

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.10.003

· 基础研究 ·

# 牙周炎和牙周健康状态的大鼠牙周组织中M1/M2型巨噬细胞的分布和比例

梁红玲, 陈斌, 何莎莎, 谢晓婷, 闫福华

南京大学医学院附属口腔医院, 南京市口腔医院牙周科, 江苏南京(210008)

**【摘要】** 目的 了解大鼠牙周炎和牙周健康状态时牙周组织中M1/M2型巨噬细胞的分布和比例。方法 选取雄性SD大鼠12只,随机分为慢性牙周炎组(chronic periodontitis, CP)( $n = 6$ )和牙周健康组(periodontal health, PH)( $n = 6$ ),CP组采用结扎丝结扎下颌第一磨牙构建牙周炎模型,经组织病理学检查确认牙周炎模型构建成功。用诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)标记M1型巨噬细胞,用CD163标记M2型巨噬细胞,采用免疫组织化学和免疫荧光法了解两组M1型和M2型巨噬细胞的分布,并比较两组M1/M2。结果 PH组M1型巨噬细胞计数为 $12.17 \pm 1.40$ ,CP组M1型巨噬细胞计数为 $40.00 \pm 3.20$ ,两组差异具有统计学意义( $t = 7.96, P < 0.0001$ )。PH组M2型巨噬细胞计数为 $4.50 \pm 1.09$ ,CP组M2型巨噬细胞计数为 $5.33 \pm 0.67$ ,两组差异无统计学意义( $t = 0.65, P = 0.53$ )。PH组M1/M2比值为 $3.72 \pm 1.08$ ,CP组M1/M2比值为 $8.31 \pm 1.37$ ,两组差异具有统计学意义( $t = 2.63, P = 0.025$ )。结论 牙周炎时,M1型巨噬细胞明显增多,分布更加广泛,其可能参与了牙周炎的进展,并可能与牙骨质破坏密切相关。

**【关键词】** 牙周炎; 牙周组织; 牙周炎模型; 巨噬细胞; M1型巨噬细胞; M2型巨噬细胞

**【中图分类号】** R781.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)10-0627-07

**【引用著录格式】** 梁红玲,陈斌,何莎莎,等. 牙周炎和牙周健康状态的大鼠牙周组织中M1/M2型巨噬细胞的分布和比例[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(10): 627-633.

**Distribution and proportion of M1/M2 macrophages in periodontal tissues in rats with and without periodontitis**

LIANG Hongling, CHEN Bin, HE Shasha, XIE Xiaoting, YAN Fuhua. Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: YAN Fuhua, Email: yanfh@nju.edu.cn, Tel: 0086-25-83620253

**【Abstract】 Objective** To investigate the distribution and proportion of M1/M2 macrophages in the periodontal tissues of rats with and without periodontitis. **Method** Twelve Sprague-Dawley rats were randomly divided into a chronic periodontitis group (CP,  $n = 6$ ) and a periodontal health group (PH,  $n = 6$ ). The periodontitis model was induced at the first mandibular molar using a stainless steel ligature and was confirmed by histological analysis. M1 macrophages were labeled with inducible nitric oxide synthase (iNOS), and M2 macrophages were labeled with CD163. The distributions of M1 and M2 macrophages in the two groups were determined via immunohistochemistry and immunofluorescence, and the M1/M2 ratios were compared between the two groups. **Results** The M1 type macrophage count in the PH group was  $12.17 \pm 1.40$ , and the M1 macrophage count in the CP group was  $40.00 \pm 3.20$ ; there was a statistically significant difference between the two groups ( $t = 7.96, P < 0.0001$ ). The M2 macrophage count in the PH group was  $4.50 \pm 1.09$ , and the M2 type macrophage count in the CP group was  $5.33 \pm 0.67$ . There was no statistically significant difference between the two groups ( $t = 0.65, P = 0.53$ ). The M1/M2 ratio in the CP group was  $3.72 \pm 1.08$ , and the M1/M2 ratio in the PH group was  $8.31 \pm 1.37$ ; there was a statistically significant difference between the two groups ( $t = 2.63, P =$

**【收稿日期】** 2018-06-07; **【修回日期】** 2018-07-01

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81771078);南京市医学科技发展基金项目(QRX17176)

**【作者简介】** 梁红玲,主治医师,硕士,Email: shujisjl@163.com

**【通信作者】** 闫福华,主任医师,博士,Email: yanfh@nju.edu.cn, Tel: 0086-25-83620253

0.025). **Conclusion** During periodontitis, M1 macrophages increased significantly and were widely distributed; they may be involved in the progression of periodontitis and may be closely related to the destruction of the cementum.

**【Key words】** Periodontitis; Periodontal tissue; Periodontitis model; Macrophages; M1 macrophages; M2 macrophages

牙周炎是一类以牙周组织破坏、最终导致牙齿丧失为特征的慢性炎症性疾病,是成年人失牙的主要原因,同时,牙周炎与全身健康密切相关。菌斑微生物是牙周炎的始动因素,宿主的免疫反应决定了牙周组织破坏的进程<sup>[1]</sup>。作为宿主免疫的重要组成部分,巨噬细胞具有强大的识别、吞噬、清除外来病原体及异物的功能,并可分泌多种细胞因子调节机体免疫反应,激活适应性免疫,在免疫系统中发挥重要作用。大量研究表明,巨噬细胞可能与牙周炎进展密切相关<sup>[2-3]</sup>。因此,有必要了解牙周炎时巨噬细胞在牙周组织中的分布情况。

近年来的研究表明:巨噬细胞是包含不同亚型的复杂细胞群,而且不同类型的巨噬细胞,其功能存在较大的差异<sup>[4-6]</sup>。按照表型和分泌细胞因子的不同可以分为:经典活化型巨噬细胞(M1型)和选择活化型巨噬细胞(M2型),M1型巨噬细胞可分泌促炎因子发挥促炎功能,M2型巨噬细胞则主要参与组织修复。因此,有必要进一步了解不同亚型巨噬细胞在牙周组织中的分布情况,以期为进一步研究巨噬细胞在牙周炎发生发展中的作用提供指导。

虽然人和大鼠的巨噬细胞有不同的表面标志分子,但是他们都具有类似的作用和功能<sup>[7-8]</sup>。因此,本实验采用结扎丝结扎大鼠下颌第一磨牙构建牙周炎模型,选取巨噬细胞的主要亚型:M1型和M2型巨噬细胞为观察对象,观察大鼠牙周健康状态和牙周炎时牙周组织中M1和M2型巨噬细胞的分布和比例,以期为进一步了解不同亚型巨噬细胞在牙周炎发生发展中的作用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验分组及制作组织切片

选取牙体牙列完整,无龋坏及牙周病的5周龄雄性SD大鼠12只(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司),随机分为慢性牙周炎组(chronic periodontitis, CP)和牙周健康组(periodontal health, PH),每组6只。大鼠均采用腹腔注射0.2%戊巴比

妥钠(0.3 mL/100g)麻醉,CP组用0.2 mm钢丝结扎大鼠右下颌第一磨牙牙颈部,并将结扎丝尽量放入龈沟内避免松脱;PH组钢丝结扎后立即取出结扎钢丝。

常规喂饲鼠食和饮水,每3 d观察CP组结扎丝是否松脱以及两组大鼠的全身和牙周状况。结扎28 d后处死大鼠,去除实验组结扎丝,立即将大鼠下颌骨放入4%多聚甲醛中固定48 h,随后使用18%乙二胺四乙酸脱钙10周,常规石蜡包埋,沿牙体长轴做颊舌向连续切片,切片厚度4 mm。

### 1.2 主要试剂

兔抗鼠iNOS一抗(arigo,中国台湾),兔抗鼠CD163一抗(abcam,英国),免疫组化二抗试剂(peprotech,美国),荧光二抗试剂(abcam,英国),HE染色试剂(武汉塞维尔生物科技有限公司,中国)。

### 1.3 主要仪器

切片机(上海徠卡仪器有限公司,中国),包埋机(武汉俊杰电子有限公司,中国),脱水机(武汉俊杰电子有限公司,中国),共聚焦显微镜(尼康,日本),病理切片扫描机(pannamic,匈牙利)。

### 1.4 HE染色

将大鼠下颌骨切片常规脱蜡水化,随后放入苏木精溶液中染色5 min,流水冲洗,盐酸酒精分化,流水冲洗,返蓝液返蓝,伊红染色5 min后脱水透明,中性树胶封片,显微镜下观察两组牙周组织情况,以确认CP组牙周炎模型构建是否成功。

### 1.5 免疫组织化学染色

采用iNOS标记M1型巨噬细胞,采用CD163标记M2型巨噬细胞,之后用免疫组织化学方法观察M1型巨噬细胞和M2型巨噬细胞在两组大鼠牙周组织中的分布。

将大鼠切片脱蜡水化,微波修复抗原活性,滴加3%过氧化氢,25 min消除内源性过氧化物酶的活性,滴加山羊血清封闭液30 min封闭血清,滴加第一抗体,4℃孵育过夜,PBS清洗,随后加入第二抗体常温孵育50 min,DAB显色反应5 min,苏木精复染后脱水,用中性树胶进行封片,显微镜下观察。

### 1.6 染色细胞计数和数据处理

采用人工计数染色细胞并计算 M1/M2 的比值的方法对两组大鼠巨噬细胞进行半定量分析。使用病理切片全景扫描系统扫描免疫组织化学染色切片,将普通切片转化为高质量数字切片,选取自龈乳头至牙槽嵴顶上方之间区域,对两组 M1、M2 型巨噬细胞进行人工计数并计算 M1/M2 的比值。

### 1.7 免疫组织荧光染色

采用免疫组织荧光染色方法进一步验证免疫组织化学染色的结果。将大鼠切片脱蜡水化,微波修复抗原,用组化笔在组织周围画圈防止抗体流走,在圈内滴加自发荧光淬灭剂,5 min 淬灭自发荧光,滴加山羊血清封闭液 30 min 封闭血清,滴加第一抗体,4 ℃ 过夜,PBS 清洗,加入第二抗体常温孵育 50 min,经 DAPI 染色后用抗荧光淬灭封片剂

封片,即刻使用共聚焦显微镜进行观察并且拍照。

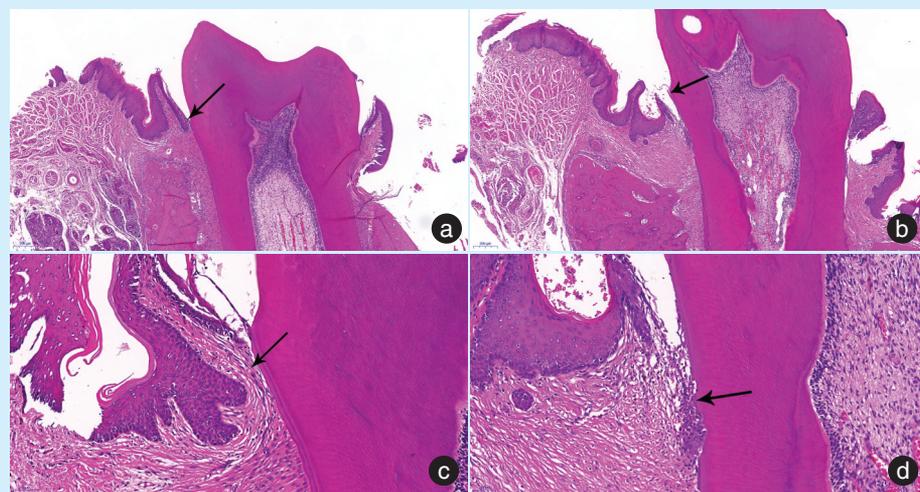
### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对两组 M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞、M1/M2 比值进行统计学分析,采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色结果

PH 组大鼠牙龈上皮结构完整,结合上皮位于釉牙骨质界附近,上皮下结缔组织内无炎症细胞浸润,牙槽骨形态结构完整,牙槽嵴高度无降低。CP 组大鼠牙龈上皮结构破坏,结合上皮明显向根方迁移增殖,纤维结缔组织显著增生,上皮下有大量炎症细胞浸润,牙槽嵴高度降低,符合牙周炎的慢性炎症性疾病的病理特征,提示 CP 组牙周炎模型构建成功(图 1)。



a: PH 组( $\times 50$ ), ←: 示釉牙骨质界; b: CP 组( $\times 50$ ), ←: 示釉牙骨质界; c: PH 组( $\times 200$ ), ←: 未见明显炎症细胞; d: CP 组( $\times 200$ ), ←: 示炎症细胞

图 1 PH 和 CP 组 HE 染色

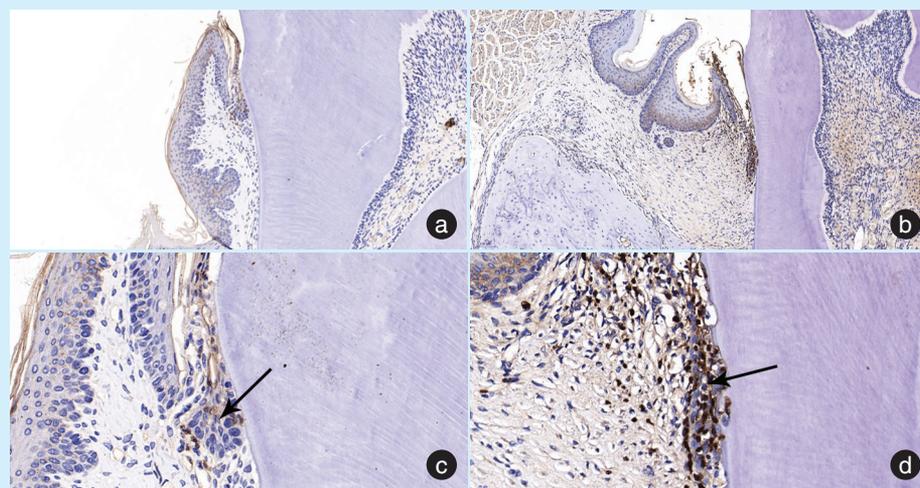
Figure 1 HE staining of PH and CP groups

### 2.2 免疫组织化学染色结果

PH 组 iNOS 阳性染色细胞(M1 型巨噬细胞)较少,范围也仅局限于上皮组织内,而 CP 组 iNOS 阳性染色细胞较 PH 组明显增多,且染色范围更广泛,深达结缔组织,尤其在牙骨质破坏区域有明显集中(图 2)。PH 组和 CP 组的 CD163 阳性染色细胞(M2 型巨噬细胞)均比较稀少(图 3)。

### 2.3 细胞计数及统计分析

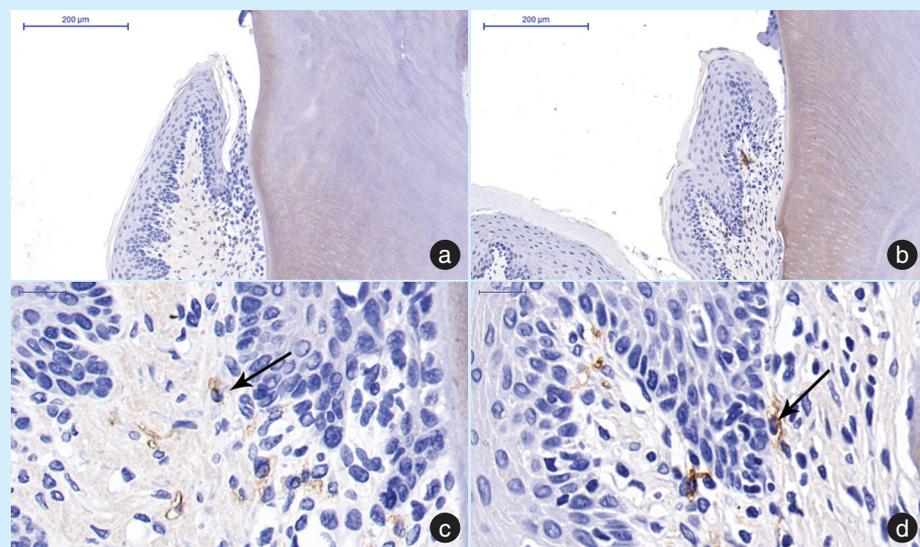
PH 组 M1 型巨噬细胞计数为  $12.17 \pm 1.40$ , CP 组 M1 型巨噬细胞计数为  $40.00 \pm 3.20$ , CP 组明显高于 PH 组,两组差异具有统计学意义( $t = 7.96$ ,  $P < 0.001$ )。PH 组 M2 型巨噬细胞计数为  $4.50 \pm 1.09$ , CP 组 M2 型巨噬细胞计数为  $5.33 \pm 0.67$ ,两组差异无统计学意义( $t = 0.65$ ,  $P = 0.53$ )。PH 组 M1/M2



a: PH组(×100); b: CP组(×100); c: PH组(×400); d: CP组(×400), ←:巨噬细胞

图2 PH和CP组M1型巨噬细胞iNOS免疫组化染色

Figure 2 Immunohistochemical staining for iNOS in M1 macrophages in the PH and CP groups



a: PH组(×100); b: CP组(×100); c: PH组(×400); d: CP组(×400); ←:巨噬细胞

图3 PH和CP组M2型巨噬细胞CD163免疫组化染色

Figure 3 Immunohistochemical staining for CD163 in M2 macrophage in the PH and CP groups

比值为  $3.72 \pm 1.08$ , CP组 M1/M2 比值为  $8.31 \pm 1.37$ , CP组明显高于PH组, 两组差异具有统计学意义 ( $t = 2.63, P = 0.025$ )。

#### 2.4 免疫荧光染色结果

与PH组相比, CP组M1型巨噬细胞在牙周组

织中的分布范围更广泛, 数量更多(图4); 而M2型巨噬细胞在两组中都很稀少(图5)。与免疫组织化学检查结果基本一致, 进一步验证了不同牙周状态下M1型和M2型巨噬细胞的分布。

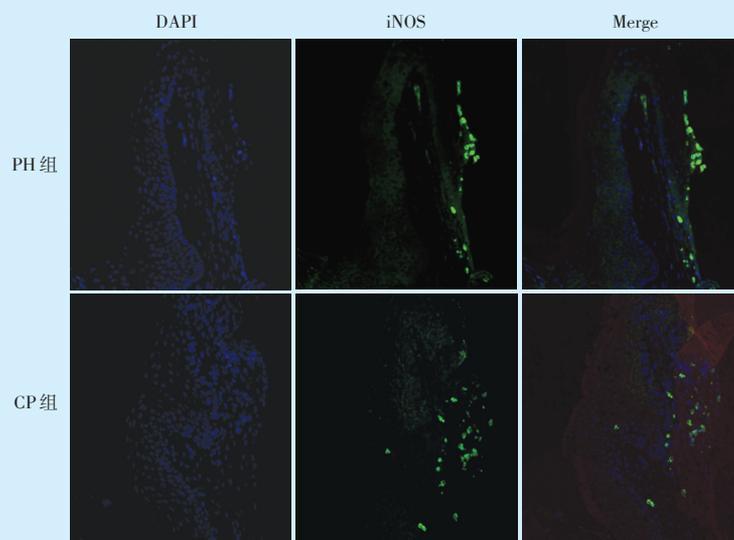


图4 PH和CP组M1型巨噬细胞iNOS免疫荧光染色 ×200

Figure 4 Immunohistochemical staining for iNOS in M1 macrophages in the PH and CP groups ×200

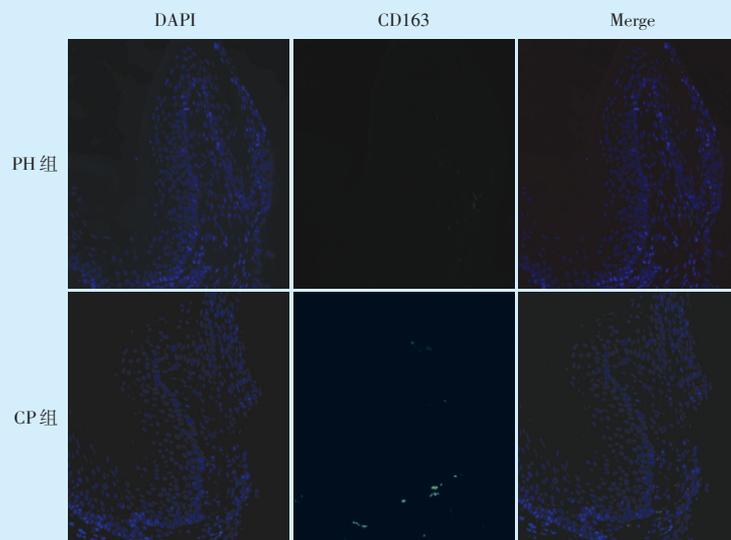


图5 PH和CP组M2型巨噬细胞CD163免疫荧光染色 ×200

Figure 5 Immunohistochemical staining for CD163 in M2 macrophages in the PH and CP groups ×200

### 3 讨论

#### 3.1 巨噬细胞与牙周炎

巨噬细胞来源于外周血中的单核细胞,在外来病原体和趋化因子的作用下,外周血单核细胞

穿透毛细血管壁进入机体组织和器官并分化为巨噬细胞。巨噬细胞具有强大的识别、吞噬、清除外来病原体及异物的功能,并可分泌多种细胞因子调节机体免疫反应,激活适应性免疫,在免疫

系统中发挥重要作用。一般分为经典活化型巨噬细胞(M1型)和替代活化型巨噬细胞(M2型)。当组织损伤或病原侵入时,巨噬细胞识别病原体,在辅助性T淋巴细胞1及局部细胞因子的作用下转化为M1型巨噬细胞,参与炎症反应,当病原体被清除后,在辅助性T淋巴细胞2及局部细胞因子的作用下分化为M2型巨噬细胞,促进组织愈合<sup>[9-10]</sup>。

大量研究表明,巨噬细胞可能参与了牙周炎的发生和发展。有研究发现,牙周炎患者牙龈组织中的巨噬细胞数量较健康个体多<sup>[11]</sup>。炎症可导致静止巨噬细胞转化为活化巨噬细胞,从而激活特异性免疫应答<sup>[12]</sup>。

另外, $\beta$ -防御素3可以通过抑制巨噬细胞的炎症因子表达从而阻止牙周炎的发展,进一步证明巨噬细胞可能参与了牙周炎的进展<sup>[2]</sup>。在Fas诱导巨噬细胞凋亡模型中,巨噬细胞被清除后成骨细胞及骨形成均减少<sup>[13]</sup>,当骨损伤时,缺少巨噬细胞会引起骨修复失败<sup>[14]</sup>,表明巨噬细胞在骨重建和骨稳态方面有重要作用。以上研究表明,巨噬细胞可能和牙周炎的进展相关。然而,以上研究没有对巨噬细胞进行更为细致的分型。

### 3.2 巨噬细胞亚型及作用

本研究结果表明,牙周炎时,牙周组织中的M1型巨噬细胞明显增多,且分布更加广泛。M1型巨噬细胞具有粘附、杀伤细菌,分泌大量促炎因子,启动获得性免疫应答的作用。在辅助性T淋巴细胞1和干扰素 $\gamma$ 、脂多糖、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的刺激下单核细胞进入组织转化形成M1型巨噬细胞,它可高度表达组织相容性复合体II、Toll样受体、CD86、集落刺激因子,并分泌白介素-1 $\beta$ 、白介素-6、白介素-12等促炎因子,吞噬病原体,招募中性粒细胞至牙周组织,导致组织炎症损伤<sup>[15]</sup>。

牙周炎是由菌斑微生物引起的慢性炎症性疾病,细菌的主要毒力因子是脂多糖,而脂多糖是M1型巨噬细胞的主要激活剂。因此,这与本研究的结果——牙周炎症组织中主要存在M1型巨噬细胞相一致。

另外,龈沟上皮是防止细菌入侵牙周组织的重要屏障。本实验中,牙周健康状态下牙周组织中M1型巨噬细胞数量较少,且主要分布在龈沟上皮处;而发生牙周炎症时,结合上皮的完整性被破坏,牙周组织中M1型巨噬细胞数量明显增多,且分布范围扩大至结缔组织。提示牙周炎症时,M1

型巨噬细胞进入牙周组织,发挥促炎,启动免疫应答以清除入侵微生物的作用。

有研究对比健康老年猕猴和牙周炎猕猴的牙龈组织中巨噬细胞的数量,发现M1型巨噬细胞的基因表达明显增高<sup>[16]</sup>。另外,Yu等<sup>[17]</sup>检测了小鼠牙周炎症组织中不同亚型巨噬细胞的分布,发现M1/M2比值与牙周组织健康有关,牙周炎明显高于牙龈健康者,与本研究结果一致。

另外,有研究表明,牙龈卟啉单孢菌导致的小鼠牙周炎骨吸收模型中M1型巨噬细胞及其分泌的炎症因子明显增多,通过皮下注射双磷酸盐-脂质体后,M1及骨吸收明显减少,提示M1型巨噬细胞与牙周炎进展密切相关<sup>[18]</sup>。

M2型巨噬细胞可以分泌抑制性细胞因子下调免疫应答,并分泌细胞外基质促进纤维变性和创伤修复,在组织愈合过程中发挥重要作用。在辅助性T淋巴细胞2和白介素4、白介素13、糖皮质激素的刺激下单核细胞进入组织转化形成M2型巨噬细胞,它可高度表达清道夫受体、CD163等,并分泌白介素-10、白介素-RA、转化生长因子等抗炎因子<sup>[19-20]</sup>。

本研究结果显示:无论是牙周健康状态,还是牙周炎症状态,M2型巨噬细胞的数量均很少。其原因可能是:①M2型与牙周炎发生发展的关系可能不密切;②本实验时间点牙周炎正处于以组织破坏为特征的牙周炎活动期,而M2型巨噬细胞主要参与组织修复。因此,导致本研究未观察到较多的M2型巨噬细胞的出现,可能需要延长观察时间来进一步证实该推测。

综上所述,与牙周健康状态相比,牙周炎大鼠牙周组织中M1型巨噬细胞明显增多,且分布范围更加广泛,可深达结缔组织区域。本研究还发现:M1型巨噬细胞主要集中于被破坏的牙骨质附近,提示M1型巨噬细胞可能与牙骨质破坏密切相关。未来尚需更多研究证实M1型巨噬细胞在牙周炎进展过程中的作用及其机制,有助于了解牙骨质破坏的相关机制,为目前牙周再生领域中最困难的部分——牙骨质再生,提供一定的参考。

### 参考文献

- [1] Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease[J]. *Periodontol* 2000, 2006, 40: 77-93.
- [2] Cui D, Lyu J, Li HX, et al. Human beta-defensin 3 inhibits peri-

- odontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages[J]. *Mol Immunol*, 2017, 91: 65-74.
- [3] Nagashima H, Shinoda M, Honda K, et al. CXCR4 signaling in macrophages contributes to periodontal mechanical hypersensitivity in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice[J]. *Mol Pain*, 2017, 13: 1744806916689269.
- [4] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. *Immunity*, 2010, 32(5): 593-604.
- [5] Das A, Sinha M, Datta S, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(10): 2596-2606.
- [6] Mylonas KJ, Jenkins SJ, Castellani RF, et al. The adult murine heart has a sparse, phagocytically active macrophage population that expands through monocyte recruitment and adopts an M2 phenotype in response to Th2 immunologic challenge[J]. *Immunobiology*, 2015, 220(7): 924-933.
- [7] Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 451-483.
- [8] Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89(4): 557-563.
- [9] Wilson HM. SOCS proteins in macrophage polarization and function[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 357.
- [10] Bashir S, Sharma Y, Elahi A, et al. Macrophage polarization: the Link between inflammation and related diseases[J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(1): 1-11.
- [11] Gemmell E, Mchugh GB, Grieco DA, et al. Costimulatory molecules in human periodontal disease tissues[J]. *J Periodontol Res*, 2001, 36(2): 92-100.
- [12] 冯利, 冯洁, 王春华, 等. 牙周炎龈组织中巨噬细胞超微结构的观察[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2002 (S1): 90-92.
- [13] Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Immunol*, 2008, 181(2): 1232-1244.
- [14] Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, et al. Osteal macrophages promote *in vivo* intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(7): 1517-1532.
- [15] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(12): 953-964.
- [16] Gonzalez OA, Novak MJ, Kirakodu S, et al. Differential gene expression profiles reflecting macrophage polarization in aging and periodontitis gingival tissues[J]. *Immunol Invest*, 2015, 44(7): 643-664.
- [17] Yu T, Zhao L, Huang X, et al. Enhanced activity of the macrophage M1/M2 phenotypes and phenotypic switch to M1 in periodontal infection[J]. *J Periodontol*, 2016, 87(9): 1092-1102.
- [18] Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, et al. Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice[J]. *J Immunol*, 2014, 193(5): 2349-2362.
- [19] Gordon S. Alternative activation of macrophages[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(1): 23-35.
- [20] Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 453-461.

(编辑 罗燕鸿, 韩倩倩)