

牙龈卟啉单胞菌对大鼠胎盘及仔鼠出生体重的影响

梁珊珊 邢文燕 季耀庭 江汉 杜民权*

(武汉大学口腔医学院 口腔生物医学工程教育部重点实验室 湖北 武汉 430079)

[摘要] **目的:**研究牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)感染对大鼠胎盘组织 Fas、Fas 配体(Fas ligand, FasL)、Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)2、TLR4 表达水平及对新生仔鼠出生体重的影响。**方法:**将大鼠随机分为 *P. gingivalis* 感染组、阴性对照组和空白对照组,每组 13 只。采用尾静脉注射法建立 *P. gingivalis* 感染的孕鼠模型。记录各组新生仔鼠的出生体重和窝重并收集各组孕鼠在孕 18 d 的胎盘。采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测各组胎盘 Fas、FasL、TLR2 和 TLR4 表达情况。**结果:***P. gingivalis* 感染组与阴性对照组相比,其新生仔鼠出生体重显著减轻;孕鼠胎盘组织中 TLR4、Fas、FasL 的表达显著增强,TLR2 无明显变化。**结论:**在 *P. gingivalis* 感染的孕鼠模型中,*P. gingivalis* 感染可引起新生仔鼠较低出生体重,还可引起胎盘组织 TLR4、Fas、FasL 表达增强。提示罹患牙周病的孕妇娩出低体重儿,可能与 *P. gingivalis* 引起的胎盘组织 TLR4、Fas、FasL 的异常调节有关。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌 早产低体重 胎盘

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2018)05—0495—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.05.009

Effects of Porphyromonas Gingivalis Infection on Placental Tissue and Birth Weight of Neonates in Rats. LIANG Shan-shan, XING Wen-yan, JI Yao-ting, JIANG Han, DU Min-quan*. Key Laboratory for Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, School and Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Porphyromonas gingivalis infection on expressions of placental Fas ligand (Fas L), Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4, and birth weight of neonates in rats. **Methods:** Female rats were randomly divided into 3 groups: *P. gingivalis*-infected group, negative control group, and blank control group ($n=13$ for each group). Murine model of *P. gingivalis* infection was established by the tail vein injection. Birth weight of every neonate and litter weights was recorded, and the placentas were obtained at gestational day of 18. The expression levels of placental Fas, FasL, TLR2, and TLR4 were detected by Western blot analysis and immunohistochemical staining. **Results:** The newborn rats showed significantly lower birth weight in *P. gingivalis*-infected group. Furthermore, Fas, FasL, and TLR4 in placental tissues were significantly increased following *P. gingivalis* infection. However, the expression of TLR2 had no significant difference between *P. gingivalis*-infected group and negative control group. **Conclusion:** In our murine model, with elevated expression of Fas, FasL and TLR4 in placental tissues, *P. gingivalis* infection induces lower birth weight of neonates. The results indicate that pregnant woman suffering from periodontal disease, with delivery of low birth weight babies, might be related to *P. gingivalis*-induced abnormally regulation of placental Fas, FasL and TLR4.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis* Preterm low birth weight Placenta

早产低出生体重(preterm low birth weight, PLBW)为围产儿患病和死亡的主要原因,特指新生儿出生体重低于 2500 g 和(或)出生时胎龄早于 37 周^[1,2]。研究表明,感染可导致不良妊娠结果,而

牙周病是口腔常见的慢性细菌感染性疾病,与 PLBW 的发生密切相关^[3]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)作为主要的牙周致病菌,被发现存在于早产、子痫前期等不良妊娠的胎盘或脐带中^[4]。在 Pg 感染的动物模型中,伴随着感染引起系统及胎盘组织炎症反应,从而导致 PLBW 的发生^[5]。胎盘是位于母胎界面帮助母体和胎儿之间进行物质交换的主要妊娠器官,对于维持胎儿正常生

基金项目 国家自然科学基金(编号:81371145)

作者简介 梁珊珊(1991~),女,湖北襄阳人,硕士在读,主要从事口腔预防医学研究。

* 通讯作者 杜民权, E-mail: duminquan@whu.edu.cn

长发育有重要作用^[6]。Pg 感染可抑制胎盘滋养层细胞增殖并促进其凋亡^[7]。本研究通过建立 Pg 感染的孕鼠模型,研究其对新生仔鼠出生体重的影响,并进一步通过免疫组织化学法和 Western blot 法检测胎盘组织中 Fas、Fas 配体(Fas ligand, FasL)、Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)2、TLR4 的表达水平,探讨 Pg 感染引起早产低出生体重的相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与器材

Pg 标准菌株 33277 购自美国模式菌种收集中心(American type culture collection, ATCC);10 周龄健康的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Wistar 大鼠 52 只(购自湖北省实验动物研究中心),其中雌性 39 只,雄性 13 只;胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)购自美国 BD 公司;哥伦比亚血平板购自北京陆桥公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris-HCl buffer solution, TBS)购自武汉谷歌生物公司;一次性使用静脉留置针(Insyte-WTM 带翼型,碧迪医疗器械公司);兔抗鼠多克隆抗体 Fas、FasL (Abcam 公司, UK);兔抗鼠多克隆抗体 TLR2 (Absin Bioscience 公司, 中国);兔抗鼠多克隆抗体 TLR4 (Cell Signaling Technology 公司, USA);过氧化物酶标记的链霉卵白素(oxidase labeled streptomycin-avidin, SP)免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥公司);二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(福州迈新公司);电泳仪(Bio-rad 公司, Singapore);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒(Thermo 公司, USA);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒(Aspen 公司, 武汉);聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(Gelman 公司, USA);化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒(Advansta 公司, USA);Mart 厌氧微需氧微生物培养系统(荷兰);紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Pg 培养

Pg 标准菌株 33277 在无菌台中接菌到哥伦比亚血平板上,置于厌氧罐中($N_2 : CO_2 : H_2 = 80 : 10 : 10$),37 °C 电热恒温箱中培养。待 Pg 在哥伦比亚血平板上形成大小均一、表面光滑的黑色菌落后,挑取黑色单菌落进行液

体增菌。培养 30 h 后将菌液离心,经 PBS 重悬后调整细菌密度至 1×10^9 CFU/L,备用。

1.2.2 Pg 感染的孕鼠模型建立

将 39 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 3 组,每组 13 只。Pg 感染组:尾静脉注射 Pg 菌液;阴性对照组:尾静脉注射 TSB 培养基;空白对照组:无特殊处理。尾静脉注射法建立 Pg 感染性孕鼠模型:Pg 感染组和阴性对照组大鼠进行尾静脉穿刺成功后,分别注射 0.5 mL Pg 菌液和 0.5 mL TSB 培养基,尾静脉注射每日 1 次;空白对照组大鼠正常饲养,不做特殊处理。连续尾静脉注射 3d 后,3 组大鼠分别与雄性大鼠按雌雄比 3 : 1 合笼过夜,次日晨查见孕栓或阴道涂片发现精子记为妊娠第 1 天,依次完成全部的受孕工作。记录每只大鼠的怀孕天数(gd)、新生仔鼠的出生体重(bw)及窝重。合笼后 Pg 感染组和阴性对照组继续进行尾静脉注射,每 3 日 1 次,直至分娩,空白对照组仍不做特殊处理。

1.2.3 标本的采集与处理

3 组大鼠均在孕晚期,即孕 18 d(gd18)采集胎盘,每组随机选取 3 只孕鼠。异氟烷麻醉孕鼠,麻醉后剖腹行剖宫手术,取胎盘置于 4 °C 预冷 PBS 中漂洗 2~3 次,在无菌干燥纱布上尽量拭干水分后部分胎盘于 4% 多聚甲醛中固定,剩下的胎盘组织置于无菌干燥 Ep 管中,密封遮光,-80 °C 冰箱保存,备用。经固定后的胎盘组织常规脱水、石蜡包埋,连续切片(5 μ m),于恒温 60 °C 烤箱烤片过夜,切片保存,备用。

1.2.4 免疫组织化学法检测胎盘组织 Fas、FasL、TLR2、TLR4 的表达

常规脱蜡入水,过氧化物酶阻断剂 37 °C 孵育 20 min,0.01 mol/L PBS 洗片 3 次,枸橼酸钠液热修复,复温后洗片 3 次,封闭血清 37 °C 封闭 20 min,一抗孵育(Fas 1 : 100、FasL 1 : 100、TLR2 1 : 300、TLR4 1 : 150,以 PBS 代替一抗作阴性对照),4 °C 过夜,复温后洗片 3 次,滴加相应二抗 37 °C 孵育 30 min,洗片 3 次,滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液 37 °C 孵育 30 min,洗片 3 次,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片,镜检。结果以胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性,用 Image-Pro Plus(Media Cybernetics, USA)软件进行分析。

1.2.5 Western blot 检测胎盘组织 Fas、FasL、TLR2、TLR4 的表达

提取胎盘组织总蛋白,BCA 法蛋白定量,行蛋白电泳,电转印于 PVDF 膜,剪下相应的条带,5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h,一抗孵育(Fas 1 : 1000、FasL 1 : 1000、TLR2 1 :

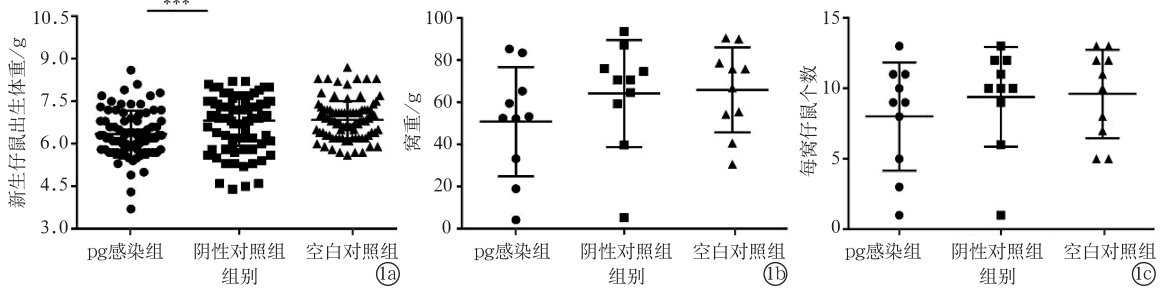
500、TLR4 1 : 300), 4 °C 过夜, TBS 缓冲液洗膜 3 次, 加入相应的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次; ECL 显影, 并用 AlphaEaseFC (Alpha Innotech, USA) 软件对电泳条进行灰度值分析, 以目的条带与内参条带的比值代表目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析 应用 GraphPad Prism 软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经方差齐性分析后选择 *t* 检验

进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Pg 感染对仔鼠出生体重的影响 Pg 感染组的新生仔鼠出生体重显著低于阴性对照组 ($P < 0.001$), 而空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.837$), 见图 1a。各组新生仔鼠的窝重及每窝仔鼠只数均无明显差异, 见图 1b 和图 1c。



注:Pg 感染组与阴性对照组比较, * * * $P < 0.001$

图 1 Pg 感染对新生仔鼠的影响 1a:仔鼠出生体重;1b:窝重 1c:每窝仔鼠只数

Fig. 1 Effects on newborn rats following Pg infection. (1a) Birth weight of neonates. (1b) Litter weight. (1c) Litter size

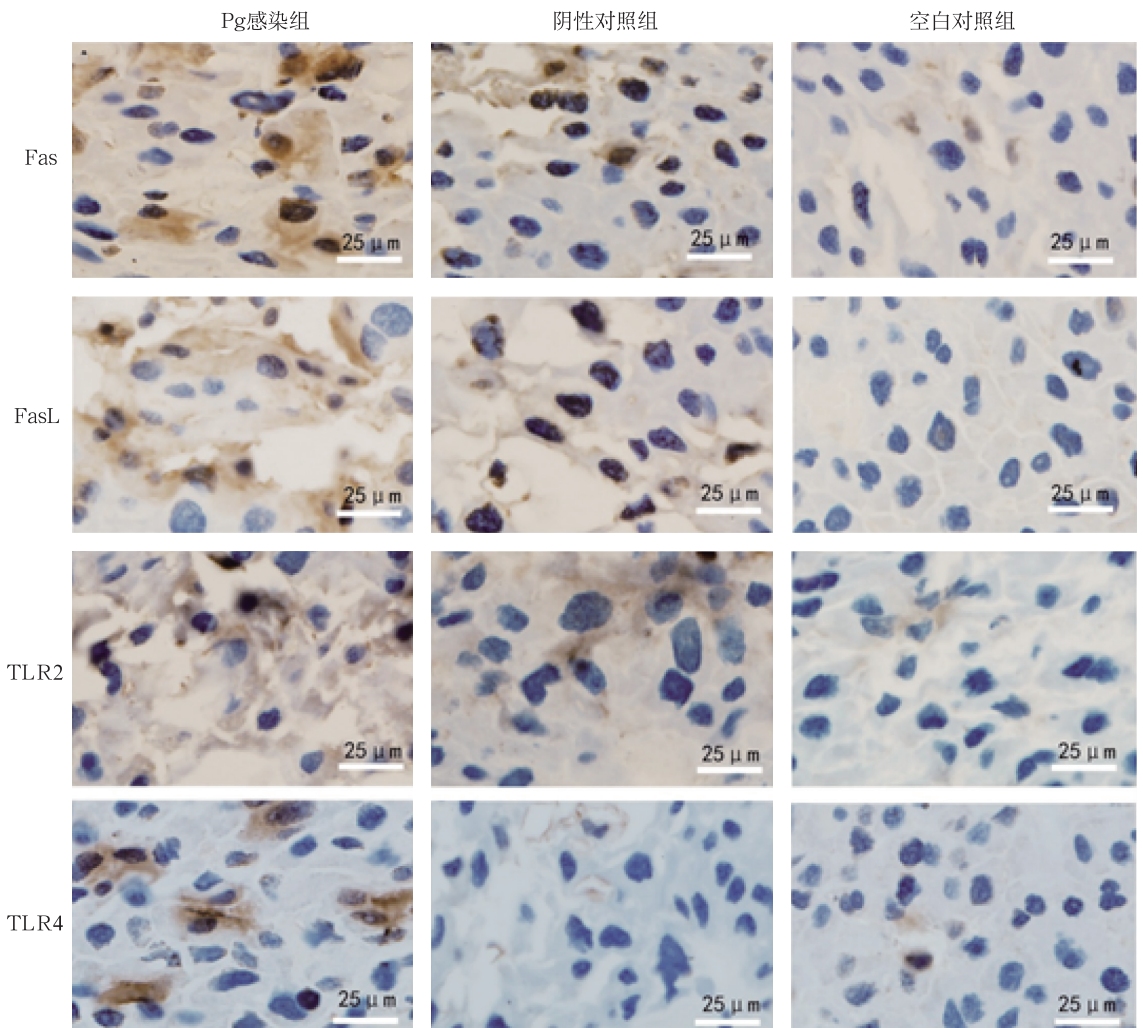


图 2 各组胎盘组织中 Fas,FasL、TLR2 和 TLR4 的免疫组织化学染色(×400)

Fig. 2 The expression of placental Fas, FasL, TLR2, and TLR4 in each group by immunohistochemical staining (×400)

表1 各组胎盘组织中 Fas、FasL、TLR2 和 TLR4 的免疫组织化学染色结果

Table 1 The average optical density of placental Fas, FasL, TLR2 and TLR4 in each group by immunohistochemistry $\bar{x} \pm s$

组别	Fas	FasL	TLR2	TLR4
Pg 感染组	0.0275 ± 0.0072 *	0.0160 ± 0.0068 *	0.0071 ± 0.004	0.0116 ± 0.0063 *
阴性对照组	0.0125 ± 0.0056	0.0064 ± 0.0047	0.0062 ± 0.0103	0.0014 ± 0.0013
空白对照组	0.0042 ± 0.0028	0.0065 ± 0.006	0.0060 ± 0.0075	0.0018 ± 0.0016

注:Pg 感染组与阴性对照组比较, * $P < 0.001$; 阴性对照组与空白对照组比较, $P > 0.05$

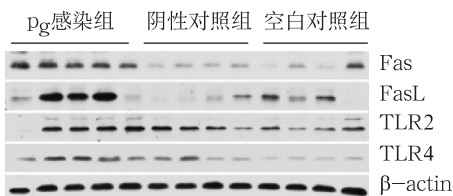
2.2 Pg 感染对大鼠胎盘组织的影响

2.2.1 免疫组织化学检测 Fas、FasL、TLR2、TLR4 的表达

免疫组织化学染色结果显示 Fas、FasL、TLR2、TLR4 在大鼠胎盘组织的表达, 见图 2。Pg 感染组的大鼠胎盘组织中 Fas 的表达水平显著高于阴性对照组 ($P < 0.001$), 而空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.621$)。Pg 感染组大鼠胎盘组织中 FasL 的表达水平显著高于阴性对照组 ($P < 0.001$), 而空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.292$)。TLR2 在各组大鼠胎盘组织中的表达水平比较差异无统计学意义。Pg 感染组大鼠胎盘组织中 TLR4 的表达水平显著高于阴性对照组 ($P < 0.001$), 而空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.679$), 见表 1。

2.2.2 Western blot 检测 Fas、FasL、TLR2、TLR4 的表达

Western blot 结果显示 Fas、FasL、TLR2、TLR4 在大鼠胎盘组织的表达, 见图 3。Pg 感染组的大鼠胎盘组织中 Fas 的表达水平显著高于阴性对照组 ($P < 0.001$), 而空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.699$)。Pg 感染组大鼠胎盘组织中 FasL、TLR2、TLR4 的表达水平与阴性对照组比较均呈不同程度的上升趋势, 但差异无统计学意义 ($P = 0.065, 0.763, 0.205$); 空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.191, 0.221, 0.172$)。



注:Pg 感染组与阴性对照组比较, $P < 0.001$

图3 Pg 感染对大鼠胎盘组织的影响

Fig. 3 Birth weight of newborn rats following Pg infection.

3 讨论

早产儿和低出生体重儿由于系统发育尚未完善, 其免疫力低、抵抗力差, 而且在其成年之后罹患糖尿病、抑郁症、肥胖和骨质疏松症等疾病的风险也较正常出生体重儿高^[2,8]。流行病学调查结果显

示, 孕妇牙周病与早产低出生体重儿的娩出密切相关^[9]。越来越多的研究结果也表明孕妇牙周健康状况不佳, 尤其是口腔微生物群落失调是不良妊娠的危险因素^[10]。牙周致病菌可能通过以下两种方式对宿主产生作用: 一是随血液循环直接播散并侵袭局部组织器官而定植, 二是其相关产物播散入血并对局部组织造成破坏。无论何种方式, 最终都会引起宿主免疫反应和炎症反应并影响母胎界面的局部妊娠组织, 从而导致不良妊娠结果。本实验建立 Pg 感染的孕鼠模型以探究其对大鼠妊娠结果的影响, 证实了孕鼠感染 Pg 会引起新生仔鼠较低出生体重。

胎盘是妊娠期间伴随胎儿生长发育而产生的特有的器官。同时, 作为胎儿从母体获取营养和氧气并进行物质交换的关键介质, 胎盘的组织和功能的正常发育与胎儿的正常生长发育密不可分。因此, 在本研究中, 我们推测出现新生仔鼠较低出生体重的结果可能与 Pg 感染引起的孕鼠胎盘组织的病理性改变有关。本实验收集各组胎盘组织进行相关指标的检测分析。

胎盘组织的生长发育受到多种因素的影响, 其中包括各种细胞因子、受体及配体等。TLR 被认为在抵御病原体的免疫反应中发挥重要作用。Hirsch 等^[11]的研究发现细菌感染引起的早产可能与始于 TLR 识别病原体的信号级联反应有关。牙周微生物向远处播散侵袭胎盘, Vinturache 等^[12]也报道局部组织中大量细菌的定植可诱发炎症级联反应, 加重组织损伤。Arce 等^[13]的研究发现口腔感染牙周致病菌的动物模型中胎盘组织的 TLR4 表达增强。本研究检测了 Pg 感染后的大鼠胎盘中 TLR2 和 TLR4 的表达水平, 结果显示 TLR4 表达水平升高而 TLR2 无显著变化。

Inaba 等^[14]的研究发现 Pg 感染可引起滋养层细胞凋亡。Fas/FasL 是介导细胞凋亡的主要信号通路之一。Ren 等^[15]报道 Pg 感染滋养层细胞的体外模型中 Fas 参与了 Pg 诱导的滋养层细胞凋亡。Qiu 等^[16]的研究发现母胎界面 Fas/FasL 的表达与

早产的发生关系密切。本研究首次在 Pg 感染的动物模型中证实了胎盘组织中凋亡因子 Fas、FasL 的表达上调。

总之,尽管免疫组织化学法和 Western blot 检测胎盘组织相关蛋白表达情况不尽相同,本研究结果表明大鼠胎盘组织 TLR4、Fas 和 FasL 与 Pg 感染关系密切,而对照组中的表达水平未见明显升高;同时,Pg 感染引起新生仔鼠的出生体重显著降低。据此推断,孕鼠感染 Pg 娩出较低体重新生仔鼠可能与胎盘组织 TLR4、Fas 和 FasL 的表达失衡和调节异常有关,为临床预防和控制 PLBW 提供新思路。然而,Pg 感染对病理性妊娠其他方面的影响及相关的具体机制有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] Hughes MM, Black RE, Katz J. 2500-g low birth weight cutoff: history and implications for future research and policy [J]. *Matern Child Health J*, 2017, 21(2): 283-289
- [2] Corbella S, Taschieri S, Francetti L, et al. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of case-control studies [J]. *Odontology*, 2012, 100(2): 232-240
- [3] Teshome A, Yitayeh A. Relationship between periodontal disease and preterm low birth weight: systematic review [J]. *Pan Afr Med J*, 2016, 24: 215
- [4] Vanterpool SF, Been JV, Houben ML, et al. Porphyromonas gingivalis within placental villous mesenchyme and umbilical cord stroma is associated with adverse pregnancy outcome [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146157
- [5] Ao M, Miyauchi M, Furusho H, et al. Dental infection of porphyromonas gingivalis induces preterm birth in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0137249
- [6] Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The human placenta project: placental structure, development, and function in real time [J]. *Placenta*, 2014, 35(5): 303-304
- [7] Li L, Ren H, Li Y, et al. Effect of porphyromonas gingivalis

- infection on human trophoblast cells proliferation and apoptosis [J]. *Journal of Oral Science Research*, 2016, 32(2): 143-146
- [8] Macpherson AJ, de Agüero MG, Ganai-Vonarburg SC. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(8): 508-517
- [9] Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes—systematic review [J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40 Suppl 14: S181-S194
- [10] Turton M, Africa CW. Further evidence for periodontal disease as a risk indicator for adverse pregnancy outcomes [J]. *Int Dent J*, 2017, 67(3): 148-156
- [11] Hirsch E, Wang H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model [J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2005, 12(3): 145-155
- [12] Vinturache AE, Gyamfi-Bannerman C, Hwang J, et al. Maternal microbiome—A pathway to preterm birth [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2016, 21(2): 94-99
- [13] Arce RM, Barros SP, Wacker B, et al. Increased TLR4 expression in murine placentas after oral infection with periodontal pathogens [J]. *Placenta*, 2009, 30(2): 156-162
- [14] Inaba H, Kuboniwa M, Sugita H, et al. Identification of signaling pathways mediating cell cycle arrest and apoptosis induced by Porphyromonas gingivalis in human trophoblasts [J]. *Infect Immun*, 2012, 80(8): 2847-2857
- [15] Ren H, Li Y, Jiang H, et al. Interferon-gamma and Fas are involved in Porphyromonas gingivalis-induced apoptosis of human extravillous trophoblast-derived HTR8/SVneo cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway [J]. *J Periodontol*, 2016, 87(11): e192-e199
- [16] Qiu Q, Yang M, Tsang BK, et al. Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal-fetal interface [J]. *J Reprod Immunol*, 2005, 65(2): 121-132

[收稿日期:2018-01-12]

(本文编辑 关隽)

关于《口腔医学研究》启用在线投稿系统的启事

《口腔医学研究》杂志网址为 www.kqxyj.com,网站主要包括投稿与查询系统、编辑加工系统、专家远程审稿系统 3 部分。作者可以通过网站投稿并查询稿件处理情况,审稿专家可实现网上审稿。

作者投稿的步骤:登录《口腔医学研究》网站→点击左侧“作者投稿系统”→注册→填写个人资料→登陆“作者投稿系统”即可。初次注册可能需要花费一定时间,但注册成功后投稿和查询便可节约大量时间和精力,今后投稿无需再次注册。

此外,编辑部的有关公告和通知也将通过网站发布,编辑部联系电话:027-87686117,E-mail:kqxyj@163.com。