

杜仲醇提取物可促进根尖周炎模型大鼠骨组织的愈合

吴大雷¹, 周守恒¹, 闫健伟¹, 李博¹, 许诺², 史春³, 高阳⁴ (¹大连医科大学附属第二医院口腔科, 辽宁省大连市 116027; ²大连医科大学中山学院, 辽宁省大连市 116000; ³大连医科大学口腔医学院, 辽宁省大连市 116000; ⁴大连市友谊医院口腔科, 辽宁省大连市 116000)

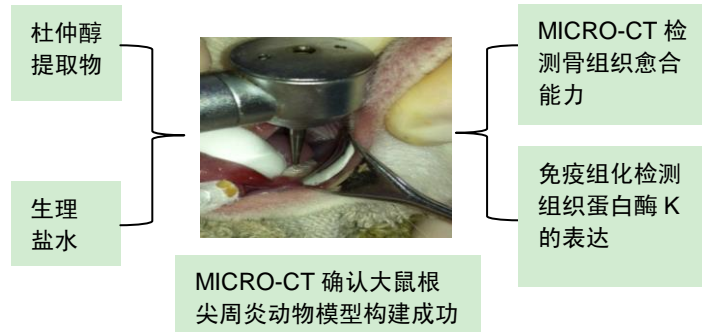
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2727

ORCID: 0000-0001-5450-7016(吴大雷)

文章快速阅读:

文章特点—

- (1)研究促进根尖周炎骨修复的相关分子机制, 增强药物对骨修复的促进作用, 对提高临床治疗效果具有重要意义;
- (2)杜仲醇提取物可以抑制骨破坏标志因子组织蛋白酶 K 的表达, 促进大鼠根尖周炎骨组织的愈合, 为根尖周炎的治疗提供一定的实验室依据。



吴大雷, 男, 1981 年生, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔方面的研究。

通讯作者: 高阳, 硕士, 副主任医师, 大连市友谊医院口腔科, 辽宁省大连市 116000

文献标识码:A

投稿日期: 2019-09-10

送审日期: 2019-09-11

采用日期: 2019-10-15

在线日期: 2020-03-30



文题释义:

杜仲: 杜仲是中国传统的中药药材, 其具有增加机体免疫性、强身健骨的疗效, 研究表明杜仲可以促进成骨细胞的增殖并且可以促进骨组织的愈合。近年来对于杜仲的研究主要集中于其有效成分的提取及分析。

杜仲醇: 是杜仲的主要有效成分之一, 可以增强关节炎大鼠骨组织的强度, 并且具有降血压以及促进伤口愈合的能力。

摘要

背景: 目前关于杜仲的研究主要集中于其治疗骨关节炎能增强骨组织的愈合能力, 但是关于杜仲对根尖周炎骨破坏的修复作用尚未见报道。

目的: 探讨杜仲醇提取物对根尖周炎大鼠组织蛋白酶 K 的影响。

方法: 选取 24 只 SD 大鼠随机分为根尖周炎组 20 只及对照组 4 只, 根尖周炎组于右侧下颌第一磨牙开髓后建立根尖周炎模型, 对照组不做任何处理。饲养 4 周后, 取根尖周炎组及对照组各 4 只拍摄 MICRO-CT, 计算根尖周炎骨破坏量, 确认大鼠根尖周炎动物模型构建成功。饲养第 5 周, 将剩余 16 只根尖周炎大鼠随机分为杜仲醇提取物组及生理盐水组, 每组 8 只, 每天灌胃杜仲醇提取物 5 mL/kg 或等量生理盐水。灌胃 4 周后, 每组取 4 只大鼠拍摄 MICRO-CT, 分析杜仲醇提取物对根尖周骨组织的修复能力, 另外取 4 只大鼠采用免疫组化染色观察右下颌第一磨牙牙槽骨组织蛋白酶 K 的表达。

结果与结论: ①MICRO-CT 结果显示, 对照组骨吸收体积为(0.223±0.009) mm³, 根尖周炎组骨吸收体积为(0.945±0.037) mm³, 两组骨吸收量比较差异有显著性意义(P=0.00), 说明大鼠根尖周炎模型构建成功; ②灌胃 4 周后, MICRO-CT 结果显示杜仲醇提取物组骨吸收体积较灌胃前减小, 差异有显著性意义(P<0.05); ③灌胃 4 周后, 免疫组化结果显示杜仲醇提取物根尖周炎骨破坏标志因子组织蛋白酶 K 的表达较灌胃前降低, 差异有显著性意义(P<0.05); ④结果表明, 杜仲醇提取物可以抑制骨破坏标志因子组织蛋白酶 K 的表达, 并且可以促进大鼠根尖周炎骨组织的愈合。

关键词:

杜仲; 根尖周炎; 动物模型; 组织蛋白酶 K; MICO-CT; 免疫组化

中图分类号: R459.9; R318; R781.3

基金资助:

辽宁省自然科学基金(20180550563), 项目负责人: 史春

Wu Dalei, Master, Attending physician, Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Corresponding author: Gao Yang, Master, Associate chief physician, Department of Stomatology, Dalian Friendship Hospital Stomatology, Dalian 116000, Liaoning Province, China

Alcohol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. promotes bone healing in rats with periapical periodontitis

Wu Dalei¹, Zhou Shouheng¹, Yan Jianwei¹, Li Bo¹, Xu Nuo², Shi Chun³, Gao Yang⁴ (¹Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China; ²Zhongshan College of Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China; ³School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China; ⁴Department of Stomatology, Dalian Friendship Hospital Stomatology, Dalian 116000, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Current research on *Eucommia ulmoides* Oliv. mainly focuses on its use in the treatment of osteoarthritis that *Eucommia ulmoides* Oliv. can enhance the healing ability of bone tissue. However, research on its bone repair ability in periapical periodontitis has not been reported.

OBJECTIVE: To study the effect of alcohol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. on cathepsin K expression in periapical periodontitis rats.

METHODS: Twenty-four Sprague-Dawley rats were divided into normal control group ($n=4$) and apical periodontitis group ($n=20$). In the periapical periodontitis group, a periapical periodontitis model was established after exposure of the dental pulp in the first molar of the right mandible. The normal control group did not deal with any treatment. After 4 weeks of feeding, four rats from each group were taken for micro-CT detection. Bone destruction was quantified to confirm whether the rat model of periapical periodontitis was successfully constructed. After 5 weeks of feeding, the remaining 16 rats with periapical periodontitis were equally randomized into alcohol extract group (given alcohol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. via intragastric administration, 5 mL/kg per day) and normal saline group (given the same dose of normal saline via intragastric administration every day). After 4 weeks of gavage, four mice from each group were selected to perform micro-CT examination. The ability of alcohol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. to repair periapical bone tissue was analyzed. First molars of the right mandible from the other four rats in each group were extracted to detect the expression of cathepsin K in the alveolar bone using immunohistochemical staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Micro-CT results showed that the rat model of periapical periodontitis was successfully constructed as there was a significant difference in the bone resorption volume between the normal control and apical periodontitis groups [(0.223±0.009) mm³ vs. (0.945±0.037) mm³, $P=0.00$]. After 4 weeks of gavage, the micro-CT results showed that the alcohol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. significantly reduced the bone resorption volume in the rat model of periapical periodontitis ($P < 0.05$). Immunohistochemistry results showed that the alcohol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. significantly inhibited the expression of cathepsin K, a marker of bone destruction, in the rat model of periapical periodontitis. Therefore, these findings indicate that the alcohol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. can inhibit the expression of cathepsin K and promote the healing of bone tissue in the rats with periapical periodontitis.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; periapical periodontitis; animal model; cathepsin K; micro-CT; immunohistochemistry

Funding: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20180550563 (to SC)

0 引言 Introduction

慢性根尖周炎是由病原体引起的根尖周围组织的炎症和牙槽骨破坏,是机体对根管内感染物质的免疫应答在牙髓根尖周组织的局部表现^[1-3]。免疫炎症反应长期持续性作用于机体,会发生氧化应激信号传导通路的变化,使骨改建的平衡失调,成骨细胞增殖受到抑制,出现大量的凋亡细胞,造成根尖周软组织的损伤和丧失^[4-6]。慢性根尖周炎骨破坏的修复,对于保留牙齿并良好行使咀嚼功能至关重要。深入研究其骨修复相关分子机制,增强药物对骨修复的促进作用,对提高临床治疗效果具有重要意义^[7]。

杜仲在传统医学中已有两千多年的历史,具有良好的安全性,杜仲一直被认为是具有多种功能的高档草药,具有强化骨骼、肝脏功能和肾脏功能的作用^[8-11]。现代药理学和分子生物学研究证实从杜仲中分离的粗提物可以安全并有效治疗骨质疏松症等骨疾病,并具有降低血压、提高机体免疫力、抗衰老、预防炎症与抑制肿瘤的功能^[12-14]。研究表明,杜仲醇提取物可以改善小鼠关节炎动物模型的骨破坏,促进成骨细胞的增殖^[15-18],但是关于杜仲对根尖周炎骨破坏的修复作用尚未见报道,该实验探讨杜仲醇提取物对大鼠根尖周炎组织中蛋白酶K表达的影响,为根尖周炎的治疗提供一定的实验室依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 2018年5月至2019年5月在大连医科大学附属第二医院完成。

1.3 材料 杜仲(北京同仁堂有限责任公司); 甲醇、生理盐水(上海生工); 电动牙钻机(日进齿科材料有限公司); MICRO-CT(RATOC Systems, Inc.); ULtraSensitive™ SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司); CM3050S冰冻

切片机(Leica公司); DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 组织蛋白酶K多克隆抗体(Santa Cruz公司); BX-43显微照相系统(Olympus公司)。

实验动物: 24只雄性SD大鼠,6周龄,体质量180-220 g,由大连医科大学SPF动物实验中心提供。该实验经过大连医科大学伦理委员会批准,动物实验伦理审批号为L20180229。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组和造模 24只SD大鼠随机分为根尖周炎组20只及对照组4只。采用腹腔注射10%水合氯醛(1 mg/kg)对大鼠实施全麻,采取仰卧位消毒右侧下颌第一磨牙,取小号球钻开髓其近中窝,探及穿髓点后去除冠髓,直接暴露开髓孔。术后2 h禁水,术后第2天正常饲养。对照组不做任何处理。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	构建根尖周炎动物模型
选择动物的基本资料:	24只雄性SD大鼠,6周龄,体质量180-220 g,由大连医科大学SPF动物实验中心提供
造模技术描述:	腹腔注射10%水合氯醛(1 mg/kg)对大鼠实施全麻,采取仰卧位消毒右侧下颌第一磨牙,取小号球钻开髓其近中窝,探及穿髓点后去除冠髓,直接暴露开髓孔。术后2 h禁水,术后第2天正常饲养
动物数量及分组方法:	24只SD大鼠随机分为根尖周炎组20只及对照组4只,在模型建立第5周,将16只根尖周炎大鼠随机分为杜仲醇提取物组及生理盐水组
造模成功评价指标:	MICRO-CT扫描确认大鼠根尖周炎模型构建成功
造模后取材及观察指标:	MICRO-CT扫描分析杜仲醇提取物对根尖周骨组织的修复能力,免疫组化染色观察组织蛋白酶K的表达
伦理委员会批准情况及批号:	该实验经过大连医科大学伦理委员会批准,动物实验伦理审批号为L20180229

1.4.2 MICRO-CT 模型建立4周后,取根尖周炎组及对照组各4只拍摄MICRO-CT。乙醚麻醉后处死大鼠,40 g/L多聚甲醛进行心脏灌注,分离右侧下颌骨,进行MICRO-CT扫描,扫描条件为0.060 mm/Pix像素、90 kV及110 mA,扫描厚度:SOD: 97 mm, SID: 37.2 mm,扫描分辨率为20 μm ,导入Mimics软件使用high quality计算根尖周炎骨破坏的体积,观察模型构建情况。

1.4.3 杜仲醇提取物制备及干预 甲醇15 mL加入2 g杜仲,震荡过夜,离心10 min取上清,采用三蒸水定容上清至15 mL后过滤(0.22 μm), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。在模型建立第5周,将剩余16只根尖周炎大鼠随机分为杜仲醇提取物组及生理盐水组,每组8只,杜仲醇提取物组每天灌胃杜仲醇提取物(10 mL/kg),生理盐水组每天灌胃等量生理盐水,灌胃4周。灌胃4周后每组各取4只大鼠进行MICRO-CT扫描,分析杜仲醇提取物对根尖周骨组织的修复能力,另外取4只大鼠进行免疫组化染色观察组织蛋白酶K的表达。

1.4.4 免疫组化染色 乙醚麻醉后处死大鼠,40 g/L多聚甲醛进行心脏灌注,分离右侧下颌骨,固定,EDTA常温脱钙24 d,加入20%Sucrose $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,OCT低温包埋,组织平行牙长轴矢状面制备冰冻切片,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干2 h,PBS清洗10 min,滴加体积分数为3% H_2O_2 (80%甲醇)室温1 h以灭活内源性过氧化物酶活性,滴加正常山羊血清封闭60 min,加入组织蛋白酶K多克隆抗体(1:250) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入生物素化兔抗山羊IgG 60 min,DAB显色,苏木精-伊红复染,显微镜下观察下颌第一磨牙根尖周病变区域组织蛋白酶K的表达,计数组织蛋白酶K阳性细胞数,记录每个标本的连续3张切片的均值。

1.5 主要观察指标 ①MICRO-CT扫描确认大鼠根尖周炎模型构建成功;②MICRO-CT扫描确认根尖周炎骨组织的恢复情况;③免疫组化检测根尖周炎骨破坏标志因子组织蛋白酶K的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 8.0 for Windows软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 选取24只SD大鼠,随机分为根尖周炎组20只及对照组4只,造模后第4周取根尖周炎组及对照组各4只大鼠拍摄MICRO-CT确认根尖周炎动物模型构建成功。在第5周,将剩余16只大鼠根尖周炎动物模型随机分为杜仲醇提取物组及生理盐水组,每组8只,均进入结果分析,中途未出现脱落。

2.2 大鼠根尖周炎动物模型的构建 MICRO-CT结果显示,对照组牙周膜正常未出现明显阴影,根尖周炎组下颌第一磨牙牙周膜出现破坏,根尖周炎骨组织出现吸收,对照组骨吸收体积为(0.222 5 \pm 0.009 0) mm^3 ,根尖周炎组骨吸收体积为(0.945 0 \pm 0.036 9) mm^3 ,两组骨吸收量比较差异有显著性意义($P=0.00$),见图1。

2.3 杜仲醇提取物促进根尖周炎骨组织的修复能力 杜仲醇提取物灌胃4周后,MICRO-CT结果显示,生理盐水组大鼠根尖骨吸收体积增加,但是与灌胃前相比差异无显著性意义($P > 0.05$),杜仲醇提取物组骨吸收体积较灌胃前减小,差异有显著性意义($P < 0.05$)。结果说明杜仲醇提取物可以促进根尖周炎骨组织的愈合,见图2。

2.4 杜仲醇提取物抑制根尖周炎骨破坏标志因子组织蛋白酶K的表达 免疫组化结果显示,生理盐水组在第4周时组织蛋白酶K表达增高,但是与灌注前相比差异无显著性意义($P > 0.05$),第4周时杜仲醇提取物组组织蛋白酶K表达较灌注前减少,差异有显著性意义($P < 0.05$)。说明杜仲醇提取物可降低根尖周炎组织蛋白酶K的表达,见图3。

3 讨论 Discussion

杜仲是一种常用的中草药,其使用历史可以追溯至2000年前,杜仲提取物可以显著抑制骨质破坏、滑膜炎症和全身性炎症^[19-22]。杜仲可通过促进MC3T3-E1成骨细胞增殖与分化成熟,并上调OPG/RANKL的比值,间接抑制破骨细胞的分化和成熟,从而抑制骨吸收,可达到预防与治疗骨质疏松症的目的^[21, 23-26]。此外,杜仲具有一定的抗炎作用,可以通过NF- κ B通路进而抑制多种炎性细胞因子。杜仲可以调节Wnt信号通路进而促进成骨细胞的增殖与分化^[23-24]。根尖周炎是一类由细菌引起的口腔感染性疾病,最终导致牙槽骨的丧失,临床上针对于根尖周炎的治疗不仅仅只是治疗其细菌感染,还需要对其骨组织的愈合进行治疗^[27-29]。目前关于杜仲治疗根尖周炎骨破坏的文章尚无报道指出。与其他提取方法相比,醇提取法可以明显减少杂质,并且已有体外实验表明杜仲醇提取物与水提取物相比更具成骨功能,该实验观察杜仲醇提取物对大鼠根尖周炎组织蛋白酶K的影响。

实验通过髓腔暴露法将牙髓直接暴露在口腔环境中模拟临床根尖周炎发生发展的过程,预实验中分别在1, 2, 3, 4, 5周通过MICRO-CT确定动物模型骨破坏情况^[30-31],结果发现在4周及5周时根尖部位出现明显的骨组织破坏,通过统计学分析显示4周及5周差异无显著性意义,因此在正式实验中选取4周作为实验组。在确定根尖周炎动物模型构建成功后,将16只大鼠根尖周炎动物模型随机分为生理盐水组及杜仲醇提取物组,每组8只。灌胃4周后每组各选取4只拍摄MICRO-CT,分析杜仲醇提取物对根尖周骨组织的修复能力。结果表明,杜仲醇提取物促进根尖周炎骨组织的恢复,差异有显著性意义($P < 0.05$);生理盐水组灌胃4周后,大鼠根尖周炎骨组织的破坏虽然有所增加,但是相对于灌胃前差异无显著性意义。组织蛋白酶K属于半胱氨酸蛋白酶家族成员,它被认为是骨破坏的标志蛋白之一^[32-38]。实验结果发现杜仲醇提取物可以抑制骨破坏标志因子组织蛋白酶K的表达,说明骨组织破坏的程度降低,进而说明杜仲醇提取物可以促进小鼠根尖周炎骨组织的愈

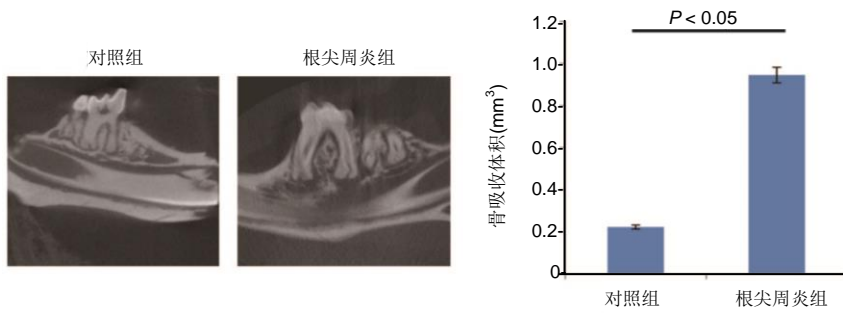
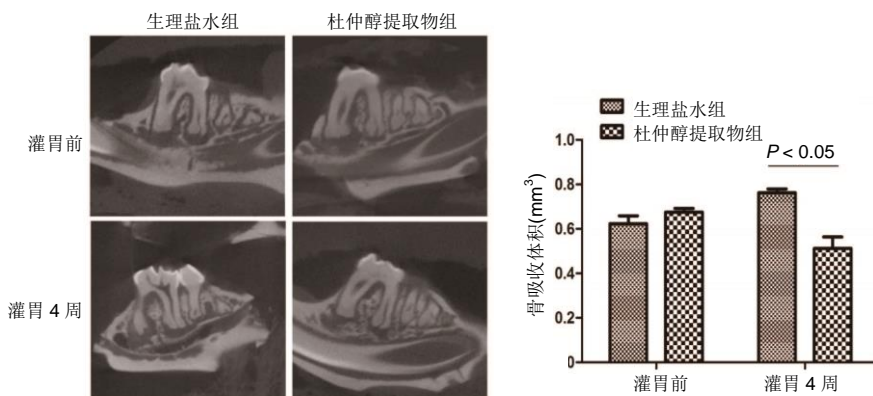


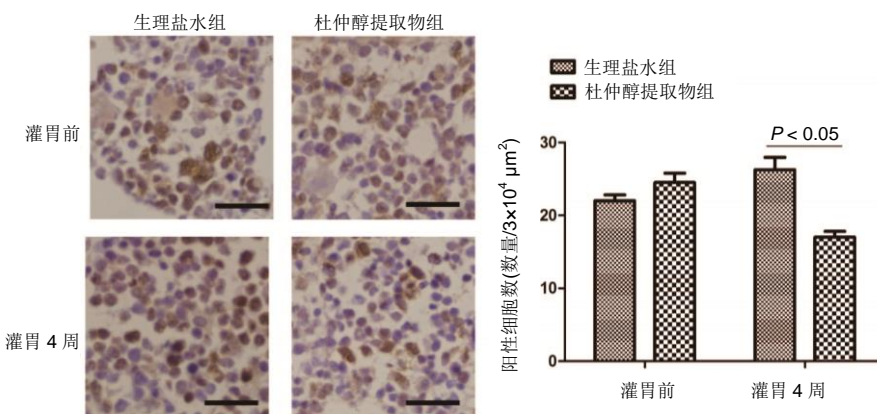
图1 MICRO-CT 分析两组大鼠下颌第一磨牙骨吸收体积

Figure 1 Micro-CT analysis of the bone resorption volume of the mandibular first molars in two groups of rats



图注: 杜仲醇提取物可以促进根尖周炎骨组织的愈合

Figure 2 Micro-CT detection of the periapical bone tissue in periapical periodontitis after repair



图注: 杜仲醇提取物可以降低根尖周炎组织蛋白酶 K 的表达

Figure 3 Immunohistochemical detection of expression of cathepsin K, a marker of bone destruction, in periapical periodontitis (×200)

合, 其结果与MICRO-CT观察一致。

综上所述, 杜仲醇提取物可以抑制根尖周炎大鼠组织蛋白酶K的表达, 促进根尖周炎骨组织的愈合, 但是其具体机制仍需进一步验证。由于杜仲的种类不同, 并且其提取物中有效成分较多, 在以后的实验中需要通过体外细胞实验鉴定其最佳有效成分, 并通过分子生物学确定其促进根尖周炎骨修复的机制。

作者贡献: 实验设计为高阳、吴大雷, 实验实施为吴大雷、周守恒及闫健伟, 实验评估为李博及许诺, 资料收集为史春。

经费支持: 该文章接受了“辽宁省自然科学基金(20180550563)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经大连医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 L20180229。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过大连医科大学统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] YANG NY, ZHOU Y, ZHAO HY, et al. Increased interleukin 1 α and interleukin 1 β expression is involved in the progression of periapical lesions in primary teeth. BMC Oral Health. 2018;18(1):124.
- [2] SIDDIQUI YD, OMORI K, ITO T, et al. Resolvin D2 Induces Resolution of Periapical Inflammation and Promotes Healing of Periapical Lesions in Rat Periapical Periodontitis. Front Immunol. 2019;10:307.
- [3] HOWAIT M, ALBASSAM A, YAMADA C, et al. Elevated Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Inflammatory Bone Resorption Induced in a Mouse Model of Periradicular Periodontitis. J Immunol. 2019;202(7):2035-2043.

- [4] KUDO H, TAKEICHI O, HATORI K, et al. A potential role for the silent information regulator 2 homologue 1 (SIRT1) in periapical periodontitis. *Int Endod J*. 2018;51(7):747-757.
- [5] SHAH A, LEE D, SONG M, et al. Clastic cells are absent around the root surface in pulp-exposed periapical periodontitis lesions in mice. *Oral Dis*. 2018;24(1-2):57-62.
- [6] JIANG C, WANG Q, SONG M, et al. Coronarin D affects TNF- α induced proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol*. 2019;108:104519.
- [7] DONG M, JIN H, ZUO M, et al. The potential effect of Bruton's tyrosine kinase in refractory periapical periodontitis. *Biomed Pharmacother*. 2019;112:108710.
- [8] BAI MM, SHI W, TIAN JM, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitory and anti-inflammatory components from the leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver (duzhong). *J Agric Food Chem*. 2015; 63(8):2198-2205.
- [9] KONG HJ, KANG JH. Efficacy of Juglandis semen complex extract for knee osteoarthritis: A pilot study protocol for a 12-week, single-center, randomized, controlled, double-blind clinical trial. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(34):e16956.
- [10] WANG JY, YUAN Y, CHEN XJ, et al. Extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. ameliorates arthritis via regulation of inflammation, synoviocyte proliferation and osteoclastogenesis in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*. 2016;194:609-616.
- [11] WANG JY, CHEN XJ, ZHANG L, et al. Anti-inflammatory effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. male flower extract on lipopolysaccharide-induced inflammation. *Chin Med J (Engl)*. 2019;132(3):319-328.
- [12] XING YF, HE D, WANG Y, et al. Chemical constituents, biological functions and pharmacological effects for comprehensive utilization of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Food Science and Human Wellness*. 2019;8(2):177-188.
- [13] JIA J, LIU M, WEN Q, et al. Screening of anti-complement active ingredients from *Eucommia ulmoides* Oliv. branches and their metabolism in vivo based on UHPLC-Q-TOF/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019;1124:26-36.
- [14] WANG CY, TANG L, HE JW, et al. Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Eucommia ulmoides*: A Review. *Am J Chin Med*. 2019;47(2):259-300.
- [15] TANGPAKDEE J, TANAKA Y, SHIBA K, et al. Structure and biosynthesis of trans-polyisoprene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry*. 1997;45(1):75-80.
- [16] HE X, WANG J, LI M, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):78-92.
- [17] WANG JY, CHEN XJ, ZHANG L, et al. Comparative Studies of Different Extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. against Rheumatoid Arthritis in CIA Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;2018:7379893.
- [18] FANG C, CHEN L, HE M, et al. Molecular mechanistic insight into the anti-hyperuricemic effect of *Eucommia ulmoides* in mice and rats. *Pharm Biol*. 2019;57(1):112-119.
- [19] SUN WT, XU XY, LI XQ, et al. Effects of dietary geniposidic acid on growth performance, flesh quality and collagen gene expression of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture Nutrition*. 2018; 24(3): 1112-1121.
- [20] HUANG H, PAN L, PAN S, et al. Effects of dietary herbal formulae combined by *Astragalus* polysaccharides, chlorogenic acid and allicin in different combinations and proportions on growth performance, non-specific immunity, antioxidant status, vibriosis resistance and damage indexes of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 2018; 49(2): 701-716.
- [21] FUJIWARA A, NISHI M, YOSHIDA S, et al. *Eucommicin A*, a β -truxinate lignan from *Eucommia ulmoides*, is a selective inhibitor of cancer stem cells. *Phytochemistry*. 2016;122:139-145.
- [22] LUO LF, WU WH, ZHOU YJ, et al. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats. *J Ethnopharmacol*. 2010;129(2):238-243.
- [23] ZHU MQ, XU WZ, WEN JL, et al. Dynamic changes of photosynthetic properties and chemical compositions of *Eucommia ulmoides* Oliver under two planting models. *Industrial Crops and Products*. 2017; 96: 46-56.
- [24] YIN CM, DUAN YN, XIANG L, et al. Effects of phloridzin, phloretin and benzoic acid at the concentrations measured in soil on the root proteome of *Malus hupehensis* Rehd Seedlings. *Scientia Horticulturae*. 2018; 228: 10-17.
- [25] DENG Y, MA F, RUIZ-ORTEGA LI, et al. Fabrication of strontium *Eucommia ulmoides* polysaccharides and in vitro evaluation of their osteoimmunomodulatory property. *Int J Biol Macromol*. 2019; 140:727-735.
- [26] ZHU MQ, WEN JL, SU YQ, et al. Effect of structural changes of lignin during the autohydrolysis and organosolv pretreatment on *Eucommia ulmoides* Oliver for an effective enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol*. 2015;185:378-385.
- [27] ISHII K, HATORI K, TAKEICHI O, et al. Expression of the Forkhead box transcription factor Foxo3a in human periapical granulomas. *J Oral Sci*. 2018;60(4):479-483.
- [28] SALLES AG, ANTUNES LAA, KÜCHLER EC, et al. Association between Apical Periodontitis and Interleukin Gene Polymorphisms: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod*. 2018;44(3):355-362.
- [29] RÔÇAS IN, SIQUEIRA JF JR. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. *PLoS One*. 2018;13(1): e0190469.
- [30] CHEN S, LEI H, LUO Y, et al. Micro-CT analysis of chronic apical periodontitis induced by several specific pathogens. *Int Endod J*. 2019;52(7):1028-1039.
- [31] WANG L, JIN H, AO X, et al. JAK2-STAT3 signaling pathway is involved in rat periapical lesions induced by *Enterococcus faecalis*. *Oral Dis*. 2019;25(7):1769-1779.
- [32] HADAYA D, SOUNDIA A, GKOUVERIS I, et al. Development of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw After Extraction of Teeth With Experimental Periapical Disease. *J Oral Maxillofac Surg*. 2019;77(1):71-86.
- [33] LOTINUN S, ISHIIHARA Y, NAGANO K, et al. Cathepsin K-deficient osteocytes prevent lactation-induced bone loss and parathyroid hormone suppression. *J Clin Invest*. 2019;129: 3058-3071.
- [34] FANG W, HE A, XIANG MX, et al. Cathepsin K-deficiency impairs mouse cardiac function after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;127:44-56.
- [35] PANG M, RODRÍGUEZ-GONZALEZ M, HERNANDEZ M, et al. AP-1 and Mitf interact with NFATc1 to stimulate cathepsin K promoter activity in osteoclast precursors. *J Cell Biochem*. 2019; 120(8):12382-12392.
- [36] WALIA B, LINGENHELD E, DUONG L, et al. A novel role for cathepsin K in periosteal osteoclast precursors during fracture repair. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1415(1):57-68.
- [37] MONS E, JANSEN IDC, LOBODA J, et al. The Alkyne Moiety as a Latent Electrophile in Irreversible Covalent Small Molecule Inhibitors of Cathepsin K. *J Am Chem Soc*. 2019;141(8): 3507-3514.
- [38] LEUSINK FK, KOUDOUNARAKIS E, FRANK MH, et al. Cathepsin K associates with lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2018;18(1):385.