

# 牙龈卟啉单胞菌在体外可破坏脐静脉内皮屏障功能:基于下调ZO-1、occludin和VE-cadherin的表达

曾 娇,李心竹,殷琳莹,陈 婷,侯 晋  
南方医科大学南方医院口腔科,广东 广州 510515

**摘要:**目的 通过体外实验探讨牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)破坏内皮屏障功能的分子机制。方法 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)体外培养形成屏障后,使用感染复数(MOI)100的*P. gingivalis*感染细胞,对照组为未感染*P. gingivalis*的HUVECs;通过跨膜电阻值(TEER),异硫氰酸荧光素(FITC)-右旋糖酐通透性实验和细菌易位实验来评估内皮屏障功能;并使用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)和Western blot实验检测*P. gingivalis*对构成内皮屏障结构的主要蛋白紧密连接蛋白1(ZO-1),occludin和VE-cadherin表达的影响。结果 HUVECs在接种培养后第5天,其跨膜电阻值趋于稳定,体外内皮屏障形成。与对照组相比,感染*P. gingivalis*后0.5 h,内皮屏障功能即会发生改变,并且随着感染时间的延长,屏障功能障碍更加显著,主要表现为:跨膜电阻值下降、40 000/70 000 FITC-Dextran通透性上升以及易位细菌的数量增加;MTT结果显示*P. gingivalis*对HUVECs的增殖能力没有影响( $P>0.05$ );除此之外,与对照组相比,HUVECs感染*P. gingivalis*后24和48 h后,qRT-PCR和Western blot结果显示被感染的HUVECs中ZO-1,occludin和VE-cadherin的mRNA和蛋白水平出现明显的下调表达( $P<0.05$ )。结论 *P. gingivalis*可以通过下调细胞间连接蛋白ZO-1、occludin和VE-cadherin的表达破坏内皮屏障,导致内皮屏障功能障碍。  
**关键词:**牙龈卟啉单胞菌;脐静脉内皮细胞;内皮屏障;细胞间连接蛋白;牙周炎

## *Porphyromonas gingivalis* infection causes umbilical vein endothelial barrier dysfunction *in vitro* by down-regulating ZO-1, occludin and VE-cadherin expression

ZENG Jiao, LI Xinzhu, YIN Linying, CHEN Ting, HOU Jin

Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To explore the molecular mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* infection-induced umbilical vein endothelial barrier dysfunction *in vitro*. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured *in vitro*, and after the formation of the endothelial barrier, the cells were infected with *P. gingivalis* at a multiplicity of infection (MOI). The transepithelial electrical resistance (TEER) of the cell barrier was measured, and FITC-dextran trans-endothelial permeability assay and bacterial translocation assay were performed to assess the endothelial barrier function. The expression levels of cell junction proteins including ZO-1, occludin and VE-cadherin in the cells were examined by qRT-PCR and Western blotting. **Results** In freshly seeded HUVECs, TEER increased until reaching the maximum on Day 5 (94  $\Omega\text{cm}^2$ ), suggesting the formation of the endothelial barrier. *P. gingivalis* infection caused an increase of the permeability of the endothelial barrier as early as 0.5 h after bacterial inoculation, and the barrier function further exacerbated with time, as shown by significantly lowered TEER, increased permeability of FITC-dextran (40 000/70 000), and increased translocation of SYTO9-*E. coli* cross the barrier. MTT assay suggested that *P. gingivalis* infection did not significantly affect the proliferation of HUVECs ( $P>0.05$ ), but in *P. gingivalis*-infected cells, the expressions of ZO-1, occludin and VE-cadherin increased significantly at 24 and 48 h after bacterial inoculation ( $P<0.05$ ). **Conclusion** *P. gingivalis* may disrupt the endothelial barrier function by down-regulating the expressions of the cell junction proteins (ZO-1, occludin, VE-cadherin) and increasing the permeability of the endothelial barrier.  
**Keywords:** *Porphyromonas gingivalis*; umbilical vein endothelial cells; endothelial barrier; cell junction proteins; periodontitis

牙周炎是累及4种牙周组织(牙龈、牙周膜、牙槽骨和牙骨质)的炎症性、破坏性疾病,临床上除表现牙龈炎症外,还伴随着牙周袋形成、牙槽骨吸收、牙松动等症状。晚期牙周炎更是导致成年人失牙的首要原因。在导致牙周炎的多因素中,龈下菌斑中的微生物是公认的牙周炎的始动因素。*P. gingivalis*是一种革兰氏阴性

厌氧菌,是引起慢性牙周疾病的主要致病菌<sup>[1,2]</sup>,也被称为牙周炎的“keystone pathogen”<sup>[3,4]</sup>。大量的研究表明,牙周疾病与全身系统性疾病有着密切关系,其中子痫前期(PE)是不良妊娠结局的一种并发症,有研究表明*P. gingivalis*在罹患子痫前期孕妇产内的检出率可高达30%~92%,其中在蜕膜和胎盘基底部检出率最高<sup>[5-7]</sup>;*P. gingivalis*侵入脐带间质除了可以增加孕妇发生PE的风险<sup>[8]</sup>还可以促使PE的发生,因此,牙周炎被认为是促进PE发病和进展的潜在危险因素<sup>[9]</sup>,

母体与胎儿之间的内皮屏障可以使得胎儿和母体之间既能进行选择性的物质交换,还能在一定程度上阻挡存在于母体循环系统中的一些药物、病原体及其产物

收稿日期:2022-07-19

基金项目:国家自然科学基金(81971902);广州市科技计划项目(202201011059)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81971902).

作者简介:曾 娇,在读硕士研究生,E-mail: 442379115@qq.com

通信作者:侯 晋,博士,副教授,E-mail: houjin@smu.edu.cn

等有害物质进入胎儿体内,保障胎儿的正常发育。有研究报道在孕妇的胎盘中,除了能够检测到*P. gingivalis*的存在,还可以检测到具核梭杆菌、伴放线放线杆菌等多种其它龈下菌斑的定植菌<sup>[10-12]</sup>。但是这些细菌是如何突破内皮屏障进入胎盘中尚不明确。我们都知道构成内皮屏障的物质基础是内皮细胞间的细胞间连接,主要包括紧密连接(TJ)和黏附连接(AJ),其中主要蛋白有连接黏附分子(JAMs), Claudin, Occludin, ZO-1, VE-cadherin和 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)等<sup>[13,14]</sup>。细胞间连接稳定性的破坏就有利于病原体通过旁细胞途径穿越屏障,造成病原体在深部以及远隔组织中的播散<sup>[15,16]</sup>。有研究发现*P. gingivalis*可以突破内皮屏障进入脐带间质中,但是对*P. gingivalis*是通过何种途径进入其中的尚未阐明。Yamada等<sup>[17]</sup>发现*P. gingivalis*可以通过抑制牙龈上皮细胞中E-cadherin和 $\beta$ -catenin的表达来影响牙龈上皮屏障功能。*P. gingivalis*的脂多糖(LPS)也可以抑制牙龈上皮细胞中E-cadherin的表达<sup>[18]</sup>。

以往的这些研究仅仅发现了*P. gingivalis*可以进入脐带间质或者胎盘养水中造成宫内的感染引发疾病的发生,但是对于细菌是通过何种途径何种机制来诱发疾病的发生并未阐明;我们发现文献报道*P. gingivalis*可以通过影响构成紧密连接的蛋白影响牙龈上皮屏障功能<sup>[17]</sup>,但是*P. gingivalis*是否也是通过这一途径破坏内皮屏障的却没有报道。本研究使用人脐静脉内皮细胞(HUVECs)建立的体外内皮屏障模型,观察*P. gingivalis*对内皮屏障功能的影响,并初步探讨了其发生的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(PromoCell);牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277菌株(Microbiologics),大肠杆菌(*E. coli*) Top 10菌株(本实验室保存);内皮细胞生长培养基(EGM)(Promo Cell),FITC-右旋糖酐(40 000/70 000)(广州昂飞生物科技有限公司),噻唑兰(MTT)、蛋白质定量试剂盒(BCA)(Sigma),聚偏二氟乙烯膜(PVDF)(Millipore),ZO-1兔单克隆抗体(#13663)、VE-cadherin兔单克隆抗体(#2500)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔的免疫球蛋白G(#7074)(CST),Occludin兔单克隆抗体(ab216327)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔单克隆抗体(ab181602)(Abcam),PrimeScript™ RT Master Mix, SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara), TRIzol® Reagent(Life),STYO9(Invitrogen),黑色酶标板(Corning),细胞嵌入皿(1.0  $\mu$ m孔径,聚酯膜)(广州永津生物科技有限公司),Anoxomat Mark II厌氧微需氧系统(Mark),BMG多功能酶标仪(BMG),Millicell ESR-2细胞电阻仪(Millipore),QuantStudio 5(ABI),电

泳系统(BIO-RAD)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞和细菌培养 HUVECs置于EGM中(含2% FBS)常规培养(37 °C,5% CO<sub>2</sub>)。*P. gingivalis*复苏后,挑取单克隆接种在胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)(5 mg/mL酵母提取物,0.5 mg/mL L-半胱氨酸盐酸盐,5 mg/L氯化血红素和1 mg/L维生素K3)中,并置于37 °C,厌氧培养(10% CO<sub>2</sub>,10% H<sub>2</sub>,80% N<sub>2</sub>)。*E. coli*复苏后,挑取单克隆接种于LB液体培养基,在37 °C恒温摇床上以150 r/min震荡培养过夜,待细菌达到对数生长期后使用。

1.2.2 TEER的检测 HUVECs以 $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于24孔板适配的悬挂式嵌入皿(底面积为0.3 cm<sup>2</sup>)小室中,24 h后,每天使用Millicell ESR-2细胞电阻仪按照说明检测内皮细胞的跨膜电阻值,当电阻值不再上升时,嵌入皿内加入*P. gingivalis*(MOI 100),分别在1、2、4、8、24、48 h检测内皮细胞的跨膜电阻值。

1.2.3 FITC-右旋糖酐通透性实验 HUVECs以 $1 \times 10^5$ /孔接种于24孔悬挂式培养皿的嵌入皿内,形成内皮屏障后加入*P. gingivalis*(MOI 100);分别在0.5、1、2、4、8、24和48 h将嵌入皿内培养基更换为200  $\mu$ L含40 000/70 000 FITC-右旋糖酐(1 mg/mL)的EGM(含2% FBS),培养下室中更换为800  $\mu$ L EGM(含2% FBS),置于37 °C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育30 min,分别吸取100  $\mu$ L下室培养板内的培养基至黑色酶标板中,于BMG多功能酶标仪测定荧光值(激发光:495 nm;发射光:520 nm),其中每组设置4个平行孔。

1.2.4 细菌易位实验 将*E. coli*( $2 \times 10^8$ 细菌菌落总数(CFU))与SYTO9染液(10  $\mu$ mol/L)1:1进行混合,室温避光孵育15 min进行标记,然后用0.9% NaCl漂洗两次后用EGM重悬( $5 \times 10^7$  CFU);HUVECs以 $1 \times 10^5$ /孔接种于24孔悬挂式培养皿的嵌入皿内,形成内皮屏障后加入*P. gingivalis*(MOI 100);分别在0.5、1、2、4、8、24和48 h将嵌入皿内培养基更换为200  $\mu$ L含SYTO9-*E. coli*的EGM(不含血清及生长因子),培养板中更换为800  $\mu$ L EGM(含2% FBS及生长因子),置于37 °C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育4 h,分别吸取100  $\mu$ L下室培养板内的培养基至黑色酶标板中,于BMG多功能酶标仪测定荧光值(激发光:488 nm;发射光:520 nm),其中每组设置4个平行孔。

1.2.5 细胞增殖实验 HUVECs以 $1 \times 10^3$ /孔接种于96孔板,次日加入*P. gingivalis*(MOI 100),分别在第1、3、5和7 d,每孔加入20  $\mu$ L的MTT溶液(5 mg/mL),于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育4 h后,加入150  $\mu$ L二甲亚砜(DMSO),震荡15 min,在酶标仪上检测吸光值( $A_{490nm}$ )。

1.2.6 Western blot 细胞分组同qRT-PCR,分别在24和48 h提取各组总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。根据

目的蛋白分子量配置十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶并进行SDS-PAGE电泳,电转至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,转印膜置于一抗中,其中 Occludin (1:1000), ZO-1 (1:1000), VE-cadherin (1:1000), GAPDH (1:10000) 4 °C 孵育过夜; Tris-HCl 缓冲盐溶液漂洗3次,室温孵育二抗后再次漂洗3次,增强化学发光法显影。使用Image-J进行转印膜目的条带和内参条带的灰度值进行定量分析。

**1.2.7 实时定量逆转录PCR** HUVECs以 $1 \times 10^6$ /孔的浓度接种于6孔板中,24 h后,加入 *P. gingivals* (MOI 100),以未加 *P. gingivals* 的HUVECs为对照,分别在24和48 h使用TRIzol裂解细胞,提取核糖核酸(RNA),各组以RNA为模板,用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒按照说明进行逆转录反应合成互补脱氧核糖核酸,利用SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒进行荧光定量PCR(反应体系20  $\mu$ L)。PCR反应程序:95 °C预变性5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s(40个循环), 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s。以GAPDH作为内参,用相对定量( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )法计算目的基因在各样品中相对mRNA的表达水平。所用引物由北京擎科生物公司合成,引物序列: ZO-1 (Forward: AAGCCTGTGTATGCCCAAG, Reverse: AACCCACACTATCTCCTTTTCTG); Occludin (Forward: ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC, Reverse: GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT); VE-cadherin (Forward: CAGCCTTTCTACCACTTCCAG, Reverse: AAGAAC TGGCCCTTGTCAC); GAPDH (Forward: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG, Reverse: ACCACCCTGTTG

CTGTAGCCAA)。

**1.2.8 统计学分析** 实验数据均应用SPSS 25.0软件进行统计学处理。数据采用均数±标准差表示。组间采用两独立样本 *t* 检验进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *P. gingivals* 对脐静脉内皮屏障跨膜电阻的影响

TEER检测方法见图1A。将HUVECs以 $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于24孔板适配的悬挂式培养皿小室中24 h后,内皮细胞紧密贴附在小室底膜上,呈鹅卵石样紧密排列,在光学显微镜下观察细胞之间无肉眼可见的间隙,且与对照组相比,内皮细胞形态正常,两组之间未见差异。

在接种后的第3天至第4天,内皮细胞的跨膜电阻值快速上升,于接种后第5天趋于稳定,不再发生明显变化,其跨膜电阻值可达到 $94 \Omega\text{cm}^2$ (图1B),因此我们认为在接种后第5天良好的内皮屏障已形成,且趋于稳定。此时我们加入 *P. gingivals* (MOI 100),对照组为已形成屏障,但未经细菌作用的HUVECs。我们在 *P. gingivals* 作用的不同时间点(0.5、1、2、4、8、24和48 h)分别测量实验组和对照组内皮细胞的TEER。检测的结果显示,与 *P. gingivals* 共培养0.5 h,脐静脉内皮屏障的TEER即出现急剧下降,在共培养1~2 h,TEER的降幅最为明显;随后降幅趋于平缓,但仍随着作用时间的延长,继续降低;共培养24 h后,TEER降到最低点,24~48 h的TEER再无明显改变(图1B),差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

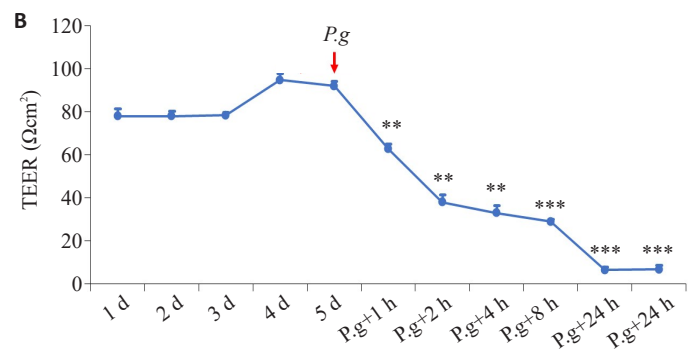
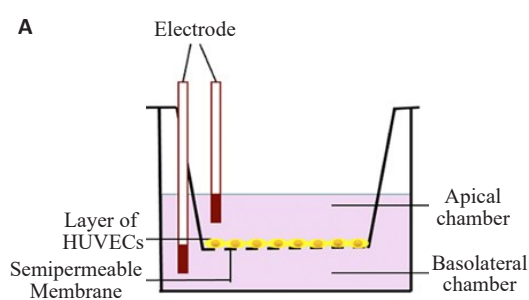


图1 内皮屏障跨膜电阻值的检测

Fig.1 Detection of transendothelial electrical resistance (TEER) of the endothelial barrier. **A:** Illustration of the device for measurement of TEER of the endothelial barrier. **B:** Changes in TEER of HUVECs after seeding and inoculation of *P. gingivals* (MOI of 100). The experiment was performed in triplicates and repeated for 3 times. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 5 d.

### 2.2 *P. gingivals* 对脐静脉内皮屏障通透性的影响

FITC标记的葡聚糖是以天然葡聚糖B512F限制水解和分级纯化制备的不同分子量葡聚糖为底物,经荧光素标记所得的合成探针(图2A)。

使用同样的方法在24孔板适配的悬挂式培养皿中形成内皮屏障。接种HUVECs 5 d后,加入 *P. gingivals* (MOI 100),对照组为已形成屏障,但未经细菌作用的HUVECs。我们在 *P. gingivals* 作用的不同时间点(0.5、



1、2、4、8、24和48 h)分别加入40 000/70 000 FITC-Dextran和SYTO9标记的*E. coli*,检测下室液体中的荧光强度。加入40 000/70 000 FITC-Dextran后的检测的结果显示,*P. gingivalis*作用0.5 h,屏障的通透性即会发生显著改变,并且*P. gingivalis*对内皮屏障通透性的影响随着作用时间的延长而增加(图2B、C)且与对照组相比,

其组间差异性均具有统计学意义( $P<0.05$ )。除此之外,*P. gingivalis*作用0.5 h,即有*E. coli*可穿越细胞屏障进入嵌入皿培养系统的下室,并且随着*P. gingivalis*作用时间的延长,穿越屏障的*E. coli*的数量也随之增加(图2D、E)。实验组与对照组之间的差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。

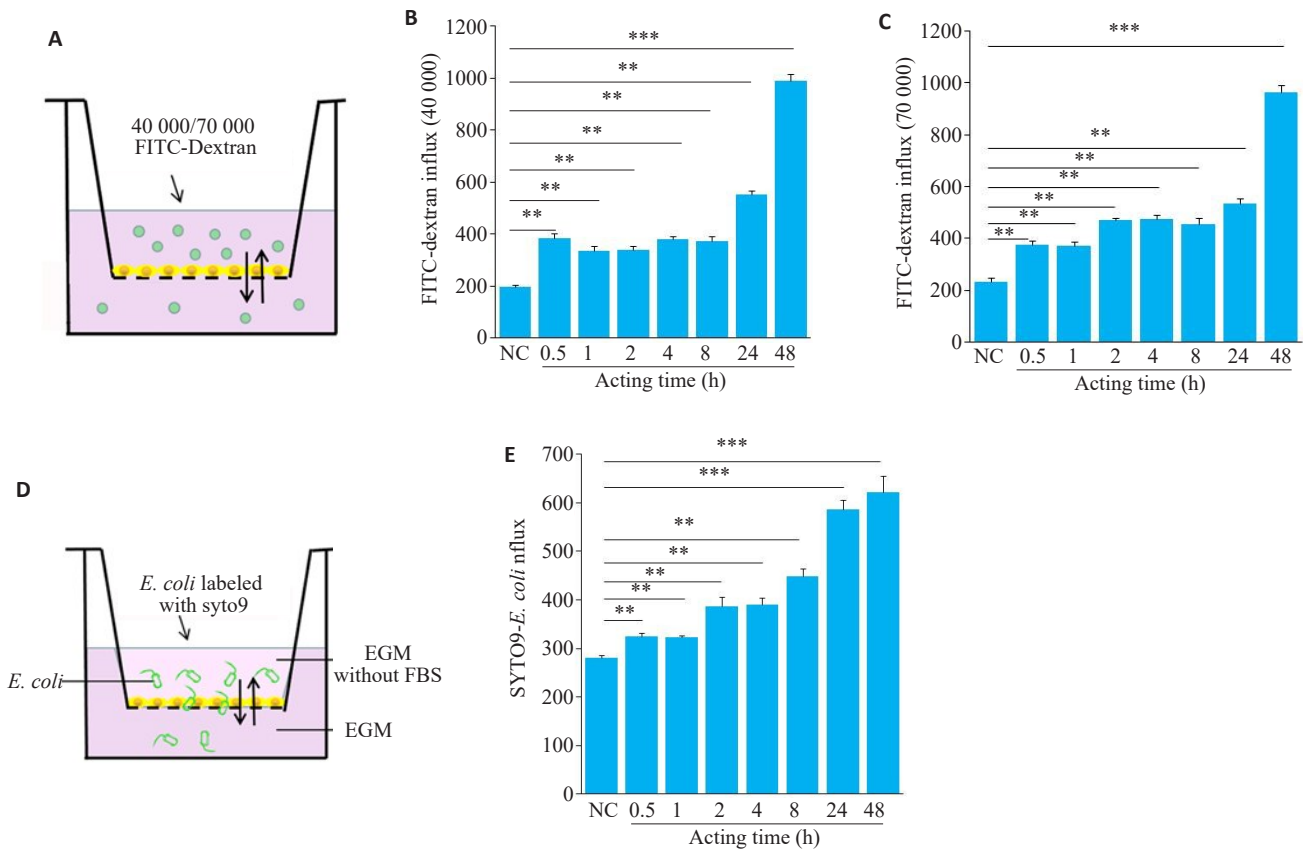


图2 内皮屏障功能实验(FITC-右旋糖酐通透实验和细菌易位实验)

Fig.2 FITC-dextran trans-endothelial permeability assay and bacterial translocation assay for assessing endothelial barrier function. A: Schematic diagram of the device for FITC-dextran trans-endothelial permeability assay. B, C: Changes in permeability of the endothelial barrier to 40 000 and 70 000 FITC-dextran after *P. gingivalis* (MOI 100) inoculation in HUVECs. D: Schematic diagram of the device for SYTO9 labeled *E. coli* translocation experiment. E: Changes in permeability of the endothelial barrier to *E. coli* after *P. gingivalis* (MOI 100) inoculation in HUVECs. The experiment was performed in triplicates and repeated for 3 times. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs NC group.

### 2.3 MTT比色法检测牙龈卟啉单胞菌对脐静脉内皮细胞增殖活性的影响

为了检测*P. gingivalis*显著增加内皮屏障的通透性是否是因为*P. gingivalis*感染而导致细胞死亡的结果。我们采用MTT法分别在感染*P. gingivalis*(MOI 100)1、3、5和7 d检测HUVECs的增殖活性,并用未感染的HUVECs做为对照。MTT结果显示:与对照组相比,*P. gingivalis*(MOI 100)感染并未对HUVECs的增殖活性产生明显影响(图3, $P>0.05$ )。

### 2.4 *P. gingivalis*对HUVECs间连接相关蛋白的影响

Western blot检测*P. gingivalis*(MOI 100)感染后24

和48 h, HUVECs中构成TJ和AJ的主要蛋白ZO-1、Occludin和VE-cadherin的表达变化,并使用Image-J对Western blot结果进行了定量分析。Western blot结果显示:一方面,构成TJ的主要蛋白ZO-1和Occludin的表达在*P. gingivalis*感染后24和48 h均出现明显下调,并且ZO-1的下调更为显著。ZO-1和Occludin在*P. gingivalis*感染组与对照组之间的表达差异具有统计学意义( $P<0.01$ );另一方面,*P. gingivalis*感染对构成AJ的主要蛋白VE-cadherin的表达也呈现下降的趋势( $P<0.01$ ,图4A、B)。为了确定*P. gingivalis*下调ZO-1、Occludin和VE-cadherin蛋白水平是通过分泌蛋白酶降解,还

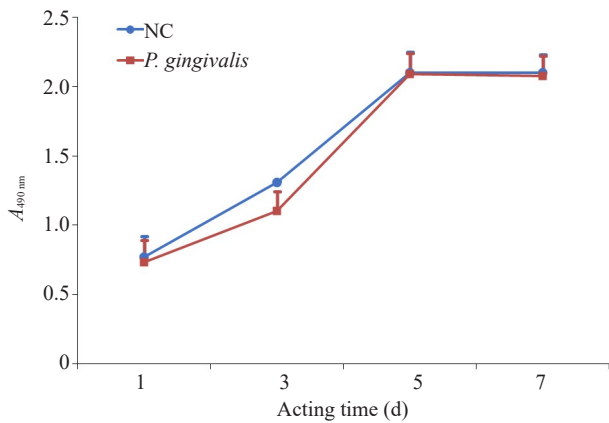


图3 牙龈卟啉单胞菌对HUVECs增殖能力的影响  
Fig.3 Effect of *P. gingivalis* infection on proliferation of cultured HUVECs. The experiment was performed in triplicates and repeated for 3 times.  $P>0.05$  vs NC group.

是在基因水平调控其表达? 我们使用qRT-PCR检测了 *P. gingivalis* 感染后,这3个基因转录水平的变化。结果显示:与对照组相比,*P. gingivalis* 感染后24和48 h,这3个基因的转录水平均出现了明显的下调,其差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图4C)。

### 3 讨论

在正常怀孕过程中,孕妇的免疫系统必须维持一个良好的平衡,一旦这个平衡被打破,就会出现紊乱,造成包括PE和早产等在内的不良妊娠结局<sup>[19,20]</sup>。PE一旦发展为子痫,即可引起抽搐发作或昏迷,除终止妊娠外,无有效治疗方法。*P. gingivalis*是第一个在先兆性早产患者的羊水中被检出的口腔微生物<sup>[9]</sup>,早在2007年,Leon

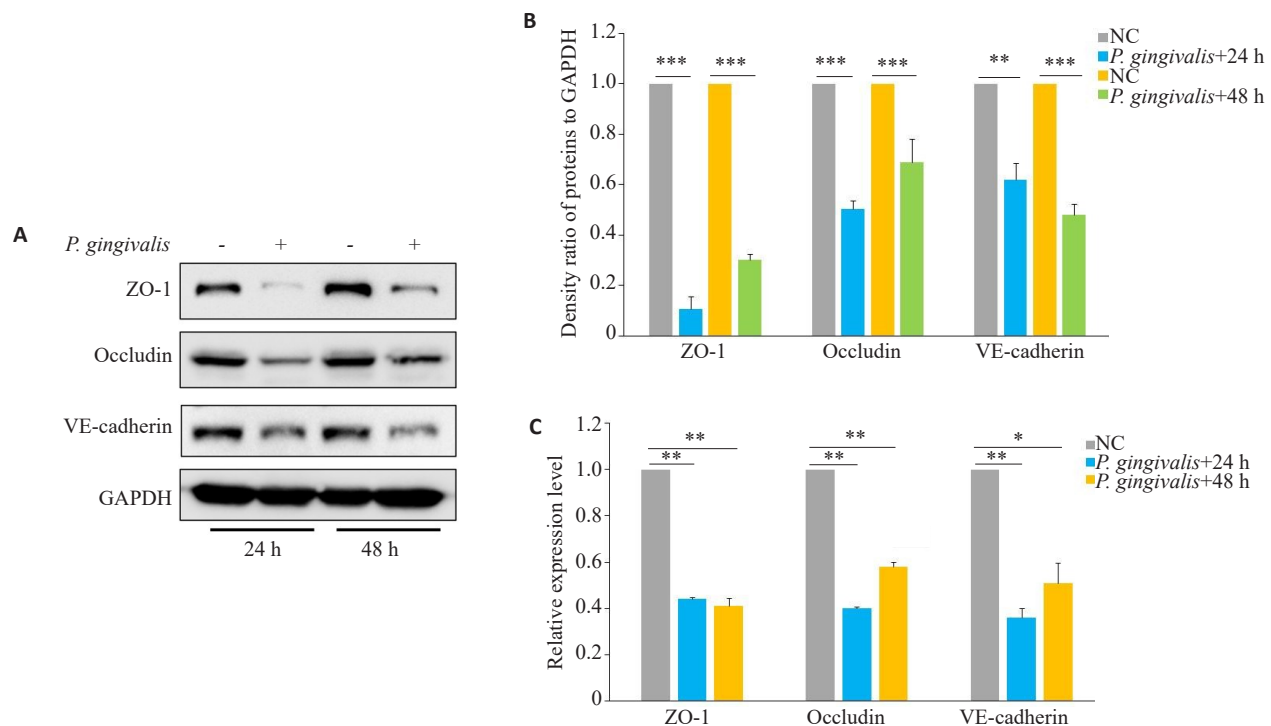


图4 牙龈卟啉单胞菌感染对HUVECs细胞间连接蛋白表达的影响  
Fig.4 Effect of *P. gingivalis* infection on expression of junction proteins in HUVECs. A: Western blotting for detection the expression of ZO-1, occludin and VE-cadherin in HUVECs at 24 and 48 after *P. gingivalis* infection. B: Semi-quantitative analysis of the blots. C: qRT-PCR for detection of the expression of ZO-1, occludin and VE-cadherin in *P. gingivalis*-infected HUVECs. The experiment was performed in triplicates and repeated for 3 times. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs NC group.

等收集罹患牙周炎孕妇的羊水和龈下菌斑,发现 *P. gingivalis* 可以同时羊水和龈下菌斑中被检测出来<sup>[21]</sup>。*P. gingivalis*还可以激活辅助性T细胞17(Th17)并增加相关细胞因子(白细胞介素17(IL-17),白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等)的表达,而IL17则会影影响螺旋动脉的重构,促进先兆子痫和早产的发生<sup>[22,23]</sup>。体外模型显示,大鼠在妊娠第5天,通过结扎

下颌第一磨牙牙颈部,并每天口服 *P. gingivalis*后,孕鼠出现了高血压、蛋白尿,并且胎鼠的体质量明显降低<sup>[8]</sup>。以上研究结果提示,来自于口腔的 *P. gingivalis*可通过循环系统易位到胎盘、脐带以及羊膜腔,其引起的宫内感染可能会促进PE的发生。

血管内皮细胞是循环血液成分与血管壁细胞和周围血管外组织相互作用的第一界面。它主要功能是提

供一种半透屏障,以控制营养物质和代谢废物的交换,同时防止病原体或循环中的有害物质进入组织。血管内皮的屏障功能依赖于内皮结构的完整性,一旦内皮屏障功能发生障碍,细胞间连接发生破坏可使循环血液中原本不能通过内皮屏障的大分子、病原体等通过旁细胞途径进入周围组织。在本实验中,我们以体外培养的HUVECs所形成的内皮屏障为研究模型,通过不同的实验探讨了*P. gingivalis*感染对脐静脉内皮屏障通透性的影响。研究结果显示,*P. gingivalis*在较短的时间内就可使内皮屏障的TEER发生明显下降。该结果说明,在*P. gingivalis*的作用下,内皮屏障的通透性可能发生了改变。除此之外,我们还发现*P. gingivalis*在较短的时间(0.5 h)内就可引起内皮屏障通透性的显著增加,表现在嵌入皿小室的下腔室中,40 000/70 000的FITC-Dextran和*E. coli*的量显著增加,且随着作用时间的延长而增加。该结果说明,*P. gingivalis*可破坏内皮屏障,使屏障对大分子物质的通透性增加。有研究表明将龈下菌斑通过静脉注射至孕鼠体内,胎盘中可检出多种口腔细菌<sup>[23,24]</sup>,并且口腔细菌可造成胎盘、羊膜腔的混合感染。这些研究结果和我们的实验结果提示,在妊娠期,由口腔微生物入血所导致的菌血症过程中,牙龈卟啉单胞菌可能作为始动者,为其他口腔细菌打开内皮屏障“大门”,促进羊膜腔内的混合感染,从而可能导致包括PE在内的不良妊娠结局的发生。

有研究表明,*P. gingivalis*可以抑制内皮细胞的增殖,促进其发生凋亡破坏内皮功能<sup>[25]</sup>。但是在我们的实验中发现*P. gingivalis*并不影响HUVECs的增殖活性。细胞间连接是构成内皮屏障的结构基础,有文献证实了*P. gingivalis*可以通过影响构成紧密连接的蛋白影响上皮屏障功能。*P. gingivalis*除了可以通过水解影响连接蛋白Occludin、E-cadherin和跨膜蛋白 $\beta$ 1-integrin以外<sup>[26-28]</sup>,用*P. gingivalis*感染口腔角质细胞HOK-16,发现*P. gingivalis*可以抑制HOK-16在层粘连蛋白(Laminin-5)上的黏附和伸展,抑制构成细胞间连接的蛋白:Catenins、paxillin、连环蛋白p120以及 $\alpha$ 3 integrin和 $\beta$ 4 integrin的表达<sup>[29]</sup>。不仅如此,*P. gingivalis*可以通过LPS来抑制牙龈上皮细胞中E-cadherin的表达,从而削弱上皮屏障的功能<sup>[18,30]</sup>。在众多的细胞间连接蛋白中,Occludin、ZO-1和VE-cadherin在维持内皮屏障的稳态中发挥着重要的作用。我们的研究发现,*P. gingivalis*感染可以在转录和蛋白水平显著下调ZO-1、Occludin和VE-cadherin的表达,影响了脐静脉内皮细胞间的TJ和AJ稳定性,从而导致内皮屏障通透性增加。也正是因为内皮屏障的破坏,可能导致母体循环中的*P. gingivalis*及其产物可以通过循环系统易位到胎盘、脐带甚至羊膜腔中,引起宫内感染从而促使PE的发生。

综上所述,本研究初步证实了牙周炎的主要致病菌*P. gingivalis*可通过下调细胞间连接蛋白ZO-1、Occludin和VE-cadherin的表达来影响内皮屏障功能,使得内皮屏障破坏,通透性增加;但*P. gingivalis*调控细胞间连接相关蛋白表达的具体分子途径仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Huck O, Mulhall H, Rubin G, et al. Akkermansia muciniphila reduces Porphyromonas gingivalis-induced inflammation and periodontal bone destruction[J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(2): 202-12.
- [2] He ZY, Zhang X, Song ZC, et al. Quercetin inhibits virulence properties of Porphyromonas gingivalis in periodontal disease[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 18313.
- [3] Hajishengallis G, Hajishengallis E, Kajikawa T, et al. Complement inhibition in pre-clinical models of periodontitis and prospects for clinical application [J]. Semin Immunol, 2016, 28(3): 285-91.
- [4] Lunar Silva I, Cascales E. Molecular Strategies Underlying Porphyromonas gingivalis Virulence[J]. J Mol Biol, 2021, 433(7): 166836.
- [5] Barak S, Oettinger-Barak O, Machtei EE, et al. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia[J]. J Periodontol, 2007, 78(4): 670-6.
- [6] Swati P, Ambika Devi, Thomas B, et al. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 285(3): 613-9.
- [7] Vanterpool SF, Been JV, Houben ML, et al. Porphyromonas gingivalis within placental villous mesenchyme and umbilical cord stroma is associated with adverse pregnancy outcome[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146157.
- [8] Mata K, Nobre AVV, Felix Silva PH, et al. A new mixed model of periodontitis-induced preeclampsia: a pilot study[J]. J Periodontal Res, 2021, 56(4): 726-34.
- [9] Daalderop LA, Wieland BV, Tomsin K, et al. Periodontal disease and pregnancy outcomes: overview of systematic reviews[J]. JDR Clin Trans Res, 2018, 3(1): 10-27.
- [10] Han YW, Ikegami A, Bissada NF, et al. Transmission of an uncultivated Bergeyella strain from the oral cavity to amniotic fluid in a case of preterm birth[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1475-83.
- [11] Ye C, Katagiri S, Miyasaka N, et al. The periodontopathic bacteria in placenta, saliva and subgingival plaque of threatened preterm labor and preterm low birth weight cases: a longitudinal study in Japanese pregnant women[J]. Clin Oral Investig, 2020, 24(12): 4261-70.
- [12] Figuero E, Han YW, Furuichi Y. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Mechanisms [J]. Periodontol 2000, 2020, 83(1): 175-88.
- [13] Adil MS, Narayanan SP, Somanath PR. Cell-cell junctions: structure and regulation in physiology and pathology [J]. Tissue Barriers, 2021, 9(1):1848212.
- [14] Cong X, Kong W. Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease [J]. Cell Signal, 2020, 66:109485.
- [15] Huber P. Targeting of the apical junctional complex by bacterial pathogens [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020, 1862(6):

- 183237.
- [16] Obino D, Duménil G. The many faces of bacterium-endothelium interactions during systemic infections[J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(2):69-81.
- [17] Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, et al. A bacterial metabolite ameliorates periodontal pathogen-induced gingival epithelial barrier disruption via GPR40 signaling[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9008.
- [18] Abe-Yutori M, Chikazawa T, Shibasaki K, et al. Decreased expression of E-cadherin by *Porphyromonas gingivalis*-lipopolysaccharide attenuates epithelial barrier function [J]. *J Periodontol Res*, 2017, 52(1): 42-50.
- [19] Aghaeepour N, Ganio EA, McIlwain D, et al. An immune clock of human pregnancy[J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(15): ean2946.
- [20] Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2317.
- [21] León R, Silva N, Ovalle A, et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor[J]. *J Periodontol*, 2007, 78(7): 1249-55.
- [22] Chopra A, Radhakrishnan R, Sharma M. *Porphyromonas gingivalis* and adverse pregnancy outcomes: a review on its intricate pathogenic mechanisms[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2020, 46(2): 213-36.
- [23] Pongcharoen S, Somran J, Sritippayawan S, et al. Interleukin-17 expression in the human placenta[J]. *Placenta*, 2007, 28(1): 59-63.
- [24] Fardini Y, Chung P, Dumm R, et al. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(4): 1789-96.
- [25] Xie M, Tang Q, Yu S, et al. *Porphyromonas gingivalis* disrupts vascular endothelial homeostasis in a TLR-NF- $\kappa$ B axis dependent manner[J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 28.
- [26] Takahashi N, Sulijaya B, Yamada-Hara M, et al. Gingival epithelial barrier: regulation by beneficial and harmful microbes [J]. *Tissue Barriers*, 2019, 7(3): e1651158.
- [27] Zheng S, Yu S, Fan X, et al. *Porphyromonas gingivalis* survival skills: Immune evasion[J]. *J Periodontol Res*, 2021, 56(6):1007-18.
- [28] Hočevar K, Potempa J, Turk B. Host cell-surface proteins as substrates of gingipains, the main proteases of *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Biol Chem*, 2018, 399(12):1353-61.
- [29] Hintermann E, Haake SK, Christen U, et al. Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in *Porphyromonas gingivalis*-infected oral keratinocytes: a strategy for cell adhesion and migration disabling[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(10): 5846-56.
- [30] Chen W, Alshaikh A, Kim S, et al. *Porphyromonas gingivalis* impairs oral epithelial barrier through targeting GRHL2 [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(10):1150-8.

(编辑:余诗诗)