

HMGN2 在牙周炎菌斑生物膜形成中的作用*

骆 洋, 李 倩, 樊亚平, 陈 娇, 张 平, 冯 云[△]

口腔疾病研究国家重点实验室(四川大学), 四川大学华西口腔医学院(成都 610041)

【摘要】 目的 研究牙周炎患者唾液高迁移率非组蛋白 N2(HMGN2)含量与牙周炎相关性以及其在牙菌斑生物膜形成中的作用。**方法** 纳入 100 例参与者,分为健康组、轻度牙周炎组、中度牙周炎组和重度牙周炎组,每组 25 例,采用酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测各组唾液中 HMGN2 的质量浓度。重组人 HMGN2 蛋白提纯和鉴定后,K-B 法检测重组人 HMGN2 对牙周炎主要致病菌牙龈卟啉单胞菌的抑菌作用,结晶紫染色法检测重组人 HMGN2 对牙龈卟啉单胞菌生物膜形成的影响。**结果** 与健康组相比,牙周炎患者(尤其是重度牙周炎患者)唾液中 HMGN2 升高($P<0.01$),HMGN2 质量浓度与患者牙菌斑指数呈负相关($r=-0.363, P<0.05$)。重组人 HMGN2 能有效抑制牙周致病菌生长和菌斑生物膜形成($P<0.05$)。**结论** HMGN2 参与了牙周炎菌斑生物膜的形成,在牙周炎发病过程中发挥重要作用。

【关键词】 牙周炎 高迁移率非组蛋白 N2 唾液 牙龈卟啉单胞菌

The Role of HMGN2 in the Development of Periodontitis Dental Plaque LUO Yang, LI Qian, FAN Ya-ping, CHEN Jiao, ZHANG Ping, FENG Yun[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: 953463551@qq.com

【Abstract】 Objective To determine the role of high mobility group chromosomal protein N2 (HMGN2) in the development of periodontitis plaque biofilm. **Methods** Saliva samples were collected before clinical interventions in patients with periodontitis (25 Mild periodontitis, 25 Moderate periodontitis and 25 Severe periodontitis) and healthy controls ($n=25$). Following an estimation of dental plaque index, the level of HMGN2 in saliva was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The recombinant human HMGN2 protein was purified and tested, its inhibitive effects on *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) growth and formation of *P. g* biofilm were detected by K-B antibacterial annulus and crystal violet staining, respectively. **Results** The healthy controls had lower levels of HMGN2 in saliva than those with periodontitis, especially those with severe periodontitis ($P<0.01$). The level of HMGN2 was negatively correlated with dental plaque index ($r=-0.363, P<0.05$). HMGN2 inhibited the development of main periodontal bacteria biofilm ($P<0.05$). **Conclusion** HMGN2 is involved in the development of periodontitis plaque biofilm and plays an important role in the development of periodontitis.

【Key words】 Periodontitis High mobility group chromosomal protein N2 Salivary *Porphyromonas gingivalis*

近年来唾液用于牙周炎的评估与牙周炎的诊断受到广泛关注,唾液在维护口腔健康和微生态平衡的同时也是口腔健康临床健康相关信息的重要来源,因为它包含针对牙周炎的特异性的生物标志物,并且它们的变化对疾病的预测、诊断有重要意义^[1-3]。因此分析在牙周炎患者唾液中蛋白的变化对牙周炎的治疗和诊断均有帮助。高迁移率非组蛋白(high mobility group chromosomal protein, HMG)是脊椎动物和非脊椎动物的细胞核中含量最

为丰富的非组蛋白,分为 HMGN、HMGB 和 HMGA^[4],HMGN2 是 HMGN 家族分子之一^[5],早期有研究认为 HMGN2 与 DNA 复制和转录活性有关^[5],新进研究发现 HMGN2 是一个免疫活性分子,在免疫反应中发挥重要作用^[6],并且 HMGN2 可能作为具有抗菌活性的多肽参与免疫炎症反应。本研究主要从 HMGN2 的抗菌活性上探测其对牙龈卟啉单胞菌生物膜形成的影响,从而探讨其对慢性牙周炎的影响。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和主要试剂

牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277(由本实验室保

* 国家自然科学基金(No. 81372892)和口腔疾病国家重点实验室自主研究课题 SKLOD201601(No. 2040305193001)资助

[△] 通信作者, E-mail: 953463551@qq.com

存),致病性大肠杆菌 54080、牛心脑浸液培养基 BHI(OXOID 公司,英国),琼脂糖、溶菌酶、胰蛋白酶、酵母提取物、LB 培养基(Sigma 公司),IPTG(华美公司),GST 融合蛋白纯化试剂盒(Genscript 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),结晶紫、HMGN2 抗体、单组分 TMB 显色液(湖州英创生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组和样本的收集 该研究的参与者 100 例,由四川大学华西口腔医院牙周科筛选,均取得患者知情同意。患者年龄段为 18~55 岁,无全身系统性疾病且近 6 个月未接受过牙周治疗,未全身使用抗生素、可刺激机体免疫系统的细胞因子及激素类药物。根据牙龈指数(gingival index, GI)、牙周袋(periodontal pocket, PD)深度、结缔组织附着丧失(clinical attachment loss, CAL)和牙槽骨吸收程度将参与者分为健康组、轻度牙周炎组、中度牙周炎组和重度牙周炎组,每组各 25 例。各组分标准:①健康组:GI=0,PD≤3 mm,CAL≤1 mm;②轻度牙周炎组:GI>0,3 mm<PD≤4 mm,1 mm<CAL≤2 mm;③中度牙周炎组:GI>0,4<PD≤6 mm,2 mm<CAL≤4 mm,有轻度牙松动;④重度牙周炎组:GI>0,PD>6 mm,CAL>4 mm,牙松动Ⅱ~Ⅲ度且有多数牙的根分叉病变。收集各组患者唾液并用牙周探针记录患者全口牙齿(第三磨牙除外)的 PD、CAL、探针出血(bleeding on probing, BOP),将唾液收集管中置冰上,12 000 r/min,4 ℃离心 20 min 后收集上清-80 ℃储存待用。

1.2.2 牙菌斑指数(dental plaque index, PLI) 对参与研究者使用质量分数为 2%的碱性品红(牙菌斑显示剂)进行菌斑染色,方法如下:①生理盐水漱口;②对患者牙面用蘸有牙菌斑显示剂的棉签进行染色 1 min;③生理盐水漱口后记录患者牙面牙菌斑指数。

采用 Quigley-Hein 菌斑指数记分,记分标准如下:0=牙面无菌斑;1=近龈缘处牙面有散在点状斑点分布;2=牙颈部菌斑宽度不超过 1 mm;3=牙颈部菌斑宽度超过 2 mm,菌斑覆盖面积≤ $\frac{1}{3}$ 牙面面积;4= $\frac{1}{3}$ <牙面菌斑覆盖面积≤ $\frac{2}{3}$;5=牙面菌斑覆盖面积> $\frac{2}{3}$ 。根据上述标准对患者每颗牙(除第三磨牙)牙面进行记分,所有牙面记分之总和除以受检牙面数即为该患者最终分值,分值越大说明该患者牙菌斑越多。

1.2.3 酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immune sorbent, ELISA)检测唾液中 HMGN2 的质量浓度 将唾液和标准品(按浓度梯度稀释)包被于 96 孔板,4 ℃过夜,第二日用 PBS 洗涤 3 次,加封闭液(质量分数为 2%的 BSA+质量分数为 5%的蔗糖+质量分数为 0.05%的叠氮钠)37 ℃孵育 1 h,加 HMGN2 抗体(兔抗,工作浓度 1:500)37 ℃孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,加二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体,工作浓度为 1:1 000)37 ℃孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,TMB 避光 37 ℃反应 20 min,终止液(2 mol/L 硫酸)终止反应,562 nm 测光密度(optical density, OD)值。根据标准品所测出的 OD 值和浓度,可换算出所测样本中 HMGN2 的质量浓度^[6]。

1.2.4 HMGN2 的提纯和鉴定

1.2.4.1 提纯 将含有重组质粒 PET-32a-c(+)-HMGN2(本课题组构建)的大肠杆菌接种于 LB 培养基中,加氨苄青霉素 25 μg/mL,200 r/min,37 ℃摇菌过夜。次日加菌液 5 mL 和氨苄青霉素于 500 mL 培养基中,200 r/min,37 ℃摇 6 h,加 IPTG (0.1 mmol/L)摇菌过夜,将菌液 12 000 r/min,4 ℃离心 5 min,细菌裂解液重悬浮细菌后超声破菌,12 000 r/min,4 ℃离心 20 min 收集上清为带标签的 HMGN2 蛋白,再用 GST 融合蛋白纯化试剂盒进行 HMGN2 蛋白的酶切纯化。

1.2.4.2 Western blot 鉴定 收集纯化后的 HMGN2 蛋白进行蛋白印记检测。蛋白浓度测定按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行,计算出相应蛋白浓度后,经 SDS-PAGE 电泳,半干转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 1 h,PBS 洗 3 次,加 HMGN2 多克隆抗体(工作浓度 1:1 000),加入质量分数为 5%的 BSA 2 h,PBS 洗 3 次,加抗兔 IgG-HRP (工作浓度为 1:2 000)1 h,PBS 洗 3 次,加 ECL+plus 试剂盒中 A 液与 B 液以体积比 40:1 混匀液体,室温避光孵育 5 min 后拍照。该实验重复 3 次。

1.2.5 细菌培养和鉴定 将牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 从-80 ℃复苏,接种于 BHI 固体血琼脂平板上,37 ℃厌氧培养〔体积分数为 80%(N₂),10%(H₂),10%(CO₂)〕48 h 后挑取单菌落于 BHI 液体培养基 37 ℃厌氧培养 48 h 后鉴定菌株。确定为纯培养后挑取单个菌落于 BHI 液体培养基中,37 ℃厌氧培养 48 h 用于细菌的扩增,用麦氏比浊仪(Phoenix Spec Nephelometer, BD 公司)调节细菌密度至 1×10⁷ CFU/mL 备用。

1.2.6 K-B 法测试 HMGN2 对牙龈卟啉单胞菌的

抑制作用 按照 K-B 法进行,分 3 组(对照组,溶菌酶组, HMGN2 组),采用直接调制菌悬液制备接种牙龈卟啉单胞菌于固体 BHI 血琼脂培养基上,对照组加重组人 PBS 10 μ L,溶菌酶组加溶菌酶 10 μ L, HMGN2 组加 HMGN2(60 ng/mL) 10 μ L,厌氧培养 48 h 后观察并测量抑菌环直径。

1.2.7 结晶紫染色法检测牙龈卟啉单胞菌生物膜形成 96 孔板提前用牙周炎患者唾液(200 μ L)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后加入菌液,空白对照组(control)为牙龈卟啉单胞菌菌悬液(每孔 200 μ L),阳性对照组(chlorhexidine)含质量分数为 0.05%的洗必泰的菌悬液(每孔200 μ L),实验组(HMGN2)含 60 ng/mL 重组人 HMGN2 的菌悬液(每孔 200 μ L),37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h 后用 PBS 洗 3 次,体积分数为 99%的甲醇固定 15 min,干燥 10 min,加入质量分数为 0.1%的结晶紫 200 μ L 孵育 5 min,流水冲去多余的染料干燥 15 min,加入体积分数为 95%的乙醇 200 μ L置摇床上摇 30 min,测 OD 值,以 OD 值反映生物膜的相对形成量。

1.2.8 统计学方法 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较使用 Graphpad prism 软件进行单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,采用 Spearman 相关进行相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组唾液中 HMGN2 的表达及其与 PLI 的相关性

结果见图 1。对健康组和 3 个牙周炎组 HMGN2 的质量浓度进行单因素方差分析,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。轻度和中度牙周炎患者唾液中 HMGN2 的质量浓度与健康组相比有所升高,但差异无统计学意义;重度牙周炎患者唾液中 HMGN2 的质量浓度与健康组相比则升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。牙周炎唾液中 HMGN2 的质量浓度与相应 PLI 呈负相关($r=-0.363, P=0.007$)。

2.2 重组人 HMGN2 蛋白鉴定结果

见图 2。重组人 HMGN2 可与 HMGN2 蛋白抗体结合且条带单一。

2.3 K-B 法测试重组人 HMGN2 对牙龈卟啉单胞菌的抑制作用

各组药物同牙龈卟啉单胞菌共同厌氧培养48 h 后,对照组抑菌环直径最小[(1.55 $\pm$ 0.029) cm], HMGN2 组抑菌环直径最大[(2.163 $\pm$ 0.068) cm],溶菌酶组居中[2.057 $\pm$ 0.041) cm]且和前两组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

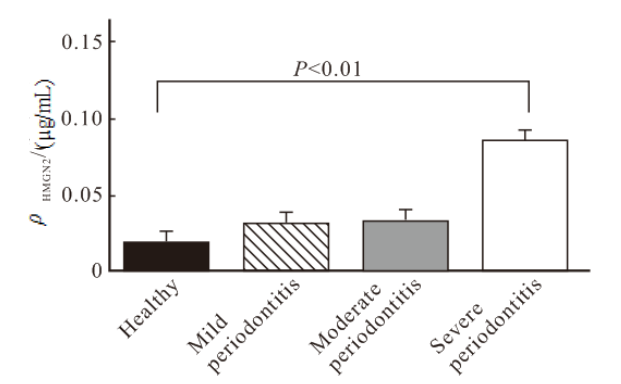


图 1 牙周炎各组与正常人唾液中 HMGN2 的表达
Fig 1 The expression of HMGN2 in saliva in patients with periodontitis and healthy controls



图 2 重组人 HMGN2 纯化后对应蛋白的鉴定
Fig 2 Identification after purification of recombinant human HMGN2

2.4 生物膜形成的检测结果

阳性对照组(OD 值 0.054 $\pm$ 0.022)和 HMGN2 组(0.451 $\pm$ 0.014)牙龈卟啉单胞菌生物膜的形成明显减少,与空白对照组(0.540 $\pm$ 0.020)比较差异有统计学意义($P<0.05$),表明重组人 HMGN2 能有效抑制牙龈卟啉单胞菌生物膜的形成。

3 讨论

慢性牙周炎是由牙菌斑微生物引起的牙周支持组织的慢性感染性疾病,并导致牙周支持组织的破坏^[7],如附着丧失、牙周袋形成和牙槽骨吸收,是引起成年人牙齿缺失的主要原因^[8]。而牙龈卟啉单胞菌又是牙周炎病变区域及活动位点最主要的优势菌,与牙周炎的发生发展有着密切的关系,被认为是证据充分的牙周炎的致病菌^[9-10],因此研究牙龈卟啉单胞菌生物膜的影响因素对牙周炎的治疗具有重要的指导意义。

牙周炎的发生发展是细菌和宿主相互作用的过程,细菌在形成生物膜的过程中不断产生炎性物质(如内毒素等),从而激活宿主免疫系统的防御功能,而 HMGN2 作为 HMG 家族成员之一,是一种具有抗菌功能的多肽、免疫效应分子^[11-12]。本研究发现牙周炎患者唾液中 HMGN2 蛋白的质量浓度比健康者高,尤其是重度牙周炎患者唾液中 HMGN2 质量浓度高于健康组,并且 HMGN2 在唾液中的含量

与相应牙菌斑指数呈负相关,即 HMGN2 越多,牙菌斑越少。根据 HMGN2 的抗菌功能,我们考虑 HMGN2 可能在牙周炎患者唾液中能有效抑制菌斑生物体的继续形成,或者对已成熟的牙菌斑生物膜有一定的破坏能力。接下来我们观察了重组人 HMGN2 对牙周主要致病菌牙龈卟啉单胞菌体外生物膜形成的影响,同时也证实了我们的猜想,重组人 HMGN2 蛋白不仅能有效抑制牙龈卟啉单胞菌,还能有效抑制牙龈卟啉单胞菌体外的菌斑生物膜。以上实验说明 HMGN2 通过参与牙周炎菌斑生物膜的形成而影响牙周炎的发生发展。

HMGN2 分子普遍存在于真核细胞中,但其含量较低,因此本实验室构建了 HMGN2 的重组表达质粒,重组表达质粒在经诱导表达重组人 HMGN2 蛋白后通过凝血酶酶切的方法去掉 GST 标签,最后得到纯度较高的纯化重组人 HMGN2 蛋白,Western blot 中的单一条带证明此方法可行。通过观察纯化后重组人 HMGN2 对牙龈卟啉单胞菌的抑制作用,说明我们提取的重组人 HMGN2 蛋白也具有抗菌功能。

牙周炎绝大多数是由驻留于龈上或者龈下的微生物引起,牙龈卟啉单胞菌已被证明与牙周炎有着密切的关系,这些微生物以菌斑的形式存在于牙面上,因为生物膜内的细菌更能有效抵抗抗生物制剂,因此牙周炎的治疗不仅要防止生物膜早期的形成,还要破坏已成熟的生物膜。目前菌斑控制、洁治、刮治和根面平整术是牙周炎治疗的基本方法^[13],但是在那些器械难以达到的部位(如根分叉病变、窄而深的牙周袋、牙周袋病变上皮等)常常在这一系列治疗后仍可残留一些菌斑生物膜,因此结合抗菌药物作为辅助治疗可以巩固疗效,更有效地控制龈下的微生物。在本实验中重组人 HMGN2 能有效抑制牙周炎主要致病菌牙龈卟啉单胞菌的菌斑生物膜,表明 HMGN2 具有治疗牙周炎的潜力,但仍需进一步的体内试验证明。

牙周炎是一个多微生物协同作用引起的感染性疾病,本研究只观察了 HMGN2 对牙龈卟啉单胞菌的作用,其是否对牙周其他细菌(如具核梭杆菌、中间普氏菌等)也有抑制作用,是否对牙周细菌复合生物膜有抑制作用都有待进一步研究。对 HMGN2 在抑制牙龈卟啉单胞菌的详细机制我们还未完全掌

握,后续还会继续重点研究。

参 考 文 献

- [1] KAUFMAN E, LAMSTER IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis—a review. *J Clin Periodontol*, 2000, 27(7):453-465.
- [2] MILLER CS, KING CP, Jr, LANGUB MC, *et al*. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc*, 2006, 137(3):322-329.
- [3] TELES RP, LIKHARI V, SOCRANSKY SS, *et al*. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontol Res*, 2009, 44(3):411-417.
- [4] BUSTIN M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8):5237-5246.
- [5] VESTNER B, BUSTIN M, GRUSS C. Stimulation of replication efficiency of a chromatin template by chromosomal protein HMG-17. *J Biol Chem*, 1998, 273(16):9409-9414.
- [6] 宋 红, 赵瑞芳, 周以钧. 牙周炎患者龈沟液和龈组织中 IL-8 的测定. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 1994, 4(4):213-215.
- [7] VARGHESE SS, THOMAS H, JAYAKUMAR ND, *et al*. Estimation of salivary tumor necrosis factor-alpha in chronic and aggressive periodontitis patients. *Contemp Clin Dent*, 2015, 6(Suppl 1):S152-S156.
- [8] DARVEAU RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(7):481-490.
- [9] DARVEAU RP, HAJISHENGALLIS G, CURTIS MA. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res*, 2012, 91(9):816-820.
- [10] XIMENEZ-FYVIE LA, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2000, 27(9):648-657.
- [11] FENG Y, HUANG N, WU Q, *et al*. Alpha-helical domain is essential for antimicrobial activity of high mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMGN2). *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(9):1087-1092.
- [12] FENG Y, HUANG N, WU Q, *et al*. HMGN2: a novel antimicrobial effector molecule of human mononuclear leukocytes? *J Leukoc Biol*, 2005, 78(5):1136-1141.
- [13] BUCHANAN SA, ROBERTSON PB. Calculus removal by scaling/root planing with and without surgical access. *J Periodontol*, 1987, 58(3):159-163.

(2015-12-11 收稿, 2016-03-14 修回)

编辑 吕 熙