

光动力疗法对牙龈卟啉单胞菌和福赛坦菌生物膜的抗菌效果

陈晨^{1,2}, 何家才^{1,2}

摘要 目的 研究新型光敏剂 NHS-BODIPY-Br 在体外对牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)和福赛坦菌(*T. forsythia*)生物膜的抗菌作用。方法 CCK-8 检测光敏剂 NHS-BODIPY-Br 的生物相容性,将 *P. gingivalis* 和 *T. forsythia* 在厌氧(10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂)条件下混合培养 48 h 形成生物膜后进行抗菌光动力治疗,光敏剂浓度分别为 5、10、15 mg/L。激光强度分别为 15 和 30 J/cm²。治疗后进行细菌活力检测、残留脂多糖检测以及激光共聚焦分析,并确定最佳治疗组合。结果 当光敏剂 NHS-BODIPY-Br 的浓度为 10 mg/L,光强度为 15 J/cm² 时细菌生物膜减少率约 98%。结论 该研究说明用光敏剂 NHS-BODIPY-Br 进行抗菌光动力治疗可以有效地抑制 *P. gingivalis* 和 *T. forsythia* 生物膜。

关键词 抗菌光动力治疗;种植体周围炎;生物膜;脂多糖

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1871-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.005

种植体周围炎是一种发生在种植体周围组织与牙菌斑相关的病理性疾病,其特征是种植体周围黏膜发炎,随后支持骨丧失^[1]。有报道^[2]称种植体周围炎是由革兰阴性细菌感染所引起的,如牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)和福赛坦菌(*Tannerella forsythia*, *T. forsythia*)。机械清创术因其一定的临床操作风险而慎用,抗生素疗法也会导致耐药菌的产生^[3]。目前,尚缺乏种植体周围炎有效的临床治疗方法。自 1999 年第 1 个光动力治疗药物被批准以来,光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)由于其侵袭性和重复性极小且无诱导耐药性而成为一种引人注目的治疗方式^[4]。光动力治疗结合光敏剂和可见光,在氧的存在下产生对细菌有毒的细胞毒性活性氧(reactive oxygen species, ROS),如单线态氧^[5-6]。该文旨在研究新型

光敏剂 NHS-BODIPY-Br 在体外对 *P. gingivalis* 和 *T. forsythia* 生物膜的抗菌作用,以期为种植体周围炎的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 *P. gingivalis* (ATCC 33277, 美国模式培养物集存库); *T. forsythia* (ATCC 43037, 美国模式培养物集存库);光敏剂 NHS-BODIPY-Br(中国科学技术大学化学与材料科学学院提供);胰酶消化液(上海碧云天生物技术有限公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁公司);阿尔玛蓝试剂盒、显色基质法试剂盒、PBS 缓冲剂(美国 Solarbio 公司);活/死染试剂盒、CO₂ 恒温孵箱(美国赛默飞公司);DMEM 培养液(美国 Gibco 公司);脑心浸液肉汤、氯化血红素、脱纤维羊血、0.02% 维生素 K1(青岛海博生物公司);680 nm 半导体激光治疗仪(中国远明激光公司);激光扫描共聚焦显微镜 880(德国 Zeiss 公司);厌氧培养箱(英国 DWS 公司);酶标仪(美国 bio-tex 公司)。

1.2 方法

1.2.1 光敏剂的准备 将光敏剂 NHS-BODIPY-Br 在 PBS 中稀释成不同浓度:5、10、15 mg/L。制备好的光敏剂在容器中避光以消除反应,并在 8 °C 下保存备用。

1.2.2 细胞增殖实验 从该课题组取 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)进行培养,取 P3 代进行实验。将 BMSCs 以 4 × 10⁴ 个/ml 的密度接种于 96 孔板中。培养 24 h 待细胞贴壁后吸出培养液,用 PBS 清洗,将不同浓度的 NHS-BODIPY-Br 加入,没有加光敏剂的细胞作为对照组。分别在培养第 1、3、5 天将 CCK-8 以 1:9 的比例加入 DMEM 培养液中,将细胞培养板置于 37 °C 恒温培养箱中 2 h,随后在 450 nm 波长处检测各孔的吸光度。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.3 生物膜的培养 将 *P. gingivalis* 和 *T. forsythia* 接种在 BHI 固体培养基上,在厌氧培养箱中培养 7 d 后收获菌落。用 PBS 稀释细菌并采用麦氏比浊法配制成细菌悬浊液 2.5 × 10⁶ ~ 3.5 × 10⁶ CFU/ml。

2021-09-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81771117)

作者单位:¹ 安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医学院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

作者简介:陈晨,女,硕士研究生;

何家才,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: hejiacai@163.com

将 0.1 ml 的细菌接种在 96 孔板中,在 37 °C 厌氧箱中培养 48 h,获得的生物膜用于阿尔玛蓝和脂多糖实验。将 1 ml 同样密度的细菌接种在共聚焦培养皿上,厌氧培养 48 h 获得的生物膜用于激光共聚焦荧光成像。

1.2.4 光动力治疗 去除培养液后,在 96 孔板中加入 0.02 ml 不同浓度的光敏剂,在共聚焦培养皿中加入 1 ml 光敏剂,反应 5 min 后去除光敏剂,使用 680 nm 波长,光剂量为 150 mw/cm² 的二极管激光器工作 100 和 200 s,分别对应 15 和 30 J/cm²。

1.2.5 阿尔玛蓝活力分析 激光处理结束后,阿尔玛蓝溶液以 1 : 10 的比例加至培养液中,96 孔板每孔中加入 0.1 ml 该混合液后在 37 °C 培养箱中培养 20 min。以 600 nm 作为参考波长,在 570 nm 波长下用酶标仪读取吸光度值。没有加入光敏剂的细菌作为对照组。吸光度减少率(%) 计算如下:(对照组阿尔玛蓝的吸光度 - 光动力治疗后阿尔玛蓝的吸光度) / 对照组阿尔玛蓝的吸光度 × 100%。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.6 脂多糖检测 在光动力治疗后,剩余的脂多糖浓度通过内毒素检测试剂盒来定量。加入细菌没有光照的是阳性对照组,没有加入细菌的是阴性对照组。在 545 nm 处读取吸光度的结果。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.7 共聚焦 光动力治疗后,在每个共聚焦培养皿中加入 1 ml 的活/死染溶液,反应 20 min 后吸出溶液,用 PBS 清洗 3 次后用于共聚焦显微镜观察。对照组未进行激光照射。每个治疗组设 3 个重复皿。图片使用软件 ZEN 进行分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 显示。多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NHS-BODIPY-Br 浓度对 BMSCs 细胞增殖的影响 与对照组相比,A、B、C 组细胞吸光度值无明显差异($F = 1.715、2.112、1.037, P > 0.05$),差异无统计学意义。见图 1、表 1。

表 1 CCK8 检测不同时间和组别的细胞 OD 值($\bar{x} \pm s$)

时间(d)	A 组	B 组	C 组	对照组
1	0.56 ± 0.03	0.53 ± 0.04	0.54 ± 0.04	0.59 ± 0.05
3	1.57 ± 0.06	1.51 ± 0.09	1.47 ± 0.07	1.56 ± 0.07
5	2.49 ± 0.12	2.42 ± 0.08	2.51 ± 0.10	2.51 ± 0.09

A 组: 5 mg/L; B 组: 10 mg/L; C 组: 15 mg/L

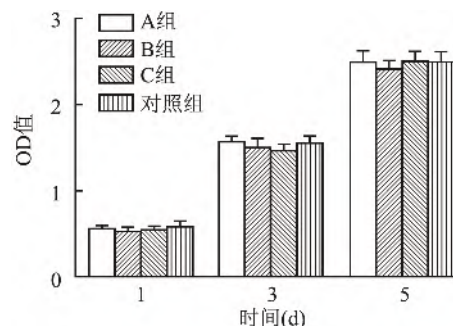


图 1 CCK-8 检测不同浓度光敏剂对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响

A 组: 5 mg/L; B 组: 10 mg/L; C 组: 15 mg/L

2.2 NHS-BODIPY-Br 浓度和光照时间对细菌活力的影响 不同浓度的 NHS-BODIPY-Br 经过光照 0、100、200 s 处理后,阿尔玛蓝检测结果显示生物膜的减少率持续上升($F = 28.882、60.525、36.923, P < 0.05$)。例如,当 NHS-BODIPY-Br 浓度 5 mg/L,光照 0 s 时细菌减少约 17%,光照 100 s 时细菌减少率约 67%,光照 200 s 时减少率约 78%。值得注意的是,当 NHS-BODIPY-Br 浓度 10 mg/L 和 15 mg/L,光照 100 s 和光照 200 s 时细菌的减少率均接近 98%,差异无统计学意义。见图 2、表 2。

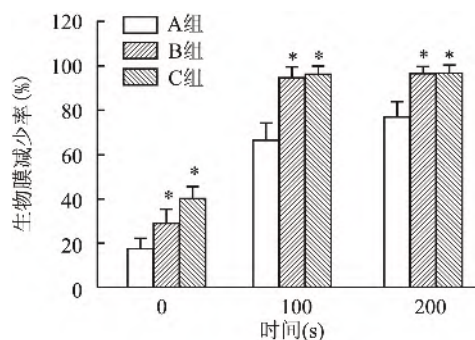


图 2 阿尔玛蓝检测结果

A 组: 5 mg/L; B 组: 10 mg/L; C 组: 15 mg/L; 与 A 组比较: * $P < 0.05$

表 2 阿尔玛蓝检测不同光敏剂浓度和光照时间对细菌生物膜的减少率($\bar{x} \pm s$)

光照时间(s)	A 组	B 组	C 组
0	17.50 ± 4.76	29.33 ± 5.95*	40.66 ± 5.04*
100	67.33 ± 6.91	94.83 ± 4.66*	96.66 ± 3.26*
200	77.50 ± 6.34	96.83 ± 2.92*	97.00 ± 3.52*

A 组: 5 mg/L; B 组: 10 mg/L; C 组: 15 mg/L; 与 A 组比较: * $P < 0.05$

2.3 NHS-BODIPY-Br 浓度和光照时间对细菌脂多糖水平的影响 不同浓度的 NHS-BODIPY-Br 经

过光照 0、100、200 s 处理后,脂多糖检测结果显示残余生物膜脂多糖的吸光度值持续下降 ($F = 41.095, 69.514, 17.840, P < 0.05$)。当 NHS-BODIPY-Br 浓度 10 mg/L 和 15 mg/L 光照 100 s 和 200 s 时,残余的脂多糖水平与阴性对照组相比,差异无统计学意义。见图 3。

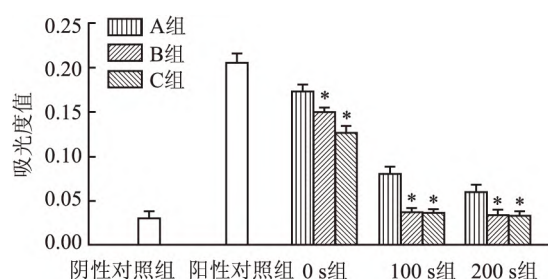


图 3 残余脂多糖水平

阳性对照组: 有细菌无光照; 阴性对照组: 无细菌; A 组: 5 mg/L; B 组: 10 mg/L; C 组: 15 mg/L; 与 A 组比较: * $P < 0.05$

2.4 不同 NHS-BODIPY-Br 浓度和光照时间处理后的共聚焦显微镜成像 图 4A 显示的是对照组的死污染。从图中绿色荧光度可看出对照组细菌存活水平显著。图 4B、E 中红色荧光和绿色荧光相间, 当 NHS-BODIPY-Br 浓度 5 mg/L 光照 100 s 和 200 s 时还有存活的细菌。图 4C、D、F、G 中红色荧光度丰富, 整个生物膜中没有活的细菌菌落。

3 讨论

近年来, 光动力治疗作为种植体周围炎的辅助治疗手段引起了越来越多的关注。与传统疗法相比, PDT 有一些优势。光动力学疗法已在医学上用于肿瘤的治疗, 并建议将其用于消除龈下微生物而对根表面进行更好的灭菌。该研究以 NHS-BODIPY-Br 作为光敏剂, 680 nm 半导体激光作为光源, 评估了 PDT 对 *P. gingivalis* 和 *T. forsythia* 生物膜的抗菌作用。该实验使用的 BODIPY 类光敏剂在光动力治疗中展示出其独特的优越性, 其吸收峰值为 680 nm 波长, 化学性质稳定, 摩尔消光系数高, 暗毒性低, 其中溴原子的加入使系间穿梭效率明显提升, 单线态氧量子产率得到明显改善, 达到 0.76^[7-8]。紫外线被证明对口腔微生物具有出色的抗菌功效。然而, 紫外线的照射可能导致 DNA 损伤和紫外线引起的皮肤损伤^[9], 而可见光和近红外光被认为是安全的^[10]。而且激光可以改变牙本质, 从而使胶原纤维暴露, 胶原蛋白可促进血凝块的附着和稳定。所以该文使用的是一种低功率的半导体激光治疗仪,

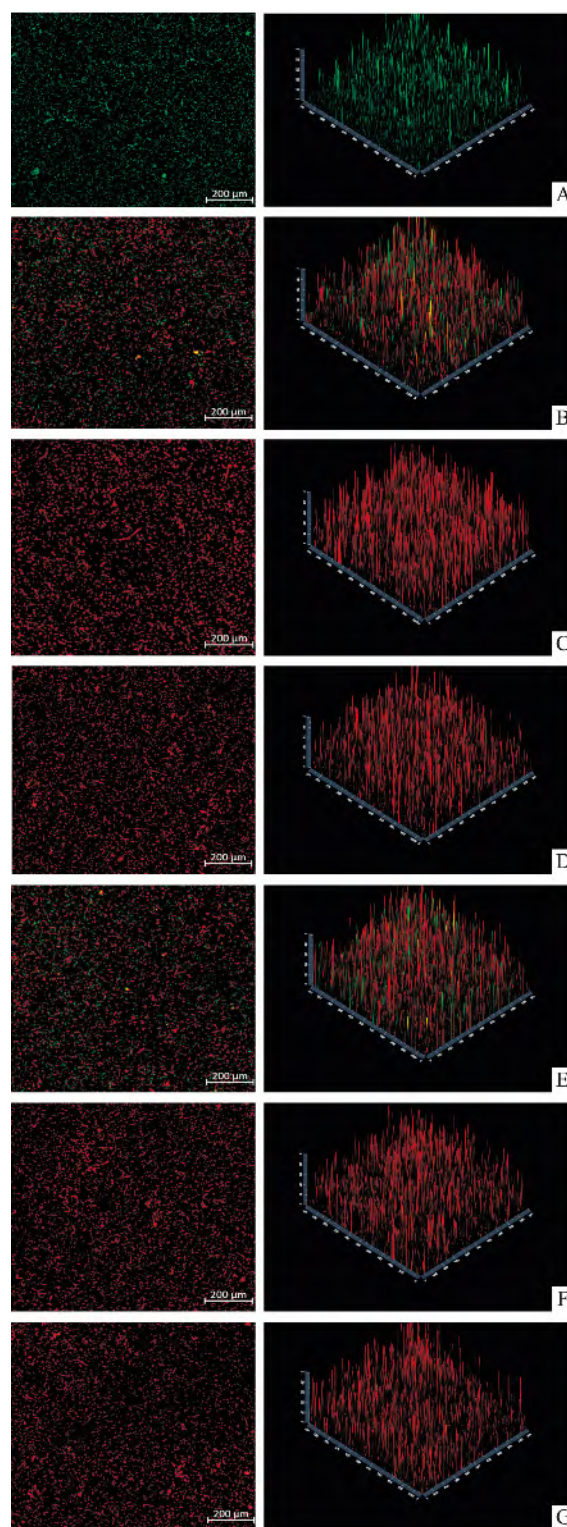


图 4 共聚焦荧光成像 $\times 20$

A: $c = 0 \text{ mg/L}, t = 0 \text{ s}$; B: $c = 5 \text{ mg/L}, t = 100 \text{ s}$; C: $c = 10 \text{ mg/L}, t = 100 \text{ s}$; D: $c = 15 \text{ mg/L}, t = 100 \text{ s}$; E: $c = 5 \text{ mg/L}, t = 200 \text{ s}$; F: $c = 10 \text{ mg/L}, t = 200 \text{ s}$; G: $c = 15 \text{ mg/L}, t = 200 \text{ s}$; c: 光敏剂浓度; t: 光照时间

大量研究^[11]表明只要参数设置合理, 使用方法正确, 就不会造成牙根和牙周组织的损害。

该研究的实验组与对照组样品相比, CCK-8 的结果并未随着 NHS-BODIPY-Br 的加入而降低, 表明 NHS-BODIPY-Br 对细胞无毒性, 表明了 NHS-BODIPY-Br 具有生物相容性。通过阿尔玛蓝来检测不同光敏剂浓度以及光照时间细菌生物膜的减少率, 当 NHS-BODIPY-Br 浓度越高, 光照时间越久, 细菌的减少率越高, 这与 Umeda et al^[12] 使用光敏剂亚甲基蓝的结果一致。脂多糖是革兰阴性菌如 *P. gingivalis* 的主要细胞壁成分, 残余脂多糖水平的多少可以间接反应残余的细菌数量。NHS-BODIPY-Br 浓度 10 mg/L, 光强度 15 J/cm² 时脂多糖含量接近阴性对照组的含量, 这与细菌活力的结果一致。该研究中共聚焦荧光显微镜成像显示当 NHS-BODIPY-Br 浓度 10 mg/L, 光强度 15 J/cm² 时能完全杀灭生物膜中的细菌, 光动力治疗可以激活敏化细胞产生 ROS, 从而促进细菌的死亡。目前研究的一个局限是生物膜的厚度相对较低。该研究是双种群生物膜生长 2 d, 不能完全代表一个真正口腔环境的复杂性, 因此, 未来的研究必须考虑生物膜厚度的变化。

革兰阴性细菌的细胞包膜是一种较为复杂且相对不易渗透的结构, 由内质膜和外膜组成, 外膜由肽聚糖层隔开^[13], 而且由于抗菌药物难以有效穿透生物膜致其在生物膜内活性较低。因此, 选择 PDT 作为替代疗法很重要。Fontana et al^[14] 通过激光共聚焦扫描显微镜表明, 亚甲基蓝对生物膜敏感性降低的原因是亚甲基蓝穿透生物膜的渗透性降低, 导致在生物膜外层滞留, 而且吩噻嗪类光敏剂如亚甲基蓝、甲苯胺蓝 O 等是细菌多药耐药泵的底物。但是该研究中当 NHS-BODIPY-Br 浓度 10 mg/L, 光强度 15 J/cm² 时, 整个生物膜中的细菌完全被杀死, 说明光敏剂 NHS-BODIPY-Br 在整个生物膜中无处不在。而且光敏剂 NHS-BODIPY-Br 负载于具有良好水溶性的纳米药物载体中, 这可能是它能穿透细菌生物膜的原因。

参考文献

- [1] Berglundh T, Armitage G, Araujo M G, et al. Peri-implant diseases and conditions: consensus report of workgroup 4 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions [J]. *J Periodontol*, 2018, 89: S313–8.
- [2] Heitz Mayfield L J A, Lang N P. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs peri-implantitis [J]. *Periodontology* 2000, 2010, 53(1): 167–81.
- [3] Marotti J, Tortamano P, Cai S, et al. Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy [J]. *Lasers Med Sci*, 2013, 28(1): 303–9.
- [4] Meng X, Yang Y, Zhou L, et al. Dual-responsive molecular probe for tumor targeted imaging and photodynamic therapy [J]. *Theranostics*, 2017, 7(7): 1781–94.
- [5] Hua F, Wu Z, Yan X, et al. DR region of Na(+)–K(+)–ATPase is a new target to protect heart against oxidative injury [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13100.
- [6] Huang L, Xuan Y, Koide Y, et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an *in vitro* study on gram-negative and gram-positive bacteria [J]. *Lasers Surg Med*, 2012, 44(6): 490–9.
- [7] Liu L, Li T, Ruan Z, et al. Reduction-sensitive polypeptide nanogel conjugated Bodipy-Br for NIR imaging-guided chem/photodynamic therapy at low light and drug dose [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 92: 745–56.
- [8] Ruan Z, Zhao Y, Yuan P, et al. PEG conjugated Bodipy-Br(2) as macro-photosensitizer for efficient imaging-guided photodynamic therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2018, 6(5): 753–62.
- [9] Panich U, Sittithumcharee G, Rathviboon N, et al. Ultraviolet radiation-induced skin aging: the role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 7370642.
- [10] D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, et al. UV radiation and the skin [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 12222–48.
- [11] Seraj B, Moosavi G Z, Chiniforush N, et al. Thermal changes in root surface of primary teeth during root canal treatment with diode lasers: an *in vitro* study [J]. *J Lasers Med Sci*, 2018, 9(4): 237–42.
- [12] Umeda M, Tsuno A, Okagami Y, et al. Bactericidal effects of a high-power, red light-emitting diode on two periodontopathic bacteria in antimicrobial photodynamic therapy *in vitro* [J]. *J Investig Clin Dent*, 2011, 2(4): 268–74.
- [13] Pereira M A, Faustino M A, Tomé J P, et al. Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2014, 13(4): 680–90.
- [14] Fontana C R, Abernethy A D, Som S, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms [J]. *J Periodontol Res*, 2009, 44(6): 751–9.

网络出版时间: 2021-11-25 8:12 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1044.006.html>

WDR12 对 GC-1 细胞增殖凋亡及核糖体蛋白基因表达的影响

郭兰华 娟

摘要 目的 探究敲低 WD 重复结构域 12(WDR12) 对小鼠精原细胞(GC-1)的影响。方法 利用脂质体转染法将针对 WDR12 的 shRNA 编码克隆(shWDR12)及阴性对照的 EGFP 质粒转染细胞后,Western blot 和 Q-PCR 检测细胞中 WDR12 表达量;CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况;TUNEL 试剂盒染色检测细胞凋亡情况;Q-PCR 检测细胞中核糖体蛋白基因的差异表达。结果 与转染阴性对照质粒的细胞相比,转染 shWDR12 的细胞检测结果显示成功降低了 GC-1 细胞中 WDR12 的表达($P < 0.01$);WDR12 敲低的 GC-1 细胞增殖被抑制;TUNEL 染色结果显示 WDR12 敲低后凋亡细胞数量增多;转染 shWDR12 后细胞内核糖体相关蛋白基因[核糖体蛋白 S3(RPS3) ($P < 0.05$)、核糖体蛋白 L11(RPL11) ($P < 0.01$)、核糖体蛋白 S15(RPS15) ($P < 0.05$) 以及核糖体蛋白 L31(RPL31) ($P > 0.05$)]的表达量下降。结论 转染

shWDR12 能有效敲低 GC-1 细胞中 WDR12 的表达,WDR12 表达的降低导致 GC-1 细胞出现增殖能力下降、凋亡数量增多及核糖体相关蛋白基因表达下调。

关键词 WDR12;小鼠精原细胞 GC-1;增殖;凋亡;核糖体
中图分类号 R 321.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1875-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.006

据报道^[1],全球约 15% 的夫妇患有不孕不育,其中男性因素约占 30%~55%。精子发生是一系列基因参与的复杂生物学过程^[2]。该课题组前期研究表明,WDR12 基因突变与 1 例近亲婚配家系锥形头部畸形精子症的男性患者有关。WDR12 是 WD 重复蛋白家族的成员,内源性 WDR12 在细胞的多个生物学过程中发挥作用,例如细胞分裂和增殖、细胞周期调控和核糖体生物发生^[3]。核糖体是细胞内合成蛋白质的重要细胞器,目前,已经有研究^[4]报道核糖体在精子发生过程中发挥重要作用。该研究利用 shWDR12 敲低小鼠精原细胞 GC-1 中 WDR12 的表达,观察 WDR12 对精原细胞增殖、凋亡及核糖体相关蛋白基因表达的影响。

2021-09-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82101685);安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划(编号:2020xkjT014)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:郭兰,女,硕士研究生;

华娟,女,校聘副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

hjhuaJuan@163.com

The antibacterial effect of photodynamic therapy on the biofilm of *P. gingivalis* and *T. forsythia*

Chen Chen^{1,2}, He Jiakai^{1,2}

(¹Stomatological College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Laboratory of Anhui Oral Disease Research Center, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the antibacterial effect of a new photosensitizer NHS-BODIPY-Br on the biofilm of *P. gingivalis* and *T. forsythia* *in vitro*. **Methods** The biocompatibility of photosensitizer NHS-BODIPY-Br was detected by CCK8. *P. gingivalis* and *T. forsythia* were cultured in anaerobic condition (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂) for 48 h to form a biofilm and then treated with antibacterial photodynamic therapy. The photosensitizer concentration was 5, 10, 15 mg/L and the laser intensity was 15 and 30 J/cm². After treatment, bacterial activity, residual LPS and laser confocal analysis were performed to determine the optimal treatment combination. **Results** The reduction rate of bacterial biofilm was about 98% when the concentration of NHS-BODIPY-Br was 10 mg/L and the laser intensity was 15 J/cm². **Conclusion** This study shows that the NHS-BODIPY-Br-mediated photodynamic therapy can effectively inhibit the biofilm of *P. gingivalis* and *T. forsythia*.

Key words antimicrobial photodynamic therapy; peri-implantitis; biofilm; lipopolysaccharide