

· 综 述 ·

牙龈卟啉菌相关疫苗防治牙周炎的现状研究*

戴海燕¹, 王 华²综述, 符起亚 审校

(1. 海南医学院口腔医学院, 海南海口 570102; 2. 海南医学院海南省热带病重点实验室 571101)

关键词: 疫苗; 牙龈卟啉菌; 牙周炎

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.19.031

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)19-1945-03

众所周知, 牙周炎是发生在牙齿周围支持组织的细菌感染性疾病, 以牙龈炎症和出血、牙周袋形成、牙槽骨吸收和牙松动、移位以致脱落为主要症状。牙周炎主要发生在成人, 是导致成人牙齿丧失的主要原因, 在世界范围内均有较高的发病率。不仅如此, 牙周炎还与许多系统性疾病(如心血管疾病、中风、冠状动脉粥样硬化及糖尿病)相关。因此, 研究有效和可靠的疫苗来防治牙周炎逐渐成为各国学者竞相追逐的热点。尽管多数学者认为牙周炎非单一细菌感染, 但牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, P. g)是慢性牙周炎证据充分的致病菌已是共识。尽管伴放线杆菌是侵袭性牙周炎的龈下优势菌, 但在亚洲地区(包括中国)的人群中却表现为 P. g 比例增高, 伴放线杆菌检出的比例低, 并且检出的多为低毒性株^[1]。因此, 将 P. g 或其致病的菌体表面成分作为防治牙周炎的有效免疫抗原的研究方兴未艾, 本文就 P. g 相关疫苗防治牙周炎的研究现状综述如下。

1 P. g 防治牙周炎的疫苗研究策略

1.1 以 P. g 全细胞为靶标的疫苗研究 使用 P. g 全细胞免疫的第一个实验是 1988 年, Okuda 等^[2]使用福尔马林灭活的 P. g 全细胞(*P. gingivalis* 381)经口腔免疫仓鼠, 并没有明显减少 P. g 在牙面上的定植, 但是使用兔的抗血清重复注射仓鼠口腔的被动免疫却能够减少牙面上微生物的数量。该结果归因于可能是使用了非侵袭性的 P. g 的菌株。有学者对比了热灭活和福尔马林灭活的 P. g 全细胞疫苗, 发现热灭活的疫苗能使 BALB/c 鼠产生更多的血清 P. g 特异性 IgG 和 IgM。但是经皮下或肌肉注射的免疫方式均未导致唾液中的抗体产生。相似的实验使用福尔马林灭活的 P. g 全细胞疫苗也能导致猕猴属类的动物产生相应的血清抗体^[3-4]。但实验结果都表明 P. g 全细胞疫苗所产生的抗体不足以对 P. g 造成的损坏产生完全的保护。问题: (1) P. g 具有多种多样的菌株, 使用何种菌株作为疫苗; (2) 是全细胞疫苗可能有交叉免疫反应, 因此, 人们把研究的注意力逐渐转移到了 P. g 的菌体成分上。

1.2 以 P. g 菌体表面成分为靶标的疫苗 近年来, 随着 P. g 研究的不断深入, 其菌体的结构也逐渐清晰, 使用菌体的一些成分作为候选抗原或佐剂的研究也屡见报道。研究较多的有菌毛、外膜蛋白、牙龈素、被膜等。

1.2.1 菌毛(Fimbriae) 菌毛作为候选抗原被广泛地研究不仅因为其位于细胞表面, 更重要的是菌毛可介导 P. g 黏附于宿主组织表面或对其他微生物具有黏附作用。Evans 等^[5]报道使用高度纯化的 43 kDa 菌毛蛋白免疫 P. g 感染的无菌大鼠, 能够保护和对抗大鼠的牙周破坏, 而使用高度纯化的 75 kDa 细胞表面成分却没有提供保护。该结果提示菌毛可作为防治牙周炎的有效抗原。使用霍乱毒素为佐剂免疫鼠时不

仅血清中有 IgG、IgA 和 IgM, 唾液中还产生了菌毛特异性的 IgA 抗体^[6]。用霍乱毒素 B 亚基为佐剂联合菌毛蛋白经鼻腔免疫 BALB/c 鼠, 血清特异性 IgG 和唾液中的 IgA 均增加, 且可以抑制 P. g 引起的牙槽骨的破坏, 而单独用菌毛免疫产生抗体的量则远远不足^[7]。上述研究提示菌毛可作为防治 P. g 引起的牙周破坏的免疫抗原, 联合使用佐剂效果更佳, 经鼻腔免疫可能会是一种较好的免疫方式。

1.2.2 外膜蛋白(Outer membrane protein) P. g 的外膜 50% 以上由蛋白组成, 蛋白种类有很多, 与免疫相关的研究主要是 40 kDa 的外膜蛋白。Momoi 等^[8]用 40 kDa 的外膜蛋白加上霍乱毒素 A 亚基和不耐热肠毒素 B 亚基为佐剂经鼻腔免疫鼠, 血清中能产生特异性的 IgG、IgA, 唾液中也有特异性的 IgA 抗体, 与对照组相比, 甚至在 1 年后对于 P. g 造成的牙槽骨丧失仍具有保护作用。Liu 等^[9]用 40 kDa 的外膜蛋白加上人工合成的寡核苷酸免疫 P. g 感染的鼠, 能够抑制鼠的骨吸收, 诱导了 Th1 和 Th2 细胞的产生, 并能对抗 P. g 的感染。还有报道单独使用 40 kDa 的外膜蛋白不加佐剂经皮免疫鼠同样能诱导血清特异性 IgG、IgA 和唾液中特异性 IgG 抗体产生, 且血清中抗体的存在可长达 140 d, 但唾液中抗体的滴度却逐渐减少^[10]。用 40 kDa 的外膜蛋白加上编码 Flt3L(一种细胞生长因子, 能够使抗原递呈细胞的数量增加)的基因构建的载体经舌下免疫鼠诱导了血清特异性 IgG、IgA 及唾液 IgA 的产生, 血清和唾液中抗体数量与使用霍乱毒素为佐剂的 40 kDa 的外膜蛋白免疫产生的量相当, 且在颌下腺中有 Flt3L 的表达, 颌下腺的淋巴结和脾脏中树突状细胞的数量明显增多, 更重要的是能够显著地减少因感染 P. g 引起的牙槽骨的丧失^[11]。

1.2.3 牙龈素(Gingipains) 牙龈素是 P. g 产生的胞外蛋白酶, 已被证实是半胱氨酸蛋白酶, 存在于 P. g 的外膜、膜泡或胞外的一组蛋白酶, 是 P. g 重要的致病因子之一。用来源于 P. g 的纯化的牙龈素免疫猕猴因丝线结扎导致的牙周炎, 采用数字减影技术观察牙槽骨的丧失情况。结果显示: 与对照组相比, 使用牙龈素免疫组可减少约 50% 的牙槽骨的丧失, 龈下菌斑中 P. g 的数量明显下降, 龈沟液中前列腺素的水平也明显降低^[12]。牙龈素包括精氨酸牙龈素(arginine-gingipains, Rgp)和赖氨酸牙龈素(Lysine-gingipain, Kgp), Rgp 由 rgpA 和 rgpB 两个基因编码。Kgp 和 rgpA 的组成相似, 由前肽区、蛋白酶区和黏附区组成, 而 rgpB 无黏附区。有研究对比了 rgpA、rgpB 和热灭活的 P. g 全细胞疫苗免疫鼠, 仅 rgpA 能够对 P. g 造成的鼠科动物的牙槽骨的丧失提供保护作用^[13]。将 RgpA-Kgp 重组蛋白作为抗原免疫小鼠, 诱导了 Th2 的反应, 并能保护性地对抗 P. g 引起的鼠的牙槽骨的缺失^[14]。

* 基金项目: 海南省自然科学基金资助项目(807096)。

1.2.4 被膜(capsule) 使用被膜的多聚糖(polysaccharide, CPS)为抗原免疫被 *P. g* 感染所致的鼠牙槽骨的吸收,能够抑制牙槽骨的吸收,该结果提示 CPS 可作为备选抗原对抗 *P. g* 引起的牙槽骨的吸收^[15]。联合使用被膜的多聚糖和菌毛蛋白作为抗原免疫鼠可产生血清高滴度的 IgG,比单独使用被膜的多聚糖或菌毛蛋白能更好地对抗 *P. g* 所致的感染^[16]。

1.3 以 *P. g* 基因或核酸为靶标的疫苗研究 核酸疫苗是将编码特定抗原蛋白质的基因序列克隆到合适的质粒载体上,制备成核酸表达载体,将其导入机体内,通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白质,从而激发机体免疫系统产生针对外源蛋白质的特异性免疫应答反应,又称基因疫苗。核酸疫苗包括 DNA 疫苗和 RNA 疫苗,其中研究最多的是 DNA 疫苗,目前研究证实 DNA 疫苗不仅可以诱导许多实验动物产生免疫应答,而且同样可以诱导人类机体产生免疫应答^[17-18]。有关 *P. g* 相关核酸疫苗的研究主要有牙龈卟啉单胞菌菌毛和胞外蛋白酶——牙龈素。

1.3.1 牙龈卟啉单胞菌菌毛 Kawabata 等^[19]以 pcDNA3/fimA 质粒,即编码牙龈卟啉单胞菌菌毛 FimA 基因构建的 DNA 疫苗,采用唾液腺免疫的方式免疫 BALB/c 系鼠,唾液中菌毛特异性抗体 IgA 和 IgG 及血清中 IgG 都显著地增高了,且在鼠脾脏中发现了菌毛特异性的细胞毒 T 细胞的产生。

以牙龈卟啉单胞菌菌毛 FimA 为抗原,IL-15 为细胞因子佐剂构建载体,该研究构建的 DNA 疫苗既能表达 FimA 蛋白,又能表达 IL-15,以重组质粒 PIREs-fimA;IL15 作为 DNA 疫苗采用滴鼻免疫的方式免疫大鼠,能够对 *P. g* 引起的实验性牙周炎提供有效的保护^[20]。这些研究结果为研发将来用于人类的安全有效防治牙周炎的 DNA 疫苗提供了实验依据。

Sharma 等^[21]用革登链球菌为载体制成的 FimA 的 DNA 疫苗,经口腔免疫大鼠,血清中 FimA 特异性的 IgA 和 IgG 及唾液中的 IgA 均增加,并且对于 *P. g* 引起的大鼠的牙槽骨破坏具有保护作用。该研究支持了使用革登链球菌为载体表达牙龈卟啉单胞菌菌毛经黏膜免疫来防治牙周炎的可能。

1.3.2 牙龈卟啉单胞菌胞外蛋白酶——牙龈素 精氨酸牙龈素(Arg-gingipain,Rgp),即精氨酸特异性的半胱氨酸特异酶,由 rgpA 和 rgpB 两个基因编码。Miyachi 等^[22]使用 rgpA DNA 疫苗分别采用基因枪经腹免疫和经鼻腔免疫两种方式免疫 BALB/c 鼠,每周 1 次连续 6 周,发现经鼻腔免疫可产生 IgG 和 sIgA,并能阻止因感染 *P. g* 所造成的牙槽骨的丧失。Yonezawa 等^[23]用基因枪注射携带 rgpA 的 DNA 质粒经皮内免疫 BALB/c 鼠,rgpA DNA 疫苗诱导了高水平的血清抗体,使用该免疫血清减少了 RgpA and RgpB 酶的活性并抑制了 *P. g* 对 I 型胶原的破坏。

1.4 可食性植物转基因植物疫苗的研究 与常规疫苗相比,转基因植物疫苗具有许多独特的优势,可大范围种植与栽培,成本低廉,运输与保存容易,而且用可直接食用的果蔬如香蕉、番茄作为新型的疫苗分子表达系统,可口服接种,免除了打针带来的痛苦,这些有着其他疫苗不可比拟的优势。近年来,转基因植物通过口服途径诱导免疫应答的能力已逐步得到证实,其不仅能表达外源蛋白,还可激发机体有效的黏膜免疫和系统免疫保护^[24-25]。

目前研究的抗牙周炎的转基因植物疫苗主要以 *P. g* 菌毛 FimA 为抗原,使用霍乱毒素 B 亚基为佐剂构建的重组 CTB-FimA(266-337)质粒转化马铃薯,转染了的植物叶子基因组中能检测到 CTB-FimA(266-337)的 cDNA,在其块茎的提取物中有 CTB-FimA 融合蛋白,并证实了其生物学活性,结果表明,

使用霍乱毒素 B 亚基为载体蛋白构建的重组 CTB-FimA(266-337)质粒转化马铃薯制备出的可食植物疫苗方法可行^[26]。

2 存在问题及展望

目前国内对于以疫苗来防治牙周炎的研究还较少,国外虽有研究,但并未解决增强黏膜免疫应答对牙周组织提供完全保护等难题,并且研究仅在动物实验阶段。

通过以上文献可总结为:(1)使用菌体成分作为抗原而不再是全细胞疫苗;(2)菌体成分联合使用或加入佐剂的免疫方法较有前景;(3)经口腔或鼻腔免疫激发宿主的黏膜免疫反应的方式较有前景。

疫苗距离真正的应用还有很长的路要走,但是研究结果可以为研发安全有效的预防牙周炎疫苗提供依据。随着对 *P. g* 疫苗研究的不断深入,能够有效预防牙周炎的疫苗一定会在不久的将来造福人类。

参考文献:

- [1] 孟焕新. 牙周病学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:106-209.
- [2] Okuda K, Kato T, Naito Y, et al. Protective efficacy of active and passive immunizations against experimental infection with *Bacteroides gingivalis* in ligated hamsters[J]. J Dent Res, 1988, 67(5):807-811.
- [3] Giardino A, Ebersole JL, Holt SC. Characteristics of systemic antibody responses of nonhuman primates following active immunization with *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Bacteroides fragilis*[J]. Oral Microbiol Immunol, 1996, 11(2):79-87.
- [4] Cox SE, Holt SC, Ebersole JL. Characteristics of systemic antibody responses of nonhuman primates to cell envelope and cell wall antigens from periodontal pathogens[J]. Oral Microbiol Immunol, 1997, 12(4):204-211.
- [5] Evans RT, Klausen B, Sojar HT, et al. Immunization with *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction[J]. Infect Immun, 1992, 60(7):2926-2935.
- [6] Nagasawa T, Aramaki M, Takamatsu N, et al. Oral administration of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with cholera toxin induces anti-fimbriae serum IgG, IgM, IgA and salivary IgA antibodies[J]. J Periodontal Res, 1999, 34(3):169-174.
- [7] Takahashi Y, Kumada H, Hamada N, et al. Induction of immune responses and prevention of alveolar bone loss by intranasal administration of mice with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and recombinant cholera toxin B subunit[J]. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22(6):374-380.
- [8] Momoi F, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, et al. Nasal vaccination with the 40-kilodalton outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and a nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces long-term protective immunity with reduced levels of immunoglobulin E antibodies[J]. Infect Immun, 2008, 76(6):2777-2784.
- [9] Liu C, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, et al. Oral immunization with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane protein and CpG oligodeoxynucleotides elicits T helper 1 and 2 cytokines for enhanced protective immunity[J]. Mol

- Oral Microbiol, 2010, 25(3):178-189.
- [10] Koizumi Y, Kurita-Ochiai T, Yamamoto M. Transcutaneous immunization with an outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis without adjuvant elicits marked antibody responses[J]. Oral Microbiol Immunol, 2008, 23(2):131-138.
- [11] Zhang T, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, et al. Sublingual vaccination with outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis and Flt3 ligand elicits protective immunity in the oral cavity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(3):937-941.
- [12] Page RC, Lantz MS, Darveau R, et al. Immunization of Macaca fascicularis against experimental periodontitis using a vaccine containing cysteine proteases purified from Porphyromonas gingivalis[J]. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22(3):162-168.
- [13] Gibson FC, Genco CA. Prevention of Porphyromonas gingivalis-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1[J]. Infect Immun, 2001, 69(12):7959-7963.
- [14] O'Brien-Simpson NM, Pathirana RD, Paolini RA, et al. An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against Porphyromonas gingivalis-induced periodontal bone loss [J]. J Immunol, 2005, 175(6):3980-3989.
- [15] Gonzalez D, Tzianabos AO, Genco CA. Immunization with Porphyromonas gingivalis capsular polysaccharide prevents P. gingivalis-elicited oral bone loss in a murine model[J]. Infect Immun, 2003, 71(4):2283-2287.
- [16] Choi JI, Schifferle RE, Yoshimura F, et al. Capsular polysaccharide-fimbrial protein conjugate vaccine protects against Porphyromonas gingivalis infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes [J]. Infect Immun, 1998, 66(1):391-393.
- [17] Muthumani K, Bagarazzi M, Conway D, et al. A Gag-Pol/Env-Rev SIV239 DNA vaccine improves CD4 counts, and reduce viral loads after pathogenic intrarectal SIV(mac) 251 challenge in rhesus Macaques[J]. Vaccine, 2003, 21(7):629-637.
- [18] Timmerman JM, Singh G, Hermanson G, et al. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idio-type in patients with B-cell lymphoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(20):5845-5852.
- [19] Kawabata S, Terao Y, Fujiwara T, et al. Targeted salivary gland immunization with plasmid DNA elicits specific salivary immunoglobulin A and G antibodies and serum immunoglobulin G antibodies in mice[J]. Infect Immun, 1999, 67(11):5863-5868.
- [20] Guo H, Wang X, Jiang G, et al. Construction of a sIgA-enhancing anti-Porphyromonas gingivalis FimA vaccine and nasal immunization in mice[J]. Immunol Lett, 2006, 107(1):71-75.
- [21] Sharma A, Honma K, Evans RT, et al. Oral immunization with recombinant Streptococcus gordonii expressing porphyromonas gingivalis FimA domains[J]. Infect Immun, 2001, 69(5):2928-2934.
- [22] 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.
- [23] Yonezawa H, Ishihara K, Okuda K. Arg-gingipain A DNA vaccine induces protective immunity against infection by Porphyromonas gingivalis in a murine model[J]. Infect Immun, 2001, 69(5):2858-2864.
- [24] Streatfield SJ, Howard JA. Plant based vaccines[J]. International Journal for Parasitology, 2003, 33:479-493.
- [25] Walmsley AM, Alvarez ML, Jin Y, et al. Expression of the B subunit of Escherichia coli heat labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(10):1020-1026.
- [26] Shin EA, Lee JY, Kim TG, et al. Synthesis and assembly of an adjuvanted Porphyromonas gingivalis fimbrial antigen fusion protein in plants[J]. Protein Expr Purif, 2006, 47(1):99-109.

(收稿日期:2010-11-27 修回日期:2011-02-19)

• 综 述 •

经皮肾镜取石术麻醉研究进展*

唐建平¹, 龙平华^{2△}综述, 邱明²审校

(重庆市大足县人民医院:1. 麻醉科;2. 泌尿外科 402360)

关键词:麻醉;肾造口术;肾结石;研究进展

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.19.032

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)19-1947-03

随着微创腔镜技术的发展,泌尿系结石从传统的开放手术治疗转向输尿管肾镜治疗,经皮肾镜取石术是治疗肾多发性结

石的首选方法^[1]。经皮肾镜取石术具有取石速度快、结石取净率高、手术时间短、步骤简化、适应范围广等优点,现已在国内

* 基金项目:重庆市卫生局 2010 年医学科研基金资助项目(2010-2-440)。△ 通讯作者, Tel:13509482712; E-mail:longpinghua@sina.com。