan K. Comparison of efficacy of cannabinoids versus commercial oral care products in reducing bacterial content from dental plaque: a preliminary observation[J]. *Cureus*, 2020, 12(1): e6809.
- [35] Fatima T, Khurshid Z, Rehman A, et al. Gingival crevicular fluid (GCF): a diagnostic tool for the detection of periodontal health and diseases[J]. *Molecules*, 2021, 26(5): 1208.
- [36] Surlin P, Gheorghe DN, Popescu DM, et al. Interleukin-1 α and-1 β assessment in the gingival crevicular fluid of periodontal patients with chronic hepatitis C [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2381-2386.
- [37] Preshaw PM, Taylor JJ, Jaedicke KM, et al. Treatment of periodontitis reduces systemic inflammation in type 2 diabetes[J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47(6): 737-746.
- [38] Li C, Yu R, Ding YM. Association between *Porphyromonas Gingivalis* and systemic diseases: focus on T cells-mediated adaptive immunity[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1026457.
- [39] Yang RQ, Guo SJ, Xiao SM, et al. Enhanced wound healing and osteogenic potential of photodynamic therapy on human gingival fibroblasts[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2020, 32: 101967.
- [40] Amberg R, Elad A, Rothamel D, et al. Design of a migration assay for human gingival fibroblasts on biodegradable magnesium surfaces[J]. *Acta Biomater*, 2018, 79: 158-167.