

结扎诱导牙周炎大鼠脑内炎性及 β 淀粉样蛋白变化的实验研究

刘珂珂^{1,2,3}, 胡韶光^{1,2,3}, 吕代雨^{1,2,3}, 查贤芳^{1,2,3}, 孙晓瑜^{1,2,3}, 徐燕^{1,2,3}

摘要 目的 探讨结扎诱导的实验性牙周炎大鼠脑内的炎性变化及 β 淀粉样蛋白的变化。方法 18 只 SD 大鼠随机分为 3 组 ($n=6$): 空白对照组、慢性牙周炎组和慢性牙周炎+腹腔注射 TAK-242 组, 通过结扎大鼠双侧上颌第一磨牙牙颈部辅以接种牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 的方法建立大鼠牙周炎模型。在建模成功后的第 2 个月行标本取材, 通过 Micro-CT 分析大鼠牙槽骨破坏的情况; 通过实时荧光定量 PCR 检测大鼠牙龈组织和海马组织中白介素 (IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及大鼠海马组织中 Toll 样受体 4 (TLR4)、白细胞分化抗原 14 (CD14) 和 NF- κ B 的 mRNA 表达; 通过 ELISA 评估大鼠海马组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 及 β 淀粉样蛋白-40 (A β ₄₀) 和 A β ₄₂ 的蛋白表达。结果 结扎大鼠双侧上颌第一磨牙牙颈部辅以接种牙龈卟啉单胞菌可成功建立大鼠实验性牙周炎模型, PCR 和 ELISA 结果显示实验性牙周炎可上调大鼠海马组织中炎症因子 (IL-6、IL-1 β 和 TNF- α) 的表达水平, ELISA 结果显示实验性牙周炎大鼠海马组织中 A β ₄₂ 的含量升高; 但腹腔注射 TAK-242 预处理可降低已经上调的炎症因子及 A β ₄₂ 的表达, 这一作用是通过下调 TLR4/NF- κ B 信号通路实现。结论 结扎诱导辅以牙龈卟啉单胞菌接种建立的大鼠实验性牙周炎可诱导脑部炎症及促进脑内 A β ₄₂ 的沉积, 炎症可能在牙周炎与阿尔茨海默病等系统性疾病的相关性中发挥重要作用。

关键词 牙周炎; 牙龈卟啉单胞菌; 阿尔茨海默病; 神经炎症; β 淀粉样蛋白

中图分类号 R 781.4; R 749.16

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1048-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.007

牙周炎是一种由菌斑微生物引起的慢性感染性

疾病, 其临床病理表现为牙龈炎症、牙周袋形成、牙槽骨吸收、牙齿松动移位^[1], 研究^[2]表明 Toll 样受体 4 (toll like receptors-4, TLR4) /NF- κ B 信号通路在其病情发展中起重要作用。近年来, 越来越多的研究表明牙周炎与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 具有相关性^[3-4]。

AD 是最常见于老年人的中枢神经系统退行性疾病, 其主要病理特征为脑组织中的 β 淀粉样蛋白 (amyloid-beta protein, A β) 异常聚集形成淀粉样斑块、过度磷酸化的 tau 蛋白形成神经纤维缠结伴随着神经元变性等^[5]。研究^[6]表明慢性炎症参与 A β 的产生和积累, 导致 tau 蛋白过度磷酸化、神经原纤维缠结病变、神经元变性死亡。该研究通过探讨实验性牙周炎大鼠脑内炎症因子及 A β 水平的变化, 以期为进一步探索两者之间关系奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 实验动物 普通清洁级健康 SD 雄性大鼠 18 只, 体重 (350~400) g, 18 月龄, 购自安徽医科大学动物实验中心并提供标准饲养, 检查大鼠双侧上下颌第一磨牙牙周组织均正常, 经由安徽医科大学实验动物伦理委员会批准 (编号: 20180159)。

1.1.2 主要试剂与仪器 牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*, Pg) (标准菌株 ATCC33277, 广东省微生物菌种保藏中心); 哥伦比亚血琼脂培养基 (江门凯林贸易有限公司); 厌氧培养箱 (DonWhitley DG250 Anaerobic workstation, 英国); 维生素 K1 (上海麦克林生化科技有限公司); 氯化血红素 (青岛海博生物技术有限公司); TAK-242 (美国 MedChemExpress 公司); 二甲亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司); TRIzol[®] Reagent (美国 Invitrogen 公司); PrimeScript[™] RT Master Mix 逆转录试剂盒, TB Green[®] Premix Ex Taq[™] qPCR 试剂盒 (日本 Takara Bio 公司); 引物: GAPDH、白介素 (interleukin, IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 均购自上海生工生物工程股份有限公司; 实

2022-05-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81873019); 安徽省教育厅自然科学重大项目 (编号: KJ2017ZD17); 2021 年度安徽医科大学校科研基金 (编号: 2021xkj128); 2020 年度口腔医学院基础与临床合作研究项目 (编号: 2020kqkyT08)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院牙周黏膜科, 合肥 230032

³ 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

作者简介: 刘珂珂, 女, 硕士研究生;

徐燕, 女, 教授, 硕士生导师, 主任医师, 责任作者, E-mail: 173236344@qq.com

时荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦, Mx3000P)等。

1.2 实验方法

1.2.1 *Pg* 的培养与鉴定 将 *Pg* (ATCC33277) 冻干粉用 0.2 ml PBS 充分溶解混匀,划线法接种于哥伦比亚血琼脂培养基中,置于厌氧培养箱中(37 °C, 混合气比例:80% N₂、10% CO₂、10% H₂) 培养 5~7 d,待培养基表面长出黑色菌落,挑取单个直径约 1 mm 的菌落接种于 5 ml BHI 液体培养基(加入维生素 K₁ 及氯化血红素)进行扩增培养。

1.2.2 大鼠实验性牙周炎模型的建立 18 只 SD 大鼠随机分为 3 组($n=6$),分组情况如下:①空白对照(control)组:不做任何处理;②慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)组:结扎双侧上颌第一磨牙辅以接种牙龈卟啉单胞菌;③慢性牙周炎+TAK-242(CP+TAK-242)组:结扎双侧上颌第一磨牙辅以接种牙龈卟啉单胞菌,腹腔注射 TAK-242。

大鼠用 2% 戊巴比妥钠(2 ml/kg)腹腔注射麻醉后固定于操作板上,用 4-0 外科丝线结扎双侧上颌第一磨牙牙颈部,定期检查结扎丝线在位情况,松脱者及时重新结扎。结扎 1 周后将 *Pg* 以 1×10^8 CFU/ml 的浓度接种到结扎部位,每只大鼠每次接种 150 μ l,每 3 d 接种 1 次,共接种 5 次,整个建模时间共 6 周。TAK-242 溶于 1% DMSO 生理盐水溶液,使其终浓度为 0.5 mg/ml,腹腔注射 TAK-242 (0.5 mg/kg),每周 2 次,持续到实验结束。实验时间轴如图 1 所示。

1.2.3 大鼠海马组织和牙周组织取材 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉后立即进行断头取脑,低温快速分离两侧海马于 1.5 ml Eppendorf 管中, -80 °C 冰箱保存备用。分离牙槽骨和牙龈组织,将牙龈组织放置在 1.5 ml Eppendorf 管中, -80 °C 冰箱保存备用;上颌骨于 4% 多聚甲醛溶液中固定,保存备用。

1.2.4 Micro-CT 分析大鼠牙槽骨组织破坏情况

大鼠颌骨样本经 4% 多聚甲醛溶液固定后,采用 Micro-CT 扫描,三维重建,用相应软件测量每只大鼠双侧上颌第一磨牙釉牙骨质界(cemento-enamel junction, CEJ)至牙槽嵴顶的距离即为牙槽骨丧失量(alveolar bone loss, ABL),每颗实验牙分别测量颊侧和腭侧近中、正中、远中六个位点,取六个位点的均值作为该牙的牙槽骨丧失值。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测大鼠牙龈组织和海马组织中炎症因子及海马组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路关键因子 mRNA 表达 取部分冻存的

牙龈组织和海马组织,室温下溶解,于预冷的 PBS 中清洗去除血渍,加入适量 TRIzol 试剂裂解组织,收集并测定 RNA 浓度,使用 PrimeScript™ RT Master Mix 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, GAPDH 为内参基因,上 PCR 仪检测,相对 mRNA 水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法定量计算。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')
IL-6	F: 5'-GCCCTTCAGGAACAGCTATGA-3' R: 5'-TGTCACAACATCACTCCCAAGA-3'
IL-1 β	F: 5'-AACCTGCTGGTGTGTGACGTTT-3' R: 5'-CAGCAGCAGGCTTTTGTGTGT-3'
TNF- α	F: 5'-GGAAAGCATGATCCGAGATG-3' R: 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'
TLR4	F: 5'-AGCCATTGCTGCCAACATCA-3' R: 5'-GCCAGAGCGCTACTCAGAAAC-3'
CD14	F: 5'-CTCAACCTAGAGCCGTTTCT-3' R: 5'-CAGGA TTGTCAGACAGGTCT-3'
NF- κ B	F: 5'-CAAGATCTGCCGAGTAAACC-3' R: 5'-TCGGAACACAATGGCCACTT-3'
GAPDH	F: 5'-ACAGTCCATGCCATCACTGCC-3' R: 5'-GCCTGCTTACCACCTTCTTG-3'

1.2.6 ELISA 检测大鼠海马组织中炎症因子及 A β_{40} 和 A β_{42} 蛋白表达 取部分冻存的海马组织,室温下溶解,于预冷的 PBS 中清洗去除血渍,滤纸吸干,称取重量,加入预冷的 PBS (pH 7.4),组织与 PBS 的质量体积比为 1:10,用玻璃研磨器将组织标本充分研磨(冰上操作),4 °C 离心 20 min (2 000~3 000 r/min),仔细收集上清液,ELISA 法检测大鼠海马组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 及 A β_{40} 和 A β_{42} 的蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS 24.0 软件进行分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

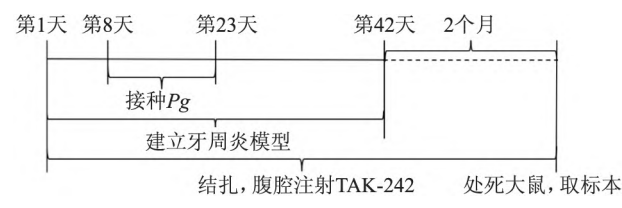


图 1 时间轴线图

2 结果

2.1 *Pg* 形态学观察 肉眼观 *Pg* 呈黑色,圆形凸起,表面光滑;革兰染色呈阴性杆菌,红色。确认

Pg 无污染后,在厌氧环境下于 BHI 液体培养基中继续培养 48 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 将离心后底部沉淀用无菌 PBS 重悬 2 次, 将菌液浓度调整为 1×10^8 CFU/ml 备用, 稀释后的菌液在 15 min 内完成接种。

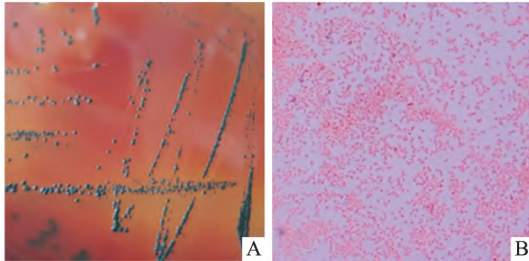


图 2 *Pg* 形态学观察

A: 肉眼观; B: 革兰染色 $\times 100$

2.2 实验性牙周炎大鼠的牙槽骨吸收 Micro-CT 扫描图像显示, CP 组与对照组相比, 上颌第一磨牙牙槽骨高度明显降低; 腹腔注射 TAK-242 组的大鼠牙槽骨吸收程度较 CP 组明显减少, 见图 3A ~ C。牙槽骨丧失测量结果显示, CP 组的牙槽骨丧失量较对照组明显增加 ($F = 602.776, P < 0.0001$); 腹腔注射 TAK-242 组大鼠牙槽骨丧失量较 CP 组明显减少 ($F = 524.042, P < 0.0001$) (图 3D)。这些结果表明牙周炎模型的建立是成功的, 腹腔注射 TAK-242 预处理可减少由结扎辅以涂菌所诱导的牙周炎导致的牙槽骨丧失。

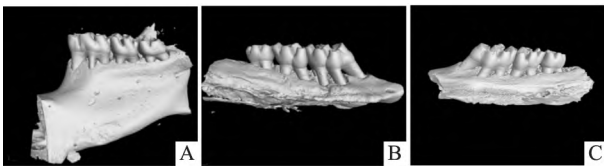


图 3 Micro-CT 所示大鼠左侧上颌骨三维重建模型

A: control 组; B: CP 组; C: CP + TAK242 组

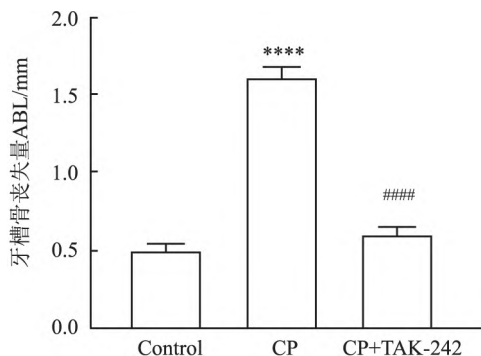


图 3D 大鼠上颌第一磨牙牙槽骨丧失量

与 control 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 CP 组比较: #### $P <$

0.0001

2.3 实验性牙周炎大鼠牙龈组织中促炎因子 mRNA 表达水平的变化 如图 4 所示, 与对照组相比, CP + TAK-242 组大鼠牙龈组织中各炎症因子的 mRNA 表达水平均无统计学差异 ($F_{IL-6} = 0.076, P = 0.792; F_{IL-1\beta} = 1.113, P = 0.332; F_{TNF-\alpha} = 0.601, P = 0.468$); 但与对照组相比, 结扎和涂菌诱导可明显上调实验大鼠牙龈组织中炎症因子的表达, 差异有统计学意义 ($F_{IL-6} = 71.491, P < 0.0001; F_{IL-1\beta} = 218.941, P < 0.0001; F_{TNF-\alpha} = 1217.952, P < 0.0001$); 而腹腔注射 TAK-242 组可降低炎症因子的表达, 差异有统计学意义 ($F_{IL-6} = 54.902, P < 0.0001; F_{IL-1\beta} = 157.674, P < 0.0001; F_{TNF-\alpha} = 72.380, P < 0.0001$)。

2.4 实验性牙周炎大鼠海马组织中促炎因子 mRNA 表达水平的变化 如图 5 所示, 对照组与 CP + TAK-242 组大鼠海马组织中各炎症因子的 mRNA 表达水平均无统计学差异; 与对照组相比, CP 组大鼠海马组织中炎症因子的表达升高, 且有统计学意义 ($F_{IL-6} = 335.140, P < 0.0001; F_{IL-1\beta} = 265.642, P < 0.0001; F_{TNF-\alpha} = 74.089, P < 0.001$); CP + TAK-242 组的大鼠与 CP 组相比, 炎症因子的表达降低, 差异有统计学意义 ($F_{IL-6} = 105.213, P < 0.0001; F_{IL-1\beta} = 154.694, P < 0.0001; F_{TNF-\alpha} = 68.954, P < 0.0001$)。

2.5 实验性牙周炎大鼠海马组织中促炎因子蛋白表达水平的变化 如图 6 所示, 与对照组相比, CP + TAK-242 组大鼠海马组织中各炎症因子的蛋白表达无明显变化; 但 CP 组大鼠较对照组, 海马组织中炎症因子的蛋白表达均升高, 差异有统计学意义 ($F_{IL-6} = 622.007, P < 0.0001; F_{IL-1\beta} = 302.341, P < 0.0001; F_{TNF-\alpha} = 120.823, P < 0.001$)。与 CP 组相比, CP + TAK-242 组炎症因子的蛋白表达均降低, 差异有统计学意义 ($F_{IL-6} = 499.412, P < 0.0001; F_{IL-1\beta} = 263.800, P < 0.0001; F_{TNF-\alpha} = 113.363, P < 0.0001$)。

2.6 实验性牙周炎大鼠海马组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路关键因子 mRNA 表达水平的变化 如图 7 所示, 与对照组相比, CP 组大鼠海马组织中该通路关键因子的 mRNA 表达均升高, 差异有统计学意义 ($F_{TLR4} = 86.983, P < 0.0001; F_{CD14} = 174.724, P < 0.0001; F_{NF-\kappa B} = 25.822, P < 0.001$); 与 CP 组相比, CP + TAK-242 组这些因子的表达降低, 且差异有统计学意义 ($F_{TLR4} = 103.068, P < 0.0001; F_{CD14} = 67.325, P < 0.0001; F_{NF-\kappa B} = 23.631, P < 0.001$)。

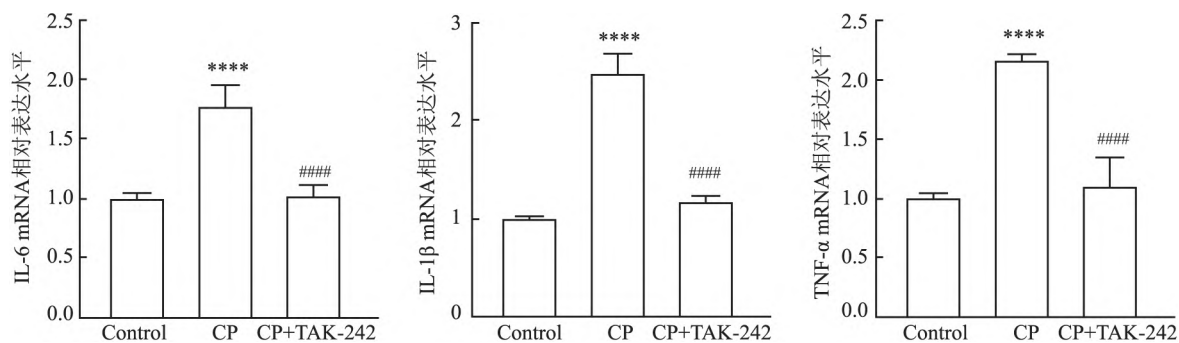


图4 实验性牙周炎大鼠牙龈组织中促炎因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α mRNA 表达水平变化
与 Control 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 CP 组比较: #### $P < 0.0001$

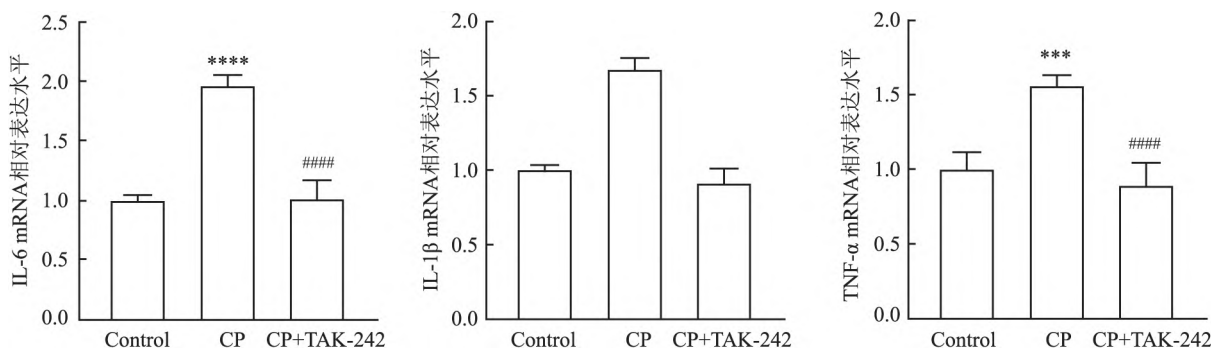


图5 实验性牙周炎大鼠海马组织中促炎因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α mRNA 表达水平变化
与 Control 组比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 CP 组比较: #### $P < 0.0001$

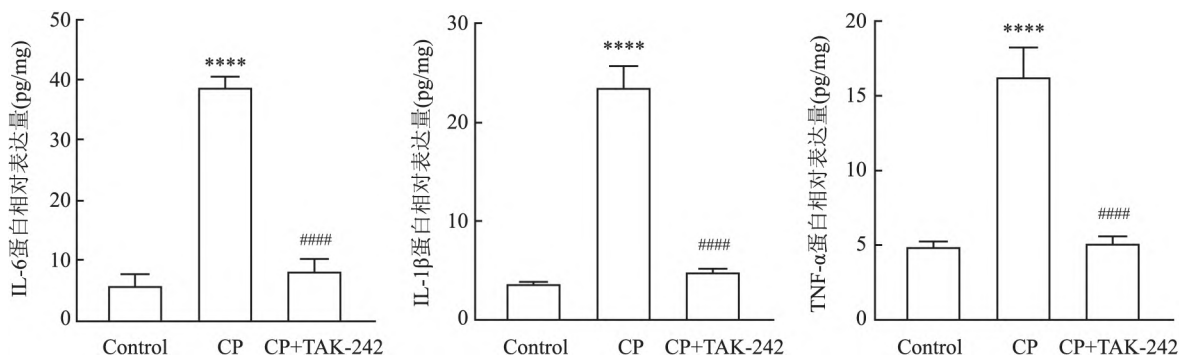


图6 实验性牙周炎大鼠海马组织中促炎因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达水平变化
与 Control 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 CP 组比较: #### $P < 0.0001$

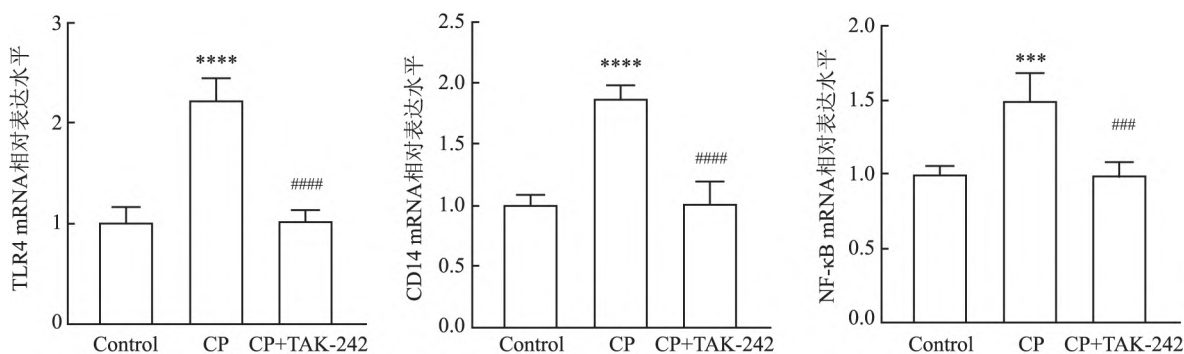


图7 实验性牙周炎大鼠海马组织中 TLR4/NF-κB 信号通路关键因子 TLR4、CD14 和 NF-κB mRNA 表达水平变化
与 Control 组比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 CP 组比较: ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$

2.7 实验性牙周炎大鼠海马组织中 Aβ₄₀ 和 Aβ₄₂ 蛋白表达水平的变化 如图 8 所示, CP 组大鼠海马组织中 Aβ₄₀ 的蛋白表达量高于对照组, 但差异无统计学意义($F_{A\beta_{40}} = 1.653, P = 0.246$); CP + TAK-242 组 Aβ₄₀ 的蛋白表达量虽低于 CP 组, 但差异无统计学意义($F_{A\beta_{40}} = 1.348, P = 0.290$)。与对照组相比, CP 组 Aβ₄₂ 的蛋白表达升高, 差异有统计学意义($F_{A\beta_{42}} = 30.152, P = 0.002$); CP + TAK-242 组 Aβ₄₂ 的蛋白表达较 CP 组降低, 差异有统计学意义($F_{A\beta_{42}} = 17.222, P = 0.006$)。

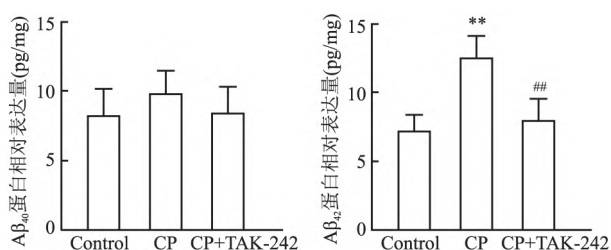


图 8 实验性牙周炎大鼠海马组织中 Aβ₄₀ 和 Aβ₄₂ 蛋白表达水平变化与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CP 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

牙周炎作为细菌(包括其毒力因子)和宿主炎症反应相互作用的结果, 具有明显的炎症特征, 炎症程度越重, 牙周组织破坏程度也越重^[7]。随着牙周医学的发展, 越来越多的研究表明牙周炎与全身慢性炎症性疾病具有共同的潜在致病机制, 牙周炎可能通过增加全身细胞因子的水平而成为全身疾病(如认知障碍)的重要危险因素^[8]。

目前, 牙周炎和 AD 的相互关系仍处于流行病学和临床病例对照研究阶段, 潜在的病理机制尚未阐明。以往的动物实验研究多采用由特定病原体感染或其毒力因子作用建立模型(如牙龈卟啉单胞菌及其毒力因子牙龈卟啉单胞菌脂多糖), 研究^[9-10]表明腹腔注射或局部应用牙龈卟啉单胞菌脂多糖可通过激活 TLR4/NF-κB 信号通路引起实验大鼠的认知功能障碍, 但这些建模方式具有局限性, 不能模拟临床牙周炎的自然发展。该实验通过结扎大鼠上颌第一磨牙辅以牙龈卟啉单胞菌接种这一公认的方法建立实验性牙周炎大鼠模型, 更类似于临床牙周炎。实验大鼠结扎后所有实验牙均探诊极易出血, 探诊深度增加; Micro-CT 扫描结果显示, 实验大鼠结扎后牙槽骨吸收明显, 说明牙周炎模型成功建立。

作为炎症的主要触发因素之一, TLR4/NF-κB

信号通路在牙周炎的病理发展中起重要作用, 被激活的 NF-κB 信号通路可以启动细胞因子的转录及翻译, 从而释放出大量的炎症因子, 抑制 TLR4/NF-κB 通路关键因子的活化可能是炎症治疗的作用靶点^[2]。TAK-242 作为 TLR4 信号传导抑制剂, 可以下调 TLR4 下游信号分子 MyD88 的表达, 抑制炎症因子的释放, 从而抑制炎症进程^[11]。该研究发现实验性牙周炎大鼠海马组织中炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 及 TLR4、CD14 和 NF-κB 的表达水平增加, TAK-242 预处理可以减弱已被上调的上述因子的表达, 说明实验性牙周炎可上调大鼠脑组织内炎症因子的表达, 进而促进神经炎症的发生。

AD 最重要的病理变化之一是脑内 Aβ 异常沉积形成老年斑, Aβ₄₀ 和 Aβ₄₂ 是最常见的两种亚型, 具有病理意义的 Aβ₄₂ 是淀粉样斑块的主要成分, Aβ₄₀ 不会引起病理性积聚^[6]。研究发现成年野生型小鼠在长期口服牙龈卟啉单胞菌脂多糖后出现神经退行性变和海马组织中 Aβ₄₂ 的积聚^[12]。该项研究发现实验性牙周炎大鼠海马组织中 Aβ₄₀ 的表达无明显变化, 但具有神经毒性的 Aβ₄₂ 的表达增加, 腹腔注射 TAK-242 预处理可以逆转这一变化。

该实验结果显示, 通过结扎大鼠双侧上颌第一磨牙辅以接种牙龈卟啉单胞菌的方法成功建立的实验性牙周炎大鼠模型, 其海马组织中炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 及 Aβ₄₂ 的表达增加, 而腹腔注射 TAK-242 预处理可降低这些因子的表达。TAK-242 作为 TLR4 信号传导抑制剂可以通过下调 TLR4/NF-κB 信号通路, 从而降低炎症因子的释放, 起到降低神经毒性的作用。该实验为通过控制或减轻牙周炎症从而缓解 AD 病理变化提供理论依据, 为进一步探究牙周炎与 AD 的相互关系提供理论支持。

参考文献

- [1] 汪芹芹, 徐燕, 胡韶光, 等. 芹菜素对大鼠骨髓间充质细胞增殖和成骨分化的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(10): 1549-54.
- [2] Li C, Li L, Chen K, et al. UFL1 Alleviates lipopolysaccharide-induced cell damage and inflammation via regulation of the TLR4/NF-κB pathway in bovine mammary epithelial cells[J]. Oxid Med Cell Longev. 2019; 2019: 6505373.
- [3] Holmer J, Eriksdotter M, Schultzberg M, et al. Association between periodontitis and risk of Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and subjective cognitive decline: A case-control study [J]. J Clin Periodontol. 2018; 45(11): 1287-98.
- [4] Liccardo D, Marzano F, Carraturo F, et al. Potential bidirectional relationship between periodontitis and Alzheimer's disease [J].

- Front Physiol 2020 ,11: 683.
- [5] Blennow K , Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future [J]. *J Intern Med* , 2018 , 284(6) : 643 – 63.
- [6] Kamer A R , Craig R G , Dasanayake A P , et al. Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases [J]. *Alzheimers Dement* 2008 ,4(4) : 242 – 50.
- [7] Hu Y , Zhang X , Zhang J , et al. Activated STAT3 signaling pathway by ligature-induced periodontitis could contribute to neuroinflammation and cognitive impairment in rats [J]. *J Neuroinflammation* 2021 ,18(1) : 80.
- [8] Cardoso E M , Reis C , Manzanares-Céspedes M C. Chronic periodontitis , inflammatory cytokines , and interrelationship with other chronic diseases [J]. *Postgrad Med* 2018 ,130(1) : 98 – 104.
- [9] Zhang J , Yu C , Zhang X , et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction , mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice [J]. *J Neuroinflammation* 2018 ,15(1) : 37.
- [10] Hu Y , Li H , Zhang J , et al. Periodontitis induced by *P. gingivalis*-LPS is associated with neuroinflammation and learning and memory impairment in sprague-dawley rats [J]. *Front Neurosci* 2020 , 14: 658.
- [11] Wang J , Chen Z , Hou S , et al. TAK-242 attenuates crush injury induced acute kidney injury through Inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathways in rats [J]. *Prehosp Disaster Med* 2020 ,35(6) : 619 – 28.
- [12] Ilievski V , Zuchowska P K , Green S J , et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation , neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice [J]. *PLoS One* , 2018 ,13(10) : e0204941.

Changes of inflammatory and β -amyloid in the brain of rats with periodontitis induced by ligation

Liu Keke^{1 2 3} , Hu Shaoguang^{1 2 3} , Lü Daiyu^{1 2 3} , Zha Xianfang^{1 2 3} , Sun Xiaoyu^{1 2 3} , Xu Yan^{1 2 3}
 (¹*Stomatological College of Anhui Medical University , Hefei 230032*; ²*Dept of Periodontology , The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University Hefei 230032*; ³*Key Lab of Oral Disease Research of Anhui Province Hefei 230032*)

Abstract Objective To explore the inflammatory changes and the changes of β -amyloid in the brain of rats with experimental periodontitis induced by ligation. **Methods** Eighteen Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n=6$): the negative control group , chronic periodontitis group and chronic periodontitis treated with intraperitoneal injection of TAK-242 group. The experimental periodontitis model was established by ligation of the necks of bilateral maxillary first molar and inoculation of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). At the end of the second month after the successful modeling , the samples were collected from the rats. The damage of the alveolar bone was analyzed by Micro-CT. The mRNA expression levels of interleukin(IL)-6 , IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in gingival tissue and hippocampal tissue , the mRNA expression level of Toll like receptors-4 (TLR4) , leukocyte differentiation antigen 14 (CD14) and NF- κ B in hippocampal tissue of rats were detected by qPCR. The protein expression levels of IL-6 , IL-1 β , TNF- α , myloid- β protein-40(A β ₄₀) and A β ₄₂ in hippocampal tissue of rats were evaluated by ELISA. **Results** Experimental periodontitis model of rats could be successfully established by ligation of the neck of the rat's bilateral maxillary first molars and inoculation with porphyromonas gingivalis. The results of qPCR and ELISA showed that experimental periodontitis up-regulated the expression levels of inflammatory factors (IL-6 , IL-1 β and TNF- α) in hippocampus of rats and the result of ELISA showed that the level of A β ₄₂ in hippocampus of experimental periodontitis rats increased. But the pretreatment with TAK-242 intraperitoneal injection could reduce the up-regulated the expression of inflammatory factors and A β ₄₂ by down-regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Conclusion** Experimental periodontitis in rats induced by ligation combined with inoculation of porphyromonas gingivalis can result in inflammation in the brain and promote the accumulation of A β ₄₂ in the brain , and it is reasonable to speculate that inflammation may play an important role in the correlation between periodontitis and systemic diseases such as Alzheimer's disease.

Key words periodontitis; *porphyromonas gingivalis*; Alzheimer's disease; neuroinflammation; β -amyloid