

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.07.004

· 基础研究 ·

晚期糖基化终产物受体在2型糖尿病伴慢性牙周炎大鼠牙龈组织内皮细胞中的表达

王刚¹, 孙澎^{2#}, 李娟³, 黄世光³

1. 中山大学附属中山医院口腔分院牙体牙髓病科, 广东 中山(528404); 2. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院口腔医学中心, 广东 深圳(518020); 3. 暨南大学口腔医学院, 广东 广州(510632)

【摘要】 目的 观察晚期糖基化终产物受体(receptor of advanced glycation end products, RAGE)在2型糖尿病伴慢性牙周炎大鼠牙龈组织内皮细胞中的表达,探讨RAGE在糖尿病伴慢性牙周炎发病机制中的作用。**方法** 60只7周龄雌性Wistar糖尿病肥胖大鼠,随机分成2组,其中30只大鼠采用丝线结扎法诱导牙周炎;另外30只作为对照组,牙周不作处理。牙周结扎并完成种菌1周后,分别将牙周炎组和对照组大鼠再随机分成2个亚组,其中1组喂养高脂饲料,另外1组喂养低脂饲料;共4组大鼠,每组15只,分别是高脂饮食-牙周炎组(HF/P)、低脂饮食-牙周炎组(LF/P)、高脂饮食-牙周健康组(HF/C)、低脂饮食-牙周健康组(LF/C)。每周进行糖耐量实验,测量空腹胰岛素、血糖,计算胰岛素抵抗指数以判断大鼠糖尿病建模情况。在第13周末慢性牙周炎建模成功后,检测血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、瘦素水平后处死大鼠。制作牙体牙周组织联合切片,观察牙周组织的组织学改变。免疫荧光双染色法检测4组大鼠牙龈组织RAGE阳性内皮细胞密度。**结果** HF/P组、HF/C组血清空腹血糖、空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数均分别显著高于LF/P组、LF/C组($P < 0.01$);HF/P组及LF/P组血清TNF- α 和IL-6水平分别显著高于HF/C组、LF/C组($P < 0.01$);HF/P组血清瘦素水平显著高于其他3组。HF/P组和HF/C组牙龈组织中RAGE阳性内皮细胞密度较LF/P组($P = 0.001$)、LF/C组($P = 0.040$)分别显著增多。HF/P组中RAGE阳性内皮细胞密度高于HF/C组($P = 0.027$)。**结论** 2型糖尿病伴牙周炎大鼠患牙周炎牙龈组织中内皮细胞表达RAGE增加,血清瘦素水平升高。

【关键词】 2型糖尿病; 牙周炎; 晚期糖基化终产物受体; 内皮细胞; 高脂饮食; 高血糖; 瘦素

【中图分类号】 R781.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)07-0428-07

【引用著录格式】 王刚,孙澎,李娟,等.晚期糖基化终产物受体在2型糖尿病伴慢性牙周炎大鼠牙龈组织内皮细胞中的表达[J].口腔疾病防治,2019,27(7):428-434.

Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissue endothelial cells from type 2 diabetic rats with chronic periodontitis WANG Gang¹, SUN Peng^{2#}, LI Juan³, HUANG Shiguang³. 1. Department of Conservative Dentistry, Affiliated Zhongshan Hospital, Sun Yat-sen University, Zhongshan 528404, China; 2. Second Clinical Medicine College of Jinan University, Oral Medicine Center of Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China; 3. School of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Corresponding author: HUANG Shiguang, Email: thshg@126.com, Tel: 86-13002019868

【Abstract】 Objective To evaluate the expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in gingival tissue endothelial cells from type 2 diabetic rats with chronic periodontitis and to explore the role of RAGE in the pathogenesis of diabetes in cases with chronic periodontitis. **Methods** Sixty 7-week-old female Wistar diabetic obese rats were randomly divided into two groups. Periodontitis was induced in 30 rats by silk ligation, and the other 30 rats were used as the control group in which the periodontal tissues were not treated. One week after periodontal ligation

【收稿日期】 2018-10-30; **【修回日期】** 2019-04-26

【基金项目】 中山市社会公益科技研究专项资金立项项目(2018B1056),广东省科技计划项目(2014A020212212)

【作者简介】 王刚,副主任医师,硕士,Email:651814586@qq.com

【通信作者】 黄世光,教授,硕士,Email: thshg@126.com, Tel: 86-13002019868

#并列第一作者

and inoculation, the periodontitis and control group rats were randomly divided into two subgroups; the first subgroup was fed a high-fat diet, and the second group was fed a low-fat diet. Thus, 15 rats per group were included in the high-fat diet periodontitis (HF/P), low-fat diet periodontitis (LF/P), high-fat diet periodontal health (HF/C), and low-fat diet periodontal health (LF/C) groups. Glucose tolerance tests were performed weekly to measure the fasting insulin and blood glucose levels and the insulin resistance index to verify successful construction of the rat diabetes model. After successful modeling of chronic periodontitis, the rats were sacrificed at the 13th week after measurement of the serum necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and leptin levels. The tooth periodontal tissues were prepared and sectioned to observe histological changes. Immunofluorescence double staining was used to detect the density of RAGE-positive endothelial cells in the gingival tissues of the four groups. **Results** The serum fasting blood glucose and insulin levels and insulin resistance index were significantly higher in the HF/P and HF/C groups than in the LF/P and LF/C groups ($P < 0.01$). The serum TNF- α and IL-6 levels were significantly higher in the HF/P and LF/P groups than in the HF/C and LF/C groups ($P < 0.01$). The serum leptin levels were significantly higher in the HF/P group than in the other three groups. The density of RAGE-positive endothelial cells was significantly higher in the HF/P and HF/C groups than in the LF/P ($P = 0.001$) and LF/C groups ($P = 0.040$). The density of RAGE-positive endothelial cells in the HF/P group was higher than that in the HF/C group ($P = 0.027$). **Conclusion** Endothelial cells in type 2 diabetic rats with periodontitis have increased gingival tissue RAGE and serum leptin levels.

【Key words】 type 2 diabetes mellitus; periodontitis; receptor for advanced glycation end products; endothelial cells; high fat diet; hyperglycaemia; leptin

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(7): 428-434.

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是继心血管病和肿瘤之后的第三大非传染性疾病,已成为人类健康的主要威胁之一。糖尿病是牙周炎的重要危险因素,牙周炎被认为是糖尿病的第六大并发症^[1]。许多研究表明T2DM与牙周病之间存在双向关系^[2],但两种疾病的内在发病机制和联系尚不清楚^[3]。研究表明,糖尿病时慢性高血糖形成的糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)和晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)在多种疾病的发病中发挥作用^[4],可能在糖尿病患者的牙周炎中起关键作用^[5]。RAGE是免疫球蛋白受体超家族的成员,并由多种细胞表达,包括内皮细胞和平滑肌细胞、淋巴细胞、单核巨噬细胞和神经元^[6]。研究显示RAGE、糖尿病和牙周炎有潜在的联系^[7]。内皮细胞在炎症过程中居核心地位。在内皮细胞的介导下,炎症介质和凝血/抗凝系统交互作用,促使炎症的进一步发展;机械应力的变化经内皮细胞转化为生物信号,并且经信号转导通路激活NF- κ B等转录因子,引起更多的细胞因子和炎症介质释放,而细胞因子也可以通过信号转导通路进行相互调节。内皮细胞通过上调其表面粘附分子促进白细胞的附壁和粘附,刺激中性粒细胞释放更多的氧化剂、蛋白酶和花生四烯酸代谢产物,加重组织损伤程度^[8]。牙周炎是一种炎症破坏性疾病,因此探讨

RAGE在糖尿病伴牙周炎牙龈组织中内皮细胞的表达情况具有重要的理论意义。CD31又称为血小板-内皮细胞粘附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31),分子量为130 kDa,属于免疫球蛋白超家族成员,在清除体内老化的中性粒细胞过程中发挥重要作用。在免疫组化中,CD31主要用于鉴定内皮细胞^[9]。本研究通过建立2型糖尿病伴慢性牙周炎大鼠模型,观察大鼠牙周组织变化,采用免疫荧光双染色法观察RAGE在牙龈组织内皮细胞中表达的情况,探讨RAGE在糖尿病伴牙周炎致病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

SPF级雌性Wistar糖尿病肥胖大鼠(Wistar diabetic fatty rats)购自中山大学医学实验动物中心;牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) (ATCC 33277)由暨南大学口腔医学院实验室提供; I 抗 Rabbit Anti-RAGE (Santa Cruz Biotechnology, 美国), Mouse-Anti-PECAM1/CD31 (武汉博士德公司); II 抗 Anti-Rabbit-Alexa Fluor®555 Conjugate (Cell Signaling technology, 美国); Anti-Mouse-Alexa Fluor®488 Conjugate (Cell Signaling technology, 美国); DAPI (MP Bio medicals, 美国); 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) (Sigma, 美国); ELISA 试剂盒

(武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 牙周致病菌附着丝线制备 将3/0无菌丝线置于含有 *P. gingivalis* ATCC 33277 改良 GAM 培养基 (1 mg/L 维生素 K1、5% 脱纤维蛋白羊血) 中, 于厌氧培养箱 (体积分数为 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) 37 ℃ 培养 5 d。

1.2.2 动物分组和模型的建立 选取 60 只 7 周龄 SPF 级雌性 Wistar 糖尿病肥胖大鼠 (中山大学动物实验中心), 置于鼠笼内, 低脂饲料。室温 22 ℃、湿度 45% ~ 55%, 12 h 光照周期环境, 每天更换鼠笼, 适应性饲养 5 d。本研究所有动物实验已通过暨南大学动物实验中心的动物实验伦理审查。

1 周后 (8 周龄), 将大鼠分成 2 组, 30 只大鼠采用氯胺酮腹腔内注射麻醉 (7.5 mg/100 g 体重), 用浸有 *P. gingivalis* 菌的 3/0 丝线在大鼠左侧上颌第二磨牙环牙颈部结扎, 颊侧打结诱导牙周炎^[10]。从结扎当天开始, 隔日接种 *P. gingivalis*, 每只大鼠口内接种制备好的菌液 0.1 mL, 共 3 次。在结扎后的 5 周里, 每周检查结扎丝线 1 次, 松动的丝线要重新结扎。另外 30 只作为对照组, 牙周不作处理。对照组的动物也同时进行麻醉但不做牙周结扎处理, 排除麻醉的影响。

牙周结扎并完成种菌 1 周后, 分别将 2 组大鼠再分成 2 组, 其中 1 组喂养高脂食物, 另外 1 组保持原来的低脂饲料。因此共有 4 组动物, 每组 15 只大鼠: 高脂饮食-牙周炎组 (high-fat fed-periodontitis group, HF/P); 低脂饮食-牙周炎组 (low-fat fed-periodontitis group, LF/P); 高脂饮食-牙周健康组 (high-fat fed-no periodontitis group, HF/C); 低脂饮食-牙周健康组 (low-fat fed-no periodontitis group, LF/C)。

1.2.3 指标检测 对大鼠腹腔内注射链脲佐菌素, 每周测定大鼠尾静脉空腹血糖、胰岛素水平, 以血糖值大于 16 mmol/L 标准判定大鼠 2 型糖尿病, 以评价葡萄糖动态平衡、胰岛素抵抗、胰岛素分泌以及 T2DM 的发生。根据空腹血糖及空腹胰岛素指标计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR), $IR = \text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素} \div 22.5$, 值均较小, 进一步取自然对数值代替。于第 13 周末处死全部大鼠前, ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、瘦素 (leptin) 水平, 对大鼠行口腔内观察, 行牙周组织学观察确定慢性牙周炎已建模成功后处死大鼠, 评价牙周炎发生的可靠性。

1.2.4 组织学观察 取上颌骨, 由中线切开, 4% 多聚甲醛固定液 0 ~ 4 ℃ 条件下固定 24 h, 15% EDTA 脱钙液脱钙 3 ~ 4 周。梯度乙醇脱水, 二甲苯置换至石蜡包埋。近远中向连续 5 μm 厚石蜡切片。HE 染色, 光学显微镜下观察牙周组织学改变。

1.2.5 RAGE 阳性内皮细胞免疫荧光双染色 组织切片经柠檬酸液修复、II 抗血清封闭, I 抗孵育, 避光条件下 II 抗孵育荧光染色, DAPI 核染后, 荧光显微镜观察。RAGE 阳性免疫荧光信号为红色荧光, CD31 阳性免疫荧光信号为绿色荧光, 定位于细胞膜或细胞浆, 同一视野下红色荧光与绿色荧光重叠后为橘黄色荧光; 细胞核染 (DAPI) 显现为蓝色荧光。组织切片由 2 名病理医师于荧光显微镜下盲法观察, 参照 Li 等^[9] 的计数方法, 选取 10 个代表性连续视野 (0.072 5 mm²/视野), 对 DAPI 阳性及 RAGE 阳性内皮细胞进行计数, 获得双阳性细胞的密度 (个/mm²), 取平均值。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用统计学软件 SPSS 13.0 分析处理。各组空腹血糖、空腹胰岛素水平、胰岛素抵抗指数、TNF- α 、IL-6 及瘦素水平及标本组织中 RAGE 阳性内皮细胞平均密度的比较, 均采用析因设计方差分析, 采用 Levene 法进行方差齐性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 型糖尿病大鼠建模后血糖、血清胰岛素水平及胰岛素抵抗指数的改变

空腹血糖、空腹胰岛素水平和胰岛素抵抗指数结果见表 1 ~ 表 3, 结果显示: 高脂饮食组的空腹血糖、空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数显著高于低脂饮食组 ($P < 0.01$); 而 HF/P 组空腹血糖、空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数也较 HF/C 组高 ($P < 0.05$); 而 LF/P 组与 LF/C 组空腹血糖、空腹胰岛素及胰岛素抵抗的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 大鼠血清炎症指标变化情况

大鼠血清炎症指标见表 4 ~ 表 6, 结果显示: 与 2 组牙周健康组 (HF/C、LF/C) 相比较, 牙周炎组 (HF/P 及 LF/P) 血清 TNF- α 、IL-6 水平明显升高 ($P < 0.01$), 而高脂饮食-牙周炎组 (HF/P) 血清 TNF- α 、IL-6 水平升高更加明显 ($P < 0.01$); HF/P 组血清瘦素水平明显高于其他 3 组 ($P < 0.01$); LF/P 组、LF/C 组与 HF/C 组血清瘦素水平相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表1 4组大鼠空腹血糖水平

Table 1 Changes in the blood glucose levels of the rats in the

four groups				$\bar{x} \pm s$, mmol/L	
大鼠	P	C	平均值	F值/t值	P值
HF	28.553 ± 0.512	20.125 ± 0.255	24.343 ± 4.890	3.301	0.033
LF	4.256 ± 0.435	4.655 ± 0.147	4.457 ± 0.443	0.468	0.361
平均值	16.412 ± 14.046	12.377 ± 8.931	14.396 ± 11.108	15.211 ¹⁾	<0.001 ¹⁾
F值/t值	131.705	153.691	122.498 ¹⁾	F = 148.059 ²⁾	
P值	<0.001	<0.001	<0.001 ¹⁾	P < 0.001 ²⁾	

注 P:牙周炎组;C:牙周健康组;HF:高脂饮食组;LF:低脂饮食组;1)主效应的F值和P值;2)交互效应的F值和P值

表2 4组大鼠空腹胰岛素水平

Table 2 Changes in the insulin levels of the rats in the four

groups				$\bar{x} \pm s$, μg/L	
大鼠	P	C	平均值	F值/t值	P值
HF	38.583 ± 0.856	30.052 ± 0.623	34.223 ± 5.040	11.538	0.001
LF	21.351 ± 0.652	20.823 ± 0.774	21.231 ± 0.395	0.654	0.549
平均值	29.968 ± 9.950	25.485 ± 5.070	27.727 ± 7.694	126.736 ¹⁾	<0.001 ¹⁾
F值/t值	116.215	23.654	93.767 ¹⁾	F = 132.909 ²⁾	
P值	<0.001	0.001	<0.001 ¹⁾	P < 0.001 ²⁾	

注 P:牙周炎组;C:牙周健康组;HF:高脂饮食组;LF:低脂饮食组;1)主效应的F值和P值;2)交互效应的F值和P值

表3 大鼠胰岛素抵抗指数的改变

Table 3 Changes in the insulin resistance index of the rats in

the four groups				$\bar{x} \pm s$	
大鼠	P	C	平均值	F/t值	P值
HF	5.902 ± 0.313	4.852 ± 0.231	5.376 ± 0.605	5.156	0.030
LF	3.234 ± 0.153	3.241 ± 0.184	3.240 ± 0.006	0.523	0.875
平均值	4.569 ± 1.537	4.047 ± 0.930	4.308 ± 1.209	16.215 ¹⁾	0.007 ¹⁾
F值/t值	53.245	13.854	63.362 ¹⁾	F = 33.552 ²⁾	
P值	0.001	0.007	0.001 ¹⁾	P = 0.003 ²⁾	

注 P:牙周炎组;C:牙周健康组;HF:高脂饮食组;LF:低脂饮食组;1)主效应的F值和P值;2)交互效应的F值和P值

表4 4组大鼠血清TNF-α水平

Table 4 Changes in TNF-α expression in the rats in the four

groups				$\bar{x} \pm s$, μg/L	
大鼠	P	C	平均值	F值/t值	P值
HF	88.203 ± 6.821	40.122 ± 3.254	64.163 ± 39.651	174.548	<0.001
LF	61.614 ± 5.352	39.452 ± 5.103	50.533 ± 22.458	164.243	<0.001
平均值	74.909 ± 16.672	39.787 ± 6.341	57.348 ± 35.784	171.432 ¹⁾	<0.001 ¹⁾
F值/t值	154.452	3.753	87.724 ¹⁾	F = 132.609 ²⁾	
P值	<0.001	0.763	<0.001 ¹⁾	P < 0.001 ²⁾	

注 P:牙周炎组;C:牙周健康组;HF:高脂饮食组;LF:低脂饮食组;TNF-α:肿瘤坏死因子-α;1)主效应的F值和P值;2)交互效应的F值和P值

2.3 组织学改变

通过牙周组织学观察确定慢性牙周炎已建模

表5 4组大鼠血清IL-6水平

Table 5 Changes in IL-6 expression in the rats in the four

groups				$\bar{x} \pm s$, μg/L	
大鼠	P	C	平均值	F值/t值	P值
HF	75.753 ± 5.382	41.253 ± 2.902	58.503 ± 25.357	137.548	<0.001
LF	58.584 ± 3.452	38.821 ± 1.773	48.703 ± 19.867	121.672	<0.001
平均值	67.169 ± 15.372	40.037 ± 5.141	53.603 ± 22.683	142.531 ¹⁾	<0.001 ¹⁾
F值/t值	119.436	6.973	133.653 ¹⁾	F = 157.913 ²⁾	
P值	<0.001	0.205	<0.001 ¹⁾	P < 0.001 ²⁾	

注 P:牙周炎组;C:牙周健康组;HF:高脂饮食组;LF:低脂饮食组;IL-6:白细胞介素-6;1)主效应的F值和P值;2)交互效应的F值和P值

表6 4组大鼠血清瘦素水平

Table 6 Changes in leptin expression in the rats in the four

groups				$\bar{x} \pm s$, μg/L	
大鼠	P	C	平均值	F值/t值	P值
HF	18.632 ± 3.453	8.453 ± 2.094	13.543 ± 11.564	42.823	<0.001
LF	8.231 ± 3.153	6.243 ± 2.181	7.237 ± 4.873	3.421	0.187
平均值	13.432 ± 9.376	7.348 ± 2.368	10.390 ± 8.657	36.432 ¹⁾	<0.001 ¹⁾
F值/t值	34.572	3.784	47.865 ¹⁾	F = 28.215 ²⁾	
P值	<0.001	0.156	<0.001 ¹⁾	P < 0.001 ²⁾	

注 P:牙周炎组;C:牙周健康组;HF:高脂饮食组;LF:低脂饮食组;1)主效应的F值和P值;2)交互效应的F值和P值

成功, HF/P组可见大量炎症细胞浸润, 结合上皮向根方增殖及凹坑状骨吸收更为明显, 牙槽嵴顶高度降低(图1a)。

LF/P组见牙龈上皮溃疡, 组织深部可见较多的炎症细胞浸润, 血管扩张充血, 牙槽嵴顶高度降低(图1b)。HF/C组(图1c)及LF/C组(图1d)牙龈上皮结构完整, 牙周膜纤维排列整齐, 固有牙槽骨形态结构完整。

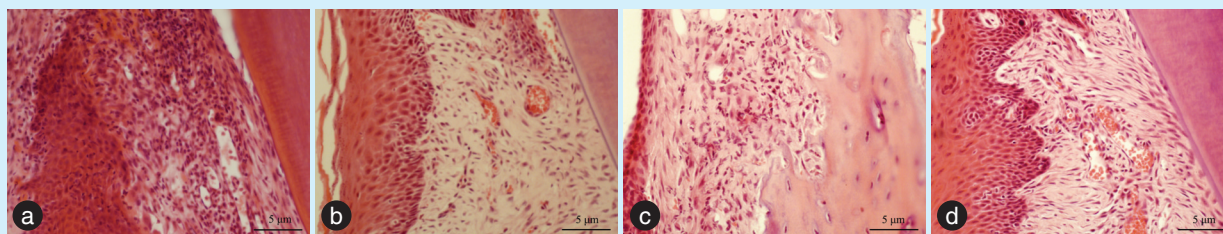
2.4 大鼠牙龈组织RAGE阳性内皮细胞的表达

各组牙龈组织中RAGE阳性内皮细胞结果见图2。

LF/P组及LF/C组仅见少量散在分布的RAGE阳性内皮细胞; HF/P组和HF/C组中RAGE阳性内皮细胞数目明显增加, 其中HF/P组RAGE阳性内皮细胞增加更明显。

各组标本中RAGE阳性内皮细胞密度的比较见表7。

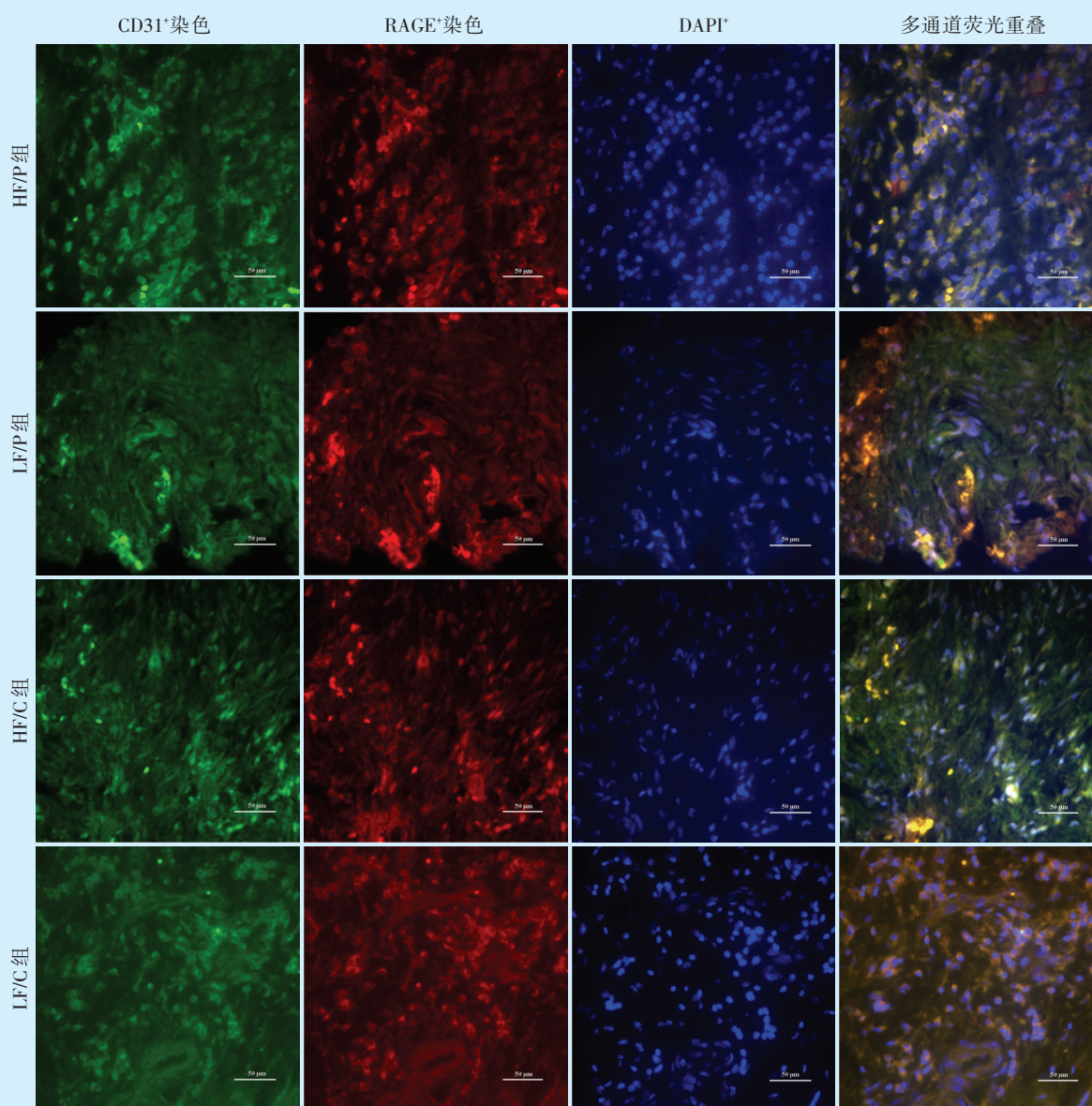
结果显示: HF/P组和HF/C组中RAGE阳性内皮细胞分别较LF/P组、LF/C组明显增多($P = 0.001$, $P = 0.040$); HF/P组中RAGE阳性内皮细胞百分比明显高于HF/C组($P = 0.027$); LF/P组及LF/C组RAGE阳性内皮细胞密度差异无统计学意义($P = 0.415$)。



a: HF/P组, 牙周组织的炎症及牙槽骨吸收严重; b: LF/P组, 牙周组织炎症和牙槽骨吸收明显; c: HF/C组, 牙周组织未见明显炎症; d: LF/C组, 牙周组织未见明显炎症。bar = 5 μ m

图1 各组大鼠牙周组织HE染色照片

Figure 1 HE-stained images showing histological changes in the periodontal tissues in each group bar = 5 μ m



bar = 50 μ m

图2 各组CD31⁺、RAGE⁺内皮细胞免疫荧光表达 激光共聚焦显微镜

Figure 2 CD31-RAGE double-positive endothelial cell infiltration as determined by double immunofluorescence staining in the 4 groups using laser scanning confocal microscopy bar = 50 μ m.

表7 各组牙龈组织 RAGE-CD31 阳性内皮细胞密度
Table 7 RAGE⁺-CD31⁺ double-positive endothelial cell
density in the gingival tissues in each group $\bar{x} \pm s$, 个/mm²

大鼠	P	C	平均值	F值/t值	P值
HF	165.702 ± 15.304	102.853 ± 10.007	134.080 ± 37.348	153.654	0.027
LF	53.352 ± 5.441	40.604 ± 5.771	46.890 ± 7.434	25.869	0.415
平均值	109.456 ± 64.887	71.459 ± 36.643	90.485 ± 52.854	529.036 ¹⁾	$P < 0.001^{1)}$
F值/t值	431.551	116.651	467.670 ¹⁾	$F = 649.612^{2)}$	
P值	0.001	0.040	0.001 ¹⁾	$P < 0.001^{2)}$	

注 P:牙周炎组;C:牙周健康组;HF:高脂饮食组;LF:低脂饮食组;¹⁾主效应的F值和P值;²⁾交互效应的F值和P值

3 讨论

T2DM和牙周炎均是发病率很高的慢性疾病,T2DM已成为人类健康的主要威胁之一。流行病学调查和动物实验均表明牙周炎和肥胖、T2DM有显著的相关性。在研究牙周炎、肥胖和T2DM三者之间联系中的一个关键问题是难以确定它们的因果关系。目前,在T2DM与牙周炎关系的研究中一般采用Wistar大鼠T2DM模型,然后通过丝线结扎法诱导牙周炎。但是,这种动物模型不能确定牙周炎对胰岛素抵抗或T2DM发生所起的作用。在本研究中,采用模拟人类肥胖的Wistar糖尿病肥胖大鼠建立牙周炎模型^[11],实验大鼠分别给予高脂肪和低脂肪饮食。实验中观察到,与2组低脂喂养大鼠比较,2组高脂喂养(HF/P、HF/C)糖尿病肥胖大鼠空腹血糖及空腹胰岛素水平均明显升高,HF/P组空腹血糖及空腹胰岛素水平明显高于HF/C组;低脂喂养组(LF/P、LF/C)空腹血糖及空腹胰岛素水平间差异无统计学意义($P > 0.05$)。采用浸有*P. gingivalis*丝线结扎建立牙周炎模型的糖尿病肥胖大鼠,牙周炎组较牙周健康组表现为明显的炎症细胞浸润和活跃的骨吸收,HF/P组较LF/P组的牙周炎症和牙槽骨吸收更加明显,HF/C及LF/C组牙龈上皮结构完整,牙周膜纤维排列整齐,固有牙槽骨形态结构完整。

在胰岛素抵抗状态下,机体对胰岛素的反应性降低,造成β细胞代偿性分泌增加。当这种代偿性分泌能力不足以控制血糖时,就会发展成为T2DM^[12]。伴有牙周炎的T2DM患者经牙周非手术治疗后,血糖、血脂获得明显改善,其治疗的可能机理是牙周炎症控制后外周血的TNF-α水平下降,进而降低了胰岛素抵抗作用^[13]。本实验观察到糖尿病肥胖大鼠,2组高脂喂养(HF/P、HF/C)血清胰岛素水平及胰岛素抵抗指数显著高于2组低

脂喂养(LF/P、LF/C)大鼠。此外,实验中观察到,与2个牙周健康组(HF/C、LF/C)相比较,牙周炎组(HF/P及LF/P)血清TNF-α和IL-6水平明显升高。HF/P组血清瘦素水平明显高于其他3组。因此,推测糖尿病通过促进血清炎症因子的表达,降低了牙周组织对局部致病因子的抵抗力,从而进一步加重、加速牙周炎的进展;同时进一步降低胰岛素的抵抗作用,造成糖尿病患者血清胰岛素水平及胰岛素抵抗指数显著升高,两者相互影响、相互促进。

血管内皮细胞广泛分布于血管腔的内侧面,构成一道稳定的细胞屏障,将血液及内皮下的组织进行分隔^[14]。血管内皮细胞不仅是机体的重要半透膜屏障,还是重要的内分泌和代谢器官,发挥极为重要的生物学功能。研究显示,炎症介质在内皮细胞的介导下,与凝血/抗凝系统交互发生反应,炎症进一步发展产生机械应力的变化经内皮细胞转化为生物信号,活化的生物信号转导通路激活NF-κB等转录因子,引起细胞因子和炎症介质进一步释放。RAGE是免疫球蛋白超家族中的一员,包括AGE和S100^[15],研究观察到巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和心肌细胞均可表达RAGE^[16],说明在炎症反应区域内RAGE可导致血管功能障碍、促炎激酶的活化和转录因子的易位,而AGE可能通过其受体RAGE对机体的多个组织产生有害影响。目前关于RAGE在糖尿病牙周病中的作用的报道所见甚少,仅有少数研究观察到牙龈组织RAGE表达的改变。RAGE与多种配体结合而激发信号转导,尤其当RAGE与AGEs结合激发多种炎症因子的产生,从而影响牙周组织发病。RAGE与其最主要的配体即AGEs的特异性结合激活NF-κB转录因子,从而刺激IL-1、IL-6、TNF-α等多种炎症因子,而这些炎症介质为慢性牙周炎形成提供可能的致病机制^[17]。Lalla等^[18]在2型糖尿病伴发慢性牙周炎的小鼠模型上已证实,用RAGE的胞外段(sRAGE)竞争抑制RAGE可有效减少牙槽骨的吸收,且牙龈组织中的TNF-α、IL-6以及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)水平均有所降低。研究显示,糖尿病的慢性高血糖导致牙周组织广泛表达RAGE,随后表达促炎介质分泌增多,加重了1型糖尿病患者的牙周破坏^[19]。因此,有关RAGE在糖尿病机制中的作用需要更深入的研究。本实验采用Wistar糖尿病肥胖大鼠建立2型糖尿病慢性牙周炎模型,分别采用

高脂和低脂喂养方法诱导大鼠胰岛素抵抗和T2DM的发生,观察了RAGE在牙龈组织内皮细胞中的表达情况,在研究中观察到,LF/P组及LF/C组仅见少量散在分布的RAGE阳性内皮细胞;HF/P组和HF/C组中RAGE阳性内皮细胞数明显增加,其中HF/P组RAGE阳性内皮细胞增加更为明显。LF/P组及LF/C组RAGE阳性内皮细胞密度差异无统计学意义。结果提示,糖尿病可能通过促进血清炎症因子TNF- α 、IL-6、瘦素等的表达,降低牙周组织对局部致病因子的抵抗力及胰岛素的抵抗作用,造成糖尿病患者血清胰岛素水平显著升高;同时高脂饮食导致RAGE在糖尿病肥胖大鼠牙龈组织的内皮细胞表达升高,而牙周炎加重了RAGE的表达;低脂饮食的大鼠牙龈组织的内皮细胞少量表达RAGE。

参考文献

- [1] Winning L, Patterson CC, Neville CE, et al. Periodontitis and incident type 2 diabetes: a prospective cohort study[J]. J Clin Periodontol, 2017, 44(3): 266-274.
- [2] Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV, et al. Cytokine ratios in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Syndr, 2017, 11(4): 277-278.
- [3] Grover HS, Luthra S. Molecular mechanisms involved in the bidirectional relationship between diabetes mellitus and periodontal disease[J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17(3): 292-301.
- [4] Amir J, Waite M, Tobler J, et al. The role of hyperglycemia in mechanisms of exacerbated inflammatory responses within the oral cavity[J]. Cell Immunol, 2011, 272: 45-52.
- [5] Gennaro G, Claudino M, Cestari TM, et al. Green tea modulates cytokine expression in the periodontium and attenuates alveolar bone resorption in type 1 diabetic rats[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134784.
- [6] Wu CH, Huang HW, Lin JA, et al. The glycation effect of caffeic acid leads to the elevation of oxidative stress and inflammation in monocytes, macrophages and vascular endothelial cells[J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(6): 585-594.
- [7] Wu TL, Tsai CC, Wang YY, et al. The association between the RAGE G82S polymorphism, sRAGE and chronic periodontitis in Taiwanese individuals with and without diabetes[J]. J Periodontol Res, 2015, 50(6): 881-889.
- [8] Chen XM, Lin JZ, Hu TT, et al. Galectin-3 exacerbates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing inflammation via integrin beta1-RhoA-JNK signaling activation[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 10990-11000.
- [9] Li J, Wang R, Huang SG. Immunomodulatory activity of interleukin-27 in human chronic periapical diseases[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 1460-1470.
- [10] Huang S, Lu F, Zhang Z, et al. The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1 α in rat experimental periodontitis[J]. J Periodontol, 2011, 82(6): 934-941.
- [11] Luo S, Yang X, Wang D, et al. Periodontitis contributes to aberrant metabolism in type 2 diabetes mellitus rats by stimulating the expression of adipokines[J]. J Periodontol Res, 2016, 51(4): 453-461.
- [12] Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, et al. Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study[J]. J Periodontol Res, 2005, 40(4): 346-353.
- [13] Pankovlu A, Chekhranova MK, Karpova SK. The interconnections of molecular mechanisms of hormone actions and their role in pathogenesis of obesity, insulin resistance, and diabetes mellitus [J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2008, 3: 28-36.
- [14] Tsubokawa M, Sato S. *In vitro* analysis of human periodontal microvascular endothelial cells[J]. J Periodontol, 2014, 85(8): 1135-1142.
- [15] Takeichi O, Hatori K, Kamimoto A, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-expressing endothelial cells co-express AGE and S100 in human periapical granulomas[J]. J Dent, 2011, 39(10): 679-685.
- [16] Katz J, Wallet S, Cha S. Periodontal disease and the oral-systemic connection: "is it all the RAGE"? [J] Quintessence Int, 2010, 41(3): 229-237.
- [17] Schmidt AM, Hasu M, Popov D, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 8807-8811.
- [18] Lalla E, Lamster I, Feit M, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice[J]. J Clin Invest, 2000, 105(8): 1117-1124.
- [19] Gennaro G, Claudino M, Cestari TM, et al. Green tea modulates cytokine expression in the periodontium and attenuates alveolar bone resorption in type 1 diabetic rats[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134784.

(编辑 张琳,曾曙光)