

干黄茶乳剂对牙周炎治疗机制的研究

翟登奎¹ 陈 岩¹ 刘 斌²

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院药学部, 哈尔滨, 150001; 2 哈尔滨市儿童医院药学部, 哈尔滨, 150010)

摘要 目的:探讨干黄茶乳剂对牙周炎治疗机制。方法:采用随机数字表法将昆明种小白鼠分为4组,每组10只,其中未经任何处理的小鼠作为对照组,采用20%、40%、80%干黄茶乳剂处理的牙周炎模型小鼠分别作为低、中、高浓度组,组间比较牙龈指数(GI)、血清IgG、牙周组织BMP2、IGF1、bFGF阳性表达量的差异。结果:与对照组比较,低、中、高浓度组各个时间点GI值、血清IgG水平均明显增高,BMP2、IGF1、bFGF阳性表达量均明显降低,比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),药物处理1、2 h时,高浓度组GI值、血清IgG水平最低,低浓度组最高,药物处理4、6 h时,中浓度组上述指标最低,低浓度组最高,比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),低、高浓度组GI值、血清IgG水平随着时间的延长而逐渐增加,中浓度组随着时间的延长而逐渐降低。中浓度组BMP2、IGF1、bFGF阳性表达量最高,其次为高浓度组,而低浓度组最低,组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:干黄茶乳剂通过发挥抗炎与修复牙周损伤组织,从而有效治疗牙周炎,且与药物浓度具有相关性,40%干黄茶乳剂维持作用4 h对牙周炎的抗炎效果最佳,有助于指导牙周炎临床治疗。

关键词 干黄茶乳剂;牙周炎;治疗

Study on Mechanism of Ganhuangcha Cream in Treating Periodontitis

Zhai Dengkui¹, Chen Yan¹, Liu Bin²

(1 Pharmacy Department in the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China;

2 Pharmacy Department in Harbin Children's Hospital, Harbin 150010, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of Ganhuangcha Cream in treating Periodontitis. **Methods:** The Kunming mice were divided into four groups by random number table, each group has 10 cases. The group given none-treatment was regarded as control group, the rest three groups were treated with 20%, 40%, 80% Ganhuangcha Cream respectively as Low, Medium, High concentration group. After the treatment, the positive expressions of gingival index (GI), serum IgG, periodontium BMP2, IGF1, bFGF were compared among groups. **Results:** Compared with the control group, GI, serum IgG levels of Low, Medium, High concentration group significantly increased, the positive expressions of IGF1, BMP2, bFGF were significantly lower, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After treated for 1 to 2h, GI, serum IgG of High concentration group were lowest, Low concentration group were highest. After treated for 4 to 6h, Medium concentration group were lowest; Low concentration group were highest, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). GI, serum IgG of Low, High concentration group increased gradually as the treating time prolonged, while the Medium concentration group decreased. The positive expressions of BMP2, IGF1 and bFGF were highest in Medium concentration group, followed by High concentration group, and then the Low concentration group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ganhuangcha Cream can treat periodontitis effectively by anti-inflammation and repairing periodontium, which is related to concentration of the drug. The treatment effect is the best when treated by 40% Ganhuangcha Cream for 4h. It provides guidance for the clinical treatment of periodontitis.

Key Words Ganhuangcha Cream; Periodontitis; Treatment

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.10.030

临床通过采用洁治、刮治、根面平整手段用于剔除附着性菌斑细菌,并通过药物辅治以控制口腔微生物形成,从而有效治疗牙周炎。相关文献显示,局部药物疗法在牙周炎的治疗中具有重要的价值^[1]。其中复方中药由于含有多种有效成分,且具有低毒、高效、多方位综合效用、难以产生细菌耐药及其感染^[2]。因此,复方中药(干黄茶乳剂)在对牙周炎治疗作用显著,但关于其治疗机制研究罕见,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 昆明种小白鼠(6~8周,18~22g,雌雄各20只);Wistar健康大白鼠(180~200g,雌雄各半),均哈尔滨医科大学附属第一临床医院动物实验室提供。

1.1.2 实验药物 干黄茶乳剂,滤液浓缩至0.3 g/mL,配置药物浓度分别为20%、40%、80%干黄茶乳

剂,由哈尔滨医科大学附属第一医院药检室提供。4℃冰箱保存,用时取出摇匀。

1.2 分组方法 将 40 只昆明种小白鼠编号,采用随机数字表法将其分为 4 组,每组 10 只。

1.2.1 对照组 小白鼠正常喂养,牙周组织不采用任何处理,从第 5 周开始涂以 0.1 mL 蒸馏水。

1.2.2 低浓度组 采用 5.0 无菌医用缝合丝结扎双侧上颌第一磨牙牙颈部,采用氨苄青霉素溶液 0.2 mL(含氨苄青霉素 2 mg)管饲,1 次/d,连续 3 d,接种牙周致病菌,采用 10% 葡萄糖水喂养,建立小鼠牙周炎模型(牙龈呈不同程度的炎性反应,附着丧失,X 线片显示牙槽骨呈不同程度的吸收,牙齿松动),建模后从第 5 周开始涂以 20% 干黄茶乳剂 0.1 mL,连续观察至第 10 周。

1.2.3 中浓度组 建立小鼠牙周炎模型,建模后从第 5 周开始涂以 40% 干黄茶乳剂 0.1 mL,连续观察至第 10 周。

1.2.4 高浓度组 建立小鼠牙周炎模型,建模后从第 5 周开始涂以 80% 干黄茶乳剂 0.1 mL,连续观察至第 10 周。

2 方法

2.1 牙龈指数(Gingival Index, GI) 小鼠采用乙醚吸入麻醉,取仰卧位,固定头部及其四肢,采用钝头牙周探针探查,取舌侧龈缘、远中腭乳头、正中颊缘、近中龈乳头各取 1 点,取 4 个测量点的平均值作为 GI,其中对于牙龈组织正常评定为 0;对于牙龈轻度颜色与水肿改变,探诊不出血,呈轻度炎性反应评定为 1;对于牙龈组织颜色变红,水肿,探诊不出血,呈中度炎性反应评定为 2;对于牙龈组织明显红肿,溃疡形成,自主出血倾向,呈严重炎性反应评定为 3。

2.2 血清 IgG 采用摘眼球法取小鼠静脉血 1 mL,置入无菌试管(不含抗凝剂),室温下静置 2 h,4℃过夜,采用 4 000 r/min 离心采集血清,置于 -20℃冰箱冷存,待测,采用酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)测定血清 IgG 光密度值(Optical Density, OD)。

2.3 免疫组化法 药物处理 6 h 后,采用颈椎脱臼处死小鼠,采用 10% 中性福尔马林液固定上颌骨标本 2 d,采用混合脱钙液脱钙,经脱水、透明、浸蜡、包埋处理后,将石蜡组织切成 4 μm 切片,常规 HE 染色,采用免疫组织化学法测定骨形成蛋白 2(Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2)、胰岛素样生长因子 1(Insulin Like Growth Factor-1, IGF1)、碱性成纤维细胞生长因子(Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)

的阳性表达。

2.4 观察指标 组间比较药物处理 1、2、4、6 h GI 值、血清 IgG 水平的差异;比较 4 组间 BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量的差异。

2.5 统计学处理 本研究数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间的计量资料采用 F 检验,进一步组间比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 提示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 组间各个时间点 GI 值的比较 1) 组间比较:低、中、高浓度组各个时间点 GI 值均明显高于对照组,中浓度组各个时间点 GI 值明显低于低浓度组,高浓度组各个时间点 GI 值明显低于低浓度组,药物处理 1、2 h,高浓度组 GI 值明显低于中浓度组,药物处理 4、6 h,中浓度组 GI 值明显低于高浓度组,组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。2) 不同时间点比较:低浓度组 GI 值随着时间的延长而逐渐增加,中浓度组 GI 值随着时间的延长而逐渐降低,高浓度组 GI 值随着时间的延长而逐渐降低,见图 2。

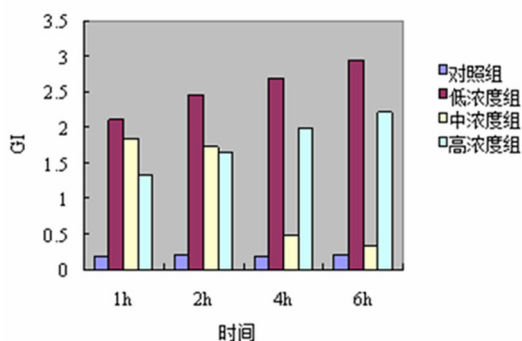


图 1 组间各个时间点 GI 值的比较

注:与对照组比较,低,中,高浓度组药物处理 1~4 h; $q > 2.5$, $P < 0.05$;与中浓度组比较,低浓度组,高浓度组药物处理 1~4 h; $q > 2.5$, $P < 0.05$

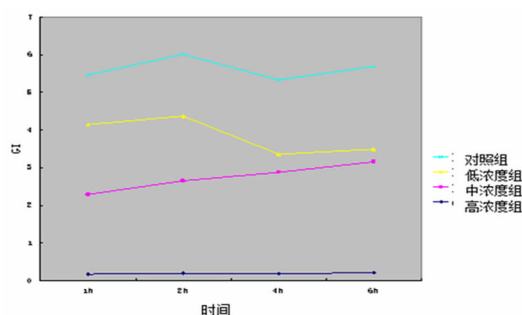


图 2 组间各个时间点 GI 值的比较

3.2 组间各个时间点血清 IgG 水平的比较 1) 组间比较:低、中、高浓度组各个时间点血清 IgG 水平均明显高于对照组,中浓度组各个时间点血清 IgG

水平明显低于低浓度组,高浓度组各个时间点血清 IgG 水平明显低于低浓度组,药物处理 1、2 h,高浓度组血清 IgG 水平明显低于中浓度组,药物处理 4、6 h,中浓度组血清 IgG 水平明显低于高浓度组,组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。2)不同时间点比较:低浓度组血清 IgG 水平随着时间的延长而逐渐增加,中浓度组血清 IgG 水平随着时间的延长而逐渐降低,高浓度组血清 IgG 水平随着时间的延长而逐渐降低,见图 4。

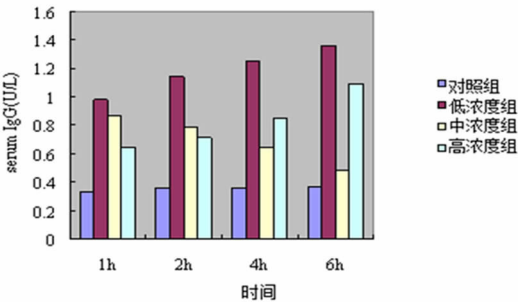


图 3 组间各个时间点血清 IgG 水平的比较

注:与对照组比较,低,中,高浓度组药物处理 1~4 h; $q > 2.5$, $P < 0.05$;与中浓度组比较,低浓度组,高浓度组药物处理 1~4 h; $q > 2.5$, $P < 0.05$

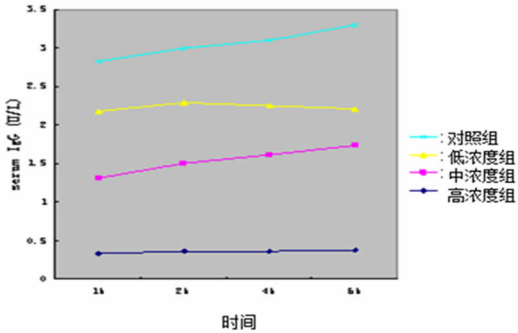


图 4 组间各个时间点血清 IgG 水平的比较

3.3 组间 BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量的比较
低、中、高浓度组 BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量均明显低于对照组,中浓度组 BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量明显高于低、高浓度组,高浓度组 BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量明显高于低浓度组,组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1

表 1 组间 BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量的比较($\bar{x} \pm s, \%$)				
组别	例数	BMP2	IGF1	bFGF
对照组	10	38.54 $\pm$ 8.23	39.68 $\pm$ 7.54	45.26 $\pm$ 9.14
低浓度组	10	12.98 $\pm$ 3.25 * Δ	15.24 $\pm$ 4.03 * Δ	17.01 $\pm$ 3.65 * Δ
中浓度组	10	32.14 $\pm$ 6.09 *	33.01 $\pm$ 6.01 *	34.29 $\pm$ 5.46 *
高浓度组	10	25.33 $\pm$ 5.14 * Δ	26.98 $\pm$ 5.14 * Δ	25.98 $\pm$ 4.26 * Δ
F		5.96	7.11	6.52
P		<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与中浓度组比较, $\Delta P < 0.05$;与高浓度组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

4 讨论

牙周炎是由菌斑微生物及其产物作用于牙周组织,通过激活免疫与宿主炎症反应机制,破坏正常牙周组织,从而导致牙周炎性反应性疾病^[3]。西药生物因子在促进损伤牙周组织修复,但生物因子来源较少,价格较为昂贵,且效果不稳定,目前难以在临床中推广应用^[4]。干黄茶乳剂是治疗牙周病的复方中药,其主要组成成分为干姜、黄连与儿茶。大量文献证实,复方中药在牙周炎的抗炎抑菌中具有重要的作用^[5]。干黄茶乳剂通过促进牙周组织细胞增殖分化,从而修复损伤的牙周组织。因此,干黄茶乳剂在牙周病并的治疗中具有重要的价值,且其取材较为简便,价格低廉,药物安全性较高,有助于临床推广应用。但关于干黄茶乳剂不同血药浓度的局部应用对牙周炎病变组织的治疗作用机制的研究罕见。

干黄茶乳剂由干姜、黄连、儿茶等 3 味中药组成,具有活血消肿、抑菌抗炎与固齿增骨等作用,局部用药有助于增加局部血药浓度,为牙周炎的治疗提供指导意义^[6]。干姜具有抗菌、镇痛消炎、抗肿瘤、促进胆汁分泌、改善消化系统功能、抗缺氧与改善局部血液循环等作用。药理研究显示,干姜的主要有效成分为姜酚、姜烯酚,两者可能通过促进肾上腺皮质激素,从而发挥明显的消炎镇痛效果。同时,姜烯酚通过抑制副伤寒、伤寒等病原微生物,且其对菌株的抗菌血药浓度高达 1 315~1 432 mg/mL^[7]。药理研究显示,黄连的主要有效成分为小檗碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱与巴马汀等,其具有抗病原微生物、解痉、止泻、抗溃疡形成、抗炎、健胃、抗心律失常、调节免疫、预防动脉硬化、改善心血管循环系统、降血糖、抑制血小板聚集、解热与抗肿瘤等功能^[8]。黄连可替代广谱抗菌药物从而发挥有效的抗病原微生物作用,其对链球菌、金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌、志贺氏痢疾菌淋菌、肠伤寒菌等革兰阴性菌、酵母菌、隐球菌、念珠菌属等真菌均发挥有效的抗菌作用。儿茶的主要有效成分为 4-羟基苯甲酸、山柰酚、槲皮素与苯酚等,其主要发挥抗病原微生物、降血糖、降血脂、抗血小板聚集、抗肿瘤等作用^[9]。相关研究证实,儿茶对革兰阳性菌、革兰阴性菌、流感病毒与内氏放线菌均具有明显的抑菌作用^[10]。

本研究结果显示,与正常小鼠比较,牙周炎小鼠模型 GI 值、血清 IgG 水平均明显增高,BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量均明显降低。菌斑微生物形成是牙周炎的始动因子,GI、IgG 在反映炎症反应程度中具有重要的意义。而 BMP2、IGF1、bFGF 是骨生成的

刺激因子,通过刺激牙周膜细胞向成骨细胞分化,从而修复牙周损伤组织^[11]。研究揭示了牙周炎广泛存在牙周炎症损伤病变组织。其中通过 20%、40%、80% 干黄茶乳剂处理 1、2 h 时,80% 干黄茶乳剂处理的牙周炎小鼠模型 GI 值、血清 IgG 水平最低,揭示了在药物处理 2 h 内,80% 干黄茶乳剂的抑菌消炎作用作为显著,但随着时间的延长,其抑菌消炎效果呈下降趋势。而 40% 干黄茶乳剂处理 4、6 h 时,牙周炎小鼠模型 GI 值、血清 IgG 水平最低,揭示了药物处理 2 h 后,40% 干黄茶乳剂的抗牙周菌斑微生物的作用最为显著,且随着作用时间的延长,其抗牙周菌斑微生物的作用逐渐增强,间接反映了 40% 干黄茶乳剂对牙周炎抗牙周菌斑微生物的持续作用最长,而 20% 干黄茶乳剂处理的牙周炎小鼠模型对抑菌作用最弱,可能与局部低血药浓度具有明显的相关性^[12]。同时,药物处理 6 h 后,采用免疫组化方法检测牙周组织 BMP2、IGF1、bFGF 表达量的比较结果显示,40% 干黄茶乳剂处理的牙周组织 BMP2、IGF1、bFGF 阳性表达量最高,其次为 80% 干黄茶乳剂,而 20% 干黄茶乳剂最低,揭示了 40% 干黄茶乳剂对牙周炎抗菌斑微生物的维持作用明显延长,可能与 40% 血药浓度更有利于牙周损伤组织的修复^[13]。但关于给药方式、渗透性对干黄茶乳剂抑菌抗炎与牙周组织修复的影响作用尚有待进一步的研究。

综上所述,干黄茶乳剂通过发挥抗炎与修复牙周损伤组织,从而有效治疗牙周炎,且与药物浓度具有相关性,40% 干黄茶乳剂维持作用 4 h 对牙周炎

的抗炎效果最佳,有助于指导牙周炎临床治疗。

参考文献

- [1] 王建宁,杨纳领,韩凉. 慢性牙周炎患者中牙龈卟啉单胞菌的检测及致病岛 Rag 基因的初步研究[J]. 中国医刊,2012,47(11):91.
 - [2] 王晶,冯巧巧. 牙周炎与患者机体代谢综合征的相关性及中药治疗的临床效果[J]. 中国现代医学杂志,2014,24(9):83-87.
 - [3] 冀章章,徐秀敏,章润贞. Er,Cr:YSGG 激光治疗慢性牙周炎的临床疗效评价[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(5):669-672.
 - [4] 王志忠,杨斌,李丽. 牙周基础治疗联合替硝唑胶囊治疗糖尿病性牙周炎的效果分析[J]. 中国医药,2013,8(9):1320-1322.
 - [5] 成爱武. 中药膏剂治疗慢性牙周炎急性期临床研究[J]. 新中医,2011,43(10):40-41.
 - [6] 米娜,翟登奎,毕良佳,等. 干黄茶乳剂的抗炎药效学及毒理性研究[J]. 口腔医学研究,2009,25(4):427-429.
 - [7] 陆国辉,李艳茹,高健美. 甘草干姜汤对博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化 SIRT1 和 TGF- β 1 蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床,2014,30(6):25-28.
 - [8] 孙振,彭淑红,嵇琴,等. 黄连药性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(11):221-223.
 - [9] 郑英明,仇琪,曹飒丽,等. 建立同时测定大鼠血浆中丹参素钠与原儿茶醛和咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 含量的液质联用方法[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(4):297-299.
 - [10] 李明潞,王玉丽,郭春宏,等. UPLC-Q-TOF-MS 法同时测定平消片中 7 种成分[J]. 中草药,2015,46(11):1625-1628.
 - [11] Sandra Viale-Bouroncle, Martin Gosau, Christian Morsczeck. NOTCH1 signaling regulates the BMP2/DLX-3 directed osteogenic differentiation of dental follicle cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2014,443(2):500-504.
 - [12] 翟登奎. 干黄茶乳膏提取工艺研究[J]. 哈尔滨医科大学学报,2008,42(6):658-659.
 - [13] 左燕,刘国良. 三七、黄连、骨碎补凝胶对牙周骨缺损再生疗效的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2013,38(9):997-1001.
- (2015-08-24 收稿 责任编辑:张文婷)
- (上接第 1565 页)
- [7] 柳友清,邢辉,韩晓兵,等. 顺铂诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡及其作用机制的研究[J]. 中国肿瘤临床,2006,33(1):1-4.
 - [8] 曲秀芬,王兵兵,张蕾,等. 卵巢早衰的现代医学研究进展[J]. 中国妇幼保健,2009,24(7):1005-1007.
 - [9] 周华,赵春梅. 中西医治疗卵巢早衰临床研究述略[J]. 中医学刊,2004,5(22):903-905.
 - [10] Shimoako T, Kamekura S, Chikuda H, et al. Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency[J]. J Biol Chem, 2004,279(15):15314-15322.
 - [11] 范燕燕,林守清,何仲,等. 卵巢功能衰退过程中血清激素和卵巢大小的改变[J]. 中国妇幼保健研究,2012,23(2):9.
 - [12] 曹金凤,郝红娟,王惠兰,等. 顺铂、依托泊苷、长春新碱、博来霉素对人卵巢颗粒细胞影响及其机制[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2012,28(11):835-838.
 - [13] Laura P, Suman R, Nafi D, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells[J]. Fertil Steril,2011,96(5):1246-1251.
 - [14] 王冰,蔡霞. 抑制素 B 与卵巢早衰的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2009,28(3):184-186,193.
 - [15] Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis[J]. Cell,1991,65(7):1097-1098.
 - [16] Ray R, Chen G, Veide CV, et al. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bax and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites[J]. Biol Chem,2000,275(2):1439-1448.
 - [17] Borovskaya TG, Goldberg VE, Fomina TI, et al. Morphological and functional state of rat varies in early and late periods[J]. after administration of platinum cytostatics. Bull Exp Biol Med,2004,137(4):331-5.
 - [18] 卢晓男,徐向荣,林丽君. 补肾二仙汤治疗卵巢早衰的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志,2008,28(7):594-596.
 - [19] 王世闻. 卵巢疾病[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:3-16.
 - [20] 李秀华,雷小敏. 卵巢早衰与免疫[J]. 中国老年学杂志,2004,24(8):776-778.
- (2014-09-28 收稿 责任编辑:张文婷)