

# 大鼠微螺钉种植体周围炎外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的水平变化

李娜<sup>1</sup> 林崇翔<sup>2</sup> 丁熙<sup>2</sup> 邵侠<sup>2</sup> 赵瑜<sup>1</sup> 屠呈威<sup>2\*</sup>

(1. 温州医科大学附属口腔医院牙体牙髓科 浙江温州 325000;

2. 温州医科大学附属第一医院口腔颌面外科 浙江温州 325000)

**[摘要]** 目的:建立大鼠股骨微螺钉种植体周围炎模型,检测其外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞水平的变化。方法:12 只雄性 SD 大鼠分为正常组、炎症组、空白组 ( $n=4$ ),正常组和炎症组单侧股骨远心端植入微螺钉种植体 1 枚,炎症组在植入种植体后用丝线环扎种植体颈部并使种植体上端暴露于体表外;正常组在植入种植体后严密缝合,植体不外露;空白组仅进行麻醉、切开及缝合等对照处理,未植入种植体。术后第 4 周取样、采血,拍摄 X 线片并采用流式细胞术检测外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) 在 T 淋巴细胞 (CD4<sup>+</sup>) 中的比例。结果:炎症组大鼠种植体周围出现炎性肉芽组织, X 线片显示植体颈部周围皮质骨有角形吸收,其外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例为 (0.66±0.32)%,显著低于正常组 (2.69±1.19)% 和空白组 (4.06±1.34)%,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );正常组和对照组之间差异无统计学意义。结论:大鼠股骨远心端微螺钉种植体周围炎模型造模成功;该动物模型外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在数量上存在异常,可能与种植体周围炎的发生有关。

**[关键词]** 微螺钉种植体 种植体周围炎 调节性 T 细胞 Foxp3 大鼠

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2018)07—0726—04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.07.010

**Change of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Level in Peripheral Blood of Experimental Peri-implantitis Model of Rats with Microscrew Implants.** LI Na<sup>1</sup>, LIN Chong-xiang<sup>2</sup>, DING Xi<sup>2</sup>, SHAO Xia<sup>2</sup>, ZHAO Yu<sup>1</sup>, TU Cheng-wei<sup>2\*</sup>.

1. Department of Endodontics, the Affiliated Stomatological Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 2. Department of Oral-maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China.

**[Abstract]** **Objective:** To establish a peri-microscrew implantitis model in the femur of rats, and investigate the change of proportion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood. **Methods:** Twelve male SD rats were divided into normal group, peri-implantitis group, and blank group ( $n=4$ ). The normal group and peri-implantitis group accepted an implantation of microscrew implant in the distal end of the femur, while the later one underwent cervical ligation immediately around the implants whose upper part was exposed in vitro. The normal group had no events after the implantation, and the blank group only accepted a “fake” operation without implantation. Four weeks after the operation, the abdominal blood was collected and the femur of each group was taken an X-ray examination and detected the the ratio of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) in T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>) using flow cytometry. **Results:** The peri-implantitis group showed an inflammatory granulation tissue around the implants, whose X-ray film indicated an angular absorption of cortical bone and had a lower proportion (0.66±0.32)% of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral blood, significantly lower than normal group (2.69±1.19)% and blank group (4.06±1.34)% ( $P<0.05$ ). There was no statistically significant difference between normal group and the control group. **Conclusion:** The model of peri-microscrew implantitis in rats' distal end of femur can be established. Rats with peri-microscrew implantitis have a decrease in the number of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood, which may be associated with the pathogenesis of peri-microscrew implantitis.

**基金项目** 温州市科技计划项目(编号:Y20140325)

温州市科技计划项目(编号:Y20170762)

**作者简介** 李娜(1986~),女,浙江宁波人,硕士,主治医师,研究方向为口腔种植与修复。

\* 通讯作者 屠呈威, E-mail:175193674@qq.com

**[Key words]** Microscrew implant Peri-implantitis Regulatory T-lymphocytes Foxp3 Rat

近年来,随着支抗技术及颌间牵引技术的逐渐发展和进步,微螺钉型支抗种植体在口腔正畸及颌面外科领域内被广泛开展<sup>[1~3]</sup>,其稳定性是获得良好治疗效果的基础。微螺钉种植体周围炎是导致种植体松动的主要原因<sup>[4]</sup>,尤其好发于骨质疏松、糖尿病等患者群体<sup>[5]</sup>,其具体的发病机制仍未阐明,机体的免疫功能失调也有可能参与其病理过程<sup>[6~8]</sup>。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群,在调节免疫反应、防止自身免疫病发生以及预防移植物抗宿主反应等方面具有重要作用和应用潜能<sup>[9~11]</sup>。Foxp3 是 Fox 转录因子家族的一员,在外周组织中,主要表达于 CD4<sup>+</sup> T 细胞,它能通过调控 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的转录和蛋白表达参与机体稳态,在感染免疫、肿瘤免疫及自身免疫病中发挥重要作用<sup>[12~14]</sup>。本次实验采用大鼠股骨微螺钉种植体模型<sup>[15]</sup>,通过破坏其颈部微生态环境模拟种植体周围炎的病理状态,检测其外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞水平的变化,初步探讨机体免疫功能的改变在微螺钉种植体周围炎发病机制的作用。

## 1 材料与方法

1.1 动物与药品 健康成年 SD 大鼠,雄性,12 只,体重 250~300 g,SPF 级,由温州医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(浙)2015-0001。分笼饲养,正常饲料和饮水饲养于温州医科大学附属第一医院动物房。水合氯醛粉剂(北京索莱宝科技有限公司),FITC-大鼠 CD4 抗体,APC-大鼠 CD25 抗体,PE-小鼠/大鼠 Foxp3 抗体及同荧光的同型对照抗体(eBioscience,美国),红细胞裂解液(MultiScience,美国),破膜试剂盒(eBioscience,美国),流式染色缓冲液(MultiScience,美国)。

1.2 材料与仪器 微螺钉种植体(自攻自钻型,直径 1.5 mm,长度 9 mm,上海昊申医疗器械有限公司)、流式细胞仪(BD FACSCalibur,美国)。

1.3 造模和分组 大鼠适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为正常种植组(A 组)、种植体周围炎组(B 组)和空白对照组(C 组),每组 4 只。3 组大鼠均用 10%水合氯醛腹腔注射(0.3 ml/100 g 体重)行全身麻醉,达效后于 A、B 组大鼠单侧股骨近心端植入微螺钉种植体 1 枚,C 组则仅行切开、预备种植窝以及缝合等处理,不植入种植体。B 组在植入种植体后用 3-0 慕丝线环扎种植体颈部,并将非螺纹部位暴露于体表外,术后第 4 周取样拍摄 X 线平片以证实微螺钉种植体周围炎造模成功。A 组植入种植

体后分层严密缝合创口,种植体不暴露于体外。

## 1.4 检查项目

1.4.1 临床观察 术后定期(每周 2~3 次)监测各组大鼠体重变化、创口愈合情况及种植体稳定性,并随时做好记录。

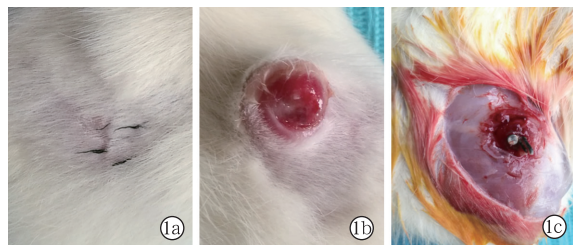
1.4.2 微种植体 X 线片检查 术后第 4 周处死各组大鼠,将 A、B 组种植体所在股骨完整取样,垂直种植体长轴拍摄等距离 X 线平片,评估 A、B 两组种植体周围是否存在骨吸收。

1.4.3 检测外周血 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例 种植体植入术后第 4 周,采集各组大鼠下腔静脉外周血 1 mL,肝素抗凝。取静脉血 100  $\mu$ L,加入藻红蛋白标记的 CD4 抗体和异硫氰酸荧光素标记的 CD25 抗体各 20  $\mu$ L,设阴性和空白对照。4  $^{\circ}$ C 冰箱避光孵育 30 min,加入 2 mL 稀释好的红细胞裂解液(1 $\times$ ),迅速混匀,观察溶液透亮后用预冷 PBS 溶液洗涤细胞,离心去上清,漩涡震荡重悬细胞后加入 1 mL 破膜工作液,避光孵育 30 min,然后加入 2 mL 破膜缓冲液,离心洗涤细胞并弃上清,用 100  $\mu$ L PBS 重悬细胞后加入适量的 Foxp3 抗体,对照管中加入适量的同型对照,避光 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加入 2 mL 破膜工作液离心洗涤细胞并弃去上清后用适量体积的流式染色缓冲液重悬细胞,并上流式细胞仪检测并分析。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件包进行 ANOVA 方差分析和 *q* 检验(student Newman Keuls test),以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 临床观察结果 植入种植体 2 周后,A 组及 C 组大鼠手术部位创口愈合良好(图 1a);B 组大鼠则出现以种植体为中心的炎性肉芽组织,表面有溃烂灶,触之易出血(图 1b),切除肉芽组织后可见种植体周围结扎丝线暴露(图 1c)。各组体重生长曲线无明显差异。

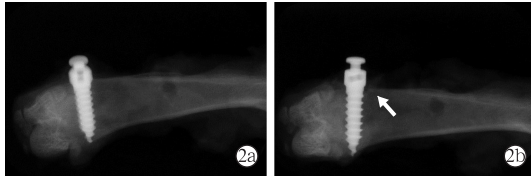


1a:创口愈合;1b:种植体周围炎性肉芽组织;1c:切除炎性肉芽组织可见种植体

图 1 种植术后 2 周大体观察

Fig. 1 General observation 2 weeks after the implantation.

2.2 微种植体骨结合情况影像学检测结果 术后4周X线片显示,正常种植组(A组)微螺钉种植体与股骨之间无纤维结缔组织长入,影像学上达到骨结合标准,种植体颈部未见骨吸收;种植体周围炎组(B组)颈部以下部位与股骨之间能达到骨结合,但颈部可见角型骨吸收(图2)。



2a:正常种植组;2b:种植体周围炎组,箭头所示为骨吸收

图2 术后4周X线片检查

Fig. 2 X-ray examination 4 weeks after the operation.

2.3 外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞检测结果 流式细胞仪检测发现,正常种植组(A组)、种植体周围炎组(B组)和空白对照组(C组)外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞(CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) 占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例;A组为(2.69±1.19)%,B组为(0.66±0.32)%,C组为(4.06±1.34)%,B组显著低于A组和C组,差异有统计学意义(P<0.05);A组和C组之间差异无统计学意义,见图3。

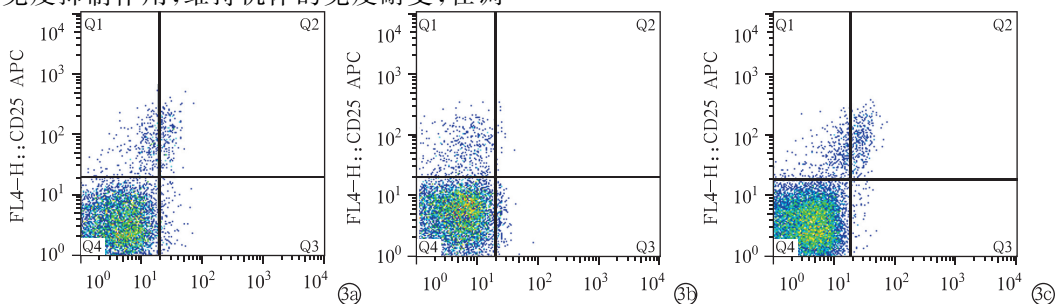
### 3 讨论

作为绝对支抗,微螺钉种植体在口腔正畸及颌间牵引等领域发挥着重要作用,但微螺钉支抗周围组织的炎症会严重影响其稳定性,进而导致治疗失败。牙周致病菌是牙周炎及种植体周围炎的始动因子,但过度的机体免疫应答所产生的组织破坏远远大于病原菌产生的破坏效应<sup>[6]</sup>。因此,探索免疫应答在微螺钉种植体周围炎发生发展中的作用,能够为其诊断和治疗提供一条新途径。调节性 T 细胞(Treg 细胞)属于 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群,主要分泌 IL-10、TGF-β,可通过抑制效应 T 细胞的增殖分化来发挥免疫抑制作用,维持机体的免疫耐受,在调

节免疫反应、防止自身免疫病发生以及抗感染、抗肿瘤免疫等方面具有重要作用和应用潜能<sup>[16]</sup>。转录因子 Foxp3 作为 Treg 特异性敏感的标志,特异性表达于 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞,在 Treg 细胞的发育和功能上是必需的<sup>[17]</sup>。目前研究发现 Treg 细胞与多种疾病有关,包括自身免疫性疾病、炎症性疾病、移植耐受及肿瘤等,同时在口腔疾病中的研究也在逐步深入<sup>[18~20]</sup>。有研究表明,IL-10、TGF-β 与牙周炎的发展进程及活动期呈负相关,在牙周炎症较轻的区域,TGF-β 升高,Treg 细胞数量增多<sup>[21]</sup>,而侵袭性及重度牙周炎患者中外周血中的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例显著低于牙周健康者和 CP 患者<sup>[22,23]</sup>。王琳源等<sup>[24]</sup>通过建立小鼠的牙周炎模型,发现牙周炎小鼠外周血中 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 细胞在 CD4<sup>+</sup> T 细胞中的比例下降,提示在牙周炎的发病过程中,Treg 细胞介导的免疫应答减弱。本实验的研究结果表明,大鼠微螺钉种植体周围炎外周血中的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞所占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例较正常及空白对照组显著下降,提示微螺钉种植体周围炎的疾病状态下,机体内 Treg 细胞介导的免疫应答减弱,与上述研究结果一致。

目前常见的支抗种植体动物模型以犬为主<sup>[25,26]</sup>,其存在价格昂贵、饲养周期长、样本量小等问题,本实验采用 SD 大鼠异位种植模型,虽然与真实口腔环境存在较大差异,但能基本模拟支抗种植体周围炎的临床状态,且具有操作简便、重复性好、样本量充足等优点,能初步探讨微螺钉支抗种植体周围炎导致的外周血中调节性 T 细胞水平的变化,为进一步的大型动物实验或临床试验提供理论支持。

综上所述,本研究表明大鼠微螺钉支抗种植体周围炎外周血中 Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在数量上存



3a:正常种植组;3b:种植体周围炎组;3c:空白对照组

图3 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞散点图

Fig. 3 Plot maps of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells/CD4<sup>+</sup> T cells.

在异常,提示了 Treg 细胞介导的免疫应答减弱在种植体周围炎的发病过程中起到了一定的作用。但因本实验采用了异位种植模型,其结果只是提示性的,仍需后续进一步的大样本或大体积动物模型进行系统性研究。

### 参考文献

- [1] 郭忠军,周洪,李瑞春,等.微螺钉型种植体支抗对成人双颌前突患者的疗效分析[J].中国口腔颌面外科杂志,2017,15(6):519-523
- [2] 白振西,高志彪,肖霞,等.颌间牵引钉在颌骨骨折内固定手术治疗中的临床应用研究[J].实用口腔医学杂志,2015,31(2):219-224
- [3] 胡超,肖金刚,胡文健,等.颌间牵引钉联合小型或微型钛板内固定修复颌骨骨折[J].中国组织工程研究,2016,20(11):1610-1615
- [4] 孙福财,余方友,李贤.盐酸米诺环素软膏对微螺钉支抗种植体周围炎龈下牙龈卟啉单胞菌影响[J].口腔医学研究,2016,33(4):395-398
- [5] 刘思,吴建勇,刘剑.微螺钉支抗的研究进展[J].南昌大学学报(医学版),2017,57(2):96-99,106
- [6] 王宇婷,邱憬.免疫应答在种植体周围炎发生发展和防治中作用的研究进展[J].口腔医学,2014,34(11):857-860
- [7] 史秋涛,谷志远.肿瘤坏死因子- $\alpha$ 与种植体周围炎炎症骨吸收[J].口腔医学研究,2015,31(7):745-747
- [8] 孙志新,张云涛.口腔种植体周围炎与白细胞介素间的关系[J].国际口腔医学杂志,2015,42(2):221-224
- [9] Costa N, Pires AE, Gabriel AM, et al. Broadened T-cell repertoire diversity in ivIg-treated SLE patients is also related to the individual status of regulatory T-cells [J]. J Clin Immunol, 2013, 33(2): 349-360
- [10] Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression [J]. Cancer Immunol Immunother, 2014, 63(1): 67-72
- [11] Koivula TT, Tuulasvaara A, Hetemäki I, et al. Regulatory T cell response correlates with the severity of human hantavirus infection [J]. J Infect, 2014, 68(4): 387-394
- [12] Da Costa A, Garza E, Graham JB, et al. Extrinsic MAVS signaling is critical for Treg maintenance of Foxp3 expression following acute flavivirus infection [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40720
- [13] Sun H, Gao W, Pan W, et al. Tim3(+) Foxp3(+) Treg cells are potent inhibitors of effector T cells and are suppressed in rheumatoid arthritis [J]. Inflammation, 2017, 40(4): 1342-1350
- [14] Wang X, Lang M, Zhao T, et al. Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3(+)Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2017, 36(21): 3048-3058
- [15] 何昇,杨璐铭,李运峰,等.骨质疏松对完成骨整合的大鼠股骨钛种植体稳定性的影响[J].口腔医学,2017,37(11):991-996
- [16] Naufel AO, Aguiar MCF, Madeira FM, et al. Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review [J]. Braz Oral Res, 2017, 31: e103
- [17] Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3 [J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(11): 703-717
- [18] 滕丹丽,梁文红. Treg 细胞在口腔疾病中的研究进展[J].中国医学创新,2015,12(12):136-139
- [19] Boduc M, Roessler M, Mandic R, et al. Foxp3 expression in lymph node metastases in patients with head and neck cancer [J]. Acta Otolaryngol, 2017, 137(11): 1215-1219
- [20] Hussaini HM, Parachuru VPB, Seymour GJ, et al. FoxP3 and TLR2 in co-expression in oral cancer [J]. Acta Histochem, 2017, 119(7): 768
- [21] Okui T, Aoki Y, Ito H, et al. The presence of IL-17<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> double-positive cells in periodontitis [J]. J Dent Res, 2012, 91(6): 574-579
- [22] 赵川江,徐琛蓉,周玉竹,等.侵袭性牙周炎患者外周血 CD-4<sup>+</sup>CD-25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的检测及功能分析 [J]. 中华口腔医学杂志,44(7):413-415
- [23] 徐琛蓉,赵川江,江丽.慢性牙周炎病人外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的检测和免疫抑制功能分析[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2009,19(9):493-496
- [24] 王琳源,关宁,林晓萍. Treg 细胞介导的免疫应答在牙周炎小鼠中的研究[J].实用口腔医学杂志,2015,31(3):318-322
- [25] 李喜红,王淑敏,崔淑霞.国产自攻型微螺钉种植体感染的实验研究[J].中国口腔种植学杂志,2013,18(3):122-124
- [26] 张燎,于宝军. PRP 对微螺钉种植支抗加载后不同时期周围骨组织变化的实验研究[J].中国口腔种植学杂志,2015,20(3):106-110

[收稿日期:2018-01-22]

(本文编辑 李四群)