

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2017.12.005

· 基础研究 ·

肥胖复合牙周炎大鼠骨骼肌中瘦素受体表达的组织学研究

苏媛¹, 吕影涛², 张雪洋¹, 陈璇君¹, 章锦才³

1. 南方医科大学口腔医院牙周种植科, 广东 广州 (510280); 2. 南方医科大学口腔医院海珠广场院区种植修复科, 广东 广州 (510280); 3. 中国科学院大学存济医学院, 北京(100049)

【摘要】 目的 探讨牙周炎对胰岛素靶组织中脂肪细胞因子受体表达的调控及其在骨骼肌胰岛素抵抗中的作用。方法 将40只新生的雄性SD大鼠随机分为4组:肥胖合并牙周炎组(OB+CP),肥胖组(OB),牙周炎组(CP)和正常对照组(C)。通过皮下注射谷氨酸钠建立肥胖模型;丝线结扎联合局部接种牙周致病菌建立牙周炎模型。采用免疫组化染色法检测4组大鼠骨骼肌组织中瘦素受体的表达。结果 瘦素受体在C组和CP组的骨骼肌中广泛表达,组间差异无统计学意义($P > 0.05$);而在OB组和OB+CP组骨骼肌组织中表达量减少,OB+CP组中瘦素受体的表达量低于OB组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肥胖和牙周炎对骨骼肌中瘦素受体的表达存在交互效应($P < 0.05$)。结论 牙周炎的局部感染不能直接影响大鼠骨骼肌组织中瘦素受体的表达,但牙周炎可使肥胖机体骨骼肌中瘦素受体的表达下调。

【关键词】 牙周炎; 瘦素受体; 骨骼肌; 胰岛素抵抗

【中图分类号】 R781.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)12-0774-05

【引用著录格式】 苏媛, 吕影涛, 张雪洋, 等. 肥胖复合牙周炎大鼠骨骼肌中瘦素受体表达的组织学研究[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(12): 774-778.

Histological observation of leptin receptor in skeletal muscle in obese rats with periodontitis SU Yuan¹, LÜ Yingtao², ZHANG Xueyang¹, CHEN Xuanjun¹, ZHANG Jincai³. 1. Department of Periodontics and Implantology, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 2. Department of Implantology and prosthodontics, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Corresponding author: ZHANG Jincai, Email: jincaizhang@live.cn, Tel: 0086-20-34314299

【Abstract】 Objective To investigate the protein expression for leptin receptor in skeletal muscle in periodontitis and obese rat models, with the aim of exploring the effect of experimental periodontitis on adipokines receptors in insulin-targeting tissues and underlying mechanisms of skeletal muscle insulin resistance. **Methods** Forty natal SD male rats were randomly divided into four groups, respectively: obese rats with periodontitis (OB+ CP group), obese rats without periodontitis (OB group), normal rats with periodontitis (CP group) and normal rats without periodontitis (C group). Obese rat model was established by subcutaneous injection of sodium glutamate. Experimental periodontitis was induced by ligation and inoculation of periodontal pathogens. Immunohistochemical analysis of leptin receptor expression in skeletal muscle of four groups was employed. **Results** In the skeletal muscle, the protein for leptin receptor in the C group and CP group were popular and strong positive, and there was no statistically significant difference between the groups ($P > 0.05$). The protein expressions in the OB + CP group and OB group were decreased. Fewer protein expression was detected in the OB + CP group when compared with OB group ($P < 0.05$). A synergistic interaction between

【收稿日期】 2017-09-25; **【修回日期】** 2017-11-03

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81400509)

【作者简介】 苏媛, 副主任医师, 博士, Email: maggie_suyuan@126.com

【通信作者】 章锦才, 教授, 博士, Email: jincaizhang@live.cn

obesity and periodontitis was evident to the expression for the leptin receptor ($P < 0.05$). **Conclusion** Local infection induced by experimental periodontitis can barely down-regulate the protein expression for leptin receptor in the skeletal muscle. However, periodontitis can significantly down-regulate the protein expressions with the presence of obesity.

【Key words】 Periodontitis; Leptin receptor; Skeletal muscle; Insulin resistance

牙周炎是由菌斑微生物引起的以牙周局部软组织的破坏和骨组织的吸收为主要特征的慢性炎症性疾病^[1]。流行病学研究证实牙周炎与肥胖有关,并且影响糖尿病患者糖化血红蛋白的控制^[2-3]。肥胖机体内贮存的大量脂肪组织是具有活跃分泌功能的内分泌器官^[4],可以分泌大量的脂肪细胞因子,作为炎症介质和信号分子参与机体的能量代谢,免疫调控和炎症介导^[5-6]。其中,瘦素与胰岛素抵抗的关系尤为密切,对胰岛素的合成、分泌发挥着负反馈调节的作用,在2型糖尿病的发病中扮演了重要的角色^[7]。而骨骼肌是瘦素受体的主要靶器官之一,它们参与葡萄糖的摄取,转运和利用,当这些靶器官组织对胰岛素反应性减低时,机体降血糖效应受损,发生胰岛素抵抗^[8-9]。研究证实牙周炎这一局部慢性感染,在单独存在或联合肥胖的状态下,可造成脂肪组织炎症状态的加重,关键脂肪细胞因子表达失调,血清中瘦素和脂联素水平升高,并且这种改变与机体的胰岛素抵抗有关^[10]。但牙周炎是否能造成骨骼肌中这些脂肪细胞因子的受体表达异常,目前尚未明确。本研究通过注射谷氨酸钠(Monosodium Glutamate, MSG)和结扎法诱导实验性肥胖和牙周炎模型,观察大鼠骨骼肌组织中瘦素受体的表达,探讨在肥胖机体胰岛素抵抗的发生发展过程中,牙周炎可能参与炎症调控的机制。

1 材料和方法

1.1 实验分组

40只新出生的雄性Sprague-Dawley(SD,由中山大学实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2007-0081)大鼠在SPF环境中饲养,随机分为4组($n = 10$),分别为肥胖合并牙周炎组(OB + CP)、肥胖组(OB)、牙周炎组(CP)和正常对照组(C),每组10只。

1.2 肥胖合并牙周炎动物模型的建立

粉剂的谷氨酸钠经生理盐水溶解,高温高压消毒后备用。OB组和OB + CP组大鼠在出生后第2、4、6、8、10天分5次给药。给药前用75%的医用乙醇

消毒仔鼠背部皮肤,使用1 mL注射器按照0.3%的给药剂量抽取MSG溶液从背部皮下缓慢、匀速推注。待药物在皮下均匀分散无自行溢出后,拔出针头,棉球擦拭注射部位,压迫止血,放回笼中由母鼠喂养。出生第21天时大鼠离乳,单笼饲养,常规饮食饮水,实时观察大鼠的发病状态。于12周龄时将OB + CP组与CP组的大鼠共20只一起进行牙周丝线结扎和涂布包括牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) ATCC33277,伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa) ATCC 29522,中间普雷沃菌(*Prevotella intermedia*, Pi) ATCC 25611和具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*Fn) ATCC 25586四种牙周致病菌的混悬液,以诱导实验性牙周炎。采用10%水合氯醛溶液,麻醉剂量为3 ml/kg,经腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠的四肢和上颌固定于手术板上,丝线结扎上颌双侧第一,第二磨牙共4颗后牙。自制扁头探针分别分离近远中,颊舌向4个方向的牙龈造成人造牙周袋,将结扎好的丝线压入深牙周袋内,以完全没入牙龈为准,以四种菌的混悬液滴入牙周袋,浸满丝线。术后常规分笼饲养,定期观察,诱导实验性牙周炎8周。

1.3 肥胖合并牙周炎大鼠模型的验证

1.3.1 肥胖模型的验证 经MSG诱导的大鼠从6周龄(成年期)至12周龄期间,每周定期观测体质量(BW),体长,腹围,血压,血糖的变化。大鼠的体长为鼻-肛长,测量大鼠静息俯卧状态下,从鼻尖到肛门的距离(BL)。根据体质量和体长,计算Lee's指数, $Lee's\ index = BW_{(g)}^{0.33}/BL_{(cm)} \times 1000$,判定大鼠向心性肥胖程度。采用无创型大鼠血压仪测定尾动脉血压的变化。空腹血糖的测定采用尾静脉血。大鼠禁食12 h,放入大鼠固定器中,取鼠尾静脉血2 mL,室温静置2 h,3 000 r/min转速离心5 min,取上清液检测血糖浓度。根据大鼠的外观特征, Lee's指数,血压和空腹血糖指标综合判断MSG诱导的大鼠肥胖模型是否成功建立。

1.3.2 牙周炎模型的验证 Micro-CT检测:4组大鼠的颌骨样本固定48 h后,采用Micro-CT扫描,三

维重建,测量双侧后牙结扎区的牙槽骨吸收后的剩余骨量,并进行统计学分析。

1.4 骨骼肌中瘦素受体的免疫组化及半定量测定方法

采用SABC法分别标记4组大鼠骨骼肌组织中瘦素受体的蛋白表达。以PBS代替一抗做空白对照,以非免疫性兔血清代替一抗做阴性对照,以自身对照做阳性对照。显微镜下观察,瘦素受体的阳性结果判定为骨骼肌细胞的胞膜和胞浆的棕黄色染色,阴性结果为切片无黄染。显微镜显影系统采集图像。选择每只大鼠1张组织切片,每张切片在高倍镜(400×)下随机选取5个视野,Image-ProPlus软件测量并计算阳性信号积分光密度值。

1.5 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,数据采用均数±标准差表示,各组数据经one-Sample Kolmogorov-Smirnov 检验是否服从正态分布,Levene 检验是否满足方差齐性, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。两组数据比较采用独立样本 t 检验;四组之间的整体比较采用析因设计资料的方差分析,同一处理因素两个不同水平之间以及同一水平不同

表1 肥胖的指标检测结果

Table 1	Data of obesity examination $n = 20, \bar{x} \pm s$		
	Lee's 指数	血压(mmHg)	血糖(mmol/L)
MSG 诱导组	298.39 ± 13.68	124 ± 11.06	6.0 ± 0.58
对照组	275.53 ± 5.65	118 ± 7.12	4.14 ± 0.4
t 值	8.523	3.725	-6.600
P 值	< 0.000 1	0.001	< 0.000 1

注 MSG:注射谷氨酸钠。

处理因素之间的比较采用独立样本的 t 检验。

2 结果

2.1 肥胖模型成功建立

MSG诱导的大鼠与正常对照组的大鼠其Lee's指数、血压和血糖值数据见表1。

MSG诱导的大鼠,其Lee's指数高于正常对照组($P < 0.000 1$),血压较正常对照组大鼠的血压高($P = 0.001$)。MSG诱导的大鼠空腹血糖也明显高于正常对照组($P < 0.000 1$)。说明经MSG诱导,大鼠表现出明显的向心性肥胖体征。大鼠在血压和血糖方面出现调控异常,这些均与人类糖尿病的病变特征类似。

表2 结扎8周后各组大鼠牙槽骨体积剩余量的比较

Table 2	Alveolar bone volume fraction of different groups at 8 weeks after ligation				$n = 10, \bar{x} \pm s$
	CP(+)	CP(-)	合计	F/t 值	P 值
OB(+)	0.385 ± 0.009	0.438 ± 0.007	0.411 ± 0.028	-11.918	< 0.000 1
OB(-)	0.386 ± 0.012	0.438 ± 0.010	0.412 ± 0.029	-10.152	< 0.000 1
合计	0.386 ± 0.010	0.438 ± 0.009	0.412 ± 0.028	224.293 ¹⁾	< 0.000 1 ¹⁾
F/t 值	-0.136	-0.558	0.033 ¹⁾	(F值 = 0.033, P值 = 0.858) ²⁾	
P 值	0.893	0.586	0.858 ¹⁾		

注 OB:肥胖组; CP:牙周炎组; 1)主效应值; 2)交互效应值。

2.2 牙周炎模型成功建立

CP组与OB + CP组大鼠口内检查见结扎区磨牙牙龈红肿、探诊出血;OB组和C组大鼠牙龈色粉红、质韧、探诊出血阴性。Micro-CT检测结果如表2所示,牙槽骨剩余体积量在OB组与C组明显多于CP组与OB + CP组,差异有统计学意义($P < 0.01$),但CP组和OB + CP组($P = 0.893$)以及OB组和C组($P = 0.586$)之间差异无统计学。说明牙周结扎联合涂菌造成CP组及OB + CP组牙槽骨的明显丧失,牙周炎模型成功建立。统计学分析也表明,牙周结扎联合涂菌与MSG所诱导的肥胖,对大鼠牙槽骨丧失无交互效应($F = 0.033, P = 0.858$)。

2.3 骨骼肌中瘦素受体的表达

四组大鼠骨骼肌中瘦素受体的蛋白表达,OB + CP组(图1a)的蛋白表达较弱,染色为浅棕色,且

只有部分肌细胞表达;OB组(图1b)的表达比OB + CP组稍广泛,但染色亦较浅;相比之下,CP组(图1c)和C组(图1d)的骨骼肌中普遍表达该蛋白,且染色较深,表达呈强阳性。经蛋白半定量分析,如表3所示,OB组瘦素受体的表达高于OB + CP组,但低于C组,差异有统计学意义($P < 0.05$);CP组与C组之间瘦素受体的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。但肥胖和牙周炎对骨骼肌中瘦素受体的表达存在交互效应($F = 4.341, P = 0.039$)。

3 讨论

以往对瘦素和炎症反应的相关性研究^[1]表明,瘦素可以参与身体多种功能的调节,并且在免疫和炎症反应中起关键作用。在比较不同牙周状态下龈沟液瘦素水平时,学者发现瘦素的表达水

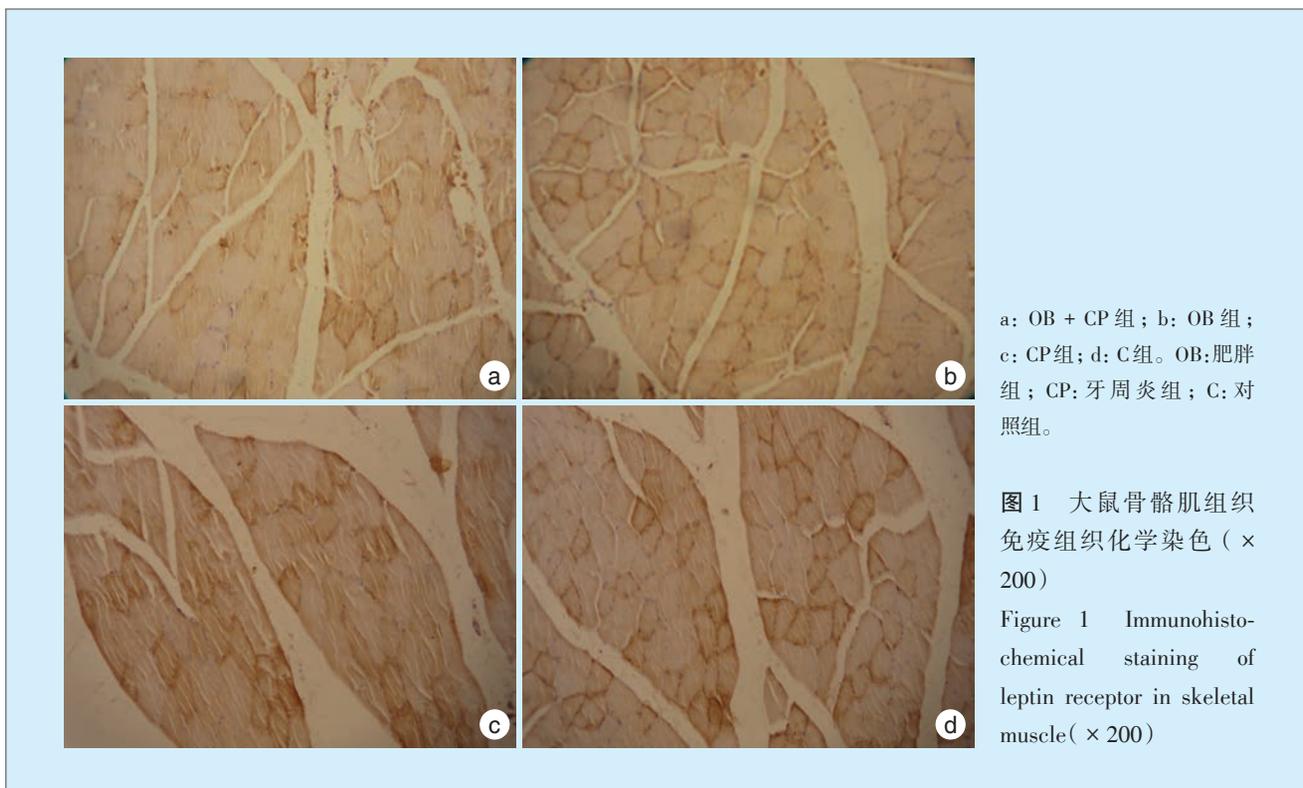


表 3 四组大鼠骨骼肌中瘦素受体蛋白表达半定量分析

Table 3 Semi-quantitative analysis of leptin receptor protein in different groups

$n = 10, \bar{x} \pm s$

	CP(+)	CP(-)	合计	<i>F</i> / <i>t</i> 值	<i>P</i> 值
OB(+)	0.119 ± 0.009	0.126 ± 0.008	0.122 ± 0.010	-3.490	0.001
OB(-)	0.159 ± 0.021	0.157 ± 0.015	0.158 ± 0.018	0.272	0.786
合计	0.139 ± 0.026	0.142 ± 0.019	0.140 ± 0.023	1.731 ¹⁾	0.190 ¹⁾
<i>F</i> / <i>t</i> 值	-10.565	-11.567	239.050 ¹⁾	(F 值 = 4.341, P 值 = 0.039) ²⁾	
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001 ¹⁾		

注 OB:肥胖组; CP:牙周炎组; 1)主效应值; 2)交互效应值。

平随着牙周炎症的加重而降低^[12]。这提示我们牙周炎可以下调局部牙周组织中表达的脂肪细胞因子水平。另外,骨骼肌、肝脏和脂肪组织作为外周胰岛素的主要的靶器官,它们参与机体糖代谢的调控^[13],瘦素受体在这3种组织中均有表达,并对胰岛素信号通路发挥直接调控作用^[14-16]。瘦素通过与靶器官组织中瘦素受体的结合发挥其调控作用,瘦素受体属于1型细胞因子受体,其细胞外领域提供瘦素结合的位点,通过构象的改变来活化与其相关的Jak2酪氨酸激酶^[17]。肥胖状态下,外周组织可发生慢性低度炎症和内质网应激,炎症信号通路的激活,可使肥胖动物的瘦素信号受损,造成外周组织的胰岛素抵抗^[18-20]。慢性牙周炎或者肥胖所处的慢性低度炎症状态下、一些炎症因子可能参与调控瘦素-瘦素受体信号通路,介导细胞内的瘦素抵抗和胰岛素抵抗,但其中的机制尚不明确。

本实验中发现,单纯牙周感染并未造成骨骼肌中瘦素受体表达的明显下调,说明牙周炎引起的机体低度慢性炎症状态在早期不足以影响骨骼肌中的炎症信号通路。而本课题组前期的研究曾发现,牙周炎能促进脂肪组织的炎症反应,瘦素因子表达失调及血清中炎症因子水平的升高^[10,21],提示我们脂肪组织相比骨骼肌组织对牙周炎的炎症调控更为敏感。这可能与脂肪组织本身属于内分泌器官,在组织内部易于聚集大量炎症调控因子有关。相比之下,骨骼肌主要通过这些细胞因子受体和其配体作用激活组织内的炎症信号,才能引起炎症反应和胰岛素抵抗的发生。因此,牙周炎对骨骼肌的炎症调控作用存在滞后效应。

本研究结果显示,在肥胖机体内,牙周炎可明显下调骨骼肌中瘦素受体的表达。这可能与肥胖状态下机体本身的免疫机制受损和炎症信号活化

有关,从而使局部组织对叠加的炎症刺激表现出高反应性。已有研究证实,机体的肥胖状态可直接造成骨骼肌中瘦素-瘦素受体的信号通路受损,骨骼肌组织处于炎症激活状态^[22],这与本研究结果相一致。本研究中单纯肥胖大鼠骨骼肌内瘦素受体的表达相对于正常对照组明显下调,瘦素-瘦素受体的结合受到抑制。而牙周炎在骨骼肌已有的炎症状态下,有可能进一步减弱瘦素-瘦素受体的结合反应,促进炎症的“瀑布效应”。研究发现,内毒素LPS可调控人肌管细胞中的炎症信号和胰岛素信号通路,造成骨骼肌细胞中JNK磷酸化增加,促炎因子IL-6和粘附分子MCP-1表达上调,同时下调胰岛素受体底物1和蛋白激酶Akt及其底物AS160的表达,使葡萄糖转运受损,最终导致胰岛素的敏感性降低^[23]。在前期的实验研究中,我们证实,以LPS为主要毒性产物的牙周感染可造成血清中瘦素水平的明显升高,并且这种高瘦素水平与大鼠机体的胰岛素抵抗指数呈正相关^[21],说明牙周感染对机体的瘦素水平具有调控作用。而骨骼肌是瘦素发挥作用的重要的外周靶器官,牙周炎可能通过影响骨骼肌中瘦素受体的表达,降低瘦素受体与瘦素的结合,从而造成血清中的瘦素水平升高,使肥胖启动的炎症信号级联放大,并通过复杂的相关机制促进外周组织胰岛素抵抗的发生发展。

综上所述,本研究认为,牙周炎的局部感染并不能直接影响外周组织的瘦素-瘦素受体结合;然而在肥胖已启动骨骼肌中炎症活化状态的前提下,牙周的低度慢性炎症可能在这条激活的信号通路上,进一步抑制瘦素-瘦素受体的结合,从而参与外周组织胰岛素抵抗的发生发展,但其具体影响机制尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 30-44.
- [2] Saxlin T, Ylöstalo P, Suominen-Taipale L, et al. Association between periodontal infection and obesity: results of the Health 2000 Survey[J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38(3): 236-242.
- [3] Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(12): 738-748.
- [4] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. *Nature*, 1994, 372(655): 425-432.
- [5] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance[J]. *Science*, 1993, 259(591): 87-91.
- [6] Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(2): 461S-465S.
- [7] Mirza S, Hossain M, Mathews C, et al. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF- α , IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study[J]. *Cytokine*, 2012, 57(1): 136-142.
- [8] Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 738-749.
- [9] Liang F, Koya D. Acupuncture: is it effective for treatment of insulin resistance?[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(7): 555-569.
- [10] Su Y, Wang D, Xuan D, et al. Periodontitis as a novel contributor of adipose tissue inflammation promotes insulin resistance in a rat model[J]. *J Periodontol*, 2013, 84(11): 1617-1626.
- [11] Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes [J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(Suppl 14): S113-S134.
- [12] 刘崇武, 吴春芳, 骆凯, 等. 不同牙周状态下龈沟液中瘦素水平的比较[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(8): 798-800.
- [13] Duque-Guimarães DE, Ozanne SE. Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24(10): 525-535.
- [14] Tilg H. Adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease: key players regulating steatosis, inflammation and fibrosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(17): 1893-1895.
- [15] Guerra B, Santana A, Fuentes T, et al. Leptin receptors in human skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2007, 102(5): 1786-1792.
- [16] 陶婷, 吴霖, 沈倍倍, 等. 老年男性非酒精性脂肪肝患者腹部脂肪面积及血清脂联素和瘦素水平的变化[J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(2): 120-123.
- [17] Robertson SA, Leininger GM, Myers MG. Molecular and neural mediators of leptin action[J]. *Physiol Behav*, 2008, 94(5): 637-642.
- [18] Ozcan L, Ergin AS, Lu A, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance[J]. *Cell Metab*, 2009, 9(1): 35-51.
- [19] Zhang XQ, Zhang G, Zhang H, et al. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity[J]. *Cell*, 2008, 135(1): 61-73.
- [20] Ogimoto K, Harris MK, Wisse BE. MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 β [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(9): 4445-4453.
- [21] 徐喆, 倪佳, 谢宝仪, 等. 肥胖复合牙周炎大鼠血清及牙龈肿物中TNF- α , IL-1 β 水平与胰岛素抵抗的关系[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2014, 24(7): 393-398.
- [22] de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation[J]. *Obes Rev*, 2015, 16(3): 207-224.
- [23] Liang H, Hussey SE, Sanchez-Avila A, et al. Effect of lipopolysaccharide on inflammation and insulin action in human muscle[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63983.

(编辑 罗燕鸿, 韩倩倩)