

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.03.004

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*

邓道坤¹ 刘佳² 杨久慧³ 张旻⁴ 陈永进⁴ 杨阳⁴ 李强^{4△}

(1 第四军医大学基础医学院四大队 陕西 西安 710032; 2 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畸科 陕西 西安 710032;

3 解放军联勤保障部队第966医院口腔科 辽宁 丹东 118000; 4 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

陕西省口腔疾病国际联合研究中心 第四军医大学口腔医院急诊与综合临床科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 明确心理应激对大鼠牙周炎组织局部病损以及抗氧化酶活性和丙二醛(MDA)含量变化的影响。**方法:** 40只健康Sprague-Dawley大鼠随机分为对照组(C)、实验性牙周炎组(EP)、实验性牙周炎+心理应激组(EP+PS)以及实验性牙周炎+心理应激+药物组(EP+PS+DR),每组10只。分别采用丝线结扎法和慢性不可预知性应激法建立大鼠实验性牙周炎模型和心理应激模型。EP组动物仅用丝线结扎右上颌第二磨牙颈部,EP+PS组动物同时接受丝线结扎和心理应激刺激,EP+PS+DR组动物除上述处置外,按5 mg/kg/日剂量腹腔注射氟西汀,而C组大鼠无任何干预措施。4周后对所有动物进行糖水偏爱度测试、行为学观察和血清学检测,并计算牙槽骨丧失和附着丧失情况,同时测量牙龈组织中抗氧化酶活性以及MDA含量。**结果:** 慢性不可预知性应激导致大鼠旷场实验中央区移动距离减少($P<0.05$)、中央区停留时间增加($P<0.05$)、糖水偏爱度降低($P<0.05$)、血清皮质酮与促肾上腺皮质激素浓度升高($P<0.05$);并且应激大鼠的牙槽骨丧失和附着丧失明显大于单纯牙周炎组($P<0.05$);同时,心理应激状态下大鼠牙龈组织的氧化还原代谢异常,表现为超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性明显低于单纯牙周炎组($P<0.05$),而MDA含量明显高于单纯牙周炎组($P<0.05$)。氟西汀在拮抗心理应激的同时,可以明显改善动物牙周炎组织局部降低的抗氧化酶活性以及升高的脂质过氧化产物含量($P<0.05$)。**结论:** 心理应激可以导致牙周炎组织的氧化损伤加重,有效拮抗心理应激有助于减轻牙周炎性组织病损。

关键词: 心理应激;牙周炎;氧化还原反应**中图分类号:** R-33; R781.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)03-418-06

The Animal Experiment of the Effect of Psychological Stress on the Redox Reaction in Periodontitis Tissue*

DENG Dao-kun¹, LIU Jia², YANG Jiu-hui³, ZHANG Min⁴, CHEN Yong-jin⁴, YANG Yang⁴, LI Qiang^{4△}

(1 The Fourth Brigade, School of Basic Medical Sciences, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Orthodontics, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 Department of stomatology, 996 hospital of PLA, Dandong, Liaoning, 118000, China; 4 State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi International Joint Research Center for Oral Diseases, Department of General Dentistry & Emergency, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To confirm the influences of psychological stress on the local lesion of periodontitis tissue as well as the antioxidant enzymes activities and malonyldialdehyde (MDA) content of periodontitis tissue in rats. **Methods:** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups equally as follows: 1) control rats (C); 2) rats with experimental periodontitis (EP); 3) rats with ED and psychological stress (EP+PS), and 4) rats with EP and PS that were treated with diazepam (EP+PS+DR). EP was induced by placing silk ligatures around the cervix of the maxillary second molars, and PS was induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) which contains seven different mild psychological stressors. Specifically, the EP rats were operated by placing the silk ligature only. The EP+PS rats were operated by placing the silk ligature and exposing the psychological stress simultaneously. The EP+PS+DR rats were intraperitoneally injected with 5 mg/kg fluoxetine every day along with the treatments of EP and PS during the experimental period. The C rats did not receive any treatments. Four weeks later, the stress level of all the animals was estimated by sucrose preference test, behav-

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81701002;81500851;81600854);

军事口腔医学国家重点实验室自主研究课题(2017ZB05)

作者简介:邓道坤(1996-),男,本科生,研究方向:牙周病防治,电话:18191456537,E-mail:2536582714@qq.com

△ 通讯作者:李强,男,博士,副教授、副主任医师,研究方向:心理应激对牙周组织健康影响,E-mail:lqag726@163.com

(收稿日期:2019-05-23 接受日期:2019-06-18)

ioral observation and hormonal assays. Then, they were euthanized, and the alveolar bone loss and attachment loss were evaluated. In addition, the gingival tissue was used for the analysis of the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and the content of MDA. **Results:** CUMS could result in altered behavior, decreased sucrose preference and increased serum corticosterone and corticotrophin in rats ($P<0.05$). Additionally, more alveolar bone loss and attachment loss were found in the EP+PS group comparing with those in EP group ($P<0.05$). Moreover, psychological stress led into abnormal redox in the gingival tissue of EP+PS group more obviously than that in the EP group, with the evidences of decreased activity of SOD, CAT and GSH-Px ($P<0.05$) as well as increased MDA content ($P<0.05$) which could be reversed by the administration of fluoxetine accompanied by the antagonistic effect against psychological stress ($P<0.05$). **Conclusions:** The results indicate that psychological stress could aggravate periodontitis by exacerbating abnormal redox reaction, and antagonizing psychological stress effectively is beneficial to alleviate periodontitis tissue lesion.

Key words: Psychological stress; Periodontitis; Redox reaction

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R781.42 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)03-418-06

前言

众所周知,牙周疾病的出现和演变受到许多因素的影响,心理应激被认为是其中之一^[1,2]。尽管许多临床实验与流行病学研究证实了心理应激与牙周炎之间存在关联^[3,4],但潜在的调控机制仍不清晰,这一问题已逐渐成为口腔医学领域的研究热点。

心理应激可以引起机体的氧化损伤^[5];而牙周炎发生时,局部大量活性氧产生能够造成牙周组织损伤^[6]。本课题组前期研究也已明确,心理应激加重牙周组织破坏、延缓了牙周炎的愈合进程^[7]。然而到目前为止,心理应激是否是通过影响牙周炎组织的氧化还原反应状态来参与牙周病损尚无研究报道,亟需我们明确。

本研究通过建立大鼠牙周炎模型和心理应激模型,观察心理应激状态下牙周炎局部病损、牙周组织中抗氧化酶活性以及丙二醛(MDA)含量的变化,探讨心理应激对大鼠实验性牙周炎牙周组织氧化还原反应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验仪器和试剂

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);RD1412-OF 旷场实验箱(上海 Mobile-datum 公司);Epoch 微量微孔板分光光度计(BioTek USA);大鼠皮质酮(Corticosterone)、促肾上腺皮质激素(ACTH),ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒以及丙二醛(MDA)测定试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司)。

1.2 实验动物与分组

40 只同源雄性 SD 大鼠(体重 200-220 g,第四军医大学动物实验中心),随机分为对照组(C)、实验性牙周炎组(EP)、实验性牙周炎+心理应激组(EP+PS)以及实验性牙周炎+心理应激+药物组(EP+PS+DR),每组 10 只。

1.3 动物模型建立

建立大鼠实验性牙周炎模型^[7],即对大鼠施行 10 g/L 戊巴比妥钠 3.5 mg/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,丝线保留 4 周。参照 Cui 等人的方法^[8]建立大鼠心理应激模型,即将禁食(24 h)、禁水

(24 h)、45℃ 强迫浸水(5 min)、4℃ 强迫浸水(5 min)、潮湿垫料(24 h)、昼夜颠倒(24 h)、束缚(1 h)7 种应激因子以随机方式施加于动物,每日早晨 9 时开始施加应激,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,共进行 4 周。其中 EP 组动物仅用丝线结扎右上颌第二磨牙颈部,EP+PS 组动物同时接受丝线结扎右上颌第二磨牙颈部和心理应激刺激,EP+PS+DR 组动物除上述处置外,按 5 mg/kg/日剂量腹腔注射氟西汀,C 组大鼠无任何干预措施。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 ± 1)℃,相对湿度(60 ± 5)%。

1.4 测试方法

1.4.1 糖水偏爱度实验 于实验结束时,参考 Willner 的方法^[9],测试大鼠对 1%蔗糖溶液的偏爱度。实验前 3 天先进行试饮,训练结束后大鼠禁食禁水 24 h,后给予 1%蔗糖水及正常饮用纯净水各一瓶,记录 1%蔗糖水在 24 h 内的消耗量以及总液体消耗量,计算蔗糖水占总液体消耗量的百分率并进行分析。

1.4.2 旷场实验 旷场实验箱(100 cm×100 cm×80 cm)为不透明树脂玻璃材料制成,侧壁为白色,箱底为黑色。将大鼠由旷场正中放入,仪器上方的摄像机立即自动记录大鼠在旷场中的移动距离(cm)以及中央区的活动时间(s)。每只大鼠的测试时间为 15 min。

1.4.3 血清学检测 各组大鼠完成糖水偏爱度实验和旷场实验后,经 10 g/L 戊巴比妥钠 3.5 mg/kg 腹腔注射麻醉,心脏取血 1.5 mL,于 4℃ 下 12000 rpm 离心 15 min,取上清,-80℃ 保存。采用 ELISA 法测定血清皮质酮、促肾上腺皮质激素含量,具体步骤按照试剂盒说明书操作。

1.4.4 组织学测量 实验结束时,采用脱颈法处死大鼠,用 100 g/L 多聚甲醛固定左侧磨牙区上颌骨 48 h,150 g/L EDTA 脱钙,石蜡包埋,制备牙长轴近中远中方向连续切片 5 μm,并确保第二磨牙近中远中根同时包含于切片内,HE 染色。其中牙槽嵴顶冠方至釉牙骨质界距离为牙槽骨丧失,结合上皮冠方至釉牙骨质界距离为附着丧失^[7](如图 1)。

1.4.5 氧化应激水平检测 取右上侧第二磨牙区域牙龈组织,称重,冰浴速剪置于组织匀浆器中,加入预冷的匀浆介质(pH 7.4,0.01 mol/L 蔗糖,0.01 mol/L Tris-HCl,0.0001 mol/L EDTA2Na 溶液)按组织块重量:匀浆介质体积为 1:9 制备 10%的组织匀浆,4℃、3000 r/min 离心 15 min,取上清液。严格遵守试

剂盒说明书检测牙龈组织中的 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性以及 MDA 含量。

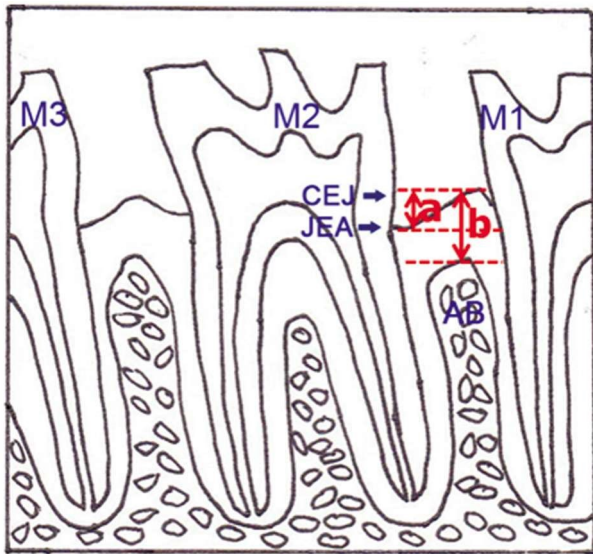


图1 牙周组织学测量示意图

M1, 第一磨牙; M2, 第二磨牙; M3, 第三磨牙; CEJ, 釉牙骨质界; JEA, 结合上皮附着; AB, 牙槽骨; a, 附着丧失; b, 牙槽骨丧失

Fig.1 Schematic diagram of periodontal histological measurement

M1, first molar; M2, second molar; M3, third molar; CEJ, cemento-enamel junction; JEA, junctional epithelium attachment; AB, alveolar bone;

a, attachment loss; b, alveolar bone loss

1.5 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对所得数据进行 one-way ANOVA 分析, 两两比较采用 LSD 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 糖水偏爱度结果

糖水偏爱程度结果显示, 实验动物接受心理应激刺激后, 糖水偏爱程度明显低于对照组和单纯实验性牙周炎组 ($P<0.05$), 而给予有效的抗应激药物治疗后, 大鼠的糖水偏爱度恢复到正常水平 ($P<0.05$) (图 2)。

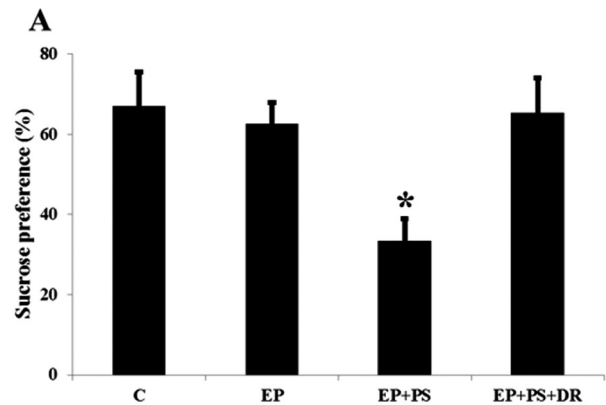


图2 糖水偏爱度

* $P<0.05$, 与 C 组、EP 组、EP+PS+DR 组比较

Fig.2 Sucrose preference

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=10$. * $P<0.05$, compared with C group, EP group and EP+PS+DR group

2.2 行为学结果

旷场实验结果显示, 与对照组和单纯实验性牙周炎组动物比较, 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 ($P<0.05$)。而应用氟西汀后上述指标恢复到正常水平 ($P>0.05$) (图 3)。

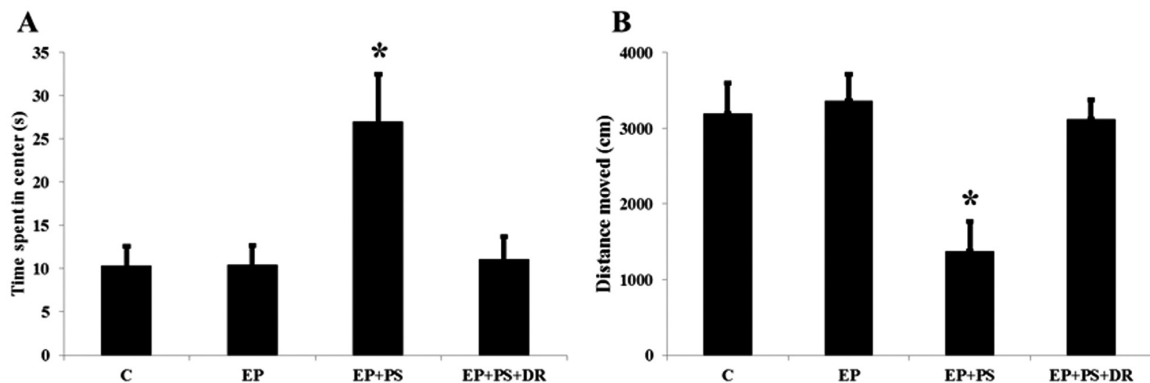


图3 旷场实验

A, 中央区停留时间; B, 移动距离

* $P<0.05$, 与 C 组、EP 组、EP+PS+DR 组比较

Fig.3 Open field test

A, Time spent in the center zone; B, Total moved distance

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=10$. * $P<0.05$, compared with C group, EP group and EP+PS+DR group

2.3 血清学结果

ELISA 实验检测结果如图 4 所示, 心理应激可以导致动物血清中两种典型的应激激素水平的显著升高 ($P<0.05$), 而氟西汀可有效逆转这种升高的趋势 ($P>0.05$)。

2.4 牙槽骨吸收和附着丧失

对动物牙槽骨吸收和附着丧失测量后发现, 单纯实验性牙周炎大鼠的牙槽骨吸收高度和附着丧失量明显高于对照组 ($P<0.05$), 而心理应激会加重这一现象 ($P<0.05$)。有效的心理应激药物治疗后, 动物牙槽骨吸收和附着丧失有所下降, 与实验组无统计学差异 ($P<0.05$), 但仍高于对照组 ($P<0.05$) (图 5)。

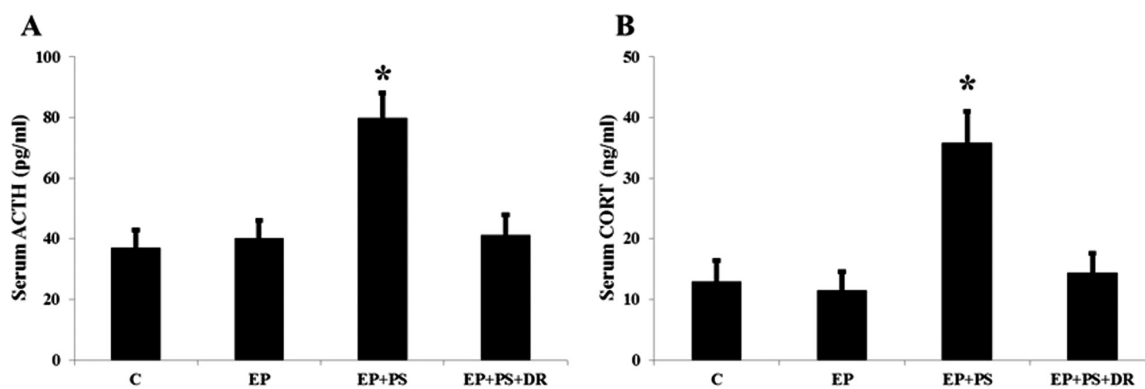


图4 血清学检测

A, 促肾上腺皮质激素; B, 皮质醇

* $P < 0.05$, 与 C 组、EP 组、EP+PS+DR 组比较

Fig.4 Assays of serum corticotropin and ACTH

A, ACTH; B, CORT

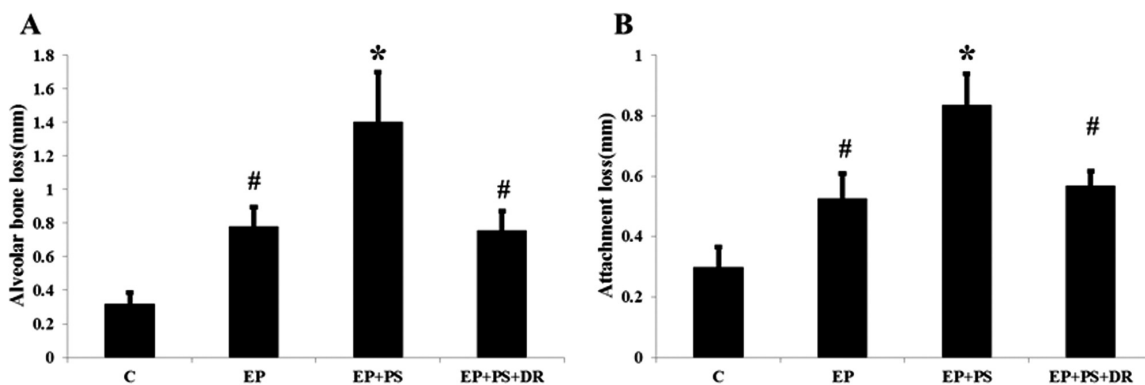
Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=10$. * $P < 0.05$, compared with C group, EP group and EP+OS+DR group

图5 牙槽骨吸收和附着丧失测量结果

A, 牙槽骨吸收; B, 附着丧失

* $P < 0.05$, 与 C 组、EP 组、EP+PS+DR 组比较; * $P < 0.05$, 与 C 组比较

Fig.5 Measurement of the alveolar resorption and attachment loss

A, Alveolar resorption; B, Attachment loss

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=10$. * $P < 0.05$, compared with C group, EP group and EP+PS+DR group; * $P < 0.05$, compared with C group

2.5 氧化还原反应状态

氧化应激检测结果显示,牙周炎导致牙龈组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)三者的活性降低,脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量上升($P < 0.05$)。在心理应激作用下,三种抗氧化酶活性下降更为明显,脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量继续升高。经过心理应激拮抗治疗后,炎性牙龈组织的抗氧化酶活性逐渐回升,MDA 含量逐渐下降,与单纯牙周炎组无明显统计学差异($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$)(图 6)。

3 讨论

牙周炎是一种常见牙周支持组织疾病,其特征表现为牙齿支持结构的破坏,最终表现为牙齿丧失。牙周微生物被医学界广泛认为是牙周炎发生的始动因素,但是单纯的菌斑微生物因素尚不足以解释慢性牙周炎的严重性和复杂性。伴随现代医学模式由传统的生物医学模式向生物-心理-社会医学模式的转变,近年来,心理应激因素在牙周炎的发生发展过程中发挥的重要作用逐渐引起学者们的关注^[9]。

本研究选取七种应激因子以随机的方式刺激大鼠,建立慢性不可预知性心理应激动物模型,并探讨心理应激对牙周炎组织氧化还原反应的影响。该模型已在国际上被广泛应用^[2,10],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对实验结果的影响。经过分析,本研究中应激动物的糖水偏爱程度、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^[11]。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。同时,本研究发现结扎诱导的大鼠牙周炎在心理应激的状态下表现出更严重的附着丧失和牙槽骨丢失。Gomes EP^[12]等人就观察到暴露于条件性应激恐惧的动物不仅表现出活动减少,还伴有牙槽骨丧失加重。当我们给予动物氟西汀治疗后,牙槽骨吸收和丧失得到了有效控制。这说明心理应激模型成功建立的同时,也说明拮抗心理应激还可以减轻牙周炎组织的病损。

脂质过氧化物和抗氧化酶活性反映了机体抗氧化能力,也间接反映组织过氧化损伤程度。Shilpa Trivedi 等人^[13]认为牙周炎与氧化应激的增加和抗氧化能力下降有高度相关性,抗氧化酶可作为牙周疾病的一种生物标志。还有其他学者通过临床牙

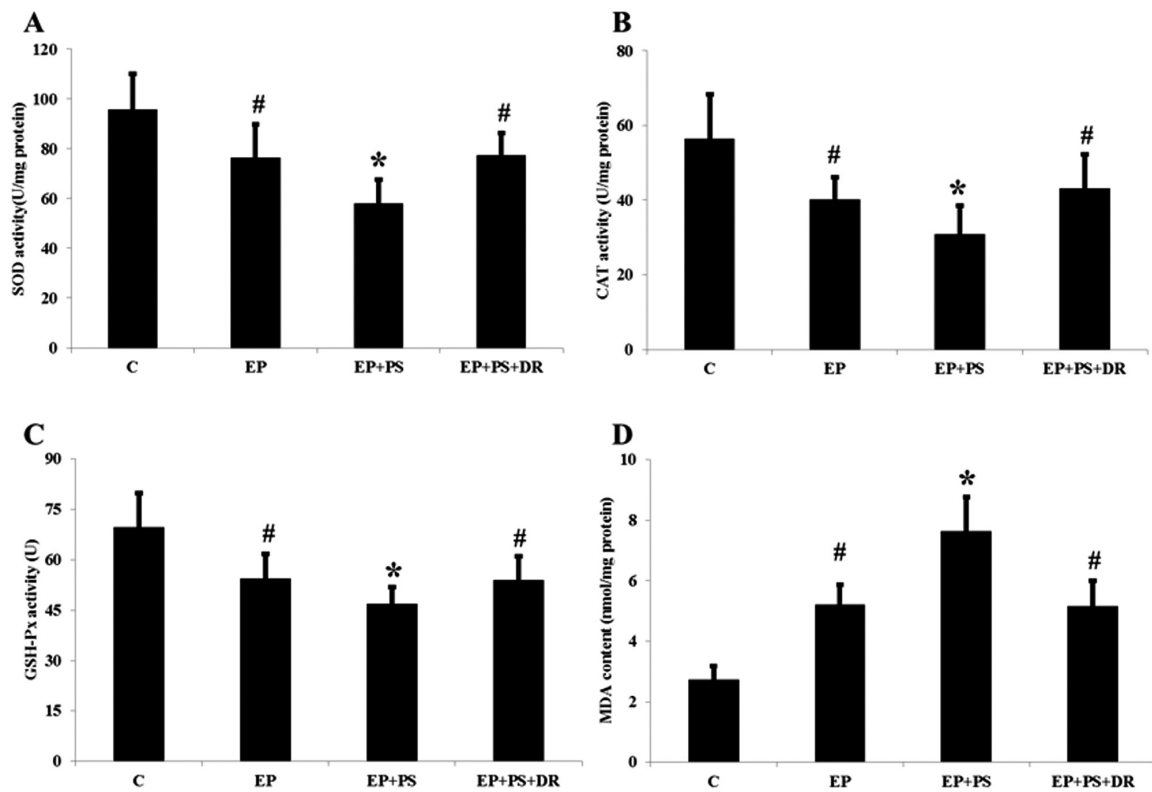


图6 氧化应激指标检测

A, SOD 活性; B, CAT 活性; C, GSH-Px 活性; D, MDA 含量

* $P < 0.05$, 与 C 组、EP 组、EP+PS+DR 组比较; # $P < 0.05$, 与 C 组比较

Fig.6 Detection of the oxidative stress index

A, SOD activity; B, CAT activity; C, GSH-Px activity; D, MDA content

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=10$. * $P < 0.05$, compared with C group, EP group and EP+PS+DR group; # $P < 0.05$, compared with C group

周检查和唾液生物标志物分析,发现牙周炎患者抗氧化能力较之健康对照组明显减少^[14]。本实验结果显示,大鼠牙周炎症组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性明显低于对照组,脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量明显高于对照组,当牙周炎动物受到心理应激后,氧化应激更加明显,从而从基础研究的角度为临床发现提供了实验佐证。事实上,活性氧与抗氧化的平衡对于牙周健康的维护有着至关重要的意义,过量活性氧可导致炎症加重,自噬溶酶体活性失调和细胞凋亡,从而导致牙周功能障碍^[15]。结合本研究牙周组织病理结果,我们得到提示,牙周炎情况下局部组织出现了氧化损伤,心理应激会加重炎症组织氧化还原反应的失衡,进一步引起牙槽骨吸收和附着丧失的加重。

长期以来,学者们一直致力于通过控制氧化损伤治疗牙周炎。相较于牙周健康受试者,慢性牙周炎患者谷胱甘肽浓度下降,维持稳定的还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)比例对于牙周健康有重要意义,这说明恢复牙周组织氧化还原的平衡在牙周治疗中具有重要意义^[16]。并且,谷胱甘肽本身就是一种主要的抗氧化剂,在牙周炎治疗中辅助使用可减少氧化应激引起的组织损伤^[17]。除此之外,植物抗氧化剂白藜芦醇也被证实能通过激活 e Sirt1/AMPK and the Nrf2/ 抗氧化防御途径,减少氧化应激和炎症反应,反过来刺激抗氧化物生成而保护牙周组织^[18,19]。在一组对照试验中,布洛芬联合甲硝唑可有效降低氧化应激水平,加速受损牙周组织重建^[20]。本研究从牙周

炎的加重因素之一——心理应激角度出发,发现使用氟西汀后,动物牙周炎症组织的抗氧化酶活性明显回升,脂质过氧化物含量显著下降,说明心理应激治疗通过纠正牙周局部氧化还原反应失衡状态,能够在很大程度上减少氧化应激对牙周组织的损害。然而,心理应激的拮抗并未完全逆转牙周炎症组织失衡的氧化损伤,这也提示我们牙周炎的发生发展是一个复杂的病理过程,牙周炎症局部环境仍存在其他影响氧化还原平衡态的因素。Almerich-Silla JM 等人通过对 86 名受试者进行横断面研究,就发现牙周炎患者的唾液中氧化应激指标水平明显升高,而牙周袋中牙周致病菌(如牙龈卟啉单胞菌、放线菌聚合菌等)的数目与类型与升高的氧化应激指标密切相关^[21]。

综上所述,心理应激在牙周炎的发生发展中扮演了十分重要的角色,它通过进一步降低牙周炎局部抗氧化酶活性、升高脂质过氧化产物含量,达到破坏氧化还原反应平衡的效果,引起牙槽骨吸收和附着丧失增多,从而加重牙周炎病理。当拮抗心理应激后,其负性影响能够得到有效逆转。这些结果为临床工作中牙周疾病的有效心因性防治提供了新的治疗思路。

参考文献(References)

- [1] Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GM, et al. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease[J]. J Periodontol, 2007, 78(8): 1491-1504
- [2] Huaixiu Lu, Minguang Xu, Feng Wang, et al. Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α signaling[J]. Exp Mol Med, 2016, 48: e223

- [3] Obulareddy VT, Chava VK, Nagarakanti S. Association of stress, salivary cortisol, and chronic periodontitis: a clinico-biochemical study [J]. *Contemp Clin Dent*, 2018, 9(Suppl 2): S299-S304
- [4] Saita M, Kaneko J, Sato T, et al. Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption[J]. *Biomaterials*, 2016, 76: 292-301
- [5] Ghezzi P, Floridi L, Boraschi D, et al. Oxidative stress and inflammation induced by environmental and psychological stressors: A biomarker perspective [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28 (9): 852-872
- [6] Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 910
- [7] 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
- [8] 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
- [9] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358-364
- [10] Semenoff-Segundo A, Proto AN, Smenoff TA, et al. Effects of two chronic stress models on ligature-induced periodontitis in Wistar rats [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(1): 66-72
- [11] Roshni Jaiswal, Nina Shenoy, Biju Thomas. 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 India Soc Periodontol*, 2016, 20(4): 381-385
- [12] Gomes EP, Aguiar JC, Fonseca-Silva T, et al. Diazepam reverses the alveolar bone loss and hippocampal interleukin-1 β and interleukin-6 enhanced by conditioned fear stress in ligature-induced periodontal disease in rats[J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(2): 151-158
- [13] Trivedi S, Lal N. Antioxidant enzymes in periodontitis[J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2017, 7(1): 54-57
- [14] Zhang T, Andrukhov O, Haririan H, et al. Total antioxidant capacity and total oxidant status in saliva of periodontitis patients in relation to bacterial load[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 5: 97
- [15] 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
- [16] Savita AM, Sarun E, Arora S, et al. Evaluation of glutathione level in gingival crevicular fluid in periodontal health, in chronic periodontitis and after nonsurgical periodontal therapy: A clinicobiochemical study [J]. *Contemp Clin Dent*, 2015, 6(2): 206-210
- [17] Bains VK, Bains R. The antioxidant master glutathione and periodontal health[J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2015, 12(5): 389-405
- [18] Chin YT, Cheng GY, Shih YJ, et al. Therapeutic applications of resveratrol and its derivatives on periodontitis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1403(1): 101-108
- [19] Bhattarai G, Poudel SB, Kook SH, et al. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis [J]. *Acta Biomater*, 2016, 29: 398-408
- [20] 王雯文, 张兰, 王韵秋, 等. 布洛芬联合甲硝唑对慢性牙周炎龈沟液中细胞因子的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(9): 1763-1766
- [21] Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, et al. Oxidative stress parameters in saliva and its association with periodontal disease and types of bacteria[J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 653537

(上接第 448 页)

- [25] Gu SX, Li X, Hamilton JL, et al. MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc [J]. *Gene*, 2015, 555(2): 80-87
- [26] Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors[J]. *Spine*, 1991, 16: 253-256
- [27] Wallach CJ, Sobima S, Watanabe Y, et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in human intervertebral disc[J]. *Spine*, 2003, 28(20): 2331-2337
- [28] Cheng CC, Uchiyama Y, Hiyama A, et al. PI3K/AKT regulates aggrecan gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 221(3): 668-676
- [29] Colombier P, Clouet J, Hamel O, et al. The lumbar intervertebral disc: from embryonic development to degeneration [J]. *Joint Bone Spine*, 2014, 81(2): 125-129
- [30] Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease[J]. *Spine*, 2003, 28(8): 755-763