

## 程序性死亡受体 1 及其配体在大鼠牙周炎发展中的时序性表达及意义

杨旭<sup>1</sup>, 杨笑晗<sup>1</sup>, 张文震<sup>2</sup>

(1.南京医科大学第二附属医院 口腔科,江苏 南京 210011;

2.南京市前进门诊部 口腔科,江苏 南京 210000)

**[摘要]** 目的:研究程序性死亡受体 1(programmed death-1,PD-1)及其配体(programmed death ligand 1,PD-L1)在大鼠牙周炎发展中的时序性表达及意义。方法:SD 大鼠随机分为对照组和模型组,按照测定时间不同随机分为 4 个亚组,分别为 A 组(造模 1 周)、B 组(造模 2 周)、C 组(造模 3 周)和 D 组(造模 4 周),每个亚组各 8 只大鼠。对各模型组大鼠采用“丝线结扎+接种牙龈卟啉单胞菌脂多糖”的方法建立大鼠上颌实验性牙周炎模型,对各组大鼠牙周进行组织病理检查和骨吸收面积测定,采用 RT-PCR 法对各组大鼠牙周组织中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1, IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 及转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) mRNA 进行测定,采用 Western 免疫印迹法对各组大鼠牙周组织 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平进行测定。采用 SPSS 22.0 软件包对数据进行统计学分析。结果:建模期间,模型组大鼠第一磨牙釉-牙骨质界到牙槽嵴顶(amelocemental junction-alveolar crest, ACJ-AC)距离和根分叉区骨吸收面积逐渐增加( $P < 0.05$ ),与相应时间点对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。建模期间,模型组大鼠牙周组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达水平持续升高( $P < 0.05$ ),TGF- $\beta$  mRNA 表达水平持续降低( $P < 0.05$ ),并且与相应时间点对对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。建模期间,模型组大鼠牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平持续升高( $P < 0.05$ ),与相应时间点对对照组相比,差异显著( $P < 0.01$ )。疾病发展过程中,大鼠牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平与牙周组织炎症介质 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达水平持续正相关( $P < 0.05$ )。结论:PD-1 作为免疫抑制分子与其受体 PD-L1 可促进牙周炎症进展,其作用可能通过调节 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达来实现。调节 PD-1 和 PD-L1 的表达,可作为治疗牙周炎相关性疾病的新靶点。

**[关键词]** 牙周炎;程序性死亡受体 1;程序性死亡配体 1;免疫调节

**[中图分类号]** R781.4

**[文献标志码]** A

DOI: 10.19439/j.sjos.2019.06.007

**Temporal expression of PD-1 and PD-L1 during the development of experimental periodontitis in rats and its implications** YANG Xu<sup>1</sup>, YANG Xiao-han<sup>1</sup>, ZHANG Wen-zhen<sup>2</sup>. (1.Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University. Nanjing 210011; 2.Department of Stomatology, Nanjing Qianjin Clinic. Nanjing 210000, Jiangsu Province, China)

**[Abstract] PURPOSE:** To study the temporal expression of programmed death receptor 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in the development of periodontitis in rats. **METHODS:** SD rats were randomly divided into control group and model group, and 4 subgroups were divided in each model group according to the time of measurement: group A (1 week), group B (2 weeks), group C (3 weeks) and group D (4 weeks). There were 8 rats in each subgroup. Maxillary periodontitis models were made by using "thread ligation + vaccination LPS-PC" in rats. Periodontal tissue specimens were examined and bone resorption areas were determined in each group. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) mRNA in periodontal tissue in each group were determined by RT-PCR method. PD-1 and PD-L1 protein expression in periodontal tissues in each group were determined by Western blotting. The data were analyzed by SPSS 22.0 software package. **RESULTS:** During modeling period, amelocemental junction-alveolar crest (ACJ-AC) distance and bone resorption area of the first molar in model group gradually increased

[收稿日期] 2019-07-29;[修回日期] 2019-08-26

[作者简介] 杨旭(1976-),女,本科,主治医师

[通信作者] 杨旭,E-mail:13913019423@163.com

©2019 年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

( $P < 0.05$ ), which were significantly different from the control group at the corresponding time point ( $P < 0.01$ ). During modeling period, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA level in periodontal tissues in the model group was continuously increased ( $P < 0.05$ ), and TGF- $\beta$  mRNA was continuously decreased ( $P < 0.05$ ), which was significantly different from the control group at the corresponding time point ( $P < 0.01$ ). During disease progress, PD-1 and PD-L1 protein level in periodontal tissues in each model group was continuously increased ( $P < 0.05$ ), which was significantly different from the control group at the corresponding time point ( $P < 0.01$ ); and PD-1 and PD-L1 protein levels in periodontal tissues in each model group was positively correlated to TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA levels ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSIONS:** PD-1, as an immunosuppressive molecule and its receptor PD-L1, can promote the progression of periodontal inflammation, and its effect may be achieved by regulating the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6. Regulating the expression of PD-1 and PD-L1 may be a new target for the treatment of periodontitis.

[Key words] Periodontitis; Programmed death receptor-1; Programmed death ligand-1; Immune regulation  
Shanghai J Stomatol, 2019, 28(6): 591-596.

牙周炎是常见的口腔感染性疾病,可引起牙龈溢脓、疼痛、出血等多种表现<sup>[1]</sup>。牙周炎是累及牙周支持组织的炎症性、破坏性疾病,会造成进行性牙周附着丧失和牙槽骨吸收,从而使牙支持组织高度降低,最终导致牙脱落或被拔除<sup>[2]</sup>,是成人失牙的主要原因<sup>[3]</sup>。牙周病是由多因素共同作用引起的慢性感染性疾病,遗传、环境与宿主免疫系统是加重牙周病的危险因素。牙周炎的始动因子是菌斑微生物,而主要破坏机制为宿主的过度免疫炎症反应。口腔共生菌和致病菌可激活以细胞免疫为主的宿主免疫应答,并产生大量炎性介质,其对机体宿主免疫系统所起的作用尚未完全达成共识。程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1) 属于 CD28 家族成员的 I 型跨膜蛋白,可通过抑制 B 细胞受体的刺激性信号而降低其活化程度。程序性死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 可通过与 PD-1 分子结合,发挥免疫负调控功能,负性调节 T 细胞的免疫应答,还可改变细胞因子的产生<sup>[4]</sup>。PD-1/PD-L1 在多种免疫性疾病的发生、发展中发挥重要的调节作用,但 PD-1/PD-L1 是否在牙周炎的发病中发挥作用,目前尚少见报道。本研究通过构建大鼠实验性牙周炎动物模型,观察 PD-1/PD-L1 在牙周炎建模过程中的时相性变化,分析其与炎症细胞因子的相关关系,以期深入探讨 PD-1/PD-L1 在牙周炎发生的分子机制中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 64 只,雌雄各半,4 周龄,体重(120 $\pm$ 20)g,由南京医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SYXK(苏)2018-0020。各组大鼠分笼

饲养,给予标准大鼠颗粒饲料,自由饮用纯净水。饲养环境温度(25 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度(50 $\pm$ 10)% ,通风换气 8~12 次/h, 12 h 交替照明。实验开始前,所有大鼠均适应性饲养 1 周,手术前 12 h 禁食不禁水。实验过程中,动物的处置符合医学伦理学标准。

### 1.2 主要实验试剂

牙龈卟啉单胞菌脂多糖 (LPS-PG) (美国 Invivogen 公司);戊巴比妥钠、苏木精-伊红试剂(美国 Sigma 公司);多聚甲醛(武汉欣欣佳丽生物科技有限公司);乙二胺四乙酸(EDTA)(天津运盛化学有限公司);TRIZOL 试剂、反转录试剂盒、Super Real Pre Mix Plus(SYBR Green) 试剂[天根生化科技(北京)有限公司]; PD-1/PD-L1 抗体(美国 BD Biosciences 公司);RIPA 裂解液、二喹啉甲酸(BCA) 蛋白定量试剂盒、兔抗鼠  $\beta$ -actin 抗体、HRP-羊抗大鼠 IgG、ECL Prime 蛋白印迹试剂(上海碧云天生物技术有限公司)。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-6、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 和内参  $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin)。引物设计与合成由天根生化科技(北京)有限公司完成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of primers of PCR

名称	序列
TNF- $\alpha$	正义: 5'-GCT TGTTCCTCAGCCTCTTCT-3'
	反义: 5'-GGTTTGCTACAACATGGGCTA-3'
IL-1 $\beta$	正义: 5'-TGGGATGATGACGACCTGCTA-3'
	反义: 5'-TACCACTTGTGGCTTATGTTCTGT-3'
IL-6	正义: 5'-GAGAAGTTAGAGTCACAGAAGGAG-3'
	反义: 5'-ATTTAGATACCCATCGACAGGATATATT-3'
TGF- $\beta$	正义: 5'-GGCAGATTCAGGGCTCTTTCG-3'
	反义: 5'-CGCTGGGTTGGAGATGTTAGG-3'
$\beta$ -actin	正义: 5'-CTTCCTTCTGGGTATGGAATCC-3'
	反义: 5'-GGAGCAATGATCTTGTATCTTCATG-3'

### 1.3 主要实验仪器

Latheta LCT200 型 Micro-CT 小动物活体影像系统 (日本 Hitachi-Aloka 公司);KD-BL 型生物组织包埋机(金华市科迪仪器设备有限公司);RM2145 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);CX21 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);超微量分光光度计(北京凯奥科技公司);ABI-stepone 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司);GeneGenius 全自动凝胶成像系统 (美国 Syngene 公司);Western Blot 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司);Fluor Chem Q 蛋白印迹成像和定量分析系统 (美国 Alpha 公司)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 实验分组** 所有大鼠随机分为对照组和模型组( $n=64$ ),每组按照测定时间不同随机分为 4 个亚组,分别为 A 组(造模 1 周)、B 组(造模 2 周)、C 组(造模 3 周)和 D 组(造模 4 周),每个亚组各 8 只大鼠。

**1.4.2 实验性牙周炎模型的建立** 各模型组大鼠采用戊巴比妥钠溶液(20 g/L)按照 0.2 mL/100 g 的剂量进行腹腔注射麻醉。固定大鼠,使用牙科探针对大鼠上颌两侧第二磨牙牙龈进行分离。使用 4# 缝线,分别结扎双侧上颌第二磨牙颈部。待结扎完成后,将缝线压入龈沟内,在腭侧打结并剪掉多余线头,并检查确认无脱落,分别于上颌第二磨牙的近腭点、远腭点和根分叉所对应的腭侧黏膜处注射 3  $\mu$ L LPS-PG(1 mg/1.5 mL),隔天注射 1 次,共注射 14 次(持续 4 周)。此期间如发现结扎线脱落,立即重新结扎。对照组大鼠未进行牙龈分离及缝线结扎,仅分别于上颌第二磨牙近腭点、远腭点和根分叉所对应的腭侧黏膜处同法注射 3  $\mu$ L 生理盐水。

### 1.4.3 观察指标

**1.4.3.1 牙周组织病理学检测和骨吸收面积测定** 各组大鼠采用戊巴比妥钠溶液(20 g/L)按照 0.2 mL/100 g 的剂量进行腹腔麻醉后脱臼处死,分离左侧上颌第一、二恒磨牙的颌骨组织块,经生理盐水清洗后,立即放入 4%多聚甲醛溶液中固定 48 h。在滴水条件下进行组织修正,放入 EDTA 脱钙液(pH=7),4  $^{\circ}$ C 脱钙 8 周。常规石蜡包埋,制成上颌第二恒磨牙近远中向 5  $\mu$ m 切片。切片 60  $^{\circ}$ C 烤箱预热后,分别经二甲苯 I 和 II 进行脱蜡,采用 100%、95%、90%、80%和 70%梯度乙醇入水后流水冲洗。苏木精染色,流水冲洗返蓝,1%盐酸乙醇分色,流水冲洗,伊红染色,蒸馏水漂洗。采用 100%、95%、90%、80%和 70%

梯度乙醇脱水,干燥,二甲苯透明,中性树脂封片。在显微镜( $\times 100$ )下观察牙周组织结构(模型组 D 和对照组 D)。每一个左侧下颌骨标本均选取 3 张包含第一磨牙近、远中根及两根之间根分叉区域的 H-E 染色片,在显微镜下拍摄数码照片,用 SPOT RT Software V3.5 软件进行分析。沿下颌第一磨牙颊、舌面牙根长轴测量釉-牙骨质界到牙槽嵴顶(amelocemental junction-alveolar crest, ACJ-AC)的距离,对根分叉区牙槽骨吸收的面积进行测量,取平均值作为该标本的根分叉区牙槽骨吸收面积。

**1.4.3.2 牙龈组织炎性介质 mRNA 的测定** 分离左侧上颌第一磨牙区牙龈组织,剪碎,加入 TRIZOL 裂解液,冰上孵育 15 min,12000 r/min 离心 10 min,提取总 RNA,采用微量酶标仪测定总 RNA 浓度及纯度。将总 RNA 反转录为 cDNA,进行定量 PCR 扩增。反应体系为 50  $\mu$ L:10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L dNTP 1  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,上游和下游引物各 1  $\mu$ L,0.5  $\mu$ L 2 U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶(含  $Mg^{2+}$ ),加入 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为:98  $^{\circ}$ C 预变性 1 0 min,95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,退火 58  $^{\circ}$ C、45 s,72  $^{\circ}$ C、60 s,反应 40 个循环,72  $^{\circ}$ C 延展 10 min。以肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参,采用 2<sup>- $\Delta$ CT</sup> 法计算 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TGF- $\beta$  mRNA 的相对表达量。

**1.4.3.3 牙龈组织 PD-1 和 PD-L1 蛋白测定** 分离另一侧上颌第一磨牙区牙龈组织,剪碎。采用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白浓度。按蛋白量 20  $\mu$ g/孔进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,湿法转至 PVDF 膜,于 5%脱脂奶粉中室温封闭 1 h,TBST 缓冲液洗膜。加入 1:1000 稀释的一抗,4  $^{\circ}$ C 过夜,TBST 缓冲液洗膜。加入 1:5000 稀释的二抗,室温下水平摇床上孵育 1 h,TBST 缓冲液充分洗膜。应用 ECL Prime 蛋白印迹试剂进行化学发光显色,X 线片曝光显影。采用 Quantity One 软件分析目标蛋白和内参 GAPDH 电泳条带的灰度值。目标蛋白 PD-1 和 PD-L1 吸光度值与内参蛋白 GAPDH 灰度值的比值代表各自的相对表达量。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件包对数据进行统计学分析。测量结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内前后比较采用配对  $t$  检验,组间分析采用单因素方差 LSD  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 牙周组织病理学观察结果

对照组大鼠牙周组织的结合上皮位于釉-牙骨质交界处,结缔组织光滑完整,无炎症细胞,牙周膜纤维排列规则,牙槽骨表面光滑,无吸收和骨吸收陷窝形成。模型组(D)大鼠牙周组织的结合上皮向根方增殖,形成较深的牙周袋,结缔组织内有大量炎症细胞浸润,牙周膜纤维排列紊乱,血管扩张,牙槽骨吸收,可见骨吸收陷窝(图 1)。

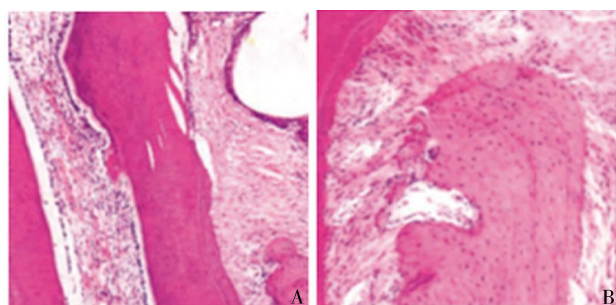


图 1 对照组 D(A)和模型组 D(B)大鼠第一磨牙根部牙周组织病理学所见(H-E,×100)

Figure 1 Pathological finding of periodontal tissues in control group D (A) and model group D (B) (H-E, ×100)

### 2.2 各组大鼠第一磨牙牙槽骨高度和牙槽骨吸收面积

建模期间,模型组大鼠第一磨牙 ACJ-AC 距离和根分叉区骨吸收面积逐渐增加( $P<0.05$ ),而对照组大鼠第一磨牙 ACJ-AC 距离和根分叉区骨吸收面积无显著变化( $P>0.05$ )。建模期间,模型组大鼠第一磨牙 ACJ-AC 距离和根分叉区骨吸收面积均较对照组显著增加( $P<0.05$ ,表 2)。

### 2.3 各组大鼠磨牙牙周组织炎症介质 mRNA 的表达

建模期间,模型组大鼠牙周组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达水平持续升高( $P<0.05$ ),TGF- $\beta$  mRNA 表达水平持续降低( $P<0.05$ );而对照组大鼠牙周组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TGF- $\beta$  mRNA 表

表 2 各组大鼠第一磨牙 ACJ-AC 距离和根分叉区骨吸收面积( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 ACJ-AC distance and bone resorption area in root bifurcation zone of first molars of rats in each group( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	ACJ-AC 距离(cm)				根分叉区骨吸收面积(mm <sup>2</sup> )			
	模型组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i>	模型组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i>
A 组	1.67±0.14	1.43±0.13	3.553	0.009	0.25±0.02	0.13±0.02	12.000	<0.001
B 组	1.94±0.15 <sup>a</sup>	1.44±0.14	6.892	<0.001	0.47±0.06 <sup>a</sup>	0.14±0.04	12.944	<0.001
C 组	2.28±0.14 <sup>ab</sup>	1.46±0.16	10.909	<0.001	0.69±0.04 <sup>ab</sup>	0.12±0.03	32.244	<0.001
D 组	2.47±0.16 <sup>abc</sup>	1.45±0.15	13.154	<0.001	0.81±0.05 <sup>abc</sup>	0.13±0.02	35.715	<0.001
<i>F</i> 值	46.357	0.063	-	-	241.646	0.646	-	-
<i>P</i>	<0.001	0.979	-	-	<0.001	0.592	-	-

注:与 A 组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 B 组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 C 组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

达水平无显著变化( $P<0.05$ )。建模期间,模型组大鼠牙周组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达水平较正常对照组显著升高 ( $P<0.05$ ),TGF- $\beta$  mRNA 表达水平较正常对照组显著降低( $P<0.05$ ,表 3)。

### 2.4 各组大鼠磨牙牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白的表达变化

建模期间,模型组大鼠牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平持续升高( $P<0.05$ ),而对照组大鼠牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平无显著变化( $P<0.05$ )。建模第 1~4 周时模型组大鼠牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平较正常对照组显著升高( $P<0.05$ ,表 4)。

### 2.5 牙周组织中 PD-1、PD-L1 蛋白表达与炎症因子 mRNA 表达的相关性分析

对病变发展过程中(即模型组 A、B、C 和 D 组) PD-1、PD-L1 蛋白表达与炎症因子 mRNA 表达的相关性分析进行分析,结果显示建模期间模型组大鼠牙周组织 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平与牙周组织炎症介质 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达水平呈正相关( $P<0.05$ );而与 IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$  mRNA 表达水平不相关( $P>0.05$ ,表 5)。

## 3 讨论

牙周炎是人类口腔的常见病、多发病,是由牙菌斑诱导始发的、多因素影响的牙周支持组织慢性炎症性疾病,其主要临床和病理特征是牙龈炎症、牙槽骨吸收、牙周袋形成及牙松动<sup>[5]</sup>。其中,牙龈肿胀和炎症可逆,但牙周围组织的丧失和牙槽骨骨质的破坏不可逆转,治疗牙周炎的重点在于如何预防和减少牙周附着丧失及牙槽骨破坏。牙周炎局部产生的炎症免疫介质会通过牙周袋内的溃烂上皮进入全身循环系统,引起系统性炎症状态的改变,进而影响全身健康<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>证实,牙周状态不良可能是导致心

表3 各组大鼠牙周组织炎症介质 mRNA 的表达水平 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Inflammatory mediators mRNA expression in periodontal tissues of rats in each group (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$ mRNA				IL-1 $\beta$ mRNA			
	模型组	对照组	t 值	P	模型组	对照组	t 值	P
A 组	1.29 $\pm$ 0.13	0.76 $\pm$ 0.06	10.470	<0.001	0.76 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.03	16.221	<0.001
B 组	1.57 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.07	17.38	<0.001	0.96 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.04	13.724	<0.001
C 组	1.78 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	0.77 $\pm$ 0.05	18.067	<0.001	1.27 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	0.26 $\pm$ 0.05	19.216	<0.001
D 组	2.26 $\pm$ 0.18 <sup>abc</sup>	0.76 $\pm$ 0.07	21.968	<0.001	1.43 $\pm$ 0.12 <sup>abc</sup>	0.31 $\pm$ 0.04	25.044	<0.001
F 值	63.886	0.184	-	-	50.802	2.747	-	-
P	<0.001	0.906	-	-	<0.001	0.062	-	-

组别	IL-6 mRNA				TGF- $\beta$ mRNA			
	模型组	对照组	t 值	P	模型组	对照组	t 值	P
A 组	1.35 $\pm$ 0.12	1.04 $\pm$ 0.15	4.565	0.003	0.96 $\pm$ 0.08	1.28 $\pm$ 0.11	-6.654	<0.001
B 组	1.83 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.12	12.578	<0.001	0.89 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.14	-7.951	<0.001
C 组	2.31 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	0.99 $\pm$ 0.10	22.764	<0.001	0.67 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	1.30 $\pm$ 0.12	-13.281	<0.001
D 组	2.74 $\pm$ 0.15 <sup>abc</sup>	1.03 $\pm$ 0.11	26.002	<0.001	0.56 $\pm$ 0.07 <sup>abc</sup>	1.32 $\pm$ 0.13	-14.559	<0.001
F 值	157.221	0.267	-	-	48.510	0.250	-	-
P	<0.001	0.849	-	-	<0.001	0.861	-	-

注:与 A 组相比,<sup>a</sup>P<0.05;与 B 组相比,<sup>b</sup>P<0.05;与 C 组相比,<sup>c</sup>P<0.05

表4 各组大鼠牙周组织中 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 PD-1 and PD-L1 protein expression in periodontal tissues of rats in each group (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	PD-1 蛋白				PD-L1 蛋白			
	模型组	对照组	t 值	P	模型组	对照组	t 值	P
A 组	0.41 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.03	3.395	0.011	0.69 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.06	4.346	0.003
B 组	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.05	5.301	<0.001	0.76 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.59 $\pm$ 0.05	6.156	0.005
C 组	0.56 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.36 $\pm$ 0.04	7.845	<0.001	0.84 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.56 $\pm$ 0.07	8.000	<0.001
D 组	0.63 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	0.35 $\pm$ 0.06	10.983	<0.001	0.92 $\pm$ 0.08 <sup>abc</sup>	0.55 $\pm$ 0.08	9.25	<0.001
F 值	32.430	0.248	-	-	18.191	0.536	-	-
P	<0.001	0.862	-	-	<0.001	0.661	-	-

注:与 A 组相比,<sup>a</sup>P<0.05;与 B 组相比,<sup>b</sup>P<0.05;与 C 组相比,<sup>c</sup>P<0.05

表5 牙周炎大鼠模型牙周组织 PD-1、PD-L1 蛋白表达与炎症因子 mRNA 表达相关性

Table 5 Correlation of PD-1, PD-L1 protein expression and inflammatory mediators mRNA expression in periodontal tissues of rats in model group

炎症因子	PD-1		PD-L1	
	r 值	P 值	r 值	P 值
TNF- $\alpha$	0.547	0.036	0.421	0.043
IL-1 $\beta$	0.613	0.186	0.512	0.217
IL-6	0.753	0.008	0.675	0.012
TGF- $\beta$	0.215	0.349	0.347	0.182

血管疾病发生的危险因素之一,牙周病患者心血管疾病患病率较健康人高 25%~50%。目前主流的观点认为,牙周炎中,牙周组织的破坏是由病原微生物感染所致的过强免疫炎症介导,通过调节机体对病原微生物的免疫反应,可能会减轻炎症并减少牙周组织损伤。因此,通过免疫调节和抗感染治疗以减轻

牙周组织破坏,成为牙周炎防治的新热点。

建立稳定可靠的牙周炎动物模型,是探讨牙周炎炎症病因、临床变化及治疗等的重要手段之一。LPS 是脂质和多糖的复合物,为 G-菌细胞壁的主要成分,可持续刺激机体单核巨噬细胞,产生大量促炎细胞因子,引起细胞损伤和凋亡,并最终形成炎症反应,导致牙槽骨吸收。Yang 等<sup>[9]</sup>在 2014 年发现,通过对大鼠上颌第一磨牙牙颈部结扎丝线,4 周后可形成牙周炎动物模型。本研究采用大鼠上颌第一磨牙牙颈部丝线结扎及牙龈接种 LPS-PG,制作大鼠牙周炎模型,以保证模型建立可靠。本研究结果显示,建模期间,模型组大鼠第一磨牙 ACJ-AC 距离和根分叉区骨吸收面积度逐渐增加(P<0.05);病理切片也证明,牙周组织出现炎症,证明造模成功。

异常宿主免疫应答会加剧牙周组织的持续性破坏,与免疫细胞产生的炎症介质有关<sup>[9]</sup>。TNF- $\alpha$  是一

种重要的细胞趋化因子,在牙槽骨吸收和牙周结缔组织损伤中起着中心作用。此外, TNF- $\alpha$  还可刺激其他促炎免疫细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 等产生<sup>[10]</sup>。牙周厌氧菌能激活人单核细胞产生 IL-1 $\beta$ , 刺激成纤维细胞产生胶原酶和前列腺素 E2, 诱导骨吸收。IL-6 可激活中性粒细胞、抑制吞噬细胞的吞噬功能, 并且诱导牙周组织血管生成, 使牙周组织内炎症细胞产生以及能量消耗增加, 从而加重炎症反应, 是与牙周炎密切相关的炎症细胞因子<sup>[11]</sup>。TGF- $\beta$  是一种多功能性生长因子, 主要在炎症调节、组织修复、肿瘤侵袭和神经系统等方面发挥作用, 并且参与调节细胞的生长、分化和免疫反应<sup>[12]</sup>。本研究结果显示, 建模期间模型组大鼠牙周组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达水平持续升高 ( $P < 0.05$ ), TGF- $\beta$  mRNA 表达水平持续降低 ( $P < 0.05$ ), 证明 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TGF- $\beta$  持续参与牙周炎的发生及发展。

PD-1 主要表达于外周 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、B 细胞等, 属于 CD28 家族成员的 I 型跨膜蛋白。PD-L1 是 PD-1 的配体, 属于 B7 超家族成员, 广泛表达于活化的 T 细胞、B 细胞等细胞。PD-L1 的生物学作用是通过与 PD-1 分子结合, 并活化其胞内段免疫受体酪氨酸抑制基序, 逆转 T 细胞耗尽和恢复抗原特异性 T 细胞应答<sup>[13]</sup>。PD-1/PD-L1 介导的负性抑制信号可通过抑制 T、B 淋巴细胞功能, 使 T 细胞增殖受到抑制, 减少其分泌的细胞因子, 从而参与多种疾病的发生、发展<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, 建模期间, 模型组大鼠牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平持续升高 ( $P < 0.05$ ), 说明 PD-1 作为免疫抑制分子与其受体 PD-L1 持续促进牙周炎症进展。相关性分析显示, 病变发展过程中, 大鼠牙周组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平与牙周组织炎症介质 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达水平持续正相关 ( $P < 0.05$ ), 说明 PD-1 和 PD-L1 可能通过调节 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达而参与牙周病的发生、发展, PD-1 和 PD-L1 可作为牙周病治疗的新靶点。

综上所述, PD-1 作为免疫抑制分子与其受体 PD-L1 促进牙周炎症进展, 其作用可能通过调节

TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达来实现; 调节 PD-1 和 PD-L1 的表达, 可作为治疗牙周炎症相关性疾病的新靶点。

利益冲突声明: 无。

作者贡献声明: 杨旭负责实验操作、数据收集及论文撰写; 杨笑晗负责实验操作及统计分析; 张文震负责研究指导、经费支持及论文修改。

## [参考文献]

- [1] Konoplya AI, Goldobin DD, Loktionov AL. Local immune and oxidative status in exacerbated chronic apical periodontitis [J]. Stomatologiia (Mosk), 2017, 96(3): 26-29.
- [2] Ma Z, Yang C, Song W, et al. Chitosan hydrogel as siRNA vector for prolonged gene silencing [J]. J Nanobiotechnology, 2014, 12: 23.
- [3] Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, et al. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression [J]. J Dent Res, 2014, 93(11): 1045-1053.
- [4] 张佳, 张峰波, 赵云娟, 等. 肺结核患者血清中 sPD-1 和 sPD-L1 与细胞因子的相关性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(2): 131-135.
- [5] Hajishengallis G, Moutsopoulos NM. Role of bacteria in leukocyte adhesion deficiency-associated periodontitis [J]. Microb Pathog, 2016, 94: 21-26.
- [6] 王丹, 倪佳, 苏媛, 等. 慢性牙周炎对 OLETF 大鼠肾脏功能的影响 [J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(8): 445-448.
- [7] Bartova J, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, et al. Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis [J]. J Immunol Res, 2014: 636893.
- [8] Yang H, Wen Q, Xue J, et al. Alveolar bone regeneration potential of a traditional Chinese medicine, Bu-Shen-Gu-Chi-Wan, in experimental periodontitis [J]. J Periodontal Res, 2014, 49(3): 382-389.
- [9] Shinwari MS, Tanwir F, Hyder PR, et al. Host modulation therapeutics in periodontics: role as an adjunctive periodontal therapy [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2014, 24(9): 676-684.
- [10] 陈铁楼, 张新海, 徐尔理, 等. 糖尿病型牙周炎牙龈组织中炎症因子表达及与细胞凋亡关系 [J]. 实用口腔医学杂志, 2017, 33(4): 518-521.
- [11] Cardoso EM, Reis C, Manzaneres-Cespedes MC. Chronic periodontitis inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases [J]. Postgrad Med, 2018, 130(1): 98-104.
- [12] 贾雨薇, 王婧, 王彪, 等. 甲基苯丙胺对脂多糖诱导小鼠血清和脾脏 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TGF- $\beta$  表达的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(2): 299-303.
- [13] 江南, 罗亮, 刘莉, 等. 复发性阿弗他溃疡患者可溶性程序性死亡受体 1 及可溶性程序性死亡配体 1 表达与免疫功能的相关性 [J]. 华西口腔医学杂志, 2017, 35(3): 286-291.