

· 基础研究 ·

牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/IL-15 对大鼠实验性牙周炎保护作用研究

于航^{1,2}, 杨智强³, 曾凤娇^{1,2}, 陈靖^{1,2}, 刘建国², 白朋元¹, 白国辉^{2*}

¹遵义医科大学口腔学院, 贵州 遵义 563000; ²贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室, 贵州 遵义 563000; ³贵阳市第二人民医院口腔科, 贵州 贵阳 550081

[摘要] 目的: 观察牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/IL-15 对 SD 大鼠实验性牙周炎的保护作用。方法: 54 只雄性 SD 大鼠随机分为 9 组, 对照组: 生理盐水组(A组)、空载质粒 pVAX1 组(B组)、牙周病组(C组); 实验组: 50 μ g、100 μ g、150 μ g pVAX1-HA2-FimA 组(D、E、F组)和 50 μ g、100 μ g、150 μ g pVAX1-HA2-FimA/IL-15 组(G、H、I组)。鼻滴免疫 SD 大鼠后建立实验性牙周炎模型, 采用 RT-qPCR 法检测牙龈中炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、基质金属蛋白酶 8(matrix metalloproteinase-8, MMP-8)mRNA 相对表达量; 立体显微镜观察并测量牙槽骨吸收量。结果: ①各实验组牙龈组织中 TNF- α 、MMP-8 mRNA 低于牙周病组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); ②相同剂量的 pVAX1-HA2-FimA/IL-15 组较 pVAX1-HA2-FimA 组大鼠牙槽骨吸收量少, 且差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA 和 pVAX1-HA2-FimA/IL-15 对 SD 大鼠实验性牙周炎具有保护作用。

[关键词] 基因疫苗; 牙周炎; 免疫

[中图分类号] R781.42

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)02-195-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20200209

Protective effects of periodontitis gene vaccine pVAX1-HA2-FimA/IL-15 and pVAX1-HA2-FimA in rats with experimental periodontitis

YU Hang^{1,2}, YANG Zhiqiang², ZENG Fengjiao^{1,2}, CHEN Jing^{1,2}, LIU Jianguo², BAI Pengyuan¹, BAI Guohui^{2*}

¹School of Stomatology, Zunyi 563000; ²Key Laboratory of Oral Disease of Higher Schools in Guizhou Province, Zunyi Medical University, Zunyi 563000; ³Department of Stomatology, Second People's Hospital, Guiyang 550081, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to observe the protective effect of periodontitis gene vaccine pVAX1-HA2-FimA and pVAX1-HA2-FimA/IL-15 in SD rats with experimental periodontitis. **Methods:** Fifty-four male SD rats were randomly divided into 9 groups: Control group (normal saline group, group A), empty plasmid pVAX1 group (group B), periodontal disease group (group C), Experimental group [50 μ g, 100 μ g, 150 μ g pVAX1-HA2-FimA group (D, E, F group) and 50 μ g, 100 μ g, 150 μ g pVAX1-HA2-FimA/IL-15 group (G, H, I group)]. Experimental periodontitis model was established after nasal drip immunization of SD rats, and the relative expression levels of TNF- α and MMP-8 mRNA in gingiva were detected by RT-qPCR. The absorption of alveolar bone was observed and measured by stereomicroscopy. **Results:** ①The TNF- α and MMP-8 mRNA in the gingival tissues of each experimental group were lower than that in the periodontal disease group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). ②Compared with the pVAX1-HA2-FimA group, the amount of alveolar bone absorption in the pVAX1-HA2-FimA/IL-15 group with the same vaccine dose was lower, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The periodontitis gene vaccines pVAX1-HA2-FimA/IL-15 and pVAX1-HA2-FimA have protective effects on SD rats with experimental periodontitis.

[Key words] gene vaccine; periodontitis; immune

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02): 195-199]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81560186); 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字 LKZ[2012]15号); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2019]1333号); 遵义市科技计划课题(遵市科合 HZ 字[2019]21号)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: baiguohui1228@126.com

牙周炎发病率高且危害性大,严重影响着人类口腔健康,且与全身疾病也有着密切的关系^[1]。第四次全国口腔流行病学调查显示,35~44岁居民中,96.7%人群口腔内存在牙结石,87.4%有牙龈出血症状,与10年前相比,上升了10.1个百分点^[2]。牙周炎是一种慢性非特异性炎症,对牙周组织的损害是持续不可逆的,因此对牙周炎的提前预防显得尤为重要^[3]。本课题组前期采用牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)表面的毒力因子菌毛蛋白A(fimbriin, FimA)和血凝素2(hemagglutinin-2, HA-2)的编码基因作为目的基因,以白介素(IL)-15作为免疫佐剂,成功构建牙周炎基因疫苗pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/IL-15^[4]。本实验将2种基因疫苗通过鼻腔黏膜免疫方式作用于SD大鼠,评价其对SD大鼠实验性牙周炎的免疫保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA/IL-15、pVAX1-HA2-FimA(本课题组前期构建),由贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室保存。SD雄性大鼠[第三军医大学野战外科研究所动物室,质检单位:重庆市实验动物质检中心,许可证号:SCXK(渝)2012-0005]。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及免疫

54只5~6周龄、体重(180±30)g健康雄性SD大鼠,采用随机数字法分为9组,每组6只,适应性喂养大鼠1周。对照组:A组:生理盐水组;B组:空载组;C组:牙周病组(炎性对照组)。实验组:D组:50 μg pVAX1-HA2-FimA组;E组:100 μg pVAX1-HA2-FimA组;F组:150 μg pVAX1-HA2-FimA组;G组:50 μg pVAX1-HA2-FimA/IL-15组;H组:100 μg pVAX1-HA2-FimA/IL-15组;I组:150 μg pVAX1-HA2-FimA/IL-15组。免疫剂量:100 μg(1 000 μg/mL);免疫时间:每隔1周免疫1次,首次免疫后,加强免疫2次,共免疫3次;免疫方法:双侧鼻腔黏膜免疫,每次滴注后直立大鼠1 min,隔5 min滴注1次。

1.2.2 建立牙周炎模型

最后1次免疫后1 d,4.0丝线结扎大鼠上颌第二磨牙,丝线伸入龈沟,采用眼科细剪,划入龈沟,划入深度1 mm,割破牙龈。每周检查缝线脱落情况。

1.2.3 立体显微镜观察并测量牙槽骨吸收量

牙周炎模型建立后第8周处死大鼠,解剖分离

上颌骨,修整颌骨。将上颌骨于NaOH溶液中加热5 min,去除软组织。于立体显微镜下观察上颌第二磨牙牙槽骨吸收程度并拍照,设定1 mm标尺,以标尺长度为参照标准,测量上颌第二磨牙颊腭侧近中、中央、远中6个位点牙槽嵴顶至釉牙骨质界的距离,以6个位点测量值的均值作为牙槽骨吸收量。

1.2.4 RT-qPCR检测上颌第二磨牙牙龈组织中肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、基质金属蛋白酶8(matrix metalloproteinase-8, MMP-8)的表达量

牙周炎模型建立后第8周处死大鼠,取大鼠上颌第二磨牙牙龈组织,提取牙龈中总RNA,逆转录为cDNA, TNF-α、MMP-8及β-actin引物均由日本TaKaRa公司设计合成(表1),3种引物均是25 μL反应体系,β-actin引物退火温度53℃, TNF-α、MMP-8引物退火温度60℃,2^{-ΔΔCT}计算目的基因相对表达量。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)
TNF-α	F端 GCGTGTTCATCCGTTCTCTACC	60
	R端 TACTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT	
MMP-8	F端 GTTTATTCTGGAACACGCT	60
	R端 ACCAATGCTGGAGATACGACA	
β-actin	F端 CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	53
β-actin	R端 ATGGAGCCACCGATCCACA	

1.3 统计学方法

实验数据用SPSS18.0软件中方差分析对数据进行统计分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

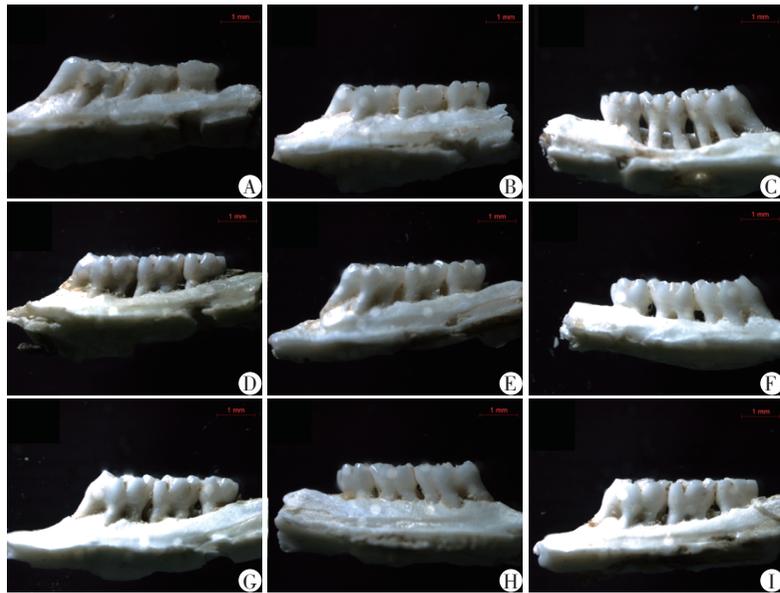
2.1 立体显微镜下测量SD大鼠上颌第二磨牙牙槽骨吸收量

A、B组大鼠上颌第二磨牙未见明显牙槽骨吸收,C组可见颊腭侧近中、中央、远中共6点均有明显的牙槽骨吸收,实验组D、E、F、G、H、I均有部分牙槽骨吸收;各组牙槽骨吸收量见图1。C组较A、B、D、E、F、G、H、I组牙槽骨吸收量高,差异有统计学意义($P < 0.01$);A、B组差异无明显统计学意义($P > 0.05$);A、B组较D、E、F、G、H、I组牙槽骨吸收量低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2)。

2.2 RT-qPCR法检测牙龈组织TNF-α、MMP-8的表达

2.2.1 目的基因扩增的溶解曲线

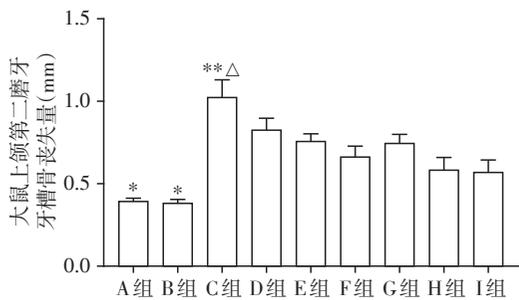
β-actin、TNF-α、MMP-8溶解曲线图见图3,溶解



A~I分别表示A~I组。

图1 体式显微镜下SD大鼠上颌第二磨牙牙槽骨吸收量

Figure 1 Absorption of alveolar bone in the maxillary second molar of SD rats under stereo microscope



与D~I组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与A、B组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

图2 大鼠上颌第二磨牙牙槽骨丧失量

Figure 2 Alveolar bone loss in rat maxillary second molar

曲线图观察到样本均无引物二聚体及非特异扩增峰,目的基因各峰值一致,说明引物设计合理,特异性高。

2.2.2 RT-qPCR 牙龈组织 TNF- α 、MMP-8 mRNA 的表达量

统计结果显示,C组较A、B、D、E、F、G、H、I组

TNF- α 、MMP-8 mRNA 相对表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$,图4、5)。H组较E组 TNF- α mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);D组较G组、F组较I组 TNF- α mRNA 表达水平无差异($P > 0.05$)。D组较G组 MMP-8 mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),H组较E组,F组较I组 MMP-8 mRNA 表达水平无差异($P > 0.05$)。

3 讨论

牙周炎因其高发生率及高危害性而逐渐引起人们的重视。目前牙周炎的治疗方法包括基础治疗、手术治疗等,但现有的治疗方式并未取得理想的效果,因此关于牙周炎的预防显得尤为重要。牙周炎的发生与口腔微生物群的失调有关,预防微生物的聚集、牙菌斑形成,将为牙周炎的预防提供基

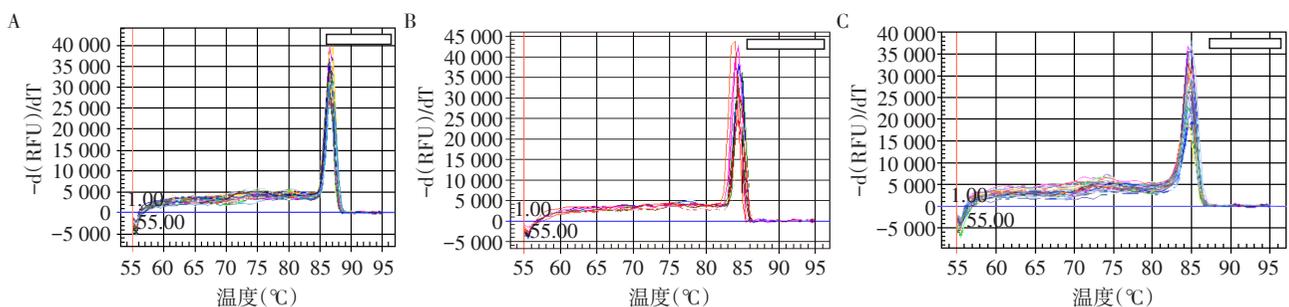
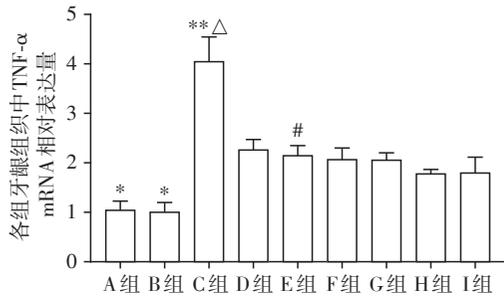


图3 大鼠牙龈组织 β -actin(A)、TNF- α (B)和MMP-8(C)溶解曲线峰图

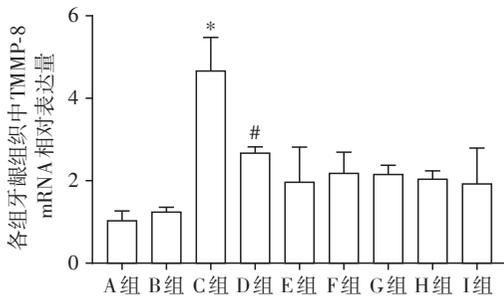
Figure 3 Peak map of β -actin (A), TNF- α (B)and MMP-8(C) melting curve in rat gingival tissue



与D-I组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与A、B组比较, $\Delta P < 0.01$; 与H组比较, * $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠牙龈组织中TNF- α 相对表达量的变化

Figure 4 Changes of relative expression of TNF- α in gingival tissues of rats in each group



C组与其他各组比较, * $P < 0.05$; 与G组比较, * $P < 0.05$ 。

图5 各组大鼠牙龈组织中MMP-8相对表达量的变化

Figure 5 Changes of relative expression of MMP-8 in gingival tissues of rats in each group

础策略。牙周炎基因疫苗的构建思路是通过寻找与牙周炎密切相关的致病菌的有效抗原结构,利用其相关基因的片段通过基因工程的方法构建共表达的重组基因片段^[5],然后通过载体的作用转移到宿主体内,并表达出相对应的蛋白质作为有效抗原,刺激机体的免疫反应,产生相应抗体。当细菌病原体再次进入机体内时,可以迅速引起机体产生抗原抗体反应,抑制致病菌的黏附或致病菌毒力因子的作用,从而达到预防牙周炎的效果。

牙龈卟啉单胞菌是公认的和牙周炎发生发展有着密切关系的致病菌,以牙龈卟啉单胞菌的毒力因子疫苗备选的目的基因有多种,Sharma等^[6]利用牙龈卟啉单胞菌的毒力因子fimA制成的基因疫苗,有效抑制了因牙龈卟啉单胞菌引起的牙槽骨丧失。Miyachi等^[7]使用rpgA制作DNA疫苗,通过基因枪经腹和鼻腔两种途径免疫小鼠,结果表明,鼻腔免疫途径的小鼠体内产生了IgG和sIgA,并能有效控制感染了牙龈卟啉单胞菌所造成的牙槽骨丧失。牙周炎是多致病菌引起的炎症性疾病,各致病菌的毒力因子亦有多种,目前相关研究中,关于牙

周炎基因疫苗多以构建单个目的基因为主,关于多基因联合构建重组质粒还鲜有报道。因此构建高效表达的多基因组合共表达质粒是当前研究的热点,也是难点^[8]。

单纯包含目的基因的裸质粒疫苗免疫后产生的抗体水平低,持续时间短,人们便考虑使用不同的佐剂以便提高抗原的免疫原性及耐受性等。目前用于疫苗工程中的佐剂主要包括蛋白类、核酸类、混合佐剂等。佐剂的加入能够增强抗原对于细胞的渗入性、防止抗原降解,增强抗原的呈递作用,从而提高抗体水平,以及延续抗体作用时间,因此佐剂的选择也显得十分重要。IL-15是一种Th1型细胞因子,在免疫中能够协同其他细胞因子,促进Th1型免疫应答的发生。有学者认为牙周炎的病例过程与Th1/Th2主导的平衡状态有关,牙周炎早期以及静止期表现为Th1型,而Th2倾向则提示牙周严重破坏。IL-15作为佐剂联合基因疫苗使用的实验已有学者报道,加入IL-15的基因疫苗经鼻黏膜免疫能够诱导更高的SIgA,并且无不良反应^[9-12]。

本实验组通过以牙龈卟啉单胞菌的主要毒力因子菌毛蛋白fimA以及牙龈素-血凝素基因编码区的核心功能区HA2的目的基因联合构建多基因联合疫苗,并以IL-15作为佐剂。通过实验发现各实验组牙龈组织中炎症因子TNF- α 、MMP-8 mRNA低于炎症对照组。表明牙周炎基因疫苗成功诱导了大鼠体内的有效免疫反应,抗体的高水平表达能够有效预防SD大鼠实验性牙周炎。因此,应用牙周炎基因疫苗pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/IL-15通过鼻黏膜免疫大鼠,对实验性牙周炎起到了明显的防御保护作用,为牙周炎基因疫苗应用于临床的研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] JØRGEN S. Periodontitis: facts, fallacies and the future [J]. Periodontol 2000, 2017, 75(1):7-23
 [2] 冯希平. 中国居民口腔健康状况——第四次中国口腔健康流行病学调查报告[A]//中华口腔医学会口腔预防医学专业委员会. 2018年中华口腔医学会第十八次口腔预防医学学术年会论文汇编, 中华口腔医学会口腔预防医学专业委员会: 中华口腔医学会, 2018:2
 [3] LIPSKY M S, PASKETT K T, GROSS A J, et al. Periodontitis: a global disease and the primary care provider's role [J]. Postgrad Med J, 2017, 93(1103):560-565
 [4] 苗晨琛. 牙龈卟啉单胞菌HA2、fimA基因重组质粒的构建及其表达的研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2016
 [5] 高晓佩, 管晓燕, 白国辉, 等. DNA疫苗的作用机制. 中

- 国组织工程研究[J]. 2018,22(8):1281-1286
- [6] SHARMA A, HONMA K, EVANS R T, et al. Oral immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing porphyromonas gingivalis fimA domains[J]. Infect Immun, 2001, 69(5):2928-2934
- [7] MIYACHI K, ISHIHARA K, KIMIZUKA R, et al. Arg-gingipain A DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice[J]. J Dent Res, 2007, 86(5):446-450
- [8] WILENSKY A, POTEPA J, HOURI-HADDAD Y, et al. Vaccination with recombinant RgpA peptide protects against Porphyromonas gingivalis-induced bone loss[J]. Journal of Periodontal Research, 2017, 52(2):285-291
- [9] CAO Q M, NI Y Y, CAO D, et al. Recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressing membrane-bound IL-15 as immunomodulatory adjuvant enhances NK and $\gamma\delta$ T cell responses and confers heterologous protection.[J]. J Virol, 2018, 92(13):7-18
- [10] WATSON D C, MOYSI E, VALENTIN A, et al. Treatment with native heterodimeric IL-15 increases cytotoxic lymphocytes and reduces SHIV RNA in lymph nodes [J]. PLoS Pathog, 2018, 14(2):e1006902
- [11] ANTIGA E, MAGLIE R, VOLPI W, et al. T helper 1-related molecules as well as IL-15 are hyperexpressed in the skin lesions of patients with pyoderma gangrenosum [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189(3):383-391
- [12] 夏丹丹, 席晓薇. IL-15联合HPV基因疫苗治疗宫颈癌的前景[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 392(3):436-441 [收稿日期] 2019-06-03

(上接第179页)

- 2015, 91(3):187-196
- [17] TANG Y R, YANG W W, WANG Y L, et al. Sex differences in the symptoms and psychological factors that influence quality of life in patients with irritable bowel syndrome [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012, 24(6):702-707
- [18] CHANG L, TONER B B, FUKUDO S, et al. Gender, age, society, culture, and the patient's perspective in the functional gastrointestinal disorders [J]. Gastroenterology, 2006, 130(5):1435-1446
- [19] SHI W, XU X, ZHANG Y, et al. Epidemiology and risk factors of functional constipation in pregnant women [J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0133521
- [20] PROVENCE A, HRISTOV K L, PARAJULI S P, et al. Regulation of guinea pig detrusor smooth muscle excitability by 17 β -estradiol: The role of the large conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channels [J]. PLoS One, 2015, 10(11):e0141950
- [21] RAHBK M, NAZEMI S, ODUM L, et al. Expression of the small conductance Ca^{2+} -activated potassium channel subtype 3(SK3) in rat uterus after stimulation with 17 β -estradiol[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e87652
- [22] LUO W, LIUC T, YANG Q H, et al. New angle of view on the role of rho/rho kinase pathway in human diseases [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2014, 13(6):378-395
- [23] JULIAN L, OLSON M F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions [J]. Small GTPases, 2014, 5:e29846
- [24] ASLAM M, HARTEL F V, ARSHAD M, et al. cAMP/PKA antagonizes thrombin-induced inactivation of endothelial myosin light chain phosphatase: role of CPI-17 [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(2):375-384
- [25] CHRISOBOLIS S, BUDZYN K, MARLEY P D, et al. Evidence that estrogen suppresses rho-kinase function in the cerebral circulation *in vivo* [J]. Stroke, 2004, 35(9):2200-2205
- [26] CHIMENTO A, SIRIANNI R, CASABURI I, et al. Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, 5(1):1
- [27] PROSSNITZ E R, BARTON M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 389(1-2):71-83 [收稿日期] 2019-06-17