

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.008

没食子水提取物对牙根面刮治保护作用的研究*

艾林¹,李恺¹,高鹏¹,张若冰²,张琳静^{1△}

(1. 中国人民解放军空军军医大学空军第九八六医院,陕西 西安 710054; 2. 陕西省药品监督管理局,陕西 西安 710065)

摘要:目的 探讨没食子水提取物对细菌在刮治牙本质小管渗透的影响,以及对牙根面刮治的保护作用。方法 选取中国人民解放军空军军医大学空军第九八六医院2020年6月至2021年6月收治患者拔除的正畸前磨牙55颗进行根管预备,分别暴露于链球菌、黏性放线菌或链球菌、牙龈卟啉单胞菌培养,检测细菌的侵袭性;将人牙髓细胞接种到牙髓腔中,暴露于菌群培养,采用实时逆转录聚合酶链式反应和免疫分析法检测白细胞介素8(IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和基质金属蛋白酶-3(MMP-3)的相对表达水平。结果 根面刮治可显著增加细菌的渗透性($P < 0.05$),没食子水提取物对刮治根面的保护作用显著($P < 0.05$);经没食子水提取物和根面刮治处理后,细菌渗透性显著降低($P < 0.05$)。mRNA检测结果显示,没食子水提取物可显著降低刮治后IL-8, MCP-1, MMP-3 mRNA的相对表达水平($P < 0.05$);但没食子水提取物与氯己定相比,其相对表达水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 根面刮治去除牙骨质,会使细菌及其毒素从牙周袋渗透到牙本质小管系统,而没食子水提取物可降低细菌的渗透性,具有保护活髓牙牙髓细胞的潜力。

关键词:没食子;水提取物;根面刮治;口腔菌群;牙髓细胞;牙本质小管

中图分类号:R932;R285.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)21-0036-04

Protective Effect of Water Extract from Galla Turcica on Root Surface After Scaling

AI Lin¹, LI Kai¹, GAO Peng¹, ZHANG Ruobing², ZHANG Linjing¹

(1. The No. 986 Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, China 710054; 2. Shaanxi Medical Products Administration, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To investigate the effect of water extract from Galla Turcica on the permeation of bacteria in dentinal tubules, and its protective effect on the root surface after scaling. **Methods** A total of 55 premolars extracted from patients for the orthodontic treatment admitted to the No. 986 Hospital of Air Force Medical University from June 2020 to June 2021 were selected for the root canal preparation, and then exposed to the *Streptococcus gordonii* / *Actinomyces oris* or *Streptococcus gordonii* / *Porphyromonas gingivalis* respectively for culture to detect the permeation of bacteria. The human dental pulp cells were inoculated into the dental pulp cavity and cultured exposing to the flora. The real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) and immunoassay were used to detect the relative expression levels of interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3). **Results** Root scaling could significantly increase the permeability of bacteria ($P < 0.05$), and the protective effect of water extract from Galla Turcica on the root surface after scaling was significant ($P < 0.05$). After the treatment of water extract from Galla Turcica and root scaling, the permeability of bacteria significantly reduced ($P < 0.05$). The results of mRNA detection showed that water extract from Galla Turcica could significantly reduce the relative expression levels of IL-8, MCP-1 and MMP-3 mRNA after scaling ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the relative expression levels of the above mRNA between the Galla Turcica + scaling group and the chlorhexidine + scaling group ($P > 0.05$). **Conclusion** The remove of cementum by root scaling can promote the permeation of bacteria and their toxins from periodontal pocket to the dentinal tubule system, while the water extract from Galla Turcica can reduce the permeability of bacteria, which has the potential to protect pulp cells of vital teeth.

Key words: Galla Turcica; water extract; root scaling; oral flora; dental pulp cell; dentinal tubule

中草药或天然药物治疗牙周炎是近年来口腔医学研究的重点,提取的部分化合物抗炎作用显著,应用前景广阔^[1]。没食子为常用中药材,来源于没食子蜂科昆虫没食子蜂的幼虫寄生于壳斗科植物没食子树幼枝上所产生的干燥虫瘿^[2]。没食子性寒,味苦,具有固涩、收敛、燥湿、止血功效,具有抗炎生物活性的有效成分主要为

鞣质、没食子酸、没食子酸烷基酯等^[3]。牙髓和牙周是一个连续的组织,局部治疗、干预会产生整体效果。牙周治疗中龈下器械治疗会导致牙骨质损伤,暴露牙本质小管。牙周组织炎症可通过暴露的牙本质小管、侧副根管,以及根尖孔影响牙髓组织。有研究表明,感染牙周组织和根管系统的微生物种群和炎性细胞浸润情况高度相

*基金项目:2020年度“十三五”军队后勤科研计划项目[CKJ20J027]。

第一作者:艾林,男,博士研究生,副主任医师,研究方向为口腔内科学、口腔生物力学,(电子信箱)173861355@qq.com。

△通信作者:张琳静,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药理学,(电子信箱)1198376936@qq.com。

似,但牙周袋的菌群多样性高于根管内^[4],在牙周炎的牙髓样本中可检测到放线菌、牙龈卟啉单胞菌、密齿螺旋体等牙周病原体^[5]。故牙周炎症会影响牙髓活力,牙周病变的严重程度与牙髓的组织学变化呈正相关^[6]。本研究中探讨了没食子水提取物处理根面对细菌在牙本质小管渗透的影响,以及不同细菌混合物接种牙髓腔后牙髓细胞的反应和细菌成分间的差异。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:ProTaper - Next型机用根管扩大针(瑞士Dentsply Maillefer公司);TF - 11#型金刚砂车针(日本马尼公司);F2002 - 259型齿科金刚砂片(上海道邦公司);Gracey器械(美国HuFriedy公司);Bluephase NM - LED型光固化灯(列支敦士登伊沃克拉 - 维瓦登特公司);Westernblot荧光分析仪、PCR仪、酶标仪、CO₂培养箱(美国Bio - Rad公司)。

试剂:没食子药材(中国新疆奇康哈博维药有限责任公司,批号20161112);20%葡萄糖酸氯己定(中国上海麦克林生化科技有限公司,批号C832370);4%次氯酸钠(NaOCl)溶液(批号239305),胎牛血清(批号12103C),四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒(批号M5655),胰蛋白酶(批号T2600000),DMEM培养基(批号D0819),丙二醇甲醚醋酸酯(PMA,批号P1585),胰蛋白酶大豆琼脂平板培养基(批号1.46069),Wilkins Chalgren厌氧琼脂培养基(批号W1761),BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号BCA1),Western蛋白质印迹盒(批号Z742091),均购自美国Sigma公司;磷酸盐缓冲液(PBS,南京森贝伽生物科技有限公司,批号BC - BPBS - 09);营养肉汤培养基(海博生物技术有限公司,批号HB0108 - 4);甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(GAPDH,美国Abcam公司,批号ab9485);TaqMan试剂盒(赛默飞世尔科技 < 中国 > 有限公司,批号4331182);三氧化矿物(批号为MTA),Tetric N - Ceram复合树脂均购自列支敦士登伊沃克拉 - 维瓦登特公司。

1.2 样本处理及分组

没食子水提取物制备:用粉碎机将没食子粉碎为粗粉,加水(质量比1:5)浸泡4 h,煎煮3次,分别过滤,每次1 h,合并煎液,滤过;真空干燥为浸膏,称定质量,分装待用。实验组用浸膏与PBS混合制备,依据没食子漱口液、西帕依固龈液的浓度调整溶液质量浓度为10 mg / mL;氯己定溶液用蒸馏水调整质量分数至0.2%(质量比)。

样本处理及分组:选取2020年6月至2021年6月就诊于中国人民解放军空军军医大学空军第九八六医院口腔科患者的55颗因正畸拔除的完整、无龋坏的前磨牙,牙齿在1%氯胺中放置7 d后置0.9%氯化钠溶液

(生理盐水)中保存。使用ProTaper - Next型机用根管扩大针进行常规根管预备,根管长度为距根尖孔1 mm处,最终预备至F2,使用MTA封闭根尖防止渗漏,用NaOCl溶液冲洗根管。根管预备后将牙齿置生理盐水中存放2个月,以去除残留的NaOCl,每3 d更换1次生理盐水。将40颗牙齿随机分为生理盐水组(生理盐水处理)、生理盐水 + 刮治组(生理盐水 + 根面刮治处理)、氯己定 + 刮治组(氯己定 + 根面刮治处理)、没食子 + 刮治组(没食子水提取物 + 根面刮治处理)共4组,每组各10颗。使用无菌棉球填充牙髓腔,用复合树脂材料光照固化充填,行根面刮治后的牙齿置实验溶液中浸泡3 d,然后将牙冠垂直插入含硅橡胶的空移液管尖盒中固化固定。实验前,样本经高温(121 ℃)消毒20 min。所有操作由1名医师独立完成。本研究已获医院医学伦理委员会的批准(伦理批准号为202003016)。

1.3 细菌对牙根的渗透性

将黏性放线菌(*Actinomyces oris* MG1)、链球菌(*Streptococcus gordonii* ATCC 10558)及牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromones gingivalis* ATCC 33277)菌株分别在含5%羊血的胰蛋白酶大豆琼脂培养板上培养24 h(37 ℃,黏性放线菌和牙龈卟啉单胞菌在厌氧条件下培养),将微生物置生理盐水中。将链球菌分别与黏性放线菌和牙龈卟啉单胞菌悬浊液按细菌含量1:1混合,置营养肉汤培养基中,加入牙齿样本培养2周(37 ℃,5%CO₂,饱和湿度)。在层流空气柜中取出牙齿样本,再次置营养肉汤培养基中厌氧条件下(37 ℃,95%CO₂,饱和湿度)培养2周。每周加入新培养的细菌,并检查细菌生长情况,每3 d更换1次营养肉汤培养基。

使用无菌金刚砂车针将牙齿纵向分为两半,在距根面表面约1 mm处收集牙根牙本质碎块标本。将碎片置含有100 μL Wilkins Chalgren厌氧琼脂培养基的Eppendorf管中,厌氧条件下培养7 d,记录细菌生长情况。

1.4 牙髓细胞培养

将3颗实验牙在流水下使用金刚砂片沿纵轴方向磨出1 mm深的切沟,用75%乙醇消毒牙齿后劈开牙齿,在严格无菌条件下完整取出牙髓组织。用无血清DMEM培养基反复冲洗牙髓组织3次,剪去根端1/3,将组织剪为1 mm³大小的碎块,在CO₂培养箱(20%FBS DMEM培养基,37 ℃,5%CO₂,饱和湿度)中孵育过夜。每日用倒置相差显微镜观察细胞的形态和生长情况,当组织块贴壁后隔日半量换液。出现细胞融合后使用胰蛋白酶消化法(2%胰蛋白酶,0.2%EDTA)收集细胞,按1:2传代。取第5~7代细胞进行实验,用无FBS细胞培养基将牙髓细胞以5 × 10³个 / cm²接种至12颗实验牙的髓腔中,MTA封闭开髓孔。将12颗实验牙分为4组,各3颗,按1.2项下方法进行根面处理,处理后将牙

齿样本置黏性放线菌 / 链球菌和牙龈卟啉单胞菌 / 链球菌菌液中(37 ℃, 5%CO₂, 饱和湿度)培养2周, 再次置营养肉汤培养基中厌氧条件下(37 ℃, 95%CO₂, 饱和湿度)培养2周。每周加入新培养的细菌, 并检查细菌生长情况, 每3 d更换1次营养肉汤培养基。

1.5 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)与免疫分析

培养后取出牙髓细胞, Trizol法提取总核糖核酸(RNA)。设计白细胞介素8(IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和基质金属蛋白酶-3(MMP-3)的引物序列, 使用TaqMan试剂盒进行RT-PCR。在反应过程中自动绘制线性标准曲线, 计算以GAPDH为对照的相关基因表达水平[表达水平 = (各实验组目的基因表达量 / 实验组内参表达量) / (GAPDH基因表达量 / GAPDH内参表达量)]。所有检测重复3次。

1.6 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件进行方差分析(ANOVA), 组内比较采用Bonferroni分析, 使用Fisher精确检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

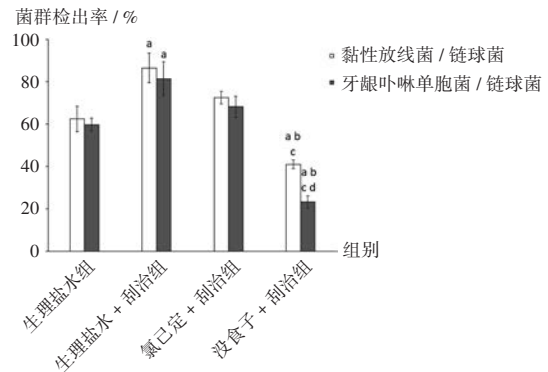
2 结果

2.1 混合培养菌株的渗透性

2种细菌混合物(黏性放线菌 / 链球菌和牙龈卟啉单胞菌 / 链球菌)都能渗透入牙本质。根面刮治可显著增加细菌的渗透性($P < 0.05$), 没食子提取物对刮治后的根面具有显著的保护作用($P < 0.05$); 而氯己定溶液具有一定的保护作用, 但作用不显著($P > 0.05$)。没食子 + 刮治组中菌群的渗透性显著降低($P < 0.05$)。详见图1。

2.2 炎性介质 mRNA 的表达

炎性介质 mRNA 检测结果显示, 各刮治组与生理盐水组相比, IL-8, MCP-1, MMP-3 mRNA 的相对表达水平均显著更高($P < 0.05$), 详见图2。可见, 没食子



注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$; 与生理盐水 + 刮治组比较, ^b $P < 0.05$; 与氯己定 + 刮治组比较, ^c $P < 0.05$; 没食子 + 刮治组内比较, ^d $P < 0.05$ 。图2同。

图1 混合培养菌株的渗透性

Note: Compared with those in the normal saline group, ^a $P < 0.05$; Compared with those in the normal saline + scaling group, ^b $P < 0.05$; Compared with those in the chlorhexidine + scaling group, ^c $P < 0.05$; Compared with those in the *Actinomyces oris* / *Streptococcus gordonii*, ^d $P < 0.05$ (for Fig. 1-2).

Fig. 1 Permeability of mix-cultured strains

可显著降低刮治后 IL-8, MCP-1, MMP-3 mRNA 的相对表达水平($P < 0.05$); 但没食子与氯己定相比, 差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

氯己定溶液被广泛用于口腔菌群的控制, 但其对黏膜有一定毒性作用^[7], 故选取中草药或天然药物治疗牙周炎是口腔医学的研究热点。没食子具有显著的临床药用特性, 其水提取物已被证明具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗菌活性, 其有效成分主要为水提取物中的没食子鞣质、没食子酸、没食子酸烷基酯等, 可用于制作漱口水^[7]。本研究中自行制备没食子水提取物, 并充分考虑稀释水提取物的浓度及吞咽后口腔中可能的稀释度, 评估其对根面刮治牙本质小管细菌渗透性的影响。

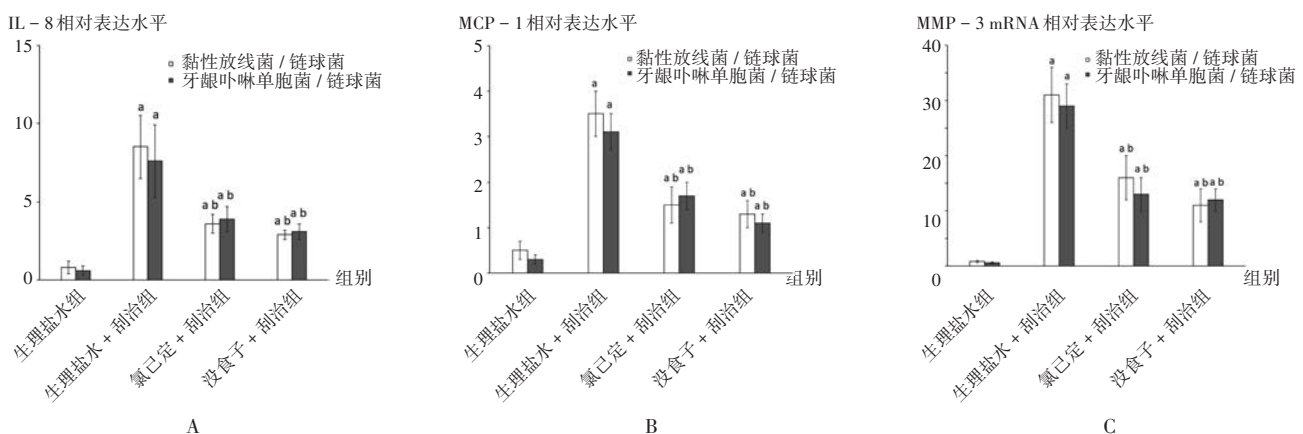


图2 炎性介质 mRNA 的相对表达水平

A. IL-8 B. MCP-1 C. MMP-3

Fig. 2 Relative expression levels of inflammatory mediator mRNA

细菌及其毒素可通过牙本质小管扩散传播,大多数细菌位于牙本质小管外部 300 μm ^[8]。单个物种的渗透模式不同于细菌共培养,细菌对牙本质小管的渗透取决于细菌种类和生物膜的复杂性,细菌的共培养更接近牙周病的体内情况^[9],故本研究中选择2种细菌共培养。经过2周牙齿与菌群的共培养,使细菌扩散到牙本质小管中。结果显示,根面刮治后,不同菌群处理后的根部牙本质中都观察到了细菌,生理盐水组细菌的渗透性更强。本研究选取的牙齿标本均来源于青少年,牙本质小管较粗,更可能促进细菌的传播。本研究结果显示,牙本质黏性放线菌/链球菌的渗透性比牙龈卟啉单胞菌/链球菌更强,但牙龈的渗透性差异不显著,这种细菌共聚集的相互作用可能在牙周牙髓联合病变的病因中起作用。

IL - 8 和 MCP - 1 都是重要的炎性趋化细胞因子^[10]。MMP - 3 在牙髓感染中具有抗炎作用^[11],其表达也可能通过白细胞介素 1(IL - 1)介导^[12]。本研究结果显示,没食子 + 刮治组炎性介质 IL - 8, MCP - 1, MMP - 3 mRNA 的相对表达水平显著低于生理盐水 + 刮治组,但与金标准氯己定 + 刮治组无显著差异,这种效应可能与没食子的保护作用有关。将菌斑应用于牙本质易引起牙髓炎症,而封闭暴露的牙本质对牙髓有保护作用^[13]。其他各组无显著差异,推测可能因为根面或侧副根管的渗漏掩盖了组间可能存在的差异;健康的牙髓是一个由全层细胞组成的复杂组织,存在各种防御机制,以防止细菌毒素或细菌的可能渗透,而本研究将牙髓细胞在生物膜中培养2周后才被植入牙髓室,与体内情况不同。而且因为生理牙髓的组织压力,牙本质小管液向外流动,故本研究的临床意义需慎重对待,并需进一步研究。

20世纪,牙周病牙根表面的牙骨质被认为含有细菌和其内毒素,需去除感染区“牙骨质”,实现牙周愈合^[14]。研究表明,过度去除牙骨质并不是实现牙周健康的必要条件,其愈合过程相似^[15]。本研究中对于根面刮治后暴露于细菌生物膜时牙髓细胞的反应提供了新的结论,即严重牙周病时,根面刮治会破坏牙根表面的保护性钙化层,会使口腔致病菌侵入牙本质小管中,其毒力因子会影响牙髓细胞。本研究结果表明,根面刮治组细菌穿透牙本质的情况更明显,而没食子水提取物对于刮治后的根面具有显著的保护作用,这是因为没食子水提取物均有显著的抗炎、抗菌作用。

综上所述,根面刮治去除牙骨质,可促使细菌及其毒素从牙周袋渗透到牙本质小管系统,而没食子水提取物具有抗菌、抗生物膜活性,可降低细菌的渗透力,具有保护活髓牙髓细胞的潜力,表明其治疗牙周病的潜力。本研究结果可对中草药的进一步探索提供方

向,未来的研究需要在更复杂的生物膜和体内环境下评估没食子的作用。

参考文献

- [1] LI S, LE W. Parkinson's disease in traditional Chinese medicine[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(4): 262.
- [2] 艾林,高鹏,李恺,等. 没食子水提取物对实验性牙周炎的改善作用[J]. *中国药业*, 2021, 30(20): 39 - 43.
- [3] 高鹏,李恺,张若冰,等. 没食子水提取物对钛表面念珠菌生物膜的抑制作用[J]. *中国药业*, 2021, 30(16): 62 - 64.
- [4] SHEN ZS, KUANG SH, ZHANG Y, et al. Chitosan hydrogel incorporated with dental pulp stem cell - derived exosomes alleviates periodontitis in mice via a macrophage - dependent mechanism[J]. *Bioact Mater*, 2020, 5(4): 1113 - 1126.
- [5] LI L, CHEN HJ, LIAN Y, et al. Comparison of dental pulp periodontal therapy and conventional simple periodontal therapy as treatment modalities for severe periodontitis[J]. *World J Clin Cases*, 2021, 9(33): 10098 - 10105.
- [6] LIU Y, GAN L, CUI DX, et al. Epigenetic regulation of dental pulp stem cells and its potential in regenerative endodontics[J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(11): 1647 - 1666.
- [7] ROSA CDDD, GOMES JMLG, MORAES SLD, et al. Use of chlorhexidine chip after scaling and root planning on periodontal disease: A systematic review and meta - analysis[J]. *Saudi Dent J*, 2021, 33(1): 1 - 10.
- [8] SHAWLI H, IOHARA K, TAROUSH M, et al. Nanobubble - Enhanced Antimicrobial Agents: A Promising Approach for Regenerative Endodontics[J]. *J Endod*, 2020, 46(9): 1248 - 1255.
- [9] WU M, XU L, CAI Z, et al. Disinfection of Cariogenic Pathogens in Planktonic Lifestyle, Biofilm and Carious Dentine with Antimicrobial Photodynamic Therapy[J]. *Photochem Photobiol*, 2020, 96(1): 170 - 177.
- [10] KOLAHDOUZ - MOHAMMADI R, SHIDFAR F, KHODA - VERDI S, et al. Resveratrol treatment reduces expression of MCP - 1, IL - 6, IL - 8 and RANTES in endometriotic stromal cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(2): 1116 - 1127.
- [11] WANG TT, HE CQ. Pro - inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 38 - 50.
- [12] HUTH S, HUTH L, MARQUARDT Y, et al. MMP - 3 plays a major role in calcium pantothenate - promoted wound healing after fractional ablative laser treatment[J]. *Lasers Med Sci*, 2022, 37(2): 887 - 894.
- [13] GUTIÉRREZ J H, JOFRÉ A, VILLENA F. Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1990, 69(4): 491 - 501.
- [14] CORNELIS MA, TEPEDINO M, CATTANEO PM, et al. Root repair after damage due to screw insertion for orthodontic miniplate placement[J]. *J Clin Exp Dent*, 2019, 11(12): e1133 - e1138.
- [15] BAO JQ, YANG YT, XIA MJ, et al. Wnt signaling: An attractive target for periodontitis treatment[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110935.

(收稿日期: 2022 - 01 - 07; 修回日期: 2022 - 04 - 21)