

心理应激对大鼠牙周炎组织 NF- κ B 表达的影响

邓道坤 刘 佳 张 旻 陈永进 李 强

摘 要 **目的** 探讨心理应激状态下大鼠牙周炎组织中 NF- κ B 表达的变化。**方法** 40 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组 (A 组)、实验性牙周炎组 (B 组)、心理应激组 (C 组)、实验性牙周炎 + 心理应激组 (D 组) 以及实验性牙周炎 + 心理应激 + 氟西汀组 (E 组), 每组 8 只动物。采用 CUMS 法建立心理应激模型, 采用丝线结扎法建立实验性牙周炎模型。实验 4 周结束后, 旷场实验观察大鼠行为学变化, ELISA 法测定大鼠血清中应激激素水平变化, 并通过 Western blot 法检测动物牙龈组织中 IkB α 、p-IkB α 、p65 和 p-NF- κ B p65 的蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 心理应激可以引起动物皮质醇和肾上腺皮质激素的含量升高 ($P < 0.05$) 以及旷场中央区停留时间和移动距离的改变 ($P < 0.05$)。同时, 牙周炎组动物牙龈组织中 p-IkB α 和 p-NF- κ B p65 的蛋白表达增多 ($P < 0.05$)、IkB α 的蛋白表达减少 ($P < 0.05$), 牙周炎合并心理应激后, p-IkB α 和 p-NF- κ B p65 的蛋白高表达更加明显 ($P < 0.05$)、IkB α 蛋白含量则持续减少 ($P < 0.05$)。当给予心理应激拮抗后, 动物的行为学和血清学变化恢复正常 ($P > 0.05$); 且与实验性牙周炎 + 心理应激组动物比较, 药物组的 p-IkB α 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达量有所下降 ($P < 0.05$), IkB α 的表达逐渐升高 ($P < 0.05$)。**结论** 核转录因子- κ B (NF- κ B) 过表达可能参与心理应激加重牙周炎这一过程。

关键词 心理应激 牙周炎 牙龈 核转录因子- κ B

中图分类号 R781.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.008

Effect of Psychological Stress on the Expression of NF- κ B in the Periodontitis Tissue in Rat. Deng Daokun, Liu Jia, Zhang Min, et al. The Fourth Brigade, School of Basic Medical Sciences, The Fourth Military Medical University, Shaanxi 710032, China

Abstract Objective To explore the NF- κ B expression in periodontitis tissues of rats under psychological stress. **Methods** 40 SD male rats were randomly divided into control group (group A), experimental periodontitis group (group B), psychological stress group (group C), experimental periodontitis + psychological stress group (group D) and experimental periodontitis + psychological stress + fluoxetine group (group E). CUMS was used to establish psychological stress model, and experimental periodontitis was introduced by placing silk ligatures around the cervixs of the right second maxillary molar. After four weeks, the behavioral alterations of rats were observed by open-field test, the stress hormone levels in serum of rats were tested by ELISA, and the protein expression of IkB α , p-IkB α , p65 and p-NF- κ B p65 in animal gingival tissues were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, psychological stress induced the increase of cortisol and adrenocortical hormone content ($P < 0.05$), and changed the time spent in the center zone and total moved distance in the open-field test in rats ($P < 0.05$). In addition, the protein expressions of p-IkB α and p-NF- κ B p65 in the periodontitis group increased ($P < 0.05$), and the IkB α protein content decreased ($P < 0.05$). After receiving psychological stress, the increased contents of p-IkB α and p-NF- κ B p65 and decreased IkB α in the experimental rats were more obvious ($P < 0.05$). After the antagonistic treatment of psychological stress, serological and behavioral alterations returned to the normal level ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression levels of p-IkB α and p-NF- κ B p65 proteins decreased somewhat ($P < 0.05$), while the expression level of IkB α increased gradually. **Conclusion** Nuclear transcription factor- κ B overexpression may be involved in the aggravating process of periodontitis induced by psychological stress.

Key words Psychological stress; Periodontitis; Gingiva; Nuclear transcription factor- κ B

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81500851、81701002); 军事口腔医学国家重点实验室自主研究基金资助项目 (3017ZB05)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学基础医学院四大队 (邓道坤); 710032 西安, 军事口腔医学国家重点实验室、国家口腔疾病临床医学研究中心、陕西省口腔疾病临床医学研究中心、第四军医大学口腔医院正颌科 (刘佳), 急诊与综合临床科 (张旻、陈永进、李强)

通讯作者: 李强, 电子信箱: lqag726@163.com

牙周炎是一种常见的慢性炎症性疾病, 其主要因素是宿主对细菌及其产物的不良反应。然而, 单纯的菌斑微生物因素目前还难以解释牙周炎的复杂发病机制。临床实验与流行病学研究证实, 许多牙周炎患者存在不良心理状态, 心理应激与牙周炎存在密切关联^[1,2]。笔者课题组前期研究也证实了心理应激可以加重大鼠牙周炎、延缓其愈合反应, 但具体机制尚

不明确^[3]。核转录因子- κ B (NF- κ B) 是一类参与机体应激反应、炎性反应等生理病理活动的细胞内重要核转录因子,并被证明在牙周炎组织中表达明显升高^[4]。心理应激状态下,需要明确加重的大鼠牙周炎炎症组织中 NF- κ B 会出现怎样的变化。因此,本研究通过建立大鼠牙周炎模型和心理应激模型,观察心理应激作用下 NF- κ B 在牙周组织中的表达变化来探讨其对牙周炎的影响。

材料与方法

1. 实验仪器与试剂:4-0 医用编织丝线(强生医疗器材有限公司),氟西汀注射液(国药准字:H12020957,天津金耀氨基酸有限公司),DYCZ-24DN 双垂直蛋白电泳仪及 WD-9413B 型凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司),ELX-800 酶标仪(美国 BioTek 公司),全蛋白提取试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 以及内参抗体 β -actin(沈阳万类生物科技有限公司);RD1412-OF 旷场实验箱(上海 Mobile-datum 公司);大鼠皮质酮及促肾上腺皮质激素 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

2. 实验动物与分组:40 只同源雄性 SD 大鼠[体重 200~220g,第四军医大学动物实验中心,动物实验许可证号:2015 伦审学(048)号]随机分为 5 组,即正常对照组(A 组)、实验性牙周炎组(B 组)、心理应激组(C 组)、实验性牙周炎+心理应激组(D 组)、实验性牙周炎+心理应激+氟西汀组(E 组)。每组 8 只动物,饲养时间 4 周。所有动物均于第四军医大学口腔医院实验动物中心(SPF 级)统一饲养,环境温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 $60\% \pm 5\%$ 。

3. 动物模型建立:参照 Zhao 等^[3]的方法建立大鼠实验性牙周炎模型,即对大鼠施行 10g/L 戊巴比妥钠 3.5mg/kg 腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,4-0 医用无菌丝线结扎大鼠右上颌第二磨牙颈部;利用口腔检查、颌骨大体标本观察以及组织形态学观察,验证大鼠实验性牙周炎建模的成功有效^[3]。参照 Cui 等^[5]的方法应用 CUMS 法建立动物心理应激模型,即将禁食 12h、禁水 12h、潮湿垫料 24h、束缚应激 1h、强迫浸水 4°C 5min、强迫浸水 45°C 5min、昼夜颠倒共计 7 种应激因子以随机方式施加于大鼠,每日只施加 1 种应激因子,1 周内每种应激因子施加 1 次,相同的应激不可连续施加 2 天。4 周后,旷场实验观察大鼠行为学变化,ELASA 法测定大鼠血清中皮质醇(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)的水平变化,以

验证 CUMS 法建模的有效性。

4. 旷场实验:将大鼠由旷场正中放入,仪器上方的摄像机自动记录指标,包括大鼠中央区活动时间和大鼠旷场移动总距离。每只大鼠的测试时间为 15min。测试完成之后,清除设备内遗留排泄物,75% 乙醇擦拭去除上一只大鼠留下的气味及痕迹后,再进行下一只大鼠的测试。

5. 血清学检测:使用 1% 戊巴比妥钠 50mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后通过眼球取血 2ml, 4°C 放置约 1~2h 后 4°C 条件下 3000r/min 离心 30min,吸取上层血清,置于 -80°C 保存备测。选用 ELASA 试剂盒检测大鼠血清 CORT 和 ACTH 的含量。

6. NF- κ B 检测:取右上侧第二磨牙区域牙龈组织,通过 Western blot 法检测牙龈组织中 I κ B α 、p-I κ B α 、p65 和 p-p65 的蛋白质水平。具体方法:眼科剪剪碎牙龈组织,经 4°C 预冷, PBS 冲洗,组织裂解液裂解提取牙龈组织总蛋白,BCA 法定量,配胶,上样, SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭 1h,加入一抗 4°C 孵育过夜,荧光二抗孵育 1h, Bio-Rad 发光仪进行 ECL 法发光检测。用软件 Quantity One 对条带进行灰度扫描并分析。

7. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对所得数据进行 One-way ANOVA 分析,两两比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 旷场实验结果:与对照组和单纯实验性牙周炎组动物比较,单纯心理应激后大鼠的中央区停留时间明显延长($P < 0.05$),总移动距离明显缩短($P < 0.05$),且与牙周炎+心理应激组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。而应用氟西汀后上述指标恢复至正常水平($P > 0.05$,图 1)。

2. 血清学检测结果:ELISA 实验检测结果显示,动物接受心理应激刺激后,两种典型的应激激素 CORT 和 ACTH 的含量显著升高($P < 0.05$),并与牙周炎合并心理应激的动物比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。而氟西汀可有效逆转这种升高的趋势($P > 0.05$,图 2)。

3. p-I κ B α 和 I κ B α 蛋白表达检测:p-I κ B α 和 I κ B α 的 Western blot 法检测和分析结果如图 3 所示。与对照组比较,单纯心理应激并不引起 p-I κ B α 和 I κ B α 的表达变化($P > 0.05$),而牙周炎牙龈组织的 p-I κ B α 蛋白含量上升、I κ B α 的蛋白含量下降($P < 0.05$)。当牙周炎动物接受心理应激刺激后,炎性组

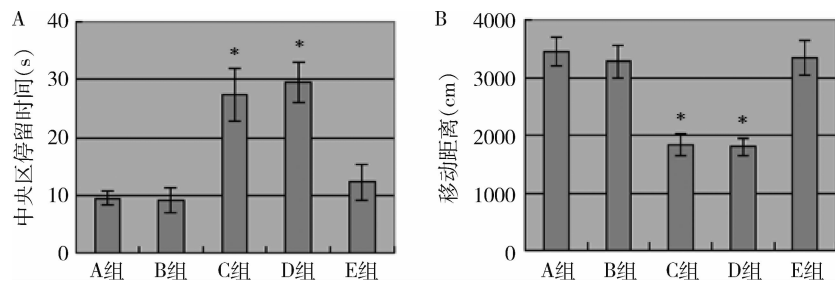


图 1 旷场实验结果

A. 中央区停留时间;B. 移动距离。与 A 组比较, * $P < 0.05$

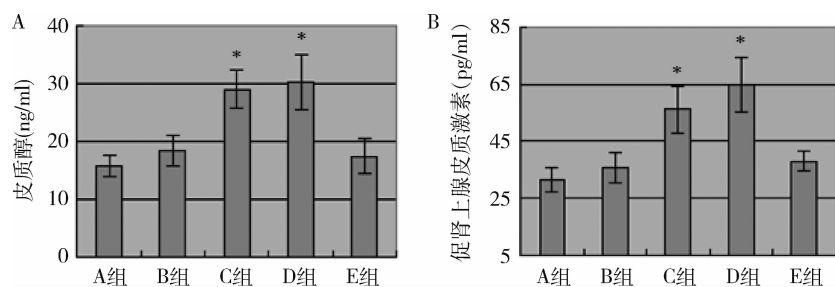


图 2 血清学检测结果

A. 皮质醇;B. 促肾上腺皮质激素。与 A 组比较, * $P < 0.05$

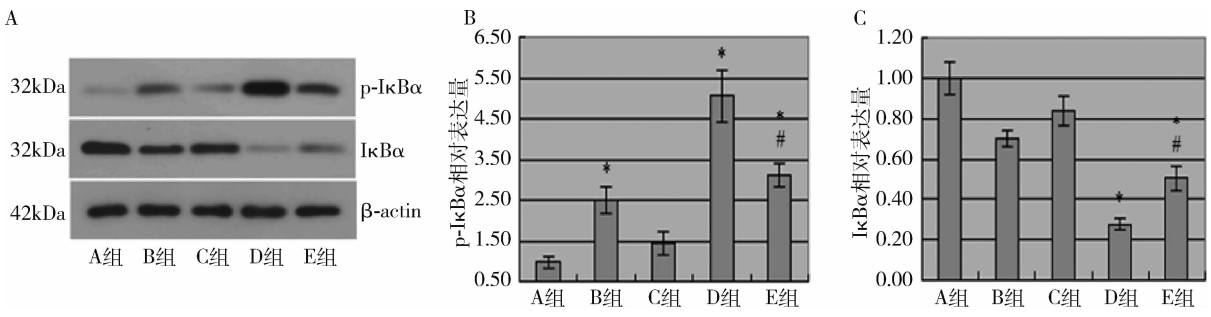


图 3 p-IκBα、IκBα 蛋白表达检测

A. p-IκBα、IκBα Western blot 法检测结果;B. p-IκBα 相对表达量;C. IκBα 相对表达量。

与 A 组比较, * $P < 0.05$;与 D 组比较, # $P < 0.05$

织的 p-IκBα 上升幅度以及 IκBα 下降幅度更加明显 ($P < 0.05$)。经过心理应激拮抗治疗后,升高表达的 p-IκBα 以及降低表达的 IκBα 趋向正常,但与对照组、单纯牙周炎组和单纯心理应激组比较差异仍有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4. NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达检测: NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 的 Western blot 法检测和分析结果如图 4 所示。与对照组比较,单纯牙周炎导致 p-NF-κB p65 蛋白含量上升 ($P < 0.05$)。牙周炎复合心理应激后,牙周炎组织中 p-NF-κB p65 的高表达更加明显,并且远大于单纯牙周炎和单纯心理应激组 ($P < 0.05$)。氟西汀拮抗心理应激后,

p-NF-κB p65 蛋白表达有所下降,但仍高于对照组、单纯牙周炎组和单纯心理应激组 ($P < 0.05$)。NF-κB p65 的蛋白表达在各组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

牙周炎作为一种常见的慢性炎症性疾病,特征在于牙齿支持结构的破坏。根据第 4 次全国口腔流行病学调查,35~44 岁居民的牙石检出率为 96.7%,牙龈出血检出率为 87.4%,牙周炎作为牙齿脱落的罪魁祸首,其重要性愈加明显。牙周组织中的微生物及其产物被认为是牙周炎的始动因素,但是单纯菌斑学说尚不足以解释牙周炎的发病机制。20 世纪以来,

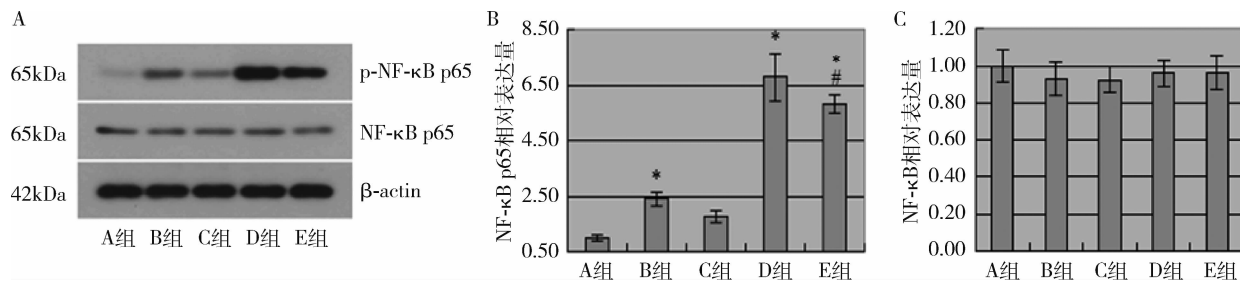


图4 NF-κB p65和p-NF-κB p65蛋白表达检测

A. p-NF-κB p65、NF-κB p65 Western blot法检测结果; B. p-NF-κB p65相对表达量; C. NF-κB p65相对表达量。

与A组比较, * $P < 0.05$; 与D组比较, [#] $P < 0.05$

随着生物-心理-社会医学模式的发展,心理因素在牙周炎发生和进展中的重要性得到了越来越广泛地认可^[6]。NF-κB作为细胞内重要核转录因子,它涉及机体的调节细胞凋亡、炎症反应、免疫应答、应激反应等,其在牙周炎中的作用日益凸显。体外研究显示,牙龈卟啉单胞菌和其他致病性牙周细菌可促进牙周组织中NF-κB的合成,而且牙周病患者牙周组织中存在大量NF-κB激活相关产物(TNF-α、IL-1)^[7]。除此之外,研究证明,牙周病的发病机制和易感性可能与NF-κB的激活有关^[4]。然而,到目前为止,NF-κB作为重要的炎症反应因子,其在心理应激加重牙周炎发展过程中扮演的角色尚未明晰^[8]。

本研究通过7种应激因子随机施加于大鼠建立心理应激模型,建立慢性不可预知性心理应激动物模型,该模型已在国际上被广泛应用,并被认为是可有效避免大鼠对重复应激产生的耐受性以及实验结果的影响^[6]。本课题组前期研究已显示,心理应激加重牙周组织破坏、延缓了牙周炎的愈合进程^[3]。经过分析显示,本研究中接受心理应激的动物,其自发性活动较对照组和实验性牙周炎组明显下降。并且,应激激素水平明显高于对照组和单纯牙周炎组,与之前的研究结果相似^[1]。在进行有效的药物治疗后,大鼠上述变化指标恢复至对照水平,这说明本研究心理应激模型建立成功。

NF-κB是一类普遍存在的重要的转录调节因子,由Rel蛋白家族成员中的两种组成同源或异源二聚体,如p65-p65或p65-p50。在多数细胞中,NF-κB与抑制蛋白IκB结合形成三聚体,一般情况下没有活性。IκB抑制蛋白家族能掩盖NF-κB的核定位信(NLS),抑制NF-κB核易位。当细胞受到外界刺激时,TRAF/RIP与TAK1或者TRAFs和NIK结合启动NF-κB经典及非经典通路,使IκK活化。

当IκK活化后,IκB蛋白被磷酸化,最终降解,从而释放了NF-κB二聚体;游离的NF-κB二聚体通过各种转录后被激活,并进入细胞核,与胞核内特异的DNA链结合,进而加快目的基因的转录。在众多研究中,IκB、p-IκB、p-NF-κB p65的含量变化等都被作为NF-κB信号通路激活的标志^[9]。

NF-κB和各种疾病的密切关系受到研究者的广泛关注,包括炎症、免疫性疾病、癌症等^[10,11]。有病例对照研究将45例男性按年龄分为应激组与对照组,测得应激组中压力诱导外周血NF-κB与DNA结合活性显著增高^[12]。而在动物实验中,褪黑素可通过抑制p65的核转位来减少心理应激诱导的NF-κB表达来改善细胞凋亡,表明心理应激与NF-κB存在密切关联^[13]。Ambili等^[4]通过免疫组化和PCR技术测量患病和健康牙龈组织细胞中NF-κB表达及其转录因子,发现患病组织明显高于健康组织。牙周炎发展到后期,常表现为大量牙槽骨吸收,而NF-κB信号通路与骨吸收的关系已经非常明确——即NF-κB与破骨细胞形成和骨吸收活性增加呈正相关^[14]。上述研究提示,NF-κB在心理应激诱导牙周炎过程中可能起到了一定的作用。

本研究结果显示,在牙周炎模型的基础上施加心理应激,会进一步促使p-IκBα和p-NF-κB p65蛋白水平的上升以及IκBα蛋白水平的下降,而NF-κB p65蛋白含量不变,提示心理应激促进了IκBα和NF-κB p65的磷酸化,最终的结果是NF-κB通路被激活。而在氟西汀治疗后,p-IκBα和p-NF-κB p65蛋白表达量下降、IκBα蛋白表达量上升,NF-κB p65总量无明显变化,说明NF-κB通路被抑制。这之前研究者对牙周炎研究中涉及到的NF-κB测量结果类似^[15]。这些发现表明,NF-κB信号通路的激活参与中心理应激加速牙周炎的发生、发展,心理

应激治疗通过纠正牙周局部 NF- κ B 过度激活,能够在很大程度上减少对牙周组织的损伤。然而,药物治疗组 p-I κ B α 和 p-NF- κ B p65 的蛋白表达仍高于单纯牙周炎组,I κ B α 表达仍低于单纯牙周炎组,说明心理应激拮抗治疗并未完全逆转心理应激造成的牙周炎龈组织中 NF- κ B 过度激活。这提示牙周炎是一个复杂的病理生理过程,心理应激因素去除后,牙周炎局部环境可能还存在着其他影响 NF- κ B 过表达的因素。比如,ROS 也可以激活牙周炎中的 NF- κ B 信号,从而导致促炎细胞因子和趋化因子的表达,最终触发炎症反应和破骨细胞分化,导致牙周破坏^[16]。此外,动物实验也证实,慢性应激可通过抑制糖皮质激素受体- α 信号,介导 NF- κ B 活性上调,最终表现为牙槽骨丧失,牙周带深度增加^[17]。

综上所述,笔者推测 NF- κ B 信号通路是心理应激加重牙周炎的重要机制之一,心理应激可以诱导 NF- κ B 的过表达,从而导致牙周炎的加重。在未来的研究中,笔者将继续深入探讨 NF- κ B 是如何通过调节上、下游分子来介导心理应激加重牙周炎病变,从而为研究牙周炎的心理病因学发病机制及有效防治提供新的防治策略。

参考文献

- 1 Jaiswal R, Shenoy N, Thomas B. Evaluation of association between psychological stress and serum cortisol levels in patients with chronic periodontitis - Estimation of relationship between psychological stress and periodontal status[J]. J Indian Soc Periodontol, 2016, 20(4): 381-385
- 2 邓道坤,刘佳,杨久慧,等.心理应激对牙周炎组织氧化还原反应影响的动物实验研究[J].现代生物医学进展,2020,20(3):418-423
- 3 Zhao YJ, Li Q, Cheng BX, *et al.* Psychological stress delays periodontitis healing in rats; the involvement of basic fibroblast growth factor[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012:732902
- 4 Ambili R, Janam P, Saneesh Babu PS, *et al.* Differential expression of transcription factors NF- κ B and STAT3 in periodontal ligament fibroblasts and gingiva of healthy and diseased individuals[J]. Arch O-

- ral Biol, 2017, 82:19-26
- 5 Cui M, Li Q, Zhang M, *et al.* Long-term curcumin treatment antagonizes masseter muscle alterations induced by chronic unpredictable mild stress in rats[J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(3):258-267
- 6 Lu H, Xu M, Wang F, *et al.* Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α signaling[J]. Exp Mol Med, 2016, 48(3):e223
- 7 Kurgan S, Kantarci A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis[J]. Periodontol 2000, 2018, 76(1):51-67
- 8 Jha P, Das H. KLF2 in Regulation of NF- κ B-mediated immune cell function and inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11):2383
- 9 Wenhua S, Guoqing C, Weidong T, *et al.* Expression and effect of S100A9 in the periodontium of diabetic rats[J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2016, 34(4):419-422
- 10 Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(9):545-558
- 11 郭子君,齐晓丹. SIRT-1 和 NF- κ B 在小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(11):152-157
- 12 Kuebler U, Zuccarella-Hackl C, Arpagaus A, *et al.* Stress-induced modulation of NF- κ B activation, inflammation-associated gene expression, and cytokine levels in blood of healthy men[J]. Brain Behav Immun, 2015, 46:87-95
- 13 Guo Y, Sun J, Li T, *et al.* Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF- κ B/iNOS and Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7:9599
- 14 Abu-Amer Y. NF- κ B signaling and bone resorption[J]. Osteoporos Int, 2013, 24(9):2377-2386
- 15 Miao L, Zhan S, Liu J. Interleukin-12-mediated expression of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts involves in NF- κ B activation[J]. Biosci Rep, 2017, 37(6):BSR20170973
- 16 Liu C, Mo L, Niu Y, *et al.* The role of reactive oxygen species and autophagy in periodontitis and their potential linkage[J]. Front Physiol, 2017, 8:439
- 17 Lu H, Xu M, Wang F, *et al.* Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α signaling[J]. Exp Mol Med, 2016, 48:e223

(收稿日期:2019-09-04)

(修回日期:2019-10-02)

(上接第 8 页)

- 24 Lu J, Wang X, Qing Z, *et al.* Detectability and reproducibility of the olfactory fMRI signal under the influence of magnetic susceptibility artifacts in the primary olfactory cortex[J]. Neuroimage, 2018, 178:613-621
- 25 Song IU, Choi EK, Oh JK, *et al.* Alteration patterns of brain glucose metabolism: comparisons of healthy controls, subjective memory impairment and mild cognitive impairment[J]. Acta Radiol, 2016, 57(1):90-97
- 26 Perrotin A, Mormino EC, Madison CM, *et al.* Subjective cognition and amyloid deposition imaging: a Pittsburgh compound B positron emission tomography study in normal elderly individuals[J]. Arch

- Neurol, 2012, 69(2):223-229
- 27 Biomarker Study Group, Aalten P, Aarsland D, *et al.* Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a Meta-analysis[J]. JAMA, 2015, 313(19):1924-1938
- 28 Mattsson N, Insel PS, Donohue M, *et al.* Predicting diagnosis and cognition with ¹⁸F-AV-1451 tau PET and structural MRI in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers & Dementia, 2019, 15(4):570-580
- 29 Bondi MW, Edmonds EC, Jak AJ, *et al.* Neuropsychological criteria for mild cognitive impairment improves diagnostic precision, biomarker associations, and progression rates[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42(1):275-289

(收稿日期:2019-08-22)

(修回日期:2019-10-04)