

# 原花青素通过调节PI3K/Akt/VEGF信号通路对牙龈炎大鼠的作用机制研究<sup>△</sup>

殷晓宁<sup>1\*</sup>, 左宪宏<sup>1#</sup>, 段丽云<sup>2</sup>, 周军<sup>2</sup>(1. 张家口学院护理学院, 河北 张家口 075000; 2. 张家口市第一医院口腔科, 河北 张家口 075000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)04-0436-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.04.10



**摘要** 目的 探讨原花青素通过调节磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路对牙龈炎大鼠的潜在作用机制。方法 通过丝线缝扎大鼠上颌双侧第1磨牙牙颈部+涂抹麦芽糖+喂食20%蔗糖溶液及软食的方法构建牙龈炎大鼠模型,将造模成功的48只大鼠随机分为模型组、原花青素组(160 mg/kg)、740Y-P组(PI3K/Akt信号通路激活剂,0.02 mg/kg)、原花青素+740Y-P组(原花青素160 mg/kg+740Y-P 0.02 mg/kg),每组12只;另取12只大鼠作为对照组。各药物组大鼠灌胃或/和腹腔注射相应药液,每天1次,连续7 d。末次给药结束24 h后,测定大鼠牙龈指数,检测其龈沟液中白细胞介素18(IL-18)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、碱性磷酸酶(ALP)水平以及牙龈组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、活性氧(ROS)水平,观察大鼠牙龈组织的病理形态并检测其牙龈组织中PI3K/Akt/VEGF信号通路相关蛋白的表达情况。结果 与对照组比较,模型组大鼠牙龈组织存在局部组织扩张充血、新生毛细血管出现、胶原纤维变性丢失且排列紊乱、大量炎症细胞浸润龈沟壁等病理改变;其牙龈指数,龈沟液中IL-18、iNOS、ALP水平,牙龈组织中ROS水平,PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平以及VEGF蛋白的表达水平均显著升高,牙龈组织中SOD、CAT水平显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,原花青素组大鼠牙龈组织病理损伤减轻,上述各定量指标均显著改善( $P<0.05$ ),且740Y-P能逆转原花青素对各指标的改善作用( $P<0.05$ )。结论 原花青素可能通过抑制PI3K/Akt/VEGF信号通路来缓解牙龈炎大鼠的牙龈组织损伤,改善牙龈炎症和氧化应激。

**关键词** 原花青素;牙龈炎;牙龈组织;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/血管内皮生长因子信号通路

## Effect mechanism research of procyanidin on gingivitis rats by regulating the PI3K/Akt/VEGF signal pathway

YIN Xiaoning<sup>1</sup>, ZUO Xianhong<sup>1</sup>, DUAN Liyun<sup>2</sup>, ZHOU Jun<sup>2</sup> (1. School of Nursing, Zhangjiakou University, Hebei Zhangjiakou 075000, China; 2. Dept. of Stomatology, Zhangjiakou First Hospital, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the potential mechanism of procyanidin on rats with gingivitis by regulating phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **METHODS** The rat model of gingivitis was constructed by sewing the neck of the first maxillary molar with silk thread+applying maltose on the gum+feeding with 20% sucrose solution and soft food. Forth-eight model rats were randomly divided into model group, procyanidin group (160 mg/kg), 740Y-P group (PI3K/Akt signaling pathway activator, 0.02 mg/kg), and procyanidin+740Y-P group (procyanidin 160 mg/kg+740Y-P 0.02 mg/kg), with 12 rats in each group; another 12 rats were selected as control group; each medication group was treated with corresponding drugs intragastrically or/and intraperitoneally, once a day, for 7 consecutive days. Twenty-four hours after the last administration, the gingival index of rats was measured; the levels of interleukin-18 (IL-18), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and alkaline phosphatase (ALP) in gingival crevicular fluid, as well as the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reactive oxygen species (ROS) in gingival tissues of rats were detected; the pathological changes in gingival tissues were observed; the expression levels of PI3K/Akt/VEGF signaling pathway-related proteins in gingival tissues of rats were detected.

**RESULTS** Compared with control group, the gingival tissues of rats in the model group had severe pathological damage, which was manifested as local tissue expansion and congestion, new capillaries, degeneration and loss of collagen

<sup>△</sup>基金项目 河北省医学科学研究课题计划(No.20201434)

\* 第一作者 讲师,硕士。研究方向:口腔医学基础与临床。电话:0313-8162252。E-mail:yinxiaoning964@163.com

# 通信作者 讲师,硕士。研究方向:口腔医学基础与临床。电话:0313-8162252。E-mail:849550069@qq.com

fibers and disorder of arrangement, and a large number of inflammatory cell infiltration in the gingival sulcus wall. The gingival index, the levels of IL-18, iNOS, ALP in gingival crevicular fluid, the level of ROS in gingival tissues, the phosphorylations of PI3K and Akt, as well as the protein expression of VEGF in gingival tissues were significantly increased; the levels of SOD and CAT in gingival tissues of rats in model group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the pathological damage to the gingival tissues of rats in procyanidin group was reduced, and all quantitative indicators were significantly improved ( $P < 0.05$ ); 740Y-P could reverse the improvement effect of procyanidin on various indicators ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS** Procyanidin may alleviate gingival tissue damage, and improve gingival inflammation and oxidative stress in rats with gingivitis by inhibiting PI3K/Akt/VEGF signaling pathway.

**KEYWORDS** procyanidin; gingivitis; gingival tissue; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/vascular endothelial growth factor signaling pathway

牙龈炎是一种慢性炎症性口腔疾病,主要累及牙龈组织,若治疗不及时,会深度破坏牙周结构,引发严重牙周炎,损害牙实质,导致牙齿松动脱落,极大地影响患者的咀嚼功能<sup>[1]</sup>。研究指出,牙龈炎的致病因素以口腔牙龈卟啉单胞菌感染为主,其病理改变包括牙龈组织的炎症细胞浸润和病理性血管生成激活,因此减轻炎症是防治牙龈炎、维持口腔健康的有效手段<sup>[2]</sup>。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)是调控炎症因子表达及炎症反应发生的重要信号通路,可参与介导牙龈炎等炎症性疾病的发病过程,抑制该信号通路激活可降低炎症因子的表达水平,并可下调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,抑制血管新生,减轻脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞的炎症反应和过氧化损伤<sup>[3-4]</sup>。由此可见,PI3K/Akt/VEGF信号通路是牙龈炎的潜在治疗靶点。

原花青素是一种黄酮类活性物质,富含于葡萄籽中,具有较强的抗氧化及抗炎能力。已有研究证实,原花青素可抑制人牙周膜成纤维细胞损伤和人牙龈上皮细胞炎症因子的表达<sup>[5-6]</sup>。但上述研究仅从细胞角度探究了原花青素的抗炎效果,未能深入研究其对牙龈炎的改善作用及潜在机制。基于此,本研究通过构建牙龈炎大鼠模型,初步探究原花青素对模型大鼠牙龈组织损伤及PI3K/Akt/VEGF信号通路的影响,以期对牙龈炎的临床治疗提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

JJ-Z029-2型牙周钝头探针仪购自颀嘉科学仪器(上海)有限公司;PT-3502B型酶标仪购自北京普天新桥技术有限公司;Axiovert 200型显微镜购自德国Carl Zeiss公司;Omega Fluor Plus型凝胶成像仪购自美国Aplegen公司。

### 1.2 主要药品与试剂

原花青素原料药(批号SY28349,纯度 $\geq 99.65\%$ )购自甘肃顺意生物科技有限公司;麦芽糖、蔗糖(批号分别为JX108、JX117)均购自西安晋湘药用辅料有限公司;白细胞介素18(interleukin-18, IL-18)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒和ECL增强化学发光试剂(批号分别为NB29840、NB46227、NB55258、NB44268)均购自深圳市纽邦生物技术有限公司;740Y-P原料药(PI3K/Akt信号通路激活剂,纯度 $\geq 98.95\%$ ),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)ELISA检测试剂盒,苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒,高效RIPA裂解液,BCA蛋白检测试剂盒(批号分别为WC29845、WC47811、WC55278、WC50755、WC25632、WC46147、WC77280)均购自南京微测生物科技有限公司;兔源磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、PI3K、磷酸化Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)、Akt、VEGF、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(批号分别为JD29490、JD53814、JD32561、JD44783、JD45611、JD63326、JD42886)均购自南京基蛋生物科技股份有限公司。

### 1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,8~9周龄,体重322~351 g,购自广东莱迪生物医药研究院有限公司,生产许可证号为SCXK(粤)2022-0064。所有大鼠均在室温22~25℃、相对湿度55%~65%、每12 h昼夜循环的环境中饲养,自由饮水、摄食。本研究方案经张家口学院伦理委员会审核批准,批准编号为L2022第92号。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

参照相关文献方法<sup>[7-8]</sup>建立牙龈炎大鼠模型:大鼠经乙醚麻醉后以仰卧位固定,用丝线缝扎其上颌双侧第

1 磨牙牙颈部,于牙龈上缝 2 针固定,在其牙龈处涂抹麦芽糖,每天 3 次,并以 20% 蔗糖溶液及软食喂养;7 d 后,观察大鼠牙龈,若出现龈缘红肿、光亮、松软,触碰易出血,并伴有明显的牙龈组织病理改变(随机取 4 只造模大鼠处死后观察),则视为牙龈炎大鼠模型复制成功。将造模成功的 48 只大鼠随机分为模型组、原花青素组、740Y-P 组、原花青素+740Y-P 组,每组 12 只;另选 12 只大鼠,不作任何处理并正常喂养,作为对照组。

原花青素组大鼠灌胃 160 mg/kg 的原花青素<sup>[9]</sup>(将原花青素以生理盐水溶解制成质量浓度为 16 mg/mL 的混悬液,灌胃体积为 10 mL/kg,下同);740Y-P 组大鼠腹腔注射 0.02 mg/kg 的 740Y-P<sup>[10]</sup>(740Y-P 以生理盐水溶解制成质量浓度为 0.002 mg/mL 的溶液,注射体积为 10 mL/kg,下同);原花青素+740Y-P 组大鼠灌胃 160 mg/kg 的原花青素,同时腹腔注射 0.02 mg/kg 的 740Y-P;对照组和模型组大鼠灌胃 10 mL/kg 生理盐水;每天 1 次,持续 7 d。

## 2.2 大鼠牙龈指数的测定

末次给药结束 24 h 后,各组大鼠经麻醉后使用钝头探针探诊牙龈,参照以下标准测定牙龈指数:牙龈正常,记 0 分;牙龈有轻度炎症和轻度水肿,颜色有轻度改变,探诊不出血,记 1 分;牙龈有中度炎症,水肿光亮、色红,探诊出血,记 2 分;牙龈有重度炎症,有自动出血倾向,可见明显红肿或溃疡,记 3 分<sup>[11-12]</sup>。

## 2.3 大鼠龈沟液中 IL-18、iNOS、ALP 水平的检测及标本的采集

取 2 mm×4 mm 的滤纸条,插入大鼠两下门齿龈沟内,60 s 后取出并浸入生理盐水 0.5 mL 中,振荡 60 s 后,取出滤纸,使用 ELISA 法以酶标仪测定其中 IL-18、iNOS、ALP 水平(具体操作严格按照相应试剂盒说明书进行)。

随后,各组大鼠经麻醉后断头处死,取其牙龈组织适量,转移至高效 RIPA 裂解液中,匀浆,于 4 °C 下以 3 500 r/min 离心 10 min,取上层蛋白样品液,采用 BCA 法检测蛋白浓度后,于 -80 °C 下保存,备用;取大鼠剩余的牙龈组织,经水漂洗后,依次浸入 80%~100% 的乙醇中脱水,以二甲苯透明后,行常规石蜡包埋、切片(厚度约 4 μm),备用。

## 2.4 大鼠牙龈组织病理形态的观察

取“2.3”项下各组大鼠的牙龈组织切片,经二甲苯脱蜡、乙醇水化后,进行 HE 染色(具体操作按照相应试剂盒说明书进行),经脱水、透明后封片,使用显微镜观察其牙龈组织的病理形态,并任选 5 个视野拍照。

## 2.5 大鼠牙龈组织中 SOD、CAT、ROS 水平的检测

取“2.3”项下冻存的各组大鼠牙龈组织蛋白样品液适量,于 4 °C 下融化后,取适量,采用 ELISA 法以酶标仪测定其中 SOD、CAT、ROS 水平(具体操作按照相应试剂盒说明书进行)。

## 2.6 大鼠牙龈组织中 PI3K/Akt/VEGF 信号通路相关蛋白表达的检测

取“2.3”项下冻存的各组大鼠剩余的牙龈组织蛋白样品液,煮沸 5 min 使变性;取变性蛋白适量,于 120 V 电压下电泳 70 min,再以湿转法(110 V, 90 min)转移到硝酸纤维素膜上,以 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、VEGF、GAPDH(内参)一抗(稀释度均为 1:2 500),于 4 °C 下孵育 12 h;以 TBST 缓冲液洗涤 5 min×3 次,加入相应二抗(稀释度为 1:2 700),于室温下孵育 2 h;以 TBST 缓冲液洗涤 5 min×3 次,用 ECL 显色后,于凝胶成像仪下成像。运用 Image J 软件定量分析各蛋白的条带灰度值,并以此计算 VEGF 蛋白的表达水平(VEGF/GAPDH)和 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平(p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt)。

## 2.7 统计学方法

应用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 原花青素对牙龈炎大鼠牙龈指数的影响

与对照组比较,模型组大鼠牙龈指数显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,原花青素组大鼠牙龈指数显著降低( $P<0.05$ ),740Y-P 组大鼠牙龈指数显著升高( $P<0.05$ );与原花青素组比较,原花青素+740Y-P 组大鼠牙龈指数显著升高( $P<0.05$ );与 740Y-P 组比较,原花青素+740Y-P 组大鼠牙龈指数显著降低( $P<0.05$ )。结果见表 1。

表 1 各组大鼠牙龈指数和龈沟液中 IL-18、iNOS、ALP 水平比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	牙龈指数/分	IL-18/(pg/mL)	iNOS/(U/mL)	ALP/(U/L)
对照组	0	53.15±10.36	12.85±2.54	231.27±25.08
模型组	2.02±0.17 <sup>a</sup>	135.42±18.17 <sup>a</sup>	60.13±9.16 <sup>a</sup>	418.39±48.43 <sup>a</sup>
原花青素组	0.42±0.07 <sup>b</sup>	67.98±9.30 <sup>b</sup>	24.79±4.39 <sup>b</sup>	325.13±45.82 <sup>b</sup>
740Y-P 组	2.61±0.15 <sup>c</sup>	218.64±40.85 <sup>c</sup>	118.92±17.08 <sup>c</sup>	562.91±66.25 <sup>c</sup>
原花青素+740Y-P 组	1.95±0.12 <sup>cd</sup>	130.12±21.05 <sup>cd</sup>	57.34±7.93 <sup>cd</sup>	405.76±52.59 <sup>cd</sup>

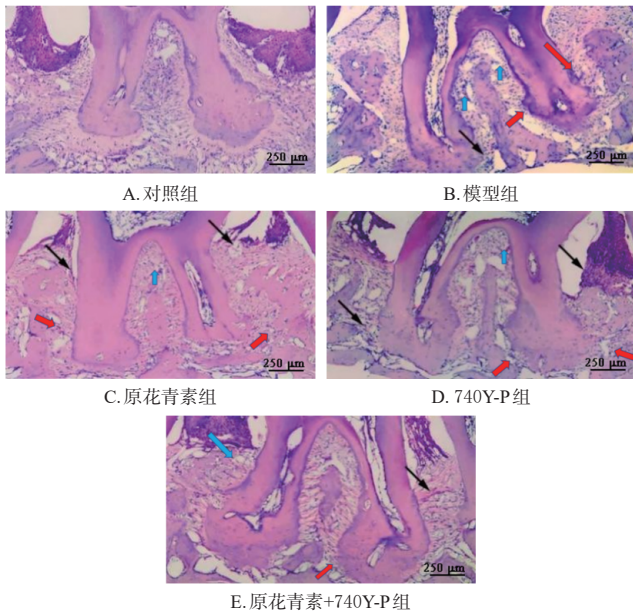
a: 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与原花青素组比较,  $P<0.05$ ; d: 与 740Y-P 组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.2 原花青素对牙龈炎大鼠龈沟液中IL-18、iNOS、ALP水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠龈沟液中IL-18、iNOS、ALP水平均显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,原花青素组大鼠龈沟液中上述指标均显著降低( $P<0.05$ ),740Y-P组则显著升高( $P<0.05$ );与原花青素组比较,原花青素+740Y-P组大鼠龈沟液中IL-18、iNOS、ALP水平均显著升高( $P<0.05$ );与740Y-P组比较,原花青素+740Y-P组大鼠龈沟液中IL-18、iNOS、ALP水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表1。

### 3.3 原花青素对牙龈炎大鼠牙龈组织病理形态的影响

对照组大鼠牙龈组织无炎症细胞浸润,形态结构未见损伤;模型组大鼠牙龈组织可见严重的病理损伤,具体表现为局部组织扩张充血、新生毛细血管出现、胶原纤维变性丢失且排列紊乱,且龈沟壁处可见大量炎症细胞浸润;原花青素组大鼠牙龈组织上述病理损伤有所减轻,而740Y-P组则有所加重;原花青素+740Y-P组牙龈组织的病理损伤情况与模型组相似。结果见图1。



黑色箭头:局部组织扩张充血;蓝色箭头:炎症细胞浸润;红色箭头:胶原纤维变性丢失。

图1 各组大鼠牙龈组织病理形态观察的显微图(HE染色)

### 3.4 原花青素对牙龈炎大鼠牙龈组织中SOD、CAT、ROS水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠牙龈组织中SOD、CAT水平显著降低,ROS水平显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,原花青素组大鼠牙龈组织中SOD、CAT水平显著升高,ROS水平显著降低( $P<0.05$ );740Y-P组大鼠牙龈组织中SOD、CAT水平显著降低,ROS水平显著升高( $P<0.05$ )。与原花青素组比较,原花青素+740Y-P组大鼠牙龈组织中SOD、CAT水平显著降低,ROS水平显著

升高( $P<0.05$ )。与740Y-P组比较,原花青素+740Y-P组大鼠牙龈组织中SOD、CAT水平显著升高,ROS水平显著降低( $P<0.05$ )。结果见表2。

表2 各组大鼠牙龈组织中SOD、CAT、ROS水平比较( $\bar{x} \pm s, n=12, U/mg$ )

组别	SOD	CAT	ROS
对照组	7.21 ± 1.62	6.22 ± 0.68	1.13 ± 0.21
模型组	2.93 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.31 <sup>a</sup>	6.95 ± 1.22 <sup>a</sup>
原花青素组	6.88 ± 0.96 <sup>b</sup>	5.81 ± 0.66 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.26 <sup>b</sup>
740Y-P组	0.56 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.08 <sup>b</sup>	10.38 ± 1.82 <sup>b</sup>
原花青素+740Y-P组	3.01 ± 0.44 <sup>cd</sup>	2.25 ± 0.34 <sup>cd</sup>	6.88 ± 1.04 <sup>cd</sup>

a: 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与原花青素组比较,  $P<0.05$ ; d: 与740Y-P组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.5 原花青素对牙龈炎大鼠牙龈组织中PI3K/Akt/VEGF信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠牙龈组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和VEGF蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,原花青素组大鼠牙龈组织中上述指标均显著降低,740Y-P组则显著升高( $P<0.05$ );与原花青素组比较,原花青素+740Y-P组大鼠牙龈组织中上述指标均显著升高( $P<0.05$ );与740Y-P组比较,原花青素+740Y-P组大鼠牙龈组织中上述指标均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图2、表3。

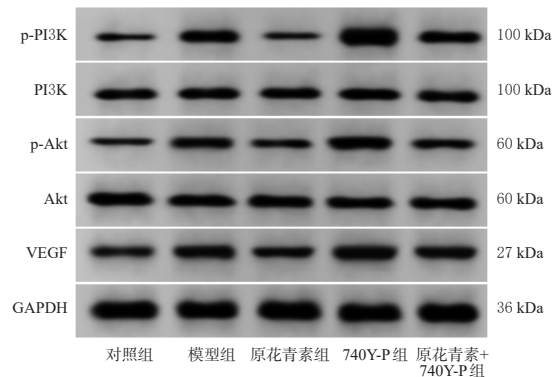


图2 各组大鼠牙龈组织中p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、VEGF蛋白表达的电泳图

表3 各组大鼠牙龈组织中PI3K、Akt蛋白磷酸化水平和VEGF蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	VEGF/GAPDH
对照组	0.51 ± 0.10	0.32 ± 0.06	0.33 ± 0.07
模型组	1.44 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.14 <sup>a</sup>
原花青素组	0.56 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.08 <sup>b</sup>
740Y-P组	2.16 ± 0.39 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.16 <sup>b</sup>
原花青素+740Y-P组	1.38 ± 0.17 <sup>cd</sup>	0.82 ± 0.15 <sup>cd</sup>	0.70 ± 0.12 <sup>cd</sup>

a: 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与原花青素组比较,  $P<0.05$ ; d: 与740Y-P组比较,  $P<0.05$ 。

## 4 讨论

牙龈炎是一种牙龈组织炎症性疾病,其病变尚未深入牙周组织,波及范围不广,对其进行早期治疗和干预可避免其发展为牙周炎,对患者口腔健康及正常咀嚼功

能的维持具有积极意义。IL-18作为促炎因子可参与机体的免疫应答及炎症进程;iNOS可催化一氧化氮产生,进而诱导氧化应激发生<sup>[13-14]</sup>。当牙龈组织发生病变时,上皮细胞会释放出包含ALP在内的多种组织特异性酶,故ALP可作为评价牙龈病变的主要指标<sup>[15]</sup>。SOD、CAT、ROS是反映机体氧化应激程度的重要指标,氧化应激的发生常常伴随SOD、CAT水平的下降和ROS水平的上升<sup>[11]</sup>。本研究通过丝线缝扎大鼠上颌双侧第1磨牙牙颈部并在牙龈处涂抹麦芽糖和喂食蔗糖的方法构建牙龈炎大鼠模型,结果显示,模型组大鼠牙龈组织中SOD、CAT水平显著降低,牙龈指数、牙龈组织中ROS和龈沟液中IL-18、iNOS、ALP水平均显著升高,同时伴有牙龈组织局部扩张充血、新生毛细血管出现、胶原纤维变性丢失且排列紊乱、大量炎症细胞浸润龈沟壁等病理损伤,表明大鼠出现了明显的牙龈炎症及氧化应激。

原花青素是提取自葡萄籽的一种天然黄酮类化合物,具有较强的抗炎、抗氧化活性,可阻止氧化应激及炎症反应的发生及进展,减轻原发性高血压大鼠的肾脏损伤,并可明显抑制磷酸三钙磨损颗粒诱导的骨细胞凋亡,还可改善糖尿病牙周炎大鼠的牙周组织损伤<sup>[16-17]</sup>。由此本课题组推测,原花青素对牙龈炎可能具有防治作用。为此,本研究以原花青素干预牙龈炎大鼠,结果显示,该成分可显著升高大鼠牙龈组织中SOD、CAT水平,显著降低牙龈指数,龈沟液中IL-18、iNOS、ALP水平和牙龈组织中ROS水平,减轻大鼠牙龈组织的病理损伤,表明原花青素对牙龈炎大鼠具有较好的干预作用,可抑制炎症反应和氧化应激,具有作为牙龈炎治疗药物的潜力。

PI3K/Akt信号通路作为炎症反应及过氧化反应的重要信号调控通路,可参与牙周炎等炎症性疾病病理进程,下调PI3K/Akt信号通路可降低炎症因子的表达水平,抑制牙周炎症<sup>[18]</sup>;同时有研究指出,VEGF上调引发的血管病理性新生是牙周疾病的重要病理特征<sup>[19]</sup>。由此可见,抑制PI3K/Akt/VEGF信号通路可能是治疗牙龈炎的有效策略。本研究结果显示,牙龈炎大鼠牙龈组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和VEGF蛋白的表达水平均显著升高,提示PI3K/Akt/VEGF信号通路参与了模型大鼠的牙龈损伤;经原花青素干预后,大鼠牙龈组织中上述指标均显著降低,提示原花青素可通过下调PI3K/Akt/VEGF信号通路来抑制炎症反应和氧化应激,减轻模型大鼠的牙龈组织损伤。本研究进一步以PI3K/Akt信号通路激活剂740Y-P干预牙龈炎大鼠进行验证,结果显示,740Y-P可加重大鼠的牙龈损伤,减弱原花青

素对牙龈炎症及氧化应激损伤的改善作用,逆转原花青素对牙龈组织的保护作用,初步证实了原花青素的上述作用与抑制PI3K/Akt/VEGF信号通路有关。

综上所述,原花青素可通过抑制PI3K/Akt/VEGF信号通路来缓解牙龈炎大鼠的牙龈组织损伤,改善牙龈炎症和氧化应激。但考虑到本研究未设置阳性对照药物(如甲硝唑、阿莫西林),且并未评价原花青素的量效关系,本课题组后续将进一步完善实验设计,基于更多潜在机制,深入评价原花青素的药效和安全性。

## 参考文献

- [1] KIM H N, KIM K, LEE Y. Intra-oral photograph analysis for gingivitis screening in orthodontic patients[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2023, 20(4): 3705.
- [2] LIU J X, LIU Z M, HUANG J Q, et al. Effect of probiotics on gingival inflammation and oral microbiota: a meta-analysis[J]. *Oral Dis*, 2022, 28(4): 1058-1067.
- [3] WANG Y P, LIN Y, WANG L H, et al. TREM2 ameliorates neuroinflammatory response and cognitive impairment via PI3K/AKT/FoxO3a signaling pathway in Alzheimer's disease mice[J]. *Aging*, 2020, 12(20): 20862-20879.
- [4] WANG T, ZHANG D, GUO C L, et al. Novel PARP inhibitor DDPF-20 induces DNA damage and inhibits angiogenesis through the PI3K/akt/VEGF pathway[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(13): 2468-2476.
- [5] 莫汉佳, 薛子轩, 黄斯铭, 等. 茶多酚、黄芩苷、原花青素拮抗脂多糖影响牙周膜成纤维细胞生理活性的差别研究[J]. *中国全科医学*, 2021, 24(增刊2): 31-34.  
MO H J, XUE Z X, HUANG S M, et al. Study on the differences of tea polyphenols, baicalin and procyanidins in antagonizing the effects of lipopolysaccharides on the physiological activities of periodontal fibroblasts[J]. *Chin Gen Pract*, 2021, 24(Suppl 2): 31-34.
- [6] 张秀娟, 吴伟, 陈欣, 等. 葡萄籽原花青素对牙龈上皮细胞炎症介质表达的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2022, 40(1): 39-44.  
ZHANG X J, WU W, CHEN X, et al. Effects of grape seed proanthocyanidins on the expression of inflammatory mediators in gingival epithelial cells[J]. *West China J Stomatol*, 2022, 40(1): 39-44.
- [7] 孙博宁, 丛蓓蓓, 高美华, 等. 正畸对牙龈炎大鼠牙周组织TLR4/NF-κB信号通路的调控作用研究[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(4): 299-304.  
SUN B N, CONG B B, GAO M H, et al. Regulatory effect of orthodontics on TLR4/NF-κB signaling pathway in

- periodontal tissue of gingivitis rats[J]. *Immunol J*, 2020, 36(4):299-304.
- [8] 徐莉,董福生,许丽华,等.  $\beta$ -防御素-1,2在实验性大鼠牙龈炎牙周炎模型牙龈上皮组织中的表达[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2011, 21(1):6-10.  
XU L, DONG F S, XU L H, et al. The expression of  $\beta$ -defensin-1, 2 in gingival epithelium in the rat gingivitis and periodontitis model[J]. *Chin J Conserv Dent*, 2011, 21(1):6-10.
- [9] 任娟,覃宏伟,周冬亮,等. 原花青素通过抑制 Toll 样受体 4/核因子- $\kappa$ B 信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *安徽医药*, 2021, 25(3):431-435, 637.  
REN J, QIN H W, ZHOU D L, et al. Protective effect of procyanidins on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Anhui Med Pharm J*, 2021, 25(3):431-435, 637.
- [10] 王峰,张安兵. 基于 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路探究补阳还五汤对痛风模型大鼠滑膜组织细胞凋亡及炎症反应的影响[J]. *免疫学杂志*, 2022, 38(7):612-619.  
WANG F, ZHANG A B. Effects of Buyang huanwu decoction on synovial tissue cell apoptosis and inflammatory response in rats with gout based on PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway[J]. *Immunol J*, 2022, 38(7):612-619.
- [11] 吴松,张文娟,崔茸茸,等. 小檗碱对牙周炎大鼠的细胞因子水平、氧化应激和炎症性骨溶解的实验研究[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(5):814-817, 851.  
WU S, ZHANG W J, CUI R R, et al. Study of berberine on cytokine levels, oxidative stress and inflammatory osteolysis in rats with periodontitis[J]. *Prog Mod Biomed*, 2022, 22(5):814-817, 851.
- [12] 王冬梅,王永学,杨熙晨,等. 米诺环素-锌纳米缓释凝胶治疗大鼠实验性牙周炎效果观察[J]. *山东医药*, 2018, 58(14):33-35.  
WANG D M, WANG Y X, YANG X C, et al. Observation on the therapeutic effect of minocycline-zinc nano-sustained release gel on experimental periodontitis in rats[J]. *Shandong Med J*, 2018, 58(14):33-35.
- [13] KANDIKATTU H K, UPPARAHALLI VENKATESHAIAH S, KUMAR S, et al. IL-18-mediated neutrophil recruitment promotes acute lung injury in inflammation-mediated chronic pancreatitis[J]. *Mol Immunol*, 2023, 155:100-109.
- [14] GUO Y Z, WEN J J, HE A, et al. iNOS contributes to heart failure with preserved ejection fraction through mitochondrial dysfunction and Akt s-nitrosylation[J]. *J Adv Res*, 2023, 43:175-186.
- [15] RISTESKA N, POPOSKI B, IVANOVSKI K, et al. Diagnostic and prognostic markers of periodontal disease[J]. *Pril*, 2021, 42(3):89-95.
- [16] 金晶晶,楼佳琪,王脉,等. 原花青素减轻 TCP 磨损颗粒诱导的骨细胞氧化损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(9):1676-1682.  
JIN J J, LOU J Q, WANG M, et al. Effects of procyanidins on oxidative damage of osteocytes caused by TCP wear particles[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2019, 35(9):1676-1682.
- [17] 朱晓娟,代海涛,李艳,等. 葡萄籽原花青素对糖尿病牙周炎大鼠血清脂联素和牙周组织炎症状态的影响[J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(9):903-908.  
ZHU X J, DAI H T, LI Y, et al. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on serum adiponectin, inflammatory factors and periodontal tissue in diabetic periodontitis rats[J]. *J Med Postgrad*, 2022, 35(9):903-908.
- [18] XIA Z X, LI Q, TANG Z Y. Network pharmacology, molecular docking, and experimental pharmacology explored Ermiao wan protected against periodontitis via the PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B/MAPK signal pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303:115900.
- [19] AFACAN B, ÖZTÜRK V Ö, PAŞALI Ç, et al. Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and TNF- $\alpha$  levels in periodontal health and disease[J]. *J Periodontol*, 2019, 90(7):788-797.

(收稿日期:2023-08-22 修回日期:2023-12-29)

(编辑:张元媛)