·基础研究·

两种代谢法荧光标记牙龈卟啉单胞菌及其在活体成像中的效果比较

程心仪，　邹沛辉，　刘佳，　栾庆先

北京大学口腔医学院·口腔医院牙周科 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心 口腔生物材料和数字诊疗装备国家工程研究中心，北京（100081）

【摘要】　目的　探讨两种代谢法荧光探针对牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*，*Pg*）的影响，并比较两种荧光探针标记的 *Pg* 在小动物活体成像中的应用效果。**方法**　本研究通过单位伦理委员会审查及单位实验生物医学伦理委员会实验动物福利伦理分会批准。*Pg* 通过生物正交反应整合四酰化 N-叠氮基乙酰半乳糖胺（N-azidoacetylgalactosamine，Ac_4GalNAz），再通过点击化学反应实现了 Cy5-二苯并环辛炔（Cy5-Dibenzocyclooctyne，Cy5-DBCO）、Cy7-DBCO 标记。根据细菌不同标记状态进行分组：*Pg* 组（对照，未经荧光标记的 *Pg*）、Cy5-*Pg* 组（Cy5-DBCO 标记的 *Pg*）、Cy7-*Pg* 组（Cy7-DBCO 标记的 *Pg*）。细菌活死染色试剂盒检测 *Pg*、Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg* 的活性；*Pg*、Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg* 分别刺激人牙龈成纤维细胞（human gingival fibroblast，HGF）后检测 HGF 白介素-6（interleukin-6，IL-6）、IL-8 的 mRNA 水平和 HGF 增殖能力；与大肠杆菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）共培养检测荧光标记的 *Pg* 的稳定性；用小动物活体成像系统（*in vivo* imaging system，IVIS）检测系列浓度梯度的 Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg* 的荧光强度。最后，将 Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg* 分别经口灌饲给 C57BL/6J 小鼠，IVIS 分别检测 Cy5 或 Cy7 信号强度，计算信噪比。**结果**　代谢法可以被应用于活的 *Pg* 的荧光标记，Cy5、Cy7 标记 *Pg* 的最佳浓度分别为 20 μmol/L、30 μmol/L。*Pg*、Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg* 中活死细菌所占面积比值分别为 1.86、1.85、1.88（$F = 0.318$，$P > 0.05$）。Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg*、*Pg* 刺激 HGF 6 h 后，HGF 的 IL-6、IL-8 mRNA 水平分别比 Ctrl 组（无细菌刺激组）升高了 7.86、7.46、6.56 倍（IL-6，$F = 40.886$，$P < 0.001$）和 12.43、13.03、13.71 倍（IL-8，$F=18.781$，$P < 0.01$），3 个实验组间无明显差异（$P > 0.05$）。Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg*、*Pg* 以不同 MOI（multiplicity of infection）刺激 HGF，与 Ctrl 组（无细菌刺激组）相比，HGF 的增殖能力均显著下降（MOI=$10^4:1$，$F = 153.52$，$P < 0.001$；MOI=$10^5:1$，$F = 331.21$，$P < 0.001$；MOI=$10^6:1$，$F = 533.65$，$P < 0.001$），3 个实验组间差异无统计学意义（$P > 0.05$）。Cy5-*Pg* 或 Cy7-*Pg* 与 *E. coli* 共培养的 24 h 内，仅有非常少的 *E. coli* 被标记上荧光，且 3 h 内荧光强度几乎无衰减。Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg* 的荧光强度与浓度呈正线性相关（$R^2 = 0.97$）。Cy5-*Pg* 或 Cy7-*Pg* 灌饲到小鼠体内后，在 1 h、3 h 时，Cy7-*Pg* 在小鼠腹部成像的信噪比分别为 Cy5-*Pg* 的 4.24 倍（$t = 6.893$，$P < 0.01$）、3.77 倍（$t = 4.407$，$P < 0.05$）；Cy7-*Pg* 在分离出的胃肠道内成像的信噪比为 Cy5-*Pg* 的 5.19 倍（$t = 4.418$，$P < 0.05$）。**结论**　代谢法荧光标记不影响 *Pg* 的活性、免疫调节能力和毒性。在小动物活体成像中 Cy7 具有比 Cy5 更好的成像效果，为研究牙周炎和全身疾病的联系提供了实验基础。

【关键词】　牙龈卟啉单胞菌；　Cy5；　Cy7；　代谢法标记；　点击化学反应；　C57BL/6J 小鼠；小动物；　活体成像；　牙周炎；　口-肠轴

【中图分类号】　R78　【文献标志码】　A　【文章编号】　2096-1456（2024）09-0664-10

【引用著录格式】　程心仪，邹沛辉，刘佳，等. 两种代谢法荧光标记牙龈卟啉单胞菌及其在活体成像中的效果比较[J]. 口腔疾病防治，2024, 32(9): 664-673. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.202440092.

Metabolic labeling of *Porphyromonas gingivalis* and comparison of two fluorescent probes for *in vivo* imaging
CHENG Xinyi, ZOU Peihui, LIU Jia, LUAN Qingxian.　Department of Periodontology, Peking University School and

Hospital of Stomatology, National Center of Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Research Center of Oral Biomaterials and Digital Medical Devices, Beijing 100081, China
Corresponding author: LUAN Qingxian, Email: kqluanqx@126.com, Tel: 86-10-82195497; LIU Jia, Email: dentistliujia@126.com, Tel: 86-10-18102029964

【Abstract】 Objective To investigate the impact of metabolic labeling on *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and compare the imaging effects of two fluorescent probes. **Methods** This study was reviewed by the unit Ethics Committee and was approved by the Experimental Animal Welfare Ethics Branch of the Unit Experimental Biomedical Ethics Committee. *Pg* integrated N-azidoacetylgalactosamine ($Ac_4GalNAz$) via a bioorthogonal reaction and was labeled with Cy5-DBCO or Cy7-DBCO via a click chemistry reaction. The bacteria were divided into *Pg* group (control, not fluorescently labeled), Cy5-*Pg* group (tagged by Cy5-DBCO), and Cy7-*Pg* group (tagged by Cy7-DBCO). A live/dead staining kit was applied to test the viability of *Pg*, Cy5-*Pg*, and Cy7-*Pg*. The mRNA levels of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 and cell proliferation were examined in human gingival fibroblasts (HGFs) after the challenge of Cy5-*Pg*, Cy7-*Pg*, or *Pg*. To investigate the stability of metabolic labeling, Cy5-*Pg* or Cy7-*Pg* was cocultured with *Escherichia coli* (*E. coli*). Cy5-*Pg* and Cy7-*Pg* signal intensity with serial dilutions were examined using an *in vivo* imaging system (IVIS). Finally, C57BL/6J mice were orally administered Cy5-*Pg* or Cy7-*Pg* for IVIS detection, and the signal-to-background ratios were calculated. **Results** Metabolic labeling could be applied to label live *Pg in vitro*. The optimal labeling concentrations for Cy5 and Cy7 were 20 μmol/L and 30 μmol/L, respectively. The area ratios of live to dead bacteria were approximately 2.0 in the three groups ($F = 0.318$, $P > 0.05$). After a 6-h challenge with Cy5-*Pg*, Cy7-*Pg*, or *Pg*, the mRNA levels of HGFs increased by 7.86-, 7.46-, and 6.56-fold for IL-6, respectively ($F = 40.886$, $P < 0.001$) and 12.43-, 13.03-, and 13.71-fold for IL-8 ($F = 18.781$, $P < 0.01$), were spectively, compared to that of the Ctrl group, which was not challenged by bacteria, where no significant differences were observed among the three groups ($P > 0.05$). HGFs were further challenged by Cy5-*Pg*, Cy7-*Pg*, or *Pg* at different MOIs, and cell proliferation was significantly inhibited (MOI = 10^4 : 1, $F = 153.52$, $P < 0.001$; MOI = 10^5 : 1, $F = 331.21$, $P < 0.001$; MOI = 10^6 : 1, $F = 533.65$, $P < 0.001$), with no significant differences among the three groups ($P > 0.05$). Within 24 h of co-culturing Cy5-*Pg* or Cy7-*Pg* with *E. coli*, minimal *E. coli* was detected. The intensities of Cy5 and Cy7 remained stable for 3 h. Additionally, the fluorescence signal intensities of Cy5 and Cy7 were linearly correlated with the concentration ($R^2 = 0.97$). After oral gavage of Cy5-*Pg* or Cy7-*Pg* in mice for the abdominal region at 1 h and 3 h, the signal-to-background ratios of Cy7-*Pg* were approximately 4.24-fold ($t = 6.893$, $P < 0.01$) and 3.77-fold ($t = 4.407$, $P < 0.05$) higher, respectively, than those of Cy5-*Pg*. For the isolated gastrointestinal tracts at 3 h, the signal-to-background ratio of Cy7-*Pg* was 5.19-fold higher than that of Cy5-*Pg* ($t = 4.418$, $P < 0.05$). **Conclusions** Metabolic labeling did not significantly affect viability, immunomodulatory ability, and toxicity. The imaging effect of Cy7 on IVIS was better than that of Cy5. Our study provided experimental evidence for the correlation between periodontitis and overall health.
【Key words】 *Porphyromonas gingivalis*; Cy5; Cy7; metabolic labeling; click chemistry reaction; C57BL/6J mice; small animal; *in vivo* imaging; periodontitis; oral-gut axis

　　牙周炎与多种系统性疾病具有密切联系[1]，"口-肠轴"被认为是可能机制之一[2]。牙周炎患者的口腔菌群失调，龈下和唾液中的微生物种类上升，致病性微生物的所占比例更高[3]。其中某些细菌可能通过消化道易位、定植于肠道，并可能在某些条件下，破坏黏膜屏障和扰乱肠道免疫，影响多种系统性疾病的发病过程，如炎症性肠病、结肠癌和肥胖等[2]。

　　牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*，*Pg*）是一种关键的牙周致病菌[4]，具有一定的耐酸能力[5]，在牙周炎患者唾液中的丰度增加[6]。在以往动物研究中，经分离得到的牙周炎患者的唾液微生物被接种于动物口腔，导致了肠道菌群失调[7-8]，并在肝[9]、脑[10]、胰腺[11]等远隔器官中通过聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）和免疫组织学法被检出。然而，不同研究中动物肠道菌群失调的表型差异很大，且并不能在肠道或血液中直接检测到*Pg*[7,12]。这说明关于*Pg*易位甚至定植

于人体肠道并传播至远隔器官的证据并不充分。

小动物荧光活体成像技术因操作简便、不受厌氧环境限制而广泛应用于肿瘤标记及药物评价、细胞或细菌的示踪等领域。常使用近红外荧光探针(如 Cy5、Cy5.5、Cy7)[13-14],在该波段内生物组织光吸收较少,光子传播效率较高[15]。代谢法荧光标记细菌是通过内源性生物合成,将经化学修饰的天然底物类似物合成进自身的细胞结构,并通过化学反应(一般是点击化学反应)将荧光探针连到处于相应结构的天然底物类似物中[16],不影响细菌活性,并可灵活选择不同波段的荧光探针。目前主要应用于肠道微生物的"显影"[17-18],尚未被应用于口腔微生物。本研究通过在体外用代谢法和近红外荧光探针 Cy5、Cy7 标记 Pg,并比较两种荧光探针标记的 Pg 在小动物活体成像中的应用效果。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

脑心浸液肉汤培养基粉(CM1135B,OXIFID,英国);氯化血红素(16009-13-5,Sigma,美国);维生素 K1(HB8462a,青岛海博生物,中国);无菌脱纤维羊血(1001339-1,青岛海博生物,中国);N-叠氮基乙酰半乳糖胺-四酰化(N-azidoacetylgalactosamine,Ac4GalNAz)(1404472-50-9,阿拉丁,中国);胰蛋白胨(LP0042B,OXOID,英国);酵母提取物(Y8020-500,索莱宝,中国);Cy5-二苯并环辛炔(Cy5 - Dibenzocyclooctyne,Cy5 - DBCO)(923,AAT Bioquest,美国);Cy7-DBCO(AK04948,天津赞城科技,中国);LIVE/DEAD Bac light 细菌活力检测试剂盒(L7007,Invitrogen,美国);CCK - 8 试剂盒(40203ES60,上海翌圣,中国);qPCR 引物(上海生工,中国);PrimeScript RT reagent Kit(RR014A,Takara,日本);SYBR Green PCR Master Mix(RK21203,武汉爱博泰克,中国)。激光共聚焦显微镜(LSM880,Zeiss,德国;TCS-SP8 STED 3X,Leica,德国);实时定量 PCR 仪(QuantStudio 1,ThermoFisher,美国);小动物活体成像系统(IVIS Spectrum,PerkinElmer,美国);多功能酶标仪(SpectraMax M4,美谷分子,中国)。

1.2 细菌培养

Pg(ATCC33277)、大肠杆菌(ATCC25922,$Escherichia coli$,$E. coli$)均由北京大学口腔医院中心实验室赠送。Pg 接种于脑心浸液(brain heart infusion broth,BHI)血琼脂平板,其中含有 5 μg/mL 氯化血红素、1 μg/mL 维生素 K1 和 50 μg/mL 无菌脱纤维羊血,在厌氧培养箱(37 ℃、80%N$_2$ 和 20% CO$_2$)中培养。$E. coli$ 接种于 LB 琼脂平板上,于 37 ℃、5% CO$_2$ 恒温培养箱。通过 16S rRNA 测序确保 Pg、$E. coli$ 的纯种状态。

1.3 代谢法荧光标记 Pg 及荧光强度检测

Pg 于 BHI 血琼脂平板、厌氧条件中培养 3 ~ 5 d,挑至 1 mL 含有 100 μmol/L Ac$_4$GalNAz 的 BHI 液体培养基中厌氧培养过夜。菌液 OD$_{600 nm}$ = 1.0(7 × 10^9 CFU/mL)时,离心(8 000 g,5 min,4 ℃)获得 Pg 沉淀。将沉淀用 1×PBS 洗涤 3 遍后,重悬于 100 μL 含有系列浓度梯度的 Cy5-DBCO、Cy7-DBCO,置于摇床(37 ℃,200 rpm)孵育 2 h。PBS 洗涤 3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min 后,滴于载玻片上,封片后置于共聚焦显微镜下观察(63×油镜)。(Cy5:激发波长 638 nm,接收波段:649~701 nm;Cy7:激发波长:730 nm,接收波段:750 ~ 850 nm。)随机选取 10 个视野,用 ImageJ 软件计算 Cy5 或 Cy7 在每个浓度下被标记的细菌的平均荧光强度。

1.4 细菌活死染色检测

根据细菌不同标记状态进行分组:Pg 组(对照,未经荧光标记的 Pg)、Cy5-Pg 组(Cy5-DBCO 标记的 Pg)、Cy7-Pg 组(Cy7-DBCO 标记的 Pg)。Pg、Cy5-Pg、Cy7-Pg 分别用细菌活死检测试剂盒室温染色 15 min。固定、涂片,并置于激光共聚焦显微镜下观察(63×油镜),激发光为 488 nm 和 561 nm,滤光片为 494 ~ 549 nm 和 590 ~ 629 nm,随机选取 10 个视野,用 ImageJ 软件计算活死细菌所占面积的比值。

1.5 细菌刺激后人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast,HGF)的炎症相关基因检测

原代 HGF 于 2013 至 2014 年期间获取、分离培养并冻存。选取 1 名知情同意、全身健康、无牙周疾病的患者在行冠延长术时切除的牙龈组织,本研究已通过北京大学口腔医院伦理委员会审查批准(批号:PKUSSIRB-2013017)。复苏后加入含 20% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素+链霉素)的 DMEM 培养基。置于细胞恒温培养箱(37 ℃,5% CO$_2$)中培养。本研究中所用的 HGF 为第 5 ~ 6 代。

将 HGF 接种于 6 孔板中,至长满 80% 时,将培养基换成不含双抗的 DMEM。将 Pg、Cy5-Pg、Cy7-Pg 用不含双抗的 DMEM 重悬,以 MOI(multiplicity of infection)=1 000∶1 加入至 HGF 中,Ctrl 组只加入等

量培养基。37 ℃、5% CO_2共培养6 h。去除上清，PBS洗3遍，TRIzol提取RNA，并逆转录成cDNA，用于实时荧光定量PCR。按qPCR试剂盒说明书操作，配制PCR反应体系，各基因引物序列见表1。放入QuantStudio Realtime PCR仪，用两步法PCR扩增标准程序。将得到的结果采用相对定量法（$2^{-\Delta\Delta CT}$法）计算各样本中目的基因的相对表达。

表1 RT-qPCR引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Primers	
	5'-3'	3'-5'
IL-6	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC	GGGAAGGCAGCAGGCAACAC
IL-8	GCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT	TTTCTGTGTTGGCGCAGTGT
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

IL-6: interleukin-6; IL-8: interleukin-8; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.6 细菌刺激后HGF的增殖检测

将HGF接种于96孔板中，Pg、Cy5-Pg、Cy7-Pg分别以MOI=10^4∶1、10^5∶1、10^6∶1刺激HGF持续12 h，Ctrl组的HGF中加入等量培养基，Bacteria组只加入Pg（与MOI=10^6组等量），Blank组只加入培养基，PBS洗3遍后，每孔加入含10% CCK-8的DMEM培养基100 µL，在孵箱中孵育1 h，用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值。

1.7 观察$E. coli$和代谢法荧光标记的Pg共培养

验证代谢法可以标记$E. coli$：方法同1.3，Cy5-DBCO、Cy7-DBCO浓度同1.3中确定的最适浓度，于激光共聚焦显微镜下观察；再将$E. coli$与Cy5-Pg或Cy7-Pg按体积比1∶1混合培养，分别于30 min、1 h、3 h、24 h时将混合菌液固定，涂片，并于激光共聚焦显微镜下观察，63×油镜，Zoom factor=3。

1.8 代谢法荧光标记的Pg荧光强度和浓度关系的检测

将Cy5-Pg、Cy7-Pg分别用PBS重悬，以1∶2梯度稀释（最高浓度为$1×10^9$ CFU/mL），接种于96孔板中，每孔100 µL，置于IVIS检测荧光强度。激发光分别为620 nm和745 nm，分别在680 nm和800 nm接收，用Living image 4.4软件对检测信号进行定量分析。

1.9 体内观察代谢法荧光标记的Pg及信噪比检测

SPF级C57BL/6J小鼠，雄性，6～8周，体重18～20 g（动物生产许可证号：SCXK（京）2021-0006）。实验小鼠适应性喂养1周后进行实验，期间12 h光照和12 h黑暗交替循环，温度（24±1）℃，湿度（60±10）%，小鼠自由摄食、饮水。动物实验通过北京大学医学部实验生物医学伦理委员会实验动物福利伦理分会批准（审批号：PUIRB-LA2023007）。

将小鼠随机均分为3组：对照组（$n=3$）、Cy5-Pg组（$n=3$）、Cy7-Pg组（$n=3$）。腹腔内注射1%戊巴比妥钠、脱毛，禁食禁水16 h。Cy5-Pg、Cy7-Pg用PBS重悬，Cy5-Pg组、Cy7-Pg组分别灌饲100 µL含约$1×10^9$ CFU的Cy5-Pg或Cy7-Pg菌液；对照组灌饲100 µL PBS。用2%异氟烷麻醉，灌饲后1 h、3 h置于IVIS检测全身荧光信号。在3 h时将动物脱颈处死，分离胃肠道至体外，用IVIS检测胃肠道内的荧光信号，并计算信噪比[19]：在Cy5-Pg组或Cy7-Pg组小鼠的腹部或胃肠道圈出有信号的区域作为感兴趣区域（region of interest，ROI），用Living image 4.4软件计算ROI内的平均荧光强度作为目标信号荧光强度，在附近无荧光信号区域圈出同样的ROI作为背景荧光强度，计算Cy5-Pg组、Cy7-Pg组的信号对比度；在对照组小鼠的相同部位圈出同样的ROI，计算对照组的信号对比度，Cy5-Pg组或Cy7-Pg组与对照组的信号对比度的比值即为信噪比。

1.10 统计学方法

采用SPSS25.0进行数据分析，采用GraphPad Prism 9.5.1软件绘图。符合正态分布的计量数据，两组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，经Levene's方差齐性检验，若方差齐性，采用Bonferroni事后检验；若方差不齐，采用Games-Howell法进行两两比较。两个相关变量间采用简单线性回归分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 体外代谢法荧光标记Pg及Cy5、Cy7的最佳标记浓度

代谢法标记的Pg呈点状或者拟杆状（图1a、1b）。Cy5、Cy7分别在荧光探针浓度为20 µmol/L、30 µmol/L时达到饱和（图1c、1d）。因此，Cy5、Cy7标记Pg的最佳浓度分别为20 µmol/L、30 µmol/L。

2.2 代谢法荧光标记对Pg活性的影响

将Cy5-Pg、Cy7-Pg及未标记的Pg分别用细菌活死染色试剂盒染色，共聚焦显微镜下，活细菌呈绿色荧光，死细菌呈红色或者橙色荧光。Pg、Cy5-Pg、Cy7-Pg中活死细菌所占面积比值（图2）分别为1.86、1.85、1.88（$F=0.318$，$P>0.05$）。

a & b: *Pg* was labeled with 0 – 40 μmol/L Cy5-DBCO (a) or Cy7-DBCO (b). c & d: the mean fluorescence intensity was analyzed using a confocal laser scanning microscope in ten visual fields for each group. This analysis revealed strong labeling for *Pg* at the concentration of 20 μmol/L Cy5-DBCO and 30 μmol/L Cy7-DBCO, which suggested the optimal labeling concentrations. Scale bar = 10 μm. **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$; ns: not significant. *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; DBCO: dibenzocyclooctyne
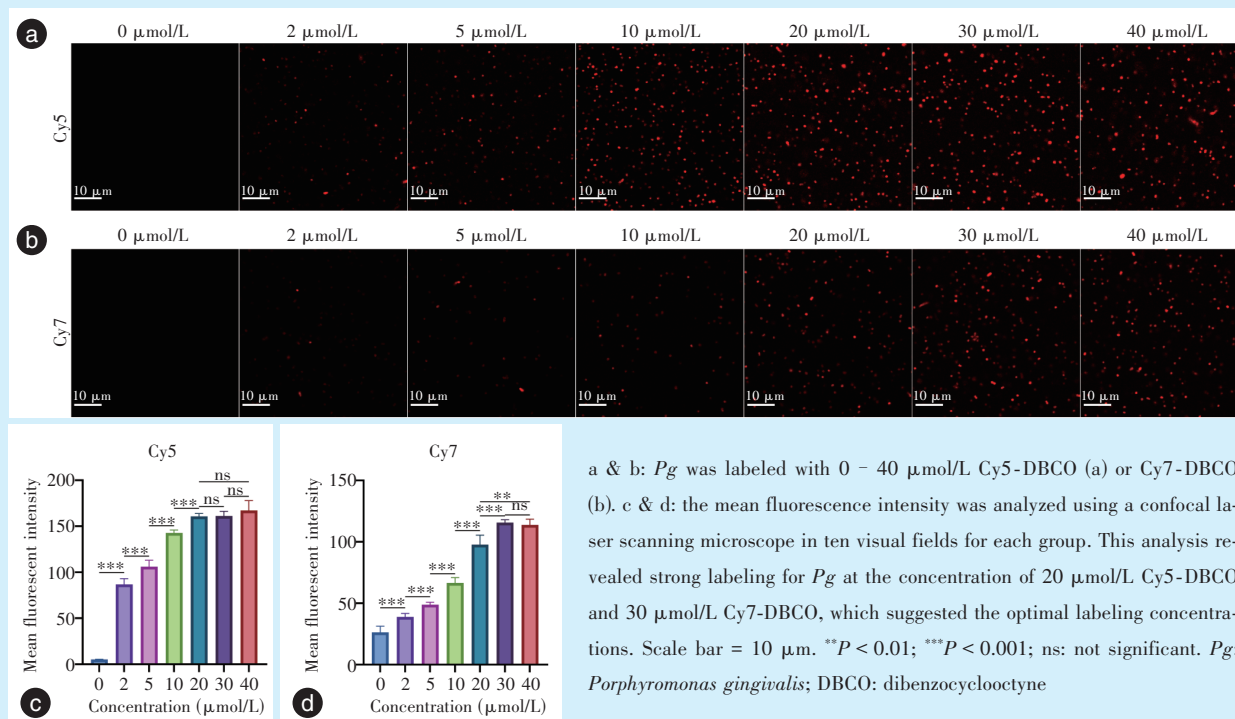
Figure 1　Metabolic labeling of *Pg* and fluorescence intensities at different concentrations of Cy5-DBCO or Cy7-DBCO
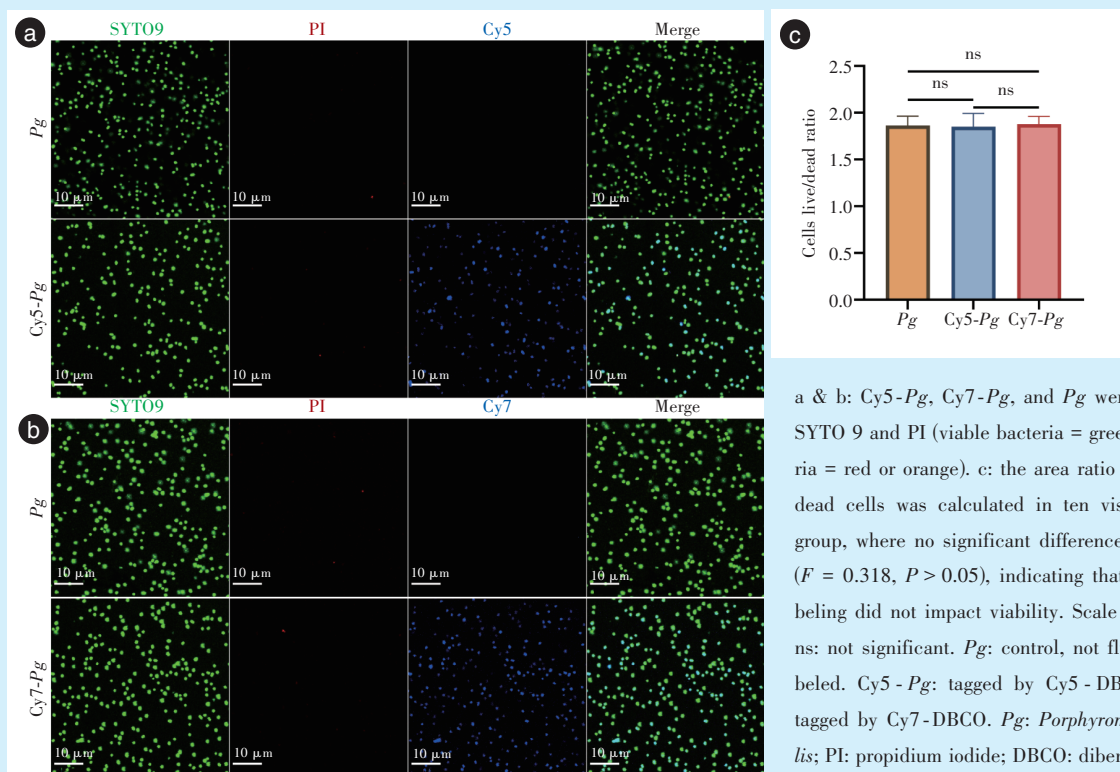图1　Cy5-DBCO、Cy7-DBCO体外代谢法标记*Pg*及不同探针浓度标记的荧光强度

a & b: Cy5-*Pg*, Cy7-*Pg*, and *Pg* were stained with SYTO 9 and PI (viable bacteria = green; dead bacteria = red or orange). c: the area ratio of live cells to dead cells was calculated in ten visual fields per group, where no significant difference was observed (F = 0.318, P > 0.05), indicating that metabolic labeling did not impact viability. Scale bar = 10 μm. ns: not significant. *Pg*: control, not fluorescently labeled. Cy5 - *Pg*: tagged by Cy5 - DBCO. Cy7 - *Pg*: tagged by Cy7 - DBCO. *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; PI: propidium iodide; DBCO: dibenzocyclooctyne

Figure 2　Viability of *Pg* tagged by different fluorescent probes via metabolic labeling
图2　不同荧光探针代谢法标记的*Pg*的活性结果

2.3　代谢法荧光标记对 Pg 免疫调节能力、对细胞毒性的影响

Pg、Cy5-Pg、Cy7-Pg 刺激 HGF 6 h 后，HGF 的 IL-6、IL-8 的 mRNA 转录水平分别比 Ctrl 组升高了 6.56、7.86、7.46 倍（IL-6：$F = 40.886$，$P < 0.001$）和 13.71、12.43、13.03 倍（IL-8：$F = 18.781$，$P < 0.01$），3 个实验组间差异无统计学意义（$P > 0.05$）（图 3a）。Cy5-Pg、Cy7-Pg、Pg 以不同 MOI 刺激 HGF，HGF 的增殖能力均显著下降（MOI=10^4：1，$F = 153.52$，$P < 0.001$；MOI=10^5：1，$F = 331.21$，$P < 0.001$；MOI=10^6：1，$F = 533.65$，$P < 0.001$），MOI=10^6：1 时，HGF 被细菌完全杀灭。3 个实验组间差异无统计学意义（$P > 0.05$）（图 3b）。
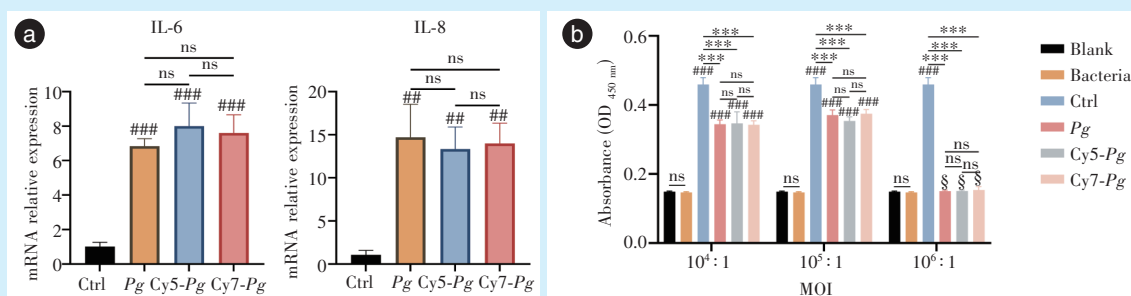
a: mRNA levels of IL-6 and IL-8 in HGF were examined after challenge with Pg, Cy5-Pg or Cy7-Pg at MOI = 1 000∶1 for 6 h. HGF in the control group was not challenged by bacteria. The mRNA levels of both IL-6 and IL-8 were not significantly different between the three groups, suggesting that metabolic labeling had no significant influence on immunomodulatory ability. ns: not significant. ##: compared to the Ctrl, $P < 0.01$; ###: compared to the Ctrl, $P < 0.001$. b: HGF proliferation was assessed using the CCK-8 kit after the challenge of Pg, Cy5-Pg, or Cy7-Pg at different MOIs (10^4∶1, 10^5∶1, 10^6∶1) for 12 h. Ctrl group: HGF + culture medium. Bacteria group: only Pg. Blank group: only culture medium. Pg, Cy5-Pg, and Cy7-Pg all inhibited cell proliferation, and no significant difference was observed among the groups; thus, metabolic labeling did not significantly affect cell toxicity. ns: not significant; §: compared to Blank, not significant; ###: compared to Blank, $P < 0.001$; ***compared to Ctrl, $P < 0.001$. Pg: control, not fluorescently labeled. Cy5-Pg: tagged by Cy5-DBCO. Cy7-Pg: tagged by Cy7-DBCO. Pg: Porphyromonas gingivalis; MOI: multiplicity of infection; IL-6: interleukin-6; IL-8: interleukin-8; HGF: human gingival fibroblast; DBCO: dibenzocyclooctyne

Figure 3　Immunomodulatory ability and toxicity of Pg tagged by different fluorescent probes via metabolic labeling

图 3　不同荧光探针代谢法标记的 Pg 的免疫调节能力、毒性结果
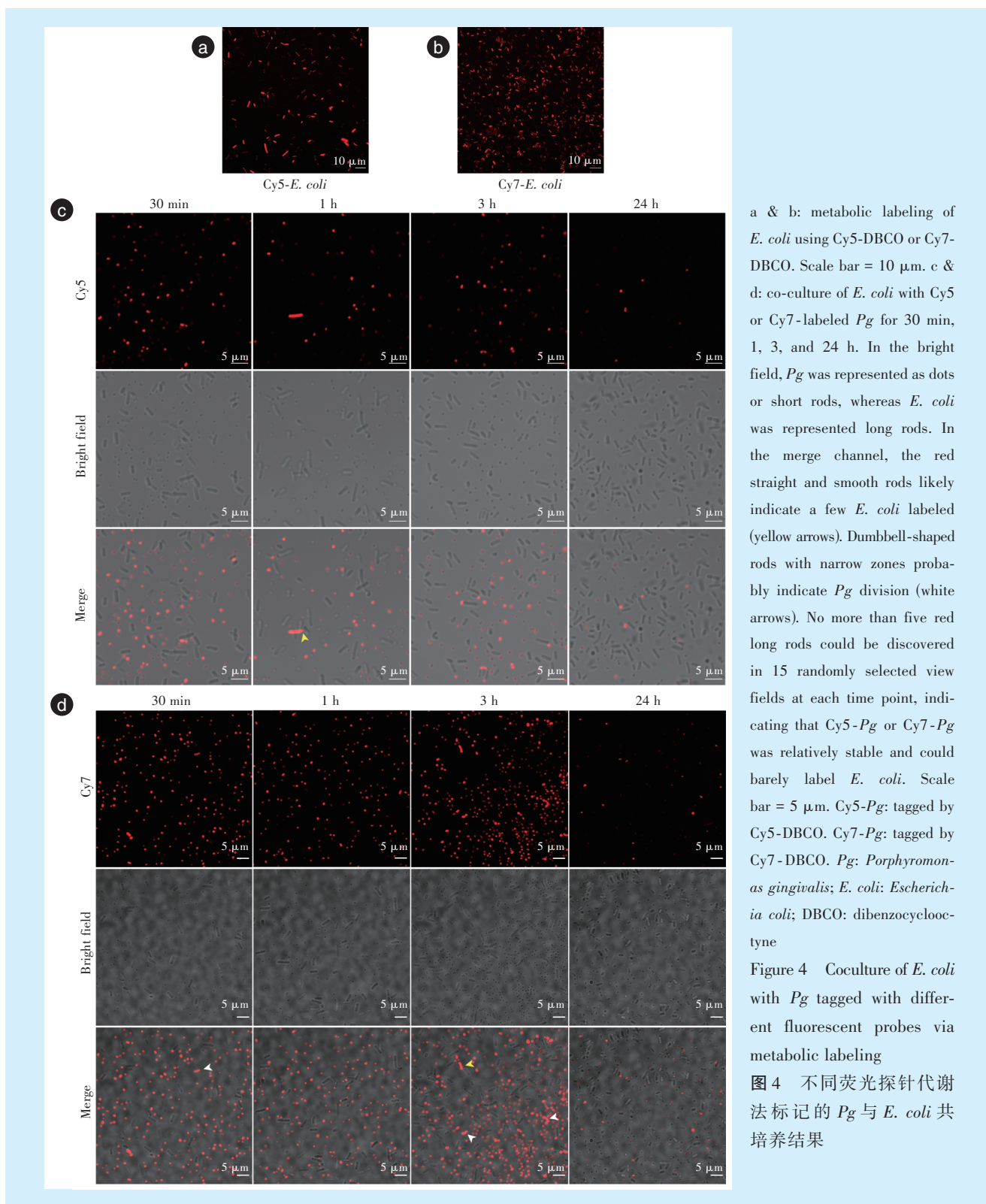
2.4　与 Pg 结合的 Cy5 或 Cy7 探针的稳定性

以同样的方法标记常见的模式细菌 $E.$ $coli$（图 4a、4b），呈红色荧光的长杆状细菌。为了明确 Cy5-Pg 或 Cy7-Pg 在接触到其他细菌时是否会使其他细菌也标记上荧光，$E.$ $coli$ 分别与 Cy5-Pg、Cy7-Pg 共培养 30 min、1 h、3 h、24 h，于每个时间点将混合菌液取出观察（图 4c、4d）。在明场中能观察到 Pg 呈点状、拟杆状，$E.$ $coli$ 呈长杆状，因此可通过形态区分这两种细菌。在 Merge 的图像里，发现少数呈现红色荧光的长杆状细菌，分为两种情况：一种如黄色箭头所示，为直线、光滑的长杆状，这可能是少数被标记上的 $E.$ $coli$；另一种如白色箭头所示，为带有缩窄区的哑铃状，结合明场图像推断是正在分裂状态的 Pg。但以上两种情况的细菌在每个时间点随机选取的 15 个视野中，总数不超过 5 个。此外，3 h 以内 Cy5 或 Cy7 荧光信号几乎无衰减，24 h 时大部分细菌荧光信号明显减弱，说明 3 h 内 Cy5-Pg 或 Cy7-Pg 是较稳定的。

2.5　Cy5、Cy7 荧光强度和 Pg 浓度的关系

使用 IVIS 检测梯度稀释的 Cy5-Pg 或 Cy7-Pg（图 5），结果显示 Cy5 或 Cy7 荧光强度和 Pg 浓度均呈正线性相关（$R^2 = 0.97$），说明检测到的荧光的强弱能定量反映 Pg 的浓度。

2.6　Cy5-Pg、Cy7-Pg 在体内成像效果比较

将 100 μL 1×10^9 CFU Cy5-Pg、Cy7-Pg 分别灌饲于小鼠口腔内，在 1 h、3 h 将小鼠置于 IVIS 中检测腹部的荧光信号强度，如图 6a、6b 所示。Cy5-Pg、Cy7-Pg 在 1 h、3 h 时均位于小鼠上腹部。3 h 时两组荧光信号强度较 1 h 无明显变化，分布面积略增加。Cy7-Pg 的分布范围广于 Cy5-Pg，但 Cy7 信号的高亮区与 Cy5 的范围几乎一致。Cy7-Pg 成像的信噪比在 1 h、3 h 时分别为 Cy5-Pg 的 4.24 倍（$t = 6.893$，$P < 0.01$）、3.77 倍（$t = 4.407$，$P < 0.05$）（图 6c）。3 h 时，将小鼠处死，取出、分离胃肠道至体外检测荧光信号强度。对照组 Cy7 通道的背景噪音分布范围明显小于 Cy5，除胃、盲肠、结肠外，还出现在 Cy5 通道的小

a & b: metabolic labeling of *E. coli* using Cy5-DBCO or Cy7-DBCO. Scale bar = 10 μm. c & d: co-culture of *E. coli* with Cy5 or Cy7-labeled *Pg* for 30 min, 1, 3, and 24 h. In the bright field, *Pg* was represented as dots or short rods, whereas *E. coli* was represented long rods. In the merge channel, the red straight and smooth rods likely indicate a few *E. coli* labeled (yellow arrows). Dumbbell-shaped rods with narrow zones probably indicate *Pg* division (white arrows). No more than five red long rods could be discovered in 15 randomly selected view fields at each time point, indicating that Cy5-*Pg* or Cy7-*Pg* was relatively stable and could barely label *E. coli*. Scale bar = 5 μm. Cy5-*Pg*: tagged by Cy5-DBCO. Cy7-*Pg*: tagged by Cy7-DBCO. *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *E. coli*: *Escherichia coli*; DBCO: dibenzocyclooctyne

Figure 4　Coculture of *E. coli* with *Pg* tagged with different fluorescent probes via metabolic labeling

图4　不同荧光探针代谢法标记的 *Pg* 与 *E. coli* 共培养结果

肠中末端。实验组 Cy5-*Pg*、Cy7-*Pg* 分布于胃及小肠中部（图6d、6e）。Cy7-*Pg* 在器官水平成像的信噪比为 Cy5-*Pg* 的 5.19 倍（$t = 4.418$，$P < 0.05$）（图6f）。

3　讨　论

本研究标记 *Pg* 方法的基础是生物正交反应，原理为生物体将经过化学修饰的寡糖分子合成进入自身的多糖或糖蛋白中，目前已应用于哺乳动物细胞[20]和肠道细菌[18, 21]。本研究选择了单糖 GalNAz，是 N-乙酰基半乳糖胺（N-acetylgalactosamine，GalNAc）的类似物，可以被合成作为 O-连接蛋白的一部分[22]，位于 *Pg* 的细胞周质和细胞膜
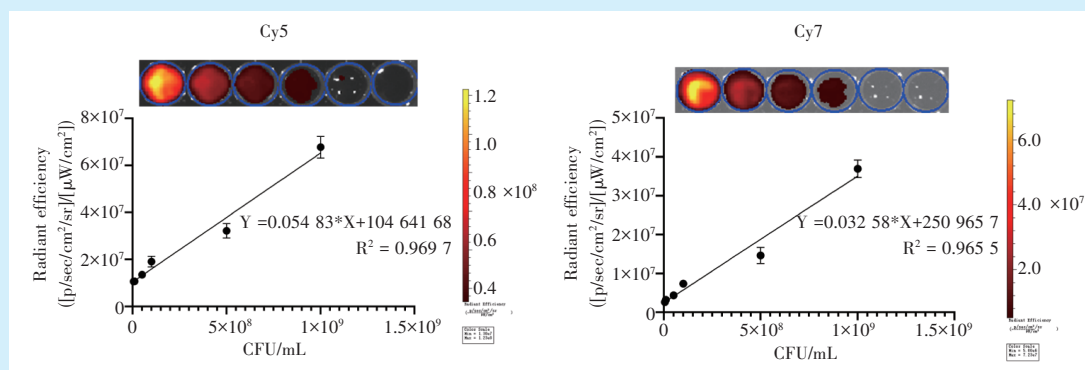
Cy5-*Pg* and Cy7-*Pg* were serially diluted and examined using IVIS. A linear relationship existed between fluorescent intensity and bacteria concentration (R^2 = 0.97). Cy5-*Pg*: tagged by Cy5-DBCO. Cy7-*Pg*: tagged by Cy7-DBCO. *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; IVIS: *in vivo* imaging system

Figure 5   Relationship between the concentration and signal intensity of *Pg* tagged by different fluorescent probes via metabolic labeling

图5   不同荧光探针代谢法标记的*Pg*荧光强度和浓度关系
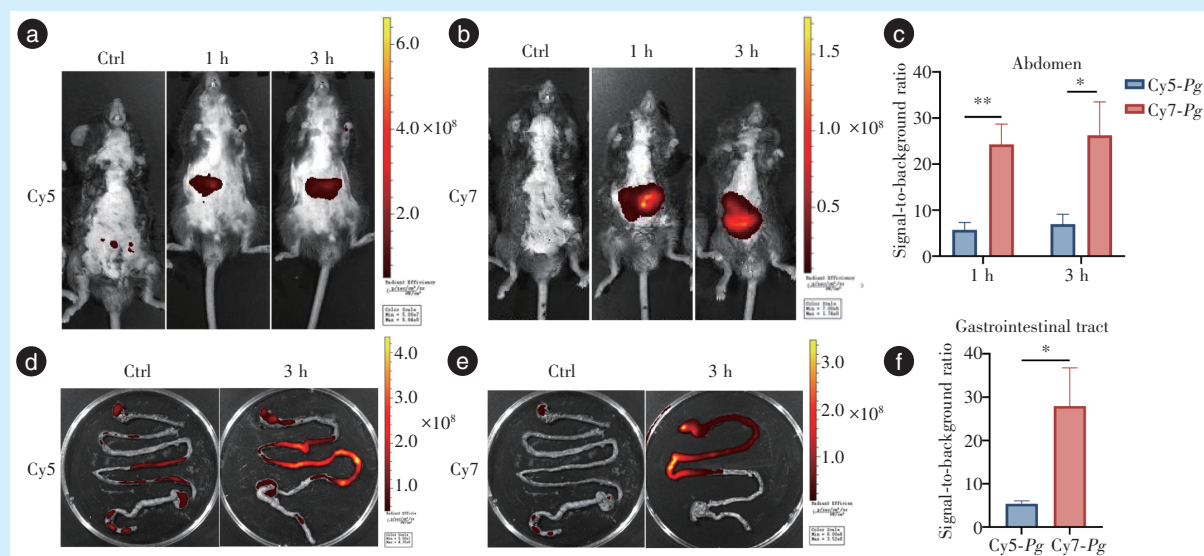
a & b: mice in the Cy5-*Pg* and Cy7-*Pg* groups were administered through oral gavage with 100 μL 1 × 10⁹ CFU Cy5-*Pg* or Cy7-*Pg*, respectively. Ctrl mice received 100 μL PBS. Mice were detected at 1 h and 3 h under IVIS to calculate the signal-to-background ratio for the abdominal area. c: the signal-to-background ratio of the Cy7-*Pg* group was higher than that of the Cy5-*Pg* group at both 1 h (t = 6.893, P < 0.01) and 3 h (t = 4.407, P < 0.05). d & e: at 3 h, the isolated gastrointestinal tracts were detected under IVIS. f: the signal-to-noise ratio of the Cy7-*Pg* group was significantly higher than that of the Cy5-*Pg* group (t = 4.418, P < 0.05), which indicated that Cy7 had a superior imaging effect than Cy5. *P < 0.05; **P < 0.01. *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*. IVIS: *in vivo* imaging system

Figure 6   Comparison of the signal-to-background ratios in C57BL/6J mice after the oral gavage of *Pg* tagged with different fluorescent probes via metabolic labeling

图6   灌饲不同荧光探针标记的*Pg*后C57BL/6J小鼠的成像信噪比结果

中[23]。Geva-Zatorsky等[21]用同样方式标记脆弱拟杆菌,发现荧光探针定位于细菌表面,并且缺失多糖A(PSA,荚膜多糖组分之一)的突变菌株 ΔPSA 的荧光非常微弱,因此该法标记分子的定位主要为细胞表面多糖。对于代谢法的荧光探针浓度,

以往文献中为20 ~ 100 μmol/L[20-21],本文标记*Pg*的 Cy5、Cy7 最适浓度分别是 20 μmol/L、30 μmol/L。探针浓度可能受细胞体积和探针基团分子大小影响,可为后续相似方法标记其他细菌提供参照。

HGF 不仅维持牙周结构的完整和稳定,还是

先天性免疫重要的前哨细胞[24]。体外HGF通过Toll样受体2识别结合 *Pg* 并分泌IL-6、IL-8[25]。牙周炎患者的HGF单细胞测序结果显示,与LPS和细菌分子相关的抗菌反应通路上调,尤其是与中性粒细胞募集相关的基因(CXCL1、IL-8)[26]。唾液中的IL-8含量与探诊出血和探诊深度指标呈正相关,并在完善的牙周治疗后下降[27]。因此,IL-6和IL-8水平能体现细菌刺激免疫系统反应的能力。本研究证实代谢法标记不影响 *Pg* 的免疫调节能力,以MOI=1 000:1刺激HGF后,HGF内IL-6和IL-8转录水平分别上升了7倍和13倍。代谢法标记脆弱拟杆菌或荚膜多糖也不影响其刺激树突状细胞、CD4+ T细胞分泌的IL-10水平[21]。Lagosz等[28]用 *Pg* 以MOI=100:1刺激HGF 4 h后,HGF的IL-6和IL-8转录水平升高了100倍和1 000倍。本研究标记 *Pg* 的过程中多次离心、洗脱可能会影响其毒力。

代谢法标记并非菌种特异性的标记方式,因此,Cy5-*Pg* 或Cy7-*Pg* 接触到其他细菌时,可能使其他细菌被标记上荧光:①Cy5-DBCO或Cy7-DBCO与 *Pg* 表面的GalNAz反应形成的共价键在反复洗脱的过程中断裂,导致溶液中存在游离的荧光探针;②Cy5-*Pg* 或Cy7-*Pg* 可能会代谢出GalNAz,被其他细菌吸收,并恰好结合游离的荧光探针。为了检验以上可能,将常见的肠道模式菌株 *E. coli* 与Cy5-*Pg* 或Cy7-*Pg* 共培养30 min、1 h、3 h、24 h,发现只有极少的 *E. coli* 可能被标记上荧光,意味着观察到的荧光绝大多数来自于Cy5-*Pg* 或Cy7-*Pg*。Tian等[29]将硒结合的代谢法探针(Pr₂GalNSe)标记不同种类的肿瘤细胞,再和未标记的T细胞共培养,发现不超过6%的硒结合的多糖会转移到T细胞上,并在3~6 h达到最高,之后逐渐下降。这说明即便是具有相互作用的细胞群,细胞膜中位于O-连接蛋白的半乳糖的交流互换也是有限的,其中的原因还需进一步实验验证。Geva-Zatorsky等[21]也观察到了类似的情况,被荧光标记的脆弱拟杆菌会在前8 h逐渐失去荧光信号,其中前4 h荧光信号强度几乎不变,4~8 h间信号迅速下降,6 h时已经下降了一半,8 h时几乎降至最低,此后至24 h信号强度几乎不变,这种下降趋势和对数期细菌数量增长的趋势恰好吻合,可能与细菌分裂有关。

Cy5和Cy7均是活体成像中常用的荧光探针,Cy7发射波长稍高于Cy5,对皮肤和脂肪的穿透力稍强[30]。胃肠道内食物残渣会导致较强的背景噪音[31],啮齿动物饲料中的苜蓿经消化后会产生叶绿素,它的两个发射峰分别在680 nm和740 nm,更接近Cy5的发射波长范围(650~700 nm),因此Cy7具有更强的信噪比。Cy5-*Pg* 和Cy7-*Pg* 分别灌饲至小鼠口腔后,Cy7-*Pg* 在小鼠腹部分布的范围更广,而核心高亮区与Cy5-*Pg* 一致。Cy5成像中,周围 *Pg* 含量少的低亮区可能因扣除背景噪音且荧光穿透力稍小而无法显示。

基于以上研究结果,一些问题仍值得探讨:一方面代谢法标记能将多种不同波段的荧光探针标记细菌,从而适用于不同成像维度,本文是从宏观水平做出探索,未来可从微观水平研究宿主-微生物的相互作用;另一方面,本研究为单次灌饲 *Pg*,未来可通过连续灌饲 *Pg* 来构造肠道微生物和黏膜屏障破坏的动物模型,进一步探讨 *Pg* 被吞咽进入消化道后与系统性疾病的联系机制。综上所述,本研究探索了一种标记活的 *Pg* 的方法,这种方法不影响 *Pg* 的功能状态,并具有良好的稳定性,为研究牙周炎和全身疾病的联系提供了实验基础。

参考文献

[1] Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(7): 426-440. doi: 10.1038/s41577-020 -00488-6.

[2] Yamazaki K. Oral-gut axis as a novel biological mechanism linking periodontal disease and systemic diseases: a review [J]. Jpn Dent Sci Rev, 2023, 59: 273-280. doi: 10.1016/j. jdsr. 2023.08. 003.

[3] Bao J, Li L, Zhang Y, et al. Periodontitis may induce gut microbiota dysbiosis via salivary microbiota [J]. Int J Oral Sci, 2022, 14 (1): 32. doi: 10.1038/s41368-022-00183-3.

[4] Usui M, Onizuka S, Sato T, et al. Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis—periodontal bacteria and inflammation [J]. Jpn Dent Sci Rev, 2021, 57: 201-208. doi: 10.1016/j. jdsr. 2021.09.005.

[5] Sato K, Takahashi N, Kato T, et al. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6955. doi: 10.1038/s41598-017-07196-7.

[6] Lu C, Zhao Q, Deng J, et al. Salivary microbiome profile of diabetes and periodontitis in a Chinese population [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 933833. doi: 10.3389/fcimb.2022.933833.

[7] Park S, Kim I, Han SJ, et al. Oral *Porphyromonas gingivalis* infec-

tion affects intestinal microbiota and promotes atherosclerosis [J]. J Clin Periodontol, 2023, 50(11): 1553‑1567. doi: 10.1111/jcpe.13864.

[8]　Chi L, Cheng X, Lin L, et al. *Porphyromonas gingivalis*‑induced cognitive impairment is associated with gut dysbiosis, neuroinflammation, and glymphatic dysfunction [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 755925. doi: 10.3389/fcimb.2021.755925.

[9]　Yao C, Lan D, Li X, et al. *Porphyromonas gingivalis* is a risk factor for the development of nonalcoholic fatty liver disease via ferroptosis [J]. Microbes Infect, 2023, 25(1/2): 105040. doi: 10.1016/j.micinf.2022.105040.

[10]　Dominy SS, Lynch C, Ermini F, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small‑molecule inhibitors [J]. Sci Adv, 2019, 5(1): eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333.

[11]　Ilievski V, Toth PT, Valyi‑Nagy K, et al. Identification of a periodontal pathogen and bihormonal cells in pancreatic islets of humans and a mouse model of periodontitis [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9976. doi: 10.1038/s41598-020-65828-x.

[12]　Kato T, Yamazaki K, Nakajima M, et al. Oral administration of *Porphyromonas gingivalis* alters the gut microbiome and serum metabolome [J]. mSphere, 2018, 3(5): e00460‑e00418. doi: 10.1128/mSphere.00460-18.

[13]　Fan D, Zhang C, Luo Q, et al. *In vivo* evaluation of integrin αvβ6-targeting peptide in NSCLC and brain metastasis[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1070967. doi: 10.3389/fonc.2023.1070967

[14]　Zlitni A, Gowrishankar G, Steinberg I, et al. Maltotriose‑based probes for fluorescence and photoacoustic imaging of bacterial infections [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1250. doi: 10.1038/s41467-020-14985-8.

[15]　冯哲, 钱骏. 近红外二区荧光活体生物成像技术研究进展 [J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617001. doi: 10.3788/LOP202259.0617001.
　　　Feng Z, Qian J. Advances on *in vivo* fluorescence bioimaging in the second near‑infrared window [J]. Laser Optoelectron Prog, 2022, 59(6): 0617001. doi: 10.3788/LOP202259.0617001.

[16]　Lin L, Du Y, Song J, et al. Imaging commensal microbiota and pathogenic bacteria in the gut [J]. Acc Chem Res, 2021, 54(9): 2076-2087. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00068.

[17]　Wang Y, Zhang C, Lai J, et al. Noninvasive PET tracking of post-transplant gut microbiota in living mice [J]. Eur J Nucl Med Mol Imag, 2020, 47(4): 991-1002. doi: 10.1007/s00259-019-04639-3.

[18]　Wang W, Yang Q, Du Y, et al. Metabolic labeling of peptidoglycan with NIR-II dye enables *in vivo* imaging of gut microbiota [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2020, 59(7): 2628‑2633. doi: 10.1002/anie.201910555.

[19]　Choi HS, Gibbs SL, Lee JH, et al. Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(2): 148-153. doi: 10.1038/nbt.2468.

[20]　Kim W, Yoon HY, Lim S, et al. *In vivo* tracking of bioorthogonally labeled T‑cells for predicting therapeutic efficacy of adoptive T‑cell therapy [J]. J Control Release, 2021, 329: 223‑236. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.002.

[21]　Geva-Zatorsky N, Alvarez D, Hudak JE, et al. *In vivo* imaging and tracking of host‑microbiota interactions via metabolic labeling of gut anaerobic bacteria [J]. Nat Med, 2015, 21(9): 1091-1100. doi: 10.1038/nm.3929.

[22]　Liu J, Hao Y, He Y, et al. Quantitative and site-specific chemoproteomic profiling of protein O-GlcNAcylation in the cell cycle [J]. ACS Chem Biol, 2021, 16(10): 1917-1923. doi: 10.1021/acschembio.1c00301.

[23]　Veith PD, Shoji M, Scott NE, et al. Characterization of the O-glycoproteome of *Porphyromonas gingivalis* [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(1): e0150221. doi: 10.1128/spectrum.01502-21.

[24]　Wielento A, Lagosz-Cwik KB, Potempa J, et al. The role of gingival fibroblasts in the pathogenesis of periodontitis [J]. J Dent Res, 2023, 102(5): 489-496. doi: 10.1177/00220345231151921.

[25]　Lagosz-Cwik KB, Wielento A, Lipska W, et al. hTERT-immortalized gingival fibroblasts respond to cytokines but fail to mimic primary cell responses to *Porphyromonas gingivalis* [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 10770. doi: 10.1038/s41598-021-90037-5.

[26]　Williams DW, Greenwell-Wild T, Brenchley L, et al. Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal‑neutrophil axis regulating tissue immunity [J]. Cell, 2021, 184(15): 4090‑4104. e15. doi: 10.1016/j.cell.2021.05.013.

[27]　Huang YK, Tseng KF, Tsai PH, et al. IL-8 as a potential therapeutic target for periodontitis and its inhibition by caffeic acid phenethyl ester *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3641. doi: 10.3390/ijms22073641.

[28]　Lagosz KB, Bysiek A, Macina JM, et al. HDAC3 regulates gingival fibroblast inflammatory responses in periodontitis [J]. J Dent Res, 2020, 99(1): 98-106. doi: 10.1177/0022034519885088.

[29]　Tian X, Zheng L, Wang C, et al. Selenium-based metabolic oligosaccharide engineering strategy for quantitative glycan detection [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 8281. doi: 10.1038/s41467‑023‑44118-w.

[30]　Gong L, Shan X, Zhao XH, et al. Activatable NIR‑II fluorescent probes applied in biomedicine: progress and perspectives [J]. ChemMedChem, 2021, 16(16): 2426‑2440. doi: 10.1002/cmdc.202100142.

[31]　Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, et al. Diet and abdominal autofluorescence detected by *in vivo* fluorescence imaging of living mice [J]. Mol Imaging, 2008, 7(1): 21-27.

（编辑　罗燕鸿, 曾曙光）

官网