

· 综 述 ·

## 牙龈卟啉单胞菌在牙周炎病理和防治中的研究进展\*

黄镜静, 武 曦 综述, 谭颖徽<sup>△</sup> 审校

(第三军医大学新桥医院口腔科, 重庆 400037)

关键词: 卟啉单胞菌, 牙髓; 牙周炎; 病理过程; 牙疾病预防

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.034

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)18-1869-03

牙周炎是细菌及其产物引起的慢性感染性疾病, 并引起宿主的免疫应答和炎性反应, 造成牙周组织的直接和间接破坏。牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*, Pg)是牙周病变区最主要的优势菌, 在慢性牙周炎、侵袭性牙周炎、牙周脓肿等的发生、发展中起重要作用, 是牙周微生物学的研究热点, 在微生物学、分子生物学、基因工程等方面都取得了一定进展。

## 1 基本特性

Pg 是革兰阴性无芽孢有菌毛的专性厌氧杆菌, 细菌自身不发酵葡萄糖, 能产生蛋白酶为其提供能量, 在血平板上培养能代谢铁储存亚铁血红素形成特征性的黑色菌落<sup>[1]</sup>, CDC 厌氧血琼脂培养基中加入的氯化血红素、维生素 K1 和绵羊冻血能促进细菌生长和黑色素形成<sup>[2]</sup>。

## 2 分 布

Pg 在健康人龈沟、唾液、龈上菌斑、口腔黏膜等部位较少, 但在龈下菌斑尤其病变的牙周组织中数量显著增多。研究表明, 牙周健康者检出的 Pg 主要是 fimA I 型 Pg, 而慢性牙周炎患者主要与 fimA II 型和 fimA IV 型 Pg 有关<sup>[3]</sup>。龈下菌斑是牙周炎的进展前沿, 与牙周组织的快速破坏相关, Pg 通过与其他细菌和宿主的相互作用影响了龈下菌斑的形成和构成, 改变了牙周菌斑生态系, 从而导致牙周疾病的发生、发展。

## 3 致病物质及机制

Pg 有关的致病物质主要分两类, (1) 菌体成分: 菌毛、纤毛、外膜、荚膜; (2) 菌体产生的毒力因子: 内毒素、蛋白酶以及一些代谢产物等。

**3.1 Pg 介导的病原体黏附和聚集** 牙菌斑是牙周炎的始动因子, 细菌的聚集和黏附是致病的先决条件。口腔细菌的相互作用主要有以下 3 种: (1) 通过凝集素-糖类样机制介导自身的共聚和其他细菌的凝集, 研究表明 Pg 能通过自身的菌毛蛋白与福赛拟杆菌 (*bacteroides forsythus*, Bf)、伴放线杆菌 (*actinobacillus actinomycetem comitans*, Aa) 的菌体多糖特异性结合, 这种结合受单糖和氨基酸的调节, 但不受温度影响; (2) 蛋白质和蛋白质间的相互作用, 主要是与唾液获得性膜间的相互作用, 易受温度影响; (3) 氢键、疏水键、亲水键等的辅助作用, Pg 的表面结构如疏水性强的纤毛、荚膜、外膜等与其相关<sup>[4-5]</sup>。

**3.2 Pg 对宿主组织的侵入** 与正常组织相比, 牙周病变部位侵入的细菌数量显著增多, Jandik 等<sup>[6]</sup>通过菌落形成单位的测定显示 Pg 在病变位点有更强的侵袭能力。Pg 的侵袭能力还受其他细菌的影响, Saito 等<sup>[7]</sup>研究发现具核梭杆菌 (*fusobacterium nucleatum*, Fn) 可以显著增强 Pg 的入侵, Aa 和 Bf 却减弱 Pg 的入侵, 这表明不同种类的病原体在入侵过程中存在协同和拮抗作用。菌毛可以介导病原体穿越上皮屏障, Amano<sup>[8]</sup>

研究发现在菌毛的 6 种基因型 (I ~ V、I b 型) 中, 具有 II 型菌毛的 Pg 可以通过降解整合素相关的信号分子, 破坏上皮屏障和上皮细胞功能从而侵入宿主组织。

**3.3 Pg 介导的免疫逃逸和组织损伤** Pg 能逃避和抵抗宿主的防御反应, 这是其得以在宿主体内适应性定植和生长的关键因素。Wang 等<sup>[9]</sup>发现 Pg 菌毛蛋白的部分成分 FimCDE 能增强病原体适应性, 介导病原体逃避细胞内杀伤机制; 与其他病原体相比, Pg 细胞壁成分肽聚糖的片段, 在刺激结合龈沟上皮受体方面具有弱的免疫活性, 此外, Pg 的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 具有特殊的结构脂质 A, 可以作为 TLR4 的拮抗剂, 抑制了炎症的 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[10]</sup>, 并且随炎症部位温度的变化, 脂质 A 可以变构调节宿主的免疫应答<sup>[11]</sup>; Brunner 等<sup>[12]</sup>首次发现 Pg 的荚膜多糖可以通过减少白细胞介素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8) 等来抑制宿主的免疫应答, 这些可能是其逃脱免疫系统的内源分子机制, 从而诱发牙周组织炎症。

Pg 侵入机体组织后, 能通过各种途径介导牙周组织的损伤。其 LPS 对成纤维细胞有明显的细胞毒作用, 可抑制人牙龈成纤维细胞的生长和增殖, 降低成纤维细胞附着和定向移动能力, 还可以抑制牙周膜细胞的活性和分化<sup>[13]</sup>, 并能与一些炎症介质如 IFN- $\gamma$  协同作用, 增加局部组织氧自由基产生, 促进成纤维细胞凋亡<sup>[14]</sup>。LPS 能通过激活 Notch1 信号抑制成骨细胞前体细胞的成骨分化<sup>[15]</sup>, 并抑制成骨细胞的生长、分化和功能, 抑制骨形成, 改变病变部位牙槽骨改建的动态平衡<sup>[16-17]</sup>。LPS 还能刺激肥大细胞脱颗粒产生前炎症介质如白三烯, 增加微血管通透性造成局部水肿, 并使肥大细胞表面的 TLR2 和 TLR4 表达增高<sup>[18]</sup>。内毒素 (endotoxin) 是革兰阴性菌细胞壁外膜的 LPS 成分, 可在细菌死亡或裂解时释放, 也可由活菌以细胞壁发泡的形式释放。

Pg 能产生许多细胞外蛋白酶, 如牙龈素 (gingipains, gps)、胶原酶, 是破坏宿主组织的重要毒力因子, 能降解非常广泛的底物, 直接参与牙周组织的破坏和降解。牙龈素是存在于 Pg 外膜、膜泡、胞外的一组蛋白酶, 为半胱氨酸酶类, 包括精氨酸-牙龈素 (arginine-gingipains, Rgps, RgpA 和 RgpB) 和赖氨酸-牙龈素 (lysine-gingipain, Kgp)。Pg 产生的牙龈素 (1) 能破坏上皮屏障的功能, 使细菌渗透入牙周结缔组织中<sup>[19]</sup>; (2) 能灭活中性粒细胞产生的抗微生物多肽 LL-37, 使其丧失与 LPS 结合的能力和杀菌活性<sup>[20]</sup>; (3) 能裂解表达于口腔上皮的 ICAM-1, 干扰了中性粒细胞的黏附和免疫作用<sup>[21]</sup>; (4) 能降解炎症介质如 IL-4、IL-5 等<sup>[22]</sup>或其配体如 TNF- $\alpha$  的配体 CD27<sup>[23]</sup>, 使机体免疫功能紊乱, 有利于细菌在龈下菌斑的生长繁殖和疾病的发生; (5) 能辅助细菌逃脱机体血清抗体的免疫应答<sup>[24]</sup>。

\* 基金项目: 军队医药卫生科研基金项目课题 (06MA184)。△

通讯作者, Tel: (023)68755632; E-mail: tanyh1962@yahoo.com.cn。

#### 4 Pg 在牙周炎防治中的研究现状和展望

Pg 是牙周炎的主要致病菌,毒力较强,因此国内外学者针对 Pg 的牙周病防治进行了大量研究,已经深入到分子水平并取得了一定进展。

通过筛选针对牙周致病菌的敏感药物或天然物质,制成牙周缓释剂,其抑菌作用可辅助治疗和控制牙周感染<sup>[25-26]</sup>。一些研究针对 FimA I、II、IV 型 Pg 菌毛制备的单克隆抗体能有效中和 Pg 所致的感染,其中抗 FimA II 型 Pg 的单克隆抗体可以抑制人牙龈成纤维细胞中 IL-8 的产生<sup>[27-28]</sup>。

将 Pg 外膜蛋白抗体制成的疫苗经皮免疫通过抑制 Pg 的共聚,可以阻止 Pg 的感染,从而有效阻止慢性牙周炎的进展<sup>[29-31]</sup>;Yu 等<sup>[32]</sup>针对 Pg 的 FimA 构建了靶向质粒 DNA 疫苗,能有效预防实验动物的牙槽骨丧失;Pg 菌毛蛋白免疫动物能阻止牙槽骨吸收。

牙周炎疫苗的研究刚刚起步,有关全菌免疫还存在一定争议,菌体成分复杂,而且全细胞抗原多,增加了与人体组织免疫交叉反应的危险性,在牙周炎病原菌的众多抗原分子中,选择有效且具有免疫保护作用的抗原分子,是研究的热点问题。此外不同病原菌的抗原分子,其单独或共同作用时,对机体的免疫系统的影响都有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Lewis JP. Metal uptake in host-pathogen interactions: role of iron in Porphyromonas gingivalis interactions with host organisms[J]. Periodontol, 2010, 52(1): 94-116.
- [2] 李德懿. 牙周病微生物学[M]. 天津:天津科技翻译出版公司, 1994: 61.
- [3] Wang Q, Zhou XD, Zheng QH, et al. Distribution of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms [J]. J Endod, 2010, 36(11): 1790-1795.
- [4] 黄定明, 周学东, 天野敦雄. 牙龈卟啉单胞菌菌毛 FimA 与福赛拟杆菌表面蛋白间相互结合机制[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(6): 302-305.
- [5] Suzuki N, Nakano Y, Kiyoura Y. Characterizing the specific coaggregation between Actinobacillus actinomycescomitans serotype c strains and Porphyromonas gingivalis ATCC 33277[J]. Oral Microbiol Immunol, 2006, 21(6): 385-391.
- [6] Jandik KA, Belanger M, Low SL, et al. Invasive differences among Porphyromonas gingivalis strains from healthy and diseased periodontal sites[J]. J Periodontal Res, 2008, 43(5): 524-530.
- [7] Saito A, Inagaki S, Ishihara K. Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by Porphyromonas gingivalis[J]. Microb Pathog, 2009, 47(6): 329-333.
- [8] Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by Porphyromonas gingivalis [J]. Front Biosci, 2007, 12: 3965-3974.
- [9] Wang M, Shakhathreh MA, James D, et al. Fimbrial proteins of porphyromonas gingivalis mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages [J]. J Immunol, 2007, 179(4): 2349-2358.
- [10] Okugawa T, Kaneko T, Yoshimura A, et al. NOD1 and NOD2 mediate sensing of periodontal pathogens [J]. J Dent Res, 2010, 89(2): 186-191.
- [11] Curtis MA, Percival RS, Devine D, et al. Temperature-dependent modulation of Porphyromonas gingivalis lipid A structure and interaction with the innate host defenses [J]. Infect Immun, 2011, 79(3): 1187-1193.
- [12] Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, et al. The capsule of Porphyromonas gingivalis reduces the immune response of human gingival fibroblasts [J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 5.
- [13] 张凤秋. 牙周优势菌内毒素的生物学活性及与牙周炎相关的发病机制[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(3): 166-169.
- [14] Ghosh A, Park JY, Fenno C, et al. Porphyromonas gingivalis, gamma interferon, and a proapoptotic fibronectin matrix form a synergistic trio that induces c-Jun N-terminal kinase 1-mediated nitric oxide generation and cell death [J]. Infect Immun, 2008, 76(12): 5514-5523.
- [15] Xing Q, Ye Q, Fan M, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide inhibits the osteoblastic differentiation of preosteoblasts by activating Notch1 signaling [J]. J Cell Physiol, 2010, 225(1): 106-114.
- [16] Wang YH, Jiang J, Zhu Q, et al. Porphyromonas gingivalis lipids inhibit osteoblastic differentiation and function [J]. Infect Immun, 2010, 78(9): 3726-3735.
- [17] Zhang W, Swearingen EB, Ju J, et al. Porphyromonas gingivalis invades osteoblasts and inhibits bone formation [J]. Microbes Infect, 2010, 12(11): 838-845.
- [18] Konopka L, Wierzbicki M, Brzezinska-Blaszczyk E. Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis stimulates rat mast cells to cysteinyl leukotriene generation and upregulates Toll-like receptor-2 and -4 expression [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(3): 803-810.
- [19] Groeger S, Doman E, Chakraborty T, et al. Effects of Porphyromonas gingivalis infection on human gingival epithelial barrier function in vitro [J]. Eur J Oral Sci, 2010, 118(6): 582-589.
- [20] Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, et al. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria [J]. Oral Microbiol Immunol, 2008, 23(4): 328-335.
- [21] Tada H, Sugawara S, Nemoto E, et al. Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains [J]. J Dent Res, 2003, 82(10): 796-801.
- [22] Tam V, O'Brien-Simpson NM, Chen YY, et al. The RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of Porphyromonas gingivalis inactivate the Th2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5 [J]. Infect Immun, 2009, 77(4): 1451-1458.
- [23] Yun LW, Decarlo AA, Hunter N. Blockade of protease-activated receptors on T cells correlates with altered pro-

- teolysis of CD27 by gingipains of Porphyromonas gingivalis[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 150(2): 217-229.
- [24] Slaney JM, Rangarajan M, Aduse-Opoku J, et al. Recognition of the carbohydrate modifications to the RgpA protease of Porphyromonas gingivalis by periodontal patient serum IgG[J]. J Periodontol Res, 2002, 37(3): 215-222.
- [25] Rodriguez-Garcia A, Galan-Wong LJ, Arevalo-Nino K. Development and in vitro evaluation of biopolymers as a delivery system against periodontopathogen microorganisms[J]. Acta Odontol Latinoam, 2010, 23(2): 158-163.
- [26] Flemmig TF, Petersilka G, Volp A, et al. Efficacy and safety of adjunctive local moxifloxacin delivery in the treatment of periodontitis[J]. J Periodontol, 2011, 82(1): 96-105.
- [27] Hijiya T, Shibata Y, Hayakawa M, et al. A monoclonal antibody against fimA type II Porphyromonas gingivalis inhibits IL-8 production in human gingival fibroblasts [J]. Hybridoma(Larchmt), 2010, 29(3): 201-204.
- [28] Maruyama M, Hayakawa M, Zhang L, et al. Monoclonal antibodies produced against lipopolysaccharide from fimA Type II Porphyromonas gingivalis[J]. Hybridoma(Larch-  
• 综 述 •
- mt), 2009, 28(6): 431-434.
- [29] Maeba S, Otake S, Namikoshi J, et al. Transcutaneous immunization with a 40-kDa outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis induces specific antibodies which inhibit coaggregation by P gingivalis[J]. Vaccine, 2005, 23(19): 2513-2521.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Yu F, Xu QA, Chen W. A targeted fimA DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice after intra-nasal administration[J]. J Clin Periodontol, 2011, 38(4): 334-340.
- (收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-11-12)

## miR-34s 与大肠癌的发生

王一飞 综述, 梁德森 审校

(哈尔滨医科大学普外八科 150001)

**关键词:** 微 RNAs; 细胞凋亡; 细胞周期; 大肠; 肿瘤

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.035

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2012)18-1871-04

随着现代人类的生活环境和生活方式的改变, 肿瘤的发生率也呈现出迅速增长的趋势, 其中消化道肿瘤是恶性肿瘤中发生率相对较高的疾病, 大肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道肿瘤常见疾病之一, 仅次于胃癌、食管癌。大肠癌是一个多基因、多阶段、长期形成的复杂的病变过程, 是大肠黏膜上皮起源的恶性肿瘤, 虽然近年来新的诊断治疗方法相继问世, 但大肠癌的病死率仍较高, 目前大肠癌发生、发展的基因调控机制越来越受到人们的关注, 其中 MicroRNAs(miRNAs)作为一种新的内源性非编码 RNA 与大肠癌的发生、发展密切相关, 本文将就 miR-34 家族(miR-34s)与大肠癌的发生及其研究进展进行综述。

### 1 miRNAs 简介

miRNAs 是一种新的内源性非编码 RNA (non-coding RNAs, ncRNAs), 它广泛存在于真核生物中, 是生物体内重要的基因调节器<sup>[1-4]</sup>, 研究证明, miRNAs 在细胞的分化、增殖、发育、新陈代谢及凋亡过程中都起着非常重要的作用, 它与人类肿瘤细胞的生成、增殖、发育过程关系非常密切, 在 miRNAs 编码的基因中既有癌基因又有抑癌基因<sup>[1, 3-4]</sup>, 所以它的不恰当的表达也就成了肿瘤发生的一种特征性标志<sup>[3, 5-6]</sup>, 实验证明, 不同家族成员的 miRNAs 的表达与对应类型癌的发生有着较为明确的关系<sup>[7]</sup>。它们在肿瘤的发生、发展过程中扮演着重要的角色。

### 2 miRNAs 与肿瘤发生

目前发现, 在人类中有近 1 000 多种 miRNAs, 30% 的人类基因都不同程度的受其控制<sup>[8]</sup>, 随着研究的深入, miRNAs 调控的靶基因越来越多地被揭示, 人们发现一种 miRNAs 在不同肿瘤的表达作用情况不同甚至相反, 因此, 单纯以抑癌与促癌把 miRNAs 分成两类显然是不准确的<sup>[9-10]</sup>。3 种机制: (1) miRNAs 定位的染色体异常<sup>[11]</sup>; (2) 表观遗传学改变<sup>[12]</sup>; (3) miRNAs 加工相关的基因及其蛋白的异常变化<sup>[13]</sup>。通过以上 3 种机制不难发现 miRNAs 与肿瘤的发生在基因水平上有着极为密切的关系, 所以说 miRNAs 与肿瘤细胞的发生、发展、抑制等活动有着不容置疑的联系。

### 3 miR-34 家族介绍及激活

**3.1 miR-34 家族介绍** miR-34 是最早从线虫中被发现的一段保守 miRNAs, 而后在脊椎动物中发现 3 个成员: miR-34a、miR-34b 以及 miR-34c。不同物种中 miR-34 基因的同源性很高, 其中成熟序列的同源性为 68%, 前体序列的同源性为 38.89%<sup>[14]</sup>。人源 miR-34a 的编码序列位于转录前体的第 2 外显子内<sup>[15-16]</sup>, miR-34b 和 miR-34c 的编码序列分别位于第 1 内含子和第 2 外显子中<sup>[16]</sup>。染色质免疫沉淀反应和位点突变实验表明上述序列即为 P53 蛋白结合位点, 并且该结合序列前存在一个 CpG 岛(CpG island)<sup>[17]</sup>。在某些肿瘤细胞中, 正是由于该 CpG 岛被甲基化阻碍了 P53 对 miR-34 的激活, 从而