

· 牙周病学研究 ·

抗中间普氏菌卵黄抗体对大鼠妊娠期龈炎疗效的初探

蒋鹏¹ 徐燕^{1*} 周莉莉¹ 徐涵颖¹ 辛保见¹ 叶兴如¹ 沈继龙³ 程婷²

(1. 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院,

安徽省口腔疾病研究重点实验室 安徽 合肥 230032;

2. 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司 安徽 合肥 230032;

3. 安徽医科大学人兽共患病安徽省重点实验室 安徽 合肥 230032)

[摘要] 目的:制备和纯化抗中间普氏菌特异性卵黄免疫球蛋白(IgY),并评价其对实验性妊娠期大鼠牙龈炎的治疗作用。方法:两步硫酸铵沉淀法获得特异性 IgY,将 24 只雌性 SD 大鼠随机分为 4 组,A 组(空白组)、B 组(阴性组):造模、C 组:(阳性组)造模+替硝唑溶液、D 组:(实验组)造模+IgY 溶液,通过牙龈指数(GI)、菌斑指数(PLI)、体重变化、RT-qPCR,及组织病理学切片观察特异性 IgY 的治疗作用。结果:通过对大鼠实验性妊娠期牙龈炎的治疗 GI、PLI($P<0.001$)、体重($P<0.05$)均得到改善,龈下菌斑治疗前后中间普氏菌的构成比明显降低($P<0.05$)。结论:抗中间普氏菌特异性卵黄抗体可改善大鼠实验性妊娠期的牙龈炎症状况。

[关键词] 中间普氏菌 牙龈炎 实时荧光定量 PCR

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)05—0466—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.05.013

Preliminary Study on Effect of Yolk Antibody against *Prevotella Intermedia* on Gingivitis during Pregnancy in Rats.

JIANG Peng¹, XU Yan^{1*}, ZHOU Li-li¹, XU Han-ying¹, XIN Bao-jian¹, YE Xin-ru¹, SHEN Ji-long³, CHENG Ting². 1. College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032, China; 2. Anhui Anke Biotechnology (Group) Co., Ltd, Hefei 230032, China; 3. Anhui Key Laboratory of Zoonoses, Anhui Medical University, Hefei 230032, China.

[Abstract] **Objective:** To prepare and purify specific yolk immunoglobulin (IgY) against *Prevotella intermedia* (P. intermedia, Pi) and to evaluate its therapeutic effect on experimental gingivitis in pregnant rats. **Methods:** Specific IgY was prepared by two-step ammonium sulfate precipitation method. Twenty-four female SD rats were randomly divided into 4 groups: group A (blank control group), group B (negative group): modeled, group C (positive control group): modeled + tinidazole solution, and group D (experimental group): modeled + specific IgY solution. The therapeutic effect of specific IgY was observed by gingival index (GI), plaque index (PLI), body weight change, RT-qPCR, and histopathological sections. **Results:** Through the treatment of experimental gestational gingivitis in rats, the GI, PLI ($P<0.001$) and body weight ($P<0.05$) were improved, and the composition ratio of P. intermedia was significantly decreased after the treatment of subgingival plaque ($P<0.05$). **Conclusion:** Anti-P. intermedia-specific yolk antibody can relieve the gingival inflammation in rats during pregnancy

[Key words] *Prevotella intermedia* Gingivitis Real-time quantitative polymerase chain reaction

妊娠期龈炎是妇女在怀孕期间的一种常见病、多发病。菌斑微生物是妊娠期龈炎的直接病因,体内类固醇激素水平的升高则使炎症加剧^[1],此时中间普氏菌成为龈下优势菌。妊娠期妇女若治疗不及

时易发展成牙周疾病,会影响胎儿的正常发育,甚至引起早产^[2],口腔微生物引发各种不良妊娠结局,对妊娠过程及胎儿健康造成极大影响^[3]。最近的研究表明,P. intermedia 可以表达半胱氨酸蛋白酶 Interpain A (Inp A)^[4],它可以使 C3α 链降解并沉积 C1 以抑制补体系统的活化^[5],Inp A 可以与牙龈卟啉单胞菌的 gingipain 一起作用以增强其功能^[6],从而导致牙周组织的破坏。由于妊娠期龈炎疾病的特殊性,治疗上的局限性及全身药物难以使用,在局部

基金项目 安徽省教育厅自然科学重大项目(编号:KJ2017ZD17)

作者简介 蒋鹏(1990~)男,浙江温州人,硕士,主要从事牙周临床工作。

* 通讯作者 徐燕, E-mail: 173236344@qq.com

用药的选择上也有限,使妊娠期龈炎的治疗效果不理想。因此很有必要开发一种无副反应的生物制剂来抑制中间普氏菌,避免或减轻妊娠期龈炎。孟明理采用 Hgp44 作为抗原免疫得到的特异性抗体能减少牙槽骨的吸收,减缓大鼠实验性牙周炎的发展进程^[7]。本研究的目的是将 InpA 作为抗原,制备和纯化针对中间普氏菌的特异性免疫球蛋白,并评估其对大鼠实验性妊娠期牙龈炎的作用。

1 材料与方 法

1.1 主要的材料和设备

SPF 级 SD 大鼠雌性 24 只(8~10 周龄)、雄性 12 只(8~10 周龄,安徽医科大学动物实验中心);中间普氏菌(ATCC25611,日本微生物菌种保藏中心);PYG 液体培养基基础(PYG Broth Medium Base,青岛海博生物技术有限公司);哥伦比亚血琼脂培养基(江门凯林贸易有限公司);K1(麦克林);氯化血红素(青岛海博生物技术有限公司);DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);探针法实时定量 PCR 试剂盒(TaKaRa,日本);厌氧工作站(DG250 Anaerobic workstation,英国 Don Whitley Scientific 公司);实时定量 PCR 仪(Agilent Technologies,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 中间普氏菌的培养和鉴定

将保存于-80℃的菌种在超净台内接种到血平板,置于厌氧工作站内培养(培养条件:37℃,混合器比例:85%N₂、10%H₂、10%CO₂),培养 4 d 可见特征性单个黑色菌落生产,将单菌落挑到 PYG 液体培养基中(加入 K1 及氯化血红素)进行扩菌培养,48 h 后用 DNA 提取试剂盒提取培养基中细菌的 DNA,利用 Pi 的 16s rRNA 引物进行鉴定 R: 5'-TTTGTGGG-GAGTAAAGCGGG-3' F: 5'-TCAACATCTCTG-TATCCTGCGT-3';大小为 575 bp。

1.2.2 特异性卵黄抗体的纯化

按照课题组前期合成的 InpA 作为抗原免疫蛋鸡获得的鸡蛋进行纯化^[7](两步硫酸铵沉淀法)提取得到特异性 IgY,并将其保存在-20℃冰箱备用。

1.2.3 Lorry 法测蛋白质浓度

紫外法粗侧样品蛋白浓度,将其浓度调整为约 100 mg/L。取牛血清白蛋白加水溶解制成 0.2 g/L 的溶液,取 6 个试管分别加入上述溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 再定容到 1 mL(样本亦定容到 1 mL),再分别加入甲液(Na₂CO₃/NaOH、酒石酸钾、CuSO₄ 按比例混合)摇匀室温放置 10 min,再加入乙液(福林酚试

剂)立即混匀,经紫外分光光度计测量样品及标准品在波长 650 nm 时的 A 值,绘制标准曲线,计算样品浓度。

1.2.4 大鼠实验性妊娠期牙龈炎的建立

24 只雌性 SD 大鼠(8~10 周龄),12 只雄性 SD 大鼠(8~10 周龄)将 24 只雌鼠随机分为 4 组:A 组:空白组、B 组:阴性组、C 组:替硝唑治疗组、D 组:IgY 治疗组,使用丝线结扎上下第一磨牙。饮用 10%蔗糖水,接种细菌(菌浓度 1×10⁹ CFU/mL)。隔日接种菌 1 次(0.2 mL),结扎 1 周后与正常组同时按 2:1 与雄鼠合笼,次日查阴道涂片,发现精子为受孕第 1 天。继续隔日接种 1 周,之后去除结扎线,分别给予相应的药物 300 μL/只,隔日 1 次共 6 次。

1.2.5 检测指标

牙龈指数(GI)、菌斑指数(PLI)^[8]、体重(测各组动物的体重,计算给药后第 4、12 天与给药前的差值,每组取均值)。

1.2.6 探针法实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测治疗前后龈下菌斑中中间普氏菌含量的变化

1.2.6.1 牙菌斑的采集及 DNA 提取

在治疗前后分别在第一磨牙患有牙龈炎的部位采集菌斑样本。用无菌刮治器探入牙周袋袋底,轻柔刮取牙根面少量龈下菌斑。并将其放在盛有 0.3 mL PBS 的 Eppendorf 管中,-80℃保存。龈下菌斑样本于室温下解冻,12000 r/min 离心 2 min,吸净上清,利用 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取 DNA,将提取物置于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,-20℃保存,备用。

1.2.6.2 引物及探针的设计

查阅文献并结合 NCBI 结果,确定引物和探针的系列(表 1)均由上海 Sangon Biotech 公司合成。

表 1 RT-qPCR 的引物和探针序列

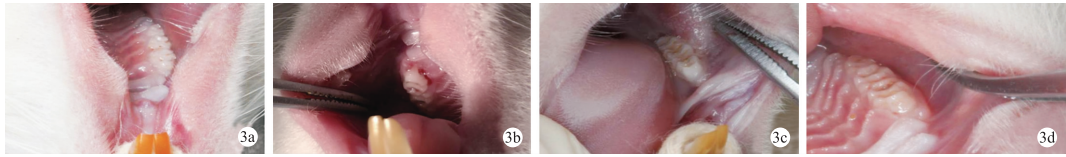
Tab. 1 Primers sequence for RT-qPCR

细菌	序列(5'→3')	长度/bp
P. intermedia		
上游引物	ATCCAACCTTCCCTCCACTC	103
下游引物	TCCACCGATGAATCTTTGGTC	
探针	CGTCAGATGCCATATGTGGAC AACATCG	
Universal ^[8]		
上游引物	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA	158
下游引物	TGCGGGACTTAACCCAACA	
探针	CACGAGCTGACGACAAGC CATGCA	

注:探针 5'均用 FAM 修饰,3'均用 TAMRA 修饰

1.2.6.3 标准品制备

由上海 Sangon Biotech 公



3a:空白组;3b:阴性对照组(生理盐水);3c:替硝唑组;3d:IgY组

图3 治疗结束后各组牙龈形态学观察

Fig. 3 Morphological observation of gingiva in each group after treatment.

司合成 *P. intermedia*、Universal 质粒 DNA, 通过公式将这 2 种标准质粒的拷贝数稀释至 1.0×10^{10} copies/ μL 备用。

1.2.6.4 RT-qPCR 反应条件 通过 PCR 梯度调节退火温度, 结合琼脂糖凝胶电泳结果, 确定最适宜退火温度(表 3):

表 2 (RT-qPCR) 的反应条件

Tab. 2 Reaction conditions of RT-PCR

细菌	预变性	变性	退火	延伸	循环数
<i>P. intermedia</i>	95 °C	95 °C	57 °C 30 s	72 °C	45
Universal	30 s	5 s	51 °C 30 s	30 s	

每个 96 孔板上均设置阳性对照和空白对照, 阳性对照为 10 倍梯度稀释的标准品 ($10^{10} \sim 10^4$ copies/ μL), 阴性对照不加模板, 用等体积的 DEPC 水代替。每个标准品和样本均重复检测 3 次, 取平均值计算菌量。

1.2.7 牙龈组织病理切片 取结扎处牙龈组织用 10% 甲醛固定, 乙醇梯度脱水, 包埋, 切 5 μm 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据的统计学分析, 实验统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 One-way ANOVA 统计分析不同处理组各项指标的差异, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。实时荧光定量 PCR 组内比较采用 Wilcoxon signed-rank 检验。



M: Marker; 1: *P. intermedia*

图1 中间普氏菌形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of *Pi*.

2 结果

2.1 中间普氏菌的鉴定 血红素在细菌表面沉积而使菌落变黑(图 1), PCR 鉴定结果(图 2)。

2.2 Lorry 法测蛋白质浓度 经检测两步硫酸铵沉淀法获得的样本中特异性卵黄抗体的含量为 31.68 g/L。

2.3 大鼠实验性妊娠期牙龈炎治疗后形态学观察 治疗结束后可见 B 组大鼠第一磨牙牙龈缘呈鲜红色光亮, 肿胀探针易出血, 呈炎症状态, 而 A、C 和 D 组牙龈色粉红, 探诊无出血(图 3)。

2.4 检测指标结果

2.4.1 临床观察指标在每组中的变化 C 组、D 组的治疗结果(GI 和 PLI)和 B 组相比差异具有统计学意义, GI ($F = 183.072, P < 0.001$), PLI ($F = 64.502, P < 0.001$), 说明替硝唑和 IgY 给药都能改善大鼠牙龈炎症状况。C 组和 D 组治疗结果相比无统计学差异 GI ($t = -0.349, P = 0.734$), PLI ($t = 0.255, P = 0.804$), 见表 3。

表 3 治疗结束后各组大鼠临床指标变化

Tab. 3 Change of clinical indexes in rats after treatment

组别	牙龈指数	菌斑指数
A 组	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.29
B 组	2.55 ± 0.27	2.05 ± 0.27
C 组	0.21 ± 0.19*	0.38 ± 0.26
D 组	0.25 ± 0.22*	0.33 ± 0.30*

注: C、D 组与 B 组相比差异具有统计学意义, * $P < 0.001$

2.4.2 治疗前后大鼠体重变化 空白组、IgY 组、替硝唑组和阴性组治疗后大鼠体重一直呈增长趋势, 空白组、IgY 组、替硝唑组的体重变化明显高于阴性组 ($P < 0.05$), 空白组、IgY 组、替硝唑组的体

表 4 3 组治疗前后 *P. intermedia* 在总菌量的构成比

Tab. 4 Comparison of *P. intermedia* in the proportion of total bacteria before and after treatments [M(P25,P75)]($\times 10^{-2}$)

细菌种类	IgY 组		阴性对照组		替硝唑组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
中间普氏菌	4.97(1.76,8.30)	0.16(0.08,0.49)*	2.67(1.80,8.74)	1.55(1.12,6.56)	4.07(2.04,5.93)	0.05(0.02,0.07)*

注: * $P < 0.05$

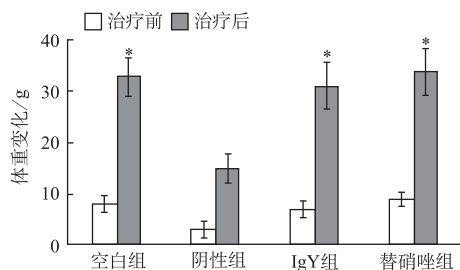
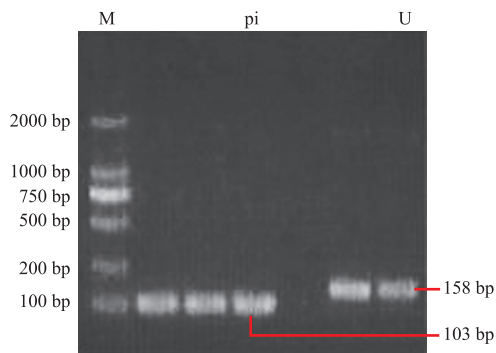


图 4 大鼠治疗前后体重变化

Fig. 4 Weight changes of rats before and after treatments.



M: marker; Pi: *P. intermedia*; U: Universal

图 5 *P. intermedia*、Universal 质粒电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis results of *P. intermedia*, Universal.

重变化无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4、表 4。

2.5 探针法实时荧光定量检测治疗前后龈下菌斑中中间普氏菌含量的变化

2.5.1 质粒电泳图(图 5)

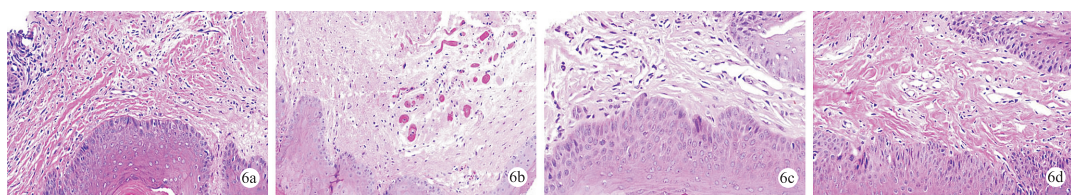
2.5.2 RT-qPCR 试验结果 *P. intermedia* 治疗前后数量均有变化 *P. intermedia* 在 IgY 组和替硝唑组治疗前后的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在阴性对照组治疗前后差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 组织病理学观察 A 组龈沟壁内胶原纤维排列整齐, 基底膜完整, 无伸长的上皮钉突, 无炎性细胞浸润, B 组可见长的上皮钉突, 基底细胞排列紊乱, 有新生毛细血管及炎性细胞浸润, 胶原纤维变性或消失, C 组和 D 组基底膜较整齐, 龈沟壁内无炎性细胞浸润, 纤维排列整齐(图 6)。

3 讨论

中间普氏菌是牙龈炎的主要致病菌, 尤其是妊娠期牙龈炎。抗生素在孕期使用是不安全的^[9]。因此, 妊娠期牙龈炎需要新的, 安全有效的治疗方法。近年来, 卵黄抗体已广泛应用于医学、食品科学和生物技术等领域。前期研究将中间普氏菌全菌作为抗原获得的特异性抗体, 能够减轻大鼠实验性妊娠期牙龈炎, 具有一定的预防作用^[10]。以霍乱弧菌 LPS 作为抗原制备 IgY, 所制备的抗弧菌脂多糖特异性 IgY 与其特异性抗原具有良好的反应性^[11]。Inp A 是中间普氏菌基因组基因编码的一种半胱氨酸蛋白酶。Potempa 的研究表明, InpA 能够降解补体因子 C3, 补体因子 C3 是整个补体系统的中心分子, 可阻断经典途径, 凝集素途径和旁路途径激活。此外, InpA 能够使血清中的 C1 沉积到惰性表面, 而不需要特定的 C1 激活剂, 这可能导致局部炎症^[5]。InpA 是中间普氏菌的重要毒力因子, 因此我们选择它作为抗原来制备针对中间普氏菌的特异性 IgY。动物实验也证实它能够减轻大鼠妊娠期的牙龈炎症。本研究结果为妊娠期牙龈炎的治疗提供了一种新的治疗方法, 为特定卵黄抗体的临床应用提供了新的方向。

抗中间普氏菌特异性卵黄抗体可改善大鼠实验性妊娠期的牙龈炎症状况。



6a: 空白组; 6b: 阴性对照组(生理盐水); 6c: 替硝唑组; 6d: IgY 组

图 6 各组牙龈组织病理学切片($\times 20$)

Fig. 6 Pathological sections of gingival tissue in each group.

参考文献

- [1] Usin MM, Tabares SM, Parodi RJ, et al. Periodontal conditions during the pregnancy associated with periodontal pathogens [J]. *J Investig Clin Dent*, 2013, 4(1):54-59.
- [2] Puertas A, Magan-Fernandez A, Blanc V, et al. Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: a comprehensive review [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(5):597-602.
- [3] 陈智慧, 吕莉娟, 张亮, 等. 口腔微生物与不良妊娠结局关系的研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(8):905-908.
- [4] Mallorqui-Fernández N, Manandhar SP, Mallorqui-Fernández G. A new autocatalytic activation mechanism for cysteine proteases revealed by *Prevotella intermedia* interpain A [J]. *J Biol Chem*, 2007, 283(5):2871-2882.
- [5] Potempa M, Potempa J, Kantyka T, et al. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3 [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(2):e1000316.
- [6] Byrne DP, Potempa J, Olczak T, et al. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: Cooperative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia* [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2013, 28(3):219-229.
- [7] 孟明理, 徐燕, 王晓静, 等. 抗牙龈素粘附片段 Hgp44 卵黄抗体对实验性牙周炎的抑制作用[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(7):699-703.
- [8] Hou YY, Zhen YH, Wang D, et al. Protective effect of an egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against *Prevotella intermedia*-mediated gingivitis[J]. *J Appl Microbiol*, 2014, 116(4):1020-1027.
- [9] Štefan M, Vojtěch J. Antibiotic therapy in pregnancy [J]. *Ceska Gynekol*, 2018, 83(1):70-80.
- [10] 王晓静, 徐燕, 孟明理, 等. 抗中间普氏菌卵黄抗体的制备及其对实验性妊娠期龈炎的预防作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(8):1154-1159.
- [11] Akbari MR, Ahmadi A, Mirkalantari S. Anti-vibriocholerae IgY antibody inhibits mortality in suckling mice model [J]. *J Natl Med Assoc*, 2018, 110(1):84-87.

[收稿日期:2018-10-18]

(本文编辑 李四群)

书讯

《现代牙槽外科新技术》由武汉大学口腔医学院口腔外科赵吉宏教授主编、上海交通大学附属第九人民医院口腔外科汪湧教授担任副主编,人民卫生出版社出版。本书介绍近年来用于牙槽外科临床的新技术、新业务,体现在诊疗理念和模式的更新、多种技术的联合应用以及学科间的交叉融合,具有技术新、范围广、学科交叉三大特色。主要包括现代影像技术在牙槽外科的应用、无痛麻醉技术、镇静镇痛技术、微创化拔牙及超声刀、显微镜等辅助器械在牙拔除中的应用、阻生牙牵引拔除术;第三磨牙牙胚预防性拔除术、拔牙后即刻种植术、拔牙后牙槽骨保存和增量术、埋伏牙外科-正畸联合治疗、根尖周病变的牙体-外科联合治疗、颌骨囊肿内牙齿的袋形导萌术等,共十七章。

本书技术新、实用性强,既对相关理论或理念作了较全面的阐述,又有大量的临床病例佐证,全书配有500幅临床病例及临床操作实景图片,文字与图片相得益彰。因此本书特别适合于口腔外科青年医师、口腔通科医生、本科生、研究生、进修医生等人员学习和参考。

订购方式:1)出版社邮购,电话:010-82802495;010-62046414。

2)网络订购:登录亚马逊、淘宝、天猫-输入书名-即可网购。