

2型糖尿病伴牙周炎模型大鼠胰腺自噬及胰岛素相关基因蛋白的表达

<https://doi.org/10.12307/2022.926>

都沙沙, 蔡智国, 杨琨, 刘琪

投稿日期: 2021-05-28

送审日期: 2021-06-01

采用日期: 2021-08-06

在线日期: 2021-11-06

中图分类号:

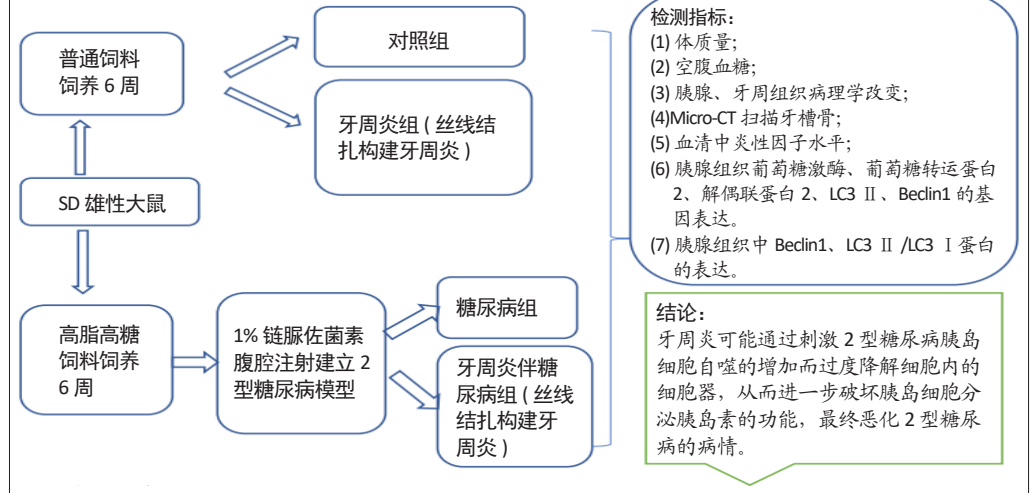
R459.9; R318; R587.1

文章编号:

2095-4344(2022)29-04605-06

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

牙周炎与糖尿病的关系:近年来, 糖尿病与牙周炎之间的双向关系得到学者们的广泛认可, 目前有关糖尿病对牙周炎影响的机制研究较多, 主要集中在高血糖所致的高炎症状态, 破骨活动增强和骨修复减弱的骨代谢平衡失调, 糖基化终末产物及其受体间的相互作用; 然而牙周病对糖尿病影响的研究较少, 故此次研究探讨牙周炎对糖尿病胰腺组织自噬的影响。

自噬:适当的自噬可以清除体内受损的细胞器, 而过度的自噬可使细胞器被过度降解从而导致细胞功能受损。

摘要

背景:糖尿病易引发全身多种器官发生病变, 牙周炎是其并发症之一, 牙周炎炎症程度越重, 越不利于血糖控制。

目的:通过建立动物模型探索牙周炎对2型糖尿病大鼠胰腺组织自噬的影响。

方法:40只雄性6周龄SD大鼠随机分为对照组和实验组, 又将实验组分为糖尿病组、牙周炎组和糖尿病伴牙周炎组, 每组10只。高脂高糖喂养+腹腔注射链脲佐菌素构建糖尿病模型, 丝线结扎法构建牙周炎模型。ELISA法检测血清中炎症因子表达水平; 实时荧光定量PCR检测胰腺组织中自噬及胰岛素分泌相关基因的表达; Western Blot法检测胰腺组织中自噬相关蛋白的表达。

结果与结论:①ELISA结果显示, 糖尿病组、牙周炎组及糖尿病伴牙周炎组的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6表达水平较对照组依次增加($P < 0.05$); ②实时荧光定量PCR结果显示, 与对照组相比, 糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组的葡萄糖激酶、葡萄糖转运蛋白2 mRNA表达水平均下降, 糖尿病伴牙周炎组的表达下降最多($P < 0.05$); 同时糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组的解偶联蛋白2、Beclin1、LC3 II mRNA表达均增加, 糖尿病伴牙周炎组的表达增加最多($P < 0.05$); 但牙周炎组与对照组各指标相比差异无显著性意义($P > 0.05$); ③Western Blot结果显示, 相较于对照组, 糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组的Beclin1、LC3 II /LC3 I 表达均增加, 糖尿病伴牙周炎组表达增加最多($P < 0.05$); 但牙周炎组与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$); ④推测2型糖尿病大鼠患牙周炎后可能诱导其胰岛细胞过度自噬, 进而影响胰岛细胞分泌胰岛素的功能, 最终加剧糖尿病病情。

关键词:糖尿病; 牙周炎; 自噬; 胰岛素分泌; 炎症因子

缩略语:葡萄糖转运蛋白2: recombinant glucose transporter 2, GLUT-2

Pancreatic autophagy and protein expression of insulin-related genes in type 2 diabetic rats with periodontitis

Du Shasha, Cai Zhiguo, Yang Kun, Liu Qi

Department of Periodontology, Hospital of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Du Shasha, Master, Physician, Department of Periodontology, Hospital of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Corresponding author: Liu Qi, MD, Professor, Department of Periodontology, Hospital of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

遵义医科大学附属医院口腔科, 贵州省遵义市 563003

第一作者: 都沙沙, 女, 1991年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 2019年遵义医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事牙周炎与2型糖尿病的关系研究。

通讯作者: 刘琪, 博士, 教授, 遵义医科大学附属医院口腔科, 贵州省遵义市 563003

<https://orcid.org/0000-0002-1313-2374> (都沙沙)

基金资助:国家自然科学基金资助项目(81860196), 课题名称: 2型糖尿病伴牙周炎牙周膜干细胞凋亡转归的线粒体损伤、自噬失调机制研究, 项目负责人: 刘琪

引用本文: 都沙沙, 蔡智国, 杨琨, 刘琪. 2型糖尿病伴牙周炎模型大鼠胰腺自噬及胰岛素相关基因蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(29):4605-4610.



Abstract

BACKGROUND: Diabetes is prone to cause multiple organ diseases in the body. Periodontitis is one of the complications. The more severe the inflammation of periodontitis is, the less favorable it is for glycemic control.

OBJECTIVE: To investigate the effect of periodontitis on autophagy of pancreatic tissue in a rat model of type 2 diabetes mellitus.

METHODS: Forty 6-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group and an experimental group, and rats in the experimental group were subdivided into three groups ($n=10$ per group): a diabetes group, a periodontitis group, and a diabetes+periodontitis group. High fat and high sugar feeding+intraperitoneal injection of streptozotocin was used to establish a diabetic model, and silk thread ligation was used to establish a periodontitis model. Enzyme-linked immune sorbent assay was used to detect the expression of inflammatory factors in rat serum. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of autophagy and insulin secretion-related genes in rat pancreatic tissue. Western blot was used to detect the protein expression of autophagy-related in rat pancreatic tissue.

RESULTS AND CONCLUSION: The results of enzyme-linked immunosorbent assay showed that the expression of tumor necrosis factor α , interleukin 1β , and interleukin 6 was increased sequentially in the diabetes group, the periodontitis group, and the diabetes+periodontitis group compared with that in the control group ($P < 0.05$). The results of real-time fluorescent quantitative PCR showed that, compared with the control group, the mRNA expression of glucokinase and recombinant glucose transporter 2 was decreased in the diabetes group and the diabetes+periodontitis group, especially in the diabetes+periodontitis group ($P < 0.05$). At the same time, the mRNA expression of uncoupling protein 2, Beclin1, and LC3II was increased in the diabetes group and the diabetes+periodontitis group, and increased most in the diabetes+periodontitis group ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between the periodontitis group and the control group ($P > 0.05$). The results of western blot showed that, compared with the control group, the expression of Beclin1, LC3II/LC3I was increased in the diabetes group and the diabetes+periodontitis group, and increased most in the diabetes+periodontitis group ($P < 0.05$). And there was no significant difference between the periodontitis group and the control group ($P > 0.05$). Therefore, it is speculated that type 2 diabetes mellitus with periodontitis may induce excessive autophagy of pancreatic islet cells, then impact the secretion function of insulin in islet cells, and finally aggravate the development of diabetes mellitus in the rat models.

Key words: diabetes; periodontitis; autophagy; insulin secretion; inflammatory factor

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81860196 (to LQ)

How to cite this article: DU SS, CAI ZG, YANG K, LIU Q. Pancreatic autophagy and protein expression of insulin-related genes in type 2 diabetic rats with periodontitis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(29):4605-4610.

0 引言 Introduction

自噬是一把双刃剑,适当的自噬可以清除体内受损的细胞器,然而过度的自噬可使细胞器被过度降解从而导致细胞功能受损,甚至发生自噬性细胞死亡^[1]。自噬与炎症相关性疾病密切相关^[2],牙周炎患者的牙周膜干细胞自噬水平升高,促进细胞发生自噬性死亡,同时伴随大量细胞因子白细胞介素 1β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 分泌增加,最终加重牙周炎炎症^[3-5]。研究显示,与非糖尿病者的胰腺组织比较,2型糖尿病患者的胰腺 β 细胞有自噬泡和自噬体的积累,存在过度的自噬,导致 β 细胞的死亡数目明显增加^[6]。

牙周炎与2型糖尿病之间互相影响,糖尿病可加剧牙周组织的破坏,作者所在团队前期研究发现糖尿病伴牙周炎患者牙周膜干细胞比牙周炎患者牙周膜干细胞的自我更新、增殖、成骨、成脂能力均降低^[7-9]。牙周炎又可加重机体全身炎症状态,促进2型糖尿病及其并发症的发生发展^[10-11]。但牙周炎是如何影响糖尿病的发展以及是否存在过度自噬,目前还不甚清楚。此次实验拟通过建立糖尿病伴牙周炎动物模型,探讨2型糖尿病伴牙周炎模型大鼠胰腺自噬及胰岛素相关基因蛋白的表达,为解释牙周炎影响糖尿病病情发展的可能机制奠定实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,组间比较采用单因素方差分析,有差异再用SNK法进行两两比较。

1.2 时间及地点 实验于2016年5月至2019年9月在遵义医科大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级健康6周龄雄性SD大鼠40只,体重180-220g,由解放军第三军医大学大坪动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)2012-0005,实验动物伦理学批准编号:[2016]2-068。

按随机数字法分为对照组($n=10$)、实验组($n=30$);实验组又分为糖尿病组、牙周炎组及糖尿病伴牙周炎组,每组10只。

1.3.2 实验试剂 链脲佐菌素(Sigma,美国);Trizol裂解液(Takara,日本);反转录试剂盒(Takara,日本)、PCR试剂盒(Takara,日本),ELISA试剂盒(RD,美国);BCA蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio,中国);Beclin1、LC3 II、LC3 I兔抗鼠单克隆抗体(Sigma,美国)等。

1.3.3 实验仪器 PCR反转录仪(Thermal Cycler,美国);PCR仪(BIO-RAD,美国);酶标仪(TEC-CAN,奥地利);倒置相差显微镜(Olympus,美国);Western Blot 荧光感应曝光机(Odyssey,美国)等。

1.4 方法

1.4.1 2型糖尿病模型造模 高脂高糖饲料饲养糖尿病组和糖尿病伴牙周炎组大鼠,6周后按35 mg/kg腹腔注射1%的链脲佐菌素,3d后以空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L,且稳定1周作为2型糖尿病大鼠成模标准^[12-13]。

1.4.2 牙周炎模型造模 糖尿病伴牙周炎组大鼠在糖尿病模型建立成功后建立牙周炎模型,牙周炎组也在此时造模,0.3%戊巴比妥钠(10 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠后探针分离牙龈,将3-0丝线双股结扎双侧上颌第一、二磨牙牙颈部,共7周^[14]。第14周末麻醉处死大鼠取双侧上颌牙槽骨行苏木精-伊红染色及Micro-CT检测。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的:	探讨牙周炎对 2 型糖尿病大鼠胰腺组织自噬相关指标的影响
选择动物的条件:	SPF 级健康 6 周龄雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 180-220 g
模型与所研究疾病的关系:	建立 2 型糖尿病与牙周炎模型探究牙周炎对 2 型糖尿病胰腺自噬的影响
动物来源及品系:	SPF 级健康 6 周龄 SD 大鼠由解放军第三军医大学大坪动物中心提供
造模技术描述:	①牙周炎模型: 麻醉后用探针分离双侧上颌第一、二磨牙近远中颊舌向的牙龈, 将 3-0 丝线双股结扎于颈部, 以完全没入牙龈为准, 每周检查丝线一次, 有脱落者及时重新结扎, 共 7 周; ②糖尿病模型: 高脂高糖饲料喂养大鼠 6 周后按 35 mg/kg 腹腔注射 1% 链脲佐菌素; ③牙周炎伴糖尿病模型: 大鼠在糖尿病模型建立成功后采用丝线结扎的方式建立牙周炎模型
动物数量及分组	SD 大鼠 40 只, 随机分组
方法:	
造模成功评价指标:	①牙周炎模型成功标准: 上颌牙槽骨牙周组织: 结合上皮向根方增殖进而形成深牙周袋, 胶原纤维排列紊乱、水肿、变性、丧失; 上颌牙槽骨根分叉暴露, 牙槽骨吸收表明牙周炎大鼠模型建成; ②2 型糖尿病模型成功标准: 注射 1% 链脲佐菌素, 3 d 后以空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 且稳定 1 周作为 2 型糖尿病大鼠成模标准
造模后观察指标:	体质量、血糖, 胰腺及牙周组织病理学变化, Micro-CT 扫描牙槽骨, 血清中炎症因子, 胰腺组织中自噬及胰岛素分泌相关基因、蛋白等指标
造模后动物处理:	取上颌牙槽骨、血清、胰尾进行相关指标的检测
伦理委员会批准:	实验动物伦理学批准编号: [2016]2-068

1.4.3 体质量监测 分别于第 0, 6, 14 周测各组大鼠体质量。

1.4.4 空腹血糖检测 分别于第 0, 6, 7 周 (链脲佐菌素注射后 1 周)、第 14 周尾静脉采血, 用血糖仪测空腹血糖, 观察各组大鼠血糖水平变化。

1.4.5 胰腺与牙周组织病理学改变 取上颌骨固定、脱钙, 将胰尾和脱钙好的上颌骨分别制成石蜡包块, 切片, 脱水, 苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察胰腺和牙周组织病理学变化。

1.4.6 Micro-CT 扫描牙槽骨 取上颌牙槽骨 (与牙周组织病理学取材区域对应) 进行 Micro-CT 扫描, 第一、二磨牙近中及远中釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离, 测量 3 次, 平均值定为该标本的牙槽骨吸收值。

1.4.7 ELISA 法检测血清中炎症因子的表达 各组大鼠麻醉处死后取腹主动脉血, 离心分离血清; 严格按照 ELISA 试剂盒操作步骤, 检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 6 的表达水平。

1.4.8 实时荧光定量 PCR 检测胰腺组织中自噬及胰岛素分泌相关基因的表达 称取胰腺胰尾组织 50 mg, 提取总 RNA, 测量其浓度及纯度, 反转录试剂盒合成 cDNA, 葡萄糖激酶、葡萄糖转运蛋白 2 (recombinant glucose transporter 2, GLUT-2)、解偶联蛋白 2、LC3 II、Beclin1 和 GAPDH 基因序列见表 1。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 65 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 95 °C 1 min。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计分析。

表 1 | 目的基因引物序列

Table 1 | Primer sequences of target genes

基因	引物序列 (5'→3')
GAPDH	Upstream: AAT GGG CAG CCG TTA GGA AA; Downstream: GCG CCC AAT ACG ACC AAA TC
葡萄糖激酶	Upstream: ACT CAC AAC GGG CAC ATG AA3; Downstream: AGC ACA AGT CGT ACC AGC TC
解偶联蛋白 2	Upstream: TGT GGT AAA GGT CCG CTT CC; Downstream: TGA GCT TGC TTT ATG GGC GA
葡萄糖转运蛋白 2	Upstream: AAT TCA CCT CCG CTT GCT CC; Downstream: ACC ATT CCG CCT ACT GCA AA
Beclin1	Upstream: AGC AGC TGG AGT TGG ATG AC; Downstream: CCA GAT GTG GAA GGT GGC AT
LC3 II	Upstream: TAC ATG GTC TAC GCC TCC CA; Downstream: GCC TAA TCC ACT GGG GAC TG3

1.4.9 Western Blot 检测胰腺组织中自噬蛋白的表达 取 100 mg 胰腺胰尾组织, 用细胞裂解液进行总蛋白提取; 用 BCA 法测定蛋白浓度; SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 免疫反应; 最后进行化学发光反应检测各组 Beclin1、LC3 II /LC3 I 蛋白的表达, 目的条带灰度值读取并进行数据分析。

1.5 主要观察指标 检测体质量、空腹血糖; Micro-CT 扫描上颌牙槽骨; 苏木精-伊红染色观察胰腺及牙槽骨病理学变化; ELISA 法检测血清中炎症因子; 实时荧光定量 PCR 检测胰腺组织中葡萄糖激酶、GLUT-2、解偶联蛋白 2、LC3 II、Beclin1 基因的表达水平; Western Blot 法检测胰腺组织中 Beclin1、LC3 II /LC3 I 蛋白的表达水平。

1.6 统计学分析 数据录入 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 结果描述以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 有差异再用 SNK 法进行两两比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

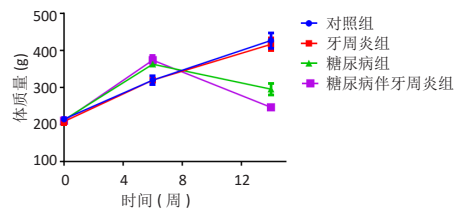
2.1 实验动物数量分析 对照组 10 只纳入结果分析, 糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组因糖尿病导致各脱失 1 只, 各模型组每组 8 只纳入结果分析。

2.2 糖尿病模型评估 体质量变化: 高糖高脂饲养 6 周后, 糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组的体质量较对照组、牙周炎组明显增加 ($P < 0.05$); 但 14 周时却较对照组、牙周炎组减轻, 且糖尿病伴牙周炎组减轻最多 ($P < 0.05$), 见图 1。

空腹血糖变化: 高糖高脂饲养 6 周后, 对照组和实验组间无显著性差异 ($P > 0.05$); 第 7 周时, 糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组高于对照组、牙周炎组 ($P < 0.05$); 并且在第 14 周时, 糖尿病伴牙周炎组最高 ($P < 0.05$), 见图 2。

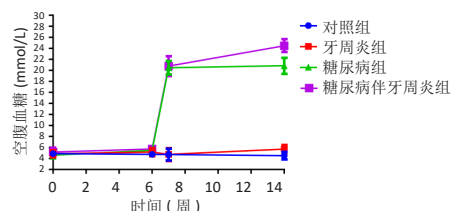
2.3 牙周炎模型评估 Micro-CT 结果显示, 牙周炎组、糖尿病伴牙周炎组第一、二磨牙牙槽骨较对照组、糖尿病组明显吸收, 根分叉暴露, 且糖尿病伴牙周炎组牙槽骨吸收最为显著, 出现牙周炎影像学表现, 这表明实验动物牙周炎模型建立成功, 见图 3。

釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离显示, 对照组与糖尿病组牙槽骨吸收程度无差异 ($P > 0.05$), 牙周炎组和糖尿病伴牙周炎组牙槽骨吸收均加剧 ($P < 0.05$), 其中糖尿病伴牙周炎组吸收最多 ($P < 0.05$), 见表 2。



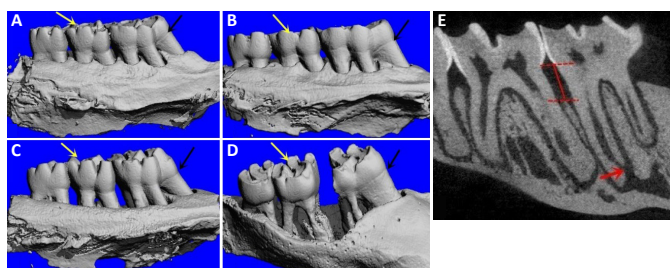
图注：6 周后，糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组的体质量较对照组、牙周炎组明显增加 ($P < 0.05$)；但 14 周时却较对照组、牙周炎组减轻，且糖尿病伴牙周炎组减轻最多 ($P < 0.05$)

图 1 | 各组大鼠不同时点体质量的变化
Figure 1 | Changes in rat body mass at different time points



图注：第 7 周时，糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组高于对照组、牙周炎组 ($P < 0.05$)；并且在第 14 周时，糖尿病伴牙周炎组最高 ($P < 0.05$)

图 2 | 各组大鼠不同时点空腹血糖的变化
Figure 2 | Changes in rat fasting blood glucose level at different time points



图注：图 A-D 分别为对照组、糖尿病组、牙周炎组、糖尿病伴牙周炎组大鼠牙槽骨吸收情况 3D 图；图 E 为第一、二磨牙近中 / 远中釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离。黑色箭头示第一磨牙；黄色箭头示第二磨牙；红色箭头示根尖孔

图 3 | 各组大鼠牙槽骨吸收情况 3D 图及釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离测量示意图

Figure 3 | Three-dimensional diagram of alveolar bone resorption and the measurement of the distance from the enamel-cementum boundary to the alveolar crest in rats

表 2 | Micro-CT 检测各组大鼠牙槽骨吸收量 ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mm}$)
Table 2 | Micro-CT detection of rat alveolar bone resorption

组别	第一磨牙	第二磨牙
对照组	0.845±0.042	0.614±0.132
糖尿病组	1.013±0.154	0.631±0.140
牙周炎组	1.322±0.055 ^{ab}	1.248±0.173 ^{ab}
糖尿病伴牙周炎组	2.120±0.206 ^{abc}	2.183±0.150 ^{abc}
F 值	54.224	72.874
P 值	0.001	0.001

表注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与糖尿病组比较，^b $P < 0.05$ ；与牙周炎组比较，^c $P < 0.05$

2.4 牙周组织病理改变 镜下见对照组、糖尿病组牙槽嵴顶高度正常，结合上皮附着于釉牙骨质界处，胶原纤维束呈现多种排列方式；牙周炎组、糖尿病伴牙周炎组牙槽骨嵴顶吸收，高度降低，结合上皮向根方增殖进而形成深牙周袋，胶原纤维排列紊乱、水肿、变性、丧失，结合 Micro-CT 扫描结果表明牙周炎大鼠模型建成，见图 4。

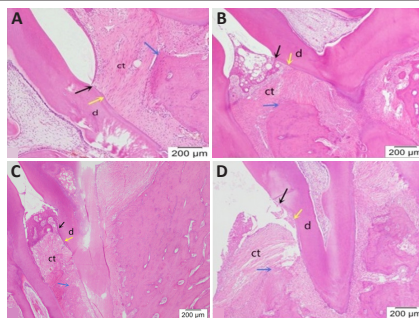


图 4 | 各组大鼠牙周组织病理改变 (苏木精-伊红染色, $\times 400$)

Figure 4 | Pathological changes of rat periodontal tissue (hematoxylin-eosin staining, $\times 400$)

图注：图 A-D 分别为对照组、糖尿病组、牙周炎组、糖尿病伴牙周炎组。d 示牙本质；ct 示结缔组织；黑色箭头示釉牙骨质界；黄色箭头示牙骨质；蓝色箭头示牙槽嵴顶

2.5 大鼠胰腺组织病理学改变 见图 5。

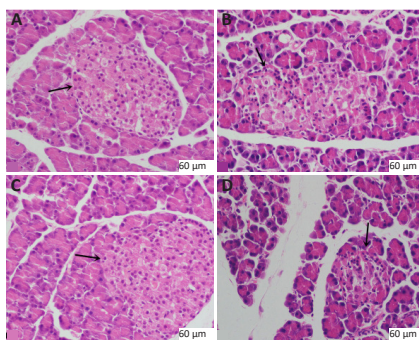


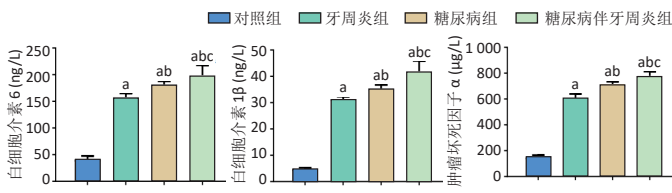
图 5 | 大鼠胰腺组织病理学改变 (苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Figure 5 | Histopathological changes of rat pancreatic tissue (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图注：图 A-D 分别为对照组、糖尿病组、牙周炎组、糖尿病伴牙周炎组。箭头示大鼠胰岛

对照组和牙周炎组大鼠胰岛结构正常，胰岛内细胞分布均匀，排列紧密，包浆丰富，胰岛与外分泌腺分界清楚，周围腺体细胞排列紧密，见图 5A, C。糖尿病组大鼠的胰岛细胞与外分泌腺界限模糊，胰岛内细胞排列疏松，周围腺体排列较松散，见图 5B。糖尿病伴牙周炎组胰岛体积显著减小，胰岛细胞数量锐减，胰岛与外分泌腺界限不清，周围腺体细胞排列十分松散，见图 5D。

2.6 血清炎性因子的 ELISA 检测结果 与对照组相比，糖尿病组、牙周炎组及糖尿病伴牙周炎组白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 的表达水平依次增加 ($P < 0.05$)，见图 6。



图注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与糖尿病组比较，^b $P < 0.05$ ；与牙周炎组比较，^c $P < 0.05$

图 6 | 各组大鼠血清白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 及肿瘤坏死因子 α 的表达水平
Figure 6 | Expression levels of interleukin 6, interleukin 1 β and tumor necrosis factor α in rat serum

2.7 实时荧光定量 PCR 检测胰岛素分泌及自噬相关基因的表达 牙周炎组葡萄糖激酶、GLUT-2 的基因表达量较对照组降低，但二者差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；糖尿病组和糖尿病

伴牙周炎组葡萄糖激酶、GLUT-2 的表达量较对照组均降低，且糖尿病伴牙周炎组降低最多 ($P < 0.05$)，见图 7A, B。

牙周炎组解偶联蛋白 2、Beclin1、LC3 II 的表达较对照组增加，但二者差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组的表达较对照组均升高，且糖尿病伴牙周炎组增加最多 ($P < 0.05$)，见图 7C-E。

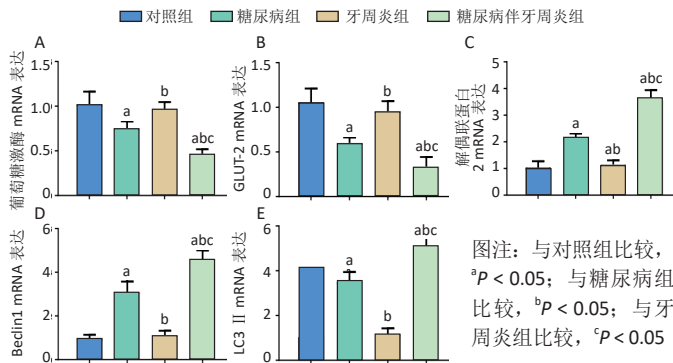
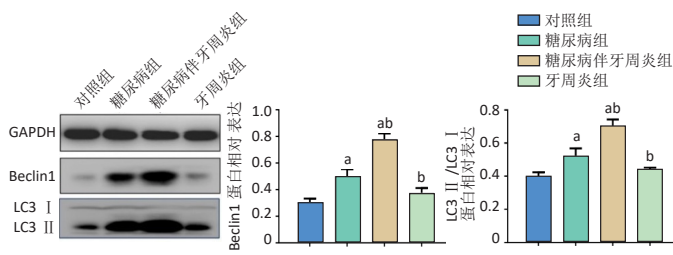


图 7 | 各组大鼠胰腺组织中葡萄糖激酶 (A)、葡萄糖转运蛋白 2 (GLUT-2) (B)、解偶联蛋白 2 (C)、Beclin1 (D)、LC3 II (E) 基因的表达

Figure 7 | Expression of glucokinase (A), recombinant glucose transporter 2 (B), uncoupling protein 2 (C), Beclin1 (D) and LC3II (E) genes in rat pancreatic tissue

2.8 Western Blot 检测自噬相关蛋白的表达 与对照组比较，牙周炎组 Beclin1、LC3 II /LC3 I 表达增加，但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；糖尿病组及糖尿病伴牙周炎组表达量增加 ($P < 0.05$)，糖尿病伴牙周炎组增加最多 ($P < 0.05$)，见图 8。



图注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与糖尿病组比较，^b $P < 0.05$

图 8 | 各组大鼠胰腺组织中 Beclin1、LC3 II /LC3 I 蛋白的表达水平

Figure 8 | Protein expression of Beclin1 and LC3II/LC3I in rat pancreatic tissue

3 讨论 Discussion

自噬是机体对废用的蛋白和细胞器进行降解，并对一些糖类、蛋白质再利用的过程，在细胞稳态的维持中发挥重要作用^[15]。自噬在生理状态下对维持细胞的生理功能至关重要，而过度的自噬可导致细胞自噬性死亡，致使机体生理功能障碍，最终加剧疾病的发生和发展^[16]。炎症性疾病与自噬密切相关，研究表明炎症因子在调节自噬方面有着重要作用，炎症因子如白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 等能诱导自噬的激活^[17-18]。此次实验结果显示糖尿病组与牙周炎组血清白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 炎症因子表达水平均增加，但牙周炎组更高，推测炎症因子可能通过受损的牙周组织进入血液循环中，致使其含量升高。而糖尿病是一种慢性低度炎症反应，与传统典型炎症反应不

同，没有典型的红、肿、热、痛炎症反应，却有相关炎症递质的升高，因此通常被称之为“低度炎症”或“代谢性炎症”^[19]，这提示其全身循环系统中炎症因子的水平可能不及牙周炎。糖尿病伴牙周炎组的炎症因子表达量最高，因此推测，在 2 型糖尿病的基础上，牙周炎发生时从牙周组织进入全身血液循环中的炎症因子与机体内存在的低度炎症状态可能产生协同作用，致使血清中炎症因子的表达量升高。

2 型糖尿病是胰岛素绝对或相对缺乏引起的代谢性疾病^[20]。葡萄糖激酶是糖代谢和胰岛素分泌调节中的关键酶，该酶催化葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖^[21]，主要存在于肝细胞和胰岛 β 细胞中，其在胰岛 β 细胞中可以识别葡萄糖分子，在转录后水平调节葡萄糖激酶的表达，但此种调节只在葡萄糖生理浓度时较敏感。如果血糖持续升高，此种调节不敏感，其活性减低可导致胰岛素分泌不足与葡萄糖代谢紊乱^[22-23]。GLUT2 是一类能转运葡萄糖的膜蛋白，是胰岛 β 细胞主要的葡萄糖转运体，生理条件下，葡萄糖经 GLUT2 转运进入细胞内，该蛋白与葡萄糖激酶共同形成葡萄糖感受器，调节胰岛素的合成与分泌^[24]。在实验性糖尿病动物模型中，观察到胰岛素分泌受损与胰岛 β 细胞 GLUT2 的表达降低显著有关，且糖尿病胰岛 β 细胞的特征之一便是 GLUT2 表达减少^[25]。解偶联蛋白 2 是存在于线粒体内膜上的转运蛋白，该蛋白解偶联氧化磷酸化使细胞内 ATP 降低^[26]。胰岛 β 细胞分泌胰岛素过程中需要 ATP 的参与，胰岛 β 细胞中绝大部分 ATP 的产生依赖线粒体氧化磷酸化过程。胰岛 β 细胞中解偶联蛋白 2 的高表达使细胞内 ATP 生产减少，从而导致胰岛素分泌降低，最终促进糖尿病的发生发展^[27-28]。此次实验结果显示，葡萄糖激酶、GLUT-2 的表达为对照组、牙周炎组、糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组依次降低，解偶联蛋白 2 的表达与之相反，但牙周炎组与对照组差异无显著性意义，推测单纯牙周炎时，其尚不足以引起大鼠胰岛细胞分泌胰岛素功能异常；而当糖尿病伴牙周炎时，牙周炎可加重破坏糖尿病大鼠胰岛细胞分泌胰岛素的功能。胰腺组织病理学改变，与糖尿病组相比，糖尿病伴牙周炎组胰腺细胞胞质明显排列不紧密、胰岛明显变小、胰岛细胞数量变少等病变进一步加重。

为进一步探讨牙周炎加重糖尿病病情是否与增加胰岛细胞自噬反应有关，检测了 Beclin1、LC3 II 的表达。Beclin1 基因作为酵母 ATG6 的同系物，常作为自噬反应的特异性基因^[29-30]。另一种自噬标志物，即 LC3，当体内发生自噬反应时，细胞浆型 LC3 (即 LC3 I) 会酶解掉一小段多肽，转变为膜型 (即 LC3 II)，机体内自噬水平的高低可通过检测 LC3 II 的表达水平来进行评估^[31-32]。此次实验结果显示，对照组、牙周炎组、糖尿病组、糖尿病伴牙周炎组 Beclin1、LC3 II 的基因与蛋白的表达依次增加，且牙周炎组与对照组的表达差异无显著性意义，推测糖尿病伴牙周炎时，牙周炎可能通过刺激大鼠胰岛细胞自噬作用的增加从而加重糖尿病病情。

综上推测牙周炎可能通过刺激 2 型糖尿病胰岛细胞自噬的增加而过度降解细胞内的细胞器，从而进一步破坏胰岛细

胞分泌胰岛素的功 能，最终恶化 2 型糖尿病的病情。这将为进一步探索牙周炎影响糖尿病病情发展的可能机制和糖尿病及其并发症的防治提供新的思路和途径。

致谢：感谢遵义医科大学动物实验中心的各位老师及导师刘琪教授在实验中提供的帮助和指导。

作者贡献：第一作者和通讯作者负责实验设计，所有作者参与实验实施及指标测定。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(81860196)”的基金资助。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：实验方案经遵义医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为 [2016]2-068。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遵义医科大学专家审核。

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] NOBORU M. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol.* 2018;20(5):521-527.

[2] DERETIC V, KLIONSKY DJ. Autophagy and inflammation: A special review issue. *Autophagy.* 2018;14(2):179-180.

[3] BULLON P, CORDERO MD, QUILES JL, et al. Autophagy in periodontitis patients and gingival fibroblasts: unraveling the link between chronic diseases and inflammation. *BMC Med.* 2012;10:122.

[4] ZHOU W, NI J, SHU R, et al. Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1 α pathway. *Cell Proliferation.* 2012;45(3):239-248.

[5] WANG Q, XUE P, ZHANG Y, et al. Increased autophagy is required to protect periodontal ligament stem cells from apoptosis in inflammatory microenvironment. *J Clin Periodontol.* 2016;43(7):618-625.

[6] 杨雯雯, 魏巍, 张丽. 自噬相关蛋白在 2 型糖尿病大鼠胰腺组织中的变化 [J]. *新疆医科大学学报*, 2019,42(6):739-742,747.

[7] 刘尔黎, 钟雯怡, 刘增一, 等. 2 型糖尿病伴牙周炎牙周膜干细胞成牙骨质分化能力的研究 [J]. *遵义医科大学学报*, 2020,43(5):599-605.

[8] 夏佳佳, 王岚, 刘琪, 等. 2 型糖尿病伴牙周炎患者牙周膜干细胞骨向分化研究 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2011,27(5):624-629.

[9] HUI F, KUN Y, PING T, et al. Glycosylation end products mediate damage and apoptosis of periodontal ligament stem cells induced by the JNK-mitochondrial pathway. *Aging.* 2020;12(13):12850-12868.

[10] 杨靖靖, 刘明宏, 吴迎涛. 牙周病与糖尿病关系的进展研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2016,36(23):6040-6042.

[11] 徐欣然, 和璐. 牙周炎对 2 型糖尿病发病影响的动物实验研究进展 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2021,29(2):145-148.

[12] 梁丽华, 唐海松, 秦明群, 等. 高脂高糖联合小剂量链尿佐菌素建立 2 型糖尿病动物模型的研究 [J]. *全科口腔医学杂志 (电子版)*, 2019,6(20):163-165.

[13] 王立刚, 徐彬, 阿吉迪丽努尔, 等. 糖尿病牙周炎模型大鼠的牙槽骨丧失 [J]. *中国组织工程研究*, 2015,19(5):710-715.

[14] 陈景宜, 张昀, 陈彩云, 等. 实验性牙周炎模型大鼠牙槽骨微结构的改变 [J]. *口腔医学研究*, 2017,33(11):1165-1168.

[15] LEE J, KIM HS. The Role of Autophagy in Eosinophilic Airway Inflammation. *Immune Network.* 2019;19(1):e5.

[16] SHAO ZQ, DOU SS, ZHU JG, et al. Apelin-13 inhibits apoptosis and excessive autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res.* 2021;16(6):1044-1051.

[17] KRAKAUER T. Inflammasomes, Autophagy, and Cell Death: The Trinity of Innate Host Defense against Intracellular Bacteria. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:1-10.

[18] MARTINE L, LETICIA FT, MAKIKO F, et al. Dysfunctional autophagy following exposure to pro-inflammatory cytokines contributes to pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):96.

[19] 马凌云, 孙凌云, 康静蕊, 等. 2 型糖尿病与炎症因子 CRP、TNF- α 、IL-6 的关系 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017,4(56):11052.

[20] 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. *中国实用内科杂志*, 2018,38(4):292-344.

[21] BJORKHAUG L, DOSKELAND A, WIERUP N, et al. Nuclear import of glucokinase in pancreatic beta-cells is mediated by a nuclear localization signal and modulated by SUMOylation. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;454:146-157.

[22] 郑宏庭, 邓华聪. 葡萄糖激酶与糖尿病的研究进展 [J]. *中国临床康复*, 2004,8(27):5960-5961.

[23] 曹宏伟, 姬秋和. 葡萄糖激酶调控血糖稳态的主要方式——调节控糖激素分泌和肝糖原合成 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2020,12(7):539-542.

[24] LI D, LINGLING H, JOHN D, et al. Erratum. WASH Regulates Glucose Homeostasis by Facilitating Glut2 Receptor Recycling in Pancreatic β -Cells. *Diabetes.* 2019;68:377-386.

[25] 黄林晶, 杨立勇. 葡萄糖转运蛋白 2 与糖尿病的关系研究进展 [J]. *医学综述*, 2009,15(23):3617-3619.

[26] 何柳, 宋岩, 胡永华. 解偶联蛋白 2 与 2 型糖尿病关系研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2008,35(22):4501-4503,4508.

[27] YIFEI Y, BOYANG Z, MASANORI N, et al. Islet β -cell-produced NUCB2/nesfatin-1 maintains insulin secretion and glycemia along with suppressing UCP-2 in β -cells. *J Physiol Sci.* 2019;69(5):733-739.

[28] GUO QY, ROBSON-DOUCETTE CA, ALLISTER EM, et al. Inducible Deletion of UCP2 in Pancreatic β -Cells Enhances Insulin Secretion. *Canad J Diabetes.* 2012;36(5):237-243.

[29] XU HD, QIN ZH. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:109-126.

[30] KANG R, ZEH HJ, LOTZE MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):571-580.

[31] LONG C, XIAOCHUAN W, XIN Z, et al. The autophagy-related genes Beclin1 and LC3 in the prognosis of pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(8):2989-2996.

[32] 余州, 王彤, 宋雅娟, 等. 细胞自噬的研究方法进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019,35(9):849-854.

(责任编辑: GD, ZN, ZH)