· 实验技术 ·

牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡对巨噬细胞促炎能力的影响

朱悦[1]，林洁[1]，洪良[2]，余琳[2]

1.浙江大学医学院附属邵逸夫医院，浙江 杭州 310013；2.浙江大学医学院附属第二医院，浙江 杭州 310009

摘要：目的 探讨牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡（OMV）对巨噬细胞促炎能力的影响及相关机制，为慢性牙周炎防治提供理论依据。**方法** 采用ExoBacteria™ OMV分离试剂盒从牙龈卟啉单胞菌培养上清液分离纯化OMV，通过透射电镜和GroEL检测验证表征。THP-1细胞经佛波酯诱导分化为THP-1巨噬细胞。提取OMV蛋白质组分和RNA组分，分别与THP-1巨噬细胞共培养，以未加OMV为对照组。采用流式荧光发光法检测肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和白细胞介素-6（IL-6）等细胞因子水平，采用蛋白免疫印迹法检测p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）、c-Jun 氨基末端激酶（JNK）和p65磷酸化水平。**结果** 牙龈卟啉单胞菌培养上清液100 mL可分离纯化（0.87±0.14）mg OMV，透射电镜显示呈杯状或球状形态，可检测标志性分子伴侣蛋白GroEL。OMV组TNF-α、IL-6水平分别为（8 309.97±0.15）和（5.13±0.93）pg/mL，高于对照组的（52.78±4.59）和（0.37±0.10）pg/mL（均P<0.05）。OMV蛋白质组分诱导THP-1巨噬细胞分泌TNF-α、IL-6水平分别为（2 614.67±536.10）和（2.45±0.41）pg/mL，高于对照组的（296.51±26.02）和（0.63±0.04）pg/mL（均P<0.05）；OMV RNA组分诱导THP-1巨噬细胞分泌TNF-α、IL-6水平与对照组差异无统计学意义（均P>0.05）。蛋白免疫印迹法结果显示，与对照组相比，OMV组p38磷酸化水平升高，JNK、p65磷酸化水平无明显变化；抑制p38活性后，OMV组TNF-α、IL-6水平下降（均P<0.05）。**结论** 牙龈卟啉单胞菌OMV可能通过激活p38 MAPK通路增强巨噬细胞分泌促炎因子TNF-α、IL-6。

关键词：牙龈卟啉单胞菌；外膜囊泡；巨噬细胞；促炎

中图分类号：R781.42　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-5087（2026）07-0752-05

Effects of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on the pro-inflammatory capacity of macrophages

ZHU Yue[1], LIN Jie[1], HONG Liang[2], YU Lin[2]

1.Sir Run Run Shaw Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310013, China; 2.The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou,Zhejiang 310009, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles (OMV) on the pro-inflammatory capacity of macrophages and the underlying mechanisms, so as to provide a theoretical basis for the prevention and treatment of chronic periodontitis. **Methods** OMV were isolated and purified from *Porphyromonas gingivalis* culture supernatants using the ExoBacteria™ OMV Isolation Kit, and characterized by transmission electron microscopy and GroEL detection. THP-1 cells were differentiated into macrophages by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) stimulation. Protein and RNA fractions extracted from the OMV were separately incubated with THP-1 macrophages, with untreated cells serving as the control group. The levels of cytokines including tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) were measured by flow cytometric fluorescence luminescence method, and the phosphorylation levels of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p65 phosphorylation were determined by Western blotting. **Results** From 100 mL of *Porphyromonas gingivalis* culture supernatant, (0.87±0.14) mg of OMV were isolated. Transmission electron microscopy revealed a typical cup-shaped or spherical morphology, and the presence of the hallmark chaperone protein GroEL was confirmed. The OMV group exhibited significantly

DOI：10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2026.07.025

基金项目：浙江省自然科学基金项目（LQN25H140003）

作者简介：朱悦，硕士，医师，主要从事慢性牙周炎发生关键作用机制及其干预研究工作，E-mail：644262597@qq.com

higher levels of TNF-α and IL-6 at (8 309.97±0.15) pg/mL and (5.13±0.93) pg/mL, respectively, compared to the control group at (52.78±4.59) pg/mL and (0.37±0.10) pg/mL (both $P<0.05$). The OMV protein fraction induced TNF-α and IL-6 secretion by THP-1 macrophages at (2 614.67±536.10) pg/mL and (2.45±0.41) pg/mL, respectively, higher than those in the control group at (296.51±26.02) pg/mL and (0.63±0.04) pg/mL (both $P<0.05$). No statistically significant differences in TNF-α or IL-6 levels were observed between the OMV RNA fraction-treated group and the control group (all $P>0.05$). Western blot analysis showed that, compared with the control group, the OMV group had increased p38 phosphorylation level, while the levels of JNK and p65 phosphorylation remained unchanged. Inhibition of p38 activity resulted in decreased TNF-α and IL-6 levels in the OMV-treated group (both $P<0.05$). **Conclusion** *Porphyromonas gingivalis* OMV may enhance macrophage secretion of the pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-6 through activation of the p38 MAPK pathway.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*; outer membrane vesicles; macrophages; pro-inflammatory

慢性牙周炎是成人常见的口腔疾病，临床上可因牙槽骨的病理性吸收导致牙齿松动、移位甚至丧失，阐明其发生机制对有效控制疾病发生发展具有重要意义[1-2]。作为“红复合体”革兰阴性厌氧菌，牙龈卟啉单胞菌是慢性牙周炎的主要致病菌之一[3]。除脂多糖、菌毛和牙龈蛋白酶等传统毒力因子外，近年来研究发现牙龈卟啉单胞菌可释放大量外膜囊泡（outer membrane vesicles，OMV）[4-5]。OMV是细菌天然分泌的纳米级膜性颗粒，内含蛋白质、核酸和脂质等多种生物活性分子，是细菌与宿主互作的新型介质。与直接细菌感染不同，OMV具有独特的生物学效应，可穿透组织间隙并将毒力因子递送至宿主细胞内部或远处部位，进而影响宿主免疫反应[6-7]。巨噬细胞是牙周局部炎症组织中最为丰富的免疫细胞，不仅驱动局部炎症的发生，也参与牙槽骨重塑与稳态维持[8]。宿主免疫应答过程中，巨噬细胞通过识别病原体相关分子模式，促进肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和白细胞介素-6（IL-6）等促炎因子释放，启动并放大局部炎症反应。然而，过度或持续的巨噬细胞活化会导致组织损伤，加剧牙周破坏[9]。本文探讨牙龈卟啉单胞菌OMV对巨噬细胞促炎能力的影响，为慢性牙周炎防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277菌株购自美国典型培养物保藏中心；ExoBacteria™ OMV分离试剂盒购自美国System Biosciences公司。人单核细胞白血病细胞系（THP-1细胞）购自中国科学院上海细胞库；人Th1/Th2/Th17亚群检测试剂盒（流式荧光发光法）购自江西赛基生物技术有限公司。佛波酯（美国Sigma公司）；RPMI 1640培养液（美国Corning公司）；胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司）；蛋白酶抑制剂Cocktail（美国Millipore公司）；p38丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）抑制剂SB 202190（美国MCE公司）；二甲基亚砜（DMSO，上海生工生物工程有限公司）；Lipofectamine 2000（美国Invitrogen公司）。GroEL抗体（美国Sigma公司）；p38抗体（美国CST公司）；磷酸化p38（p-p38）抗体（美国CST公司）；c-Jun氨基末端激酶（JNK）抗体（美国CST公司）；磷酸化JNK（p-JNK）抗体（美国CST公司）；p65抗体（美国CST公司）；磷酸化p65（p-p65）抗体（美国CST公司）。miRNeasy试剂盒（德国Qiagen公司）；厌氧血培养瓶（美国BD公司）；厌氧血培养平板（郑州贝瑞特生物技术有限公司）。超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物技术股份有限公司）；FACSCanto Ⅱ流式细胞仪（美国BD公司）。

1.2 方法

1.2.1 牙龈卟啉单胞菌复苏与培养

取1 mL胰蛋白胨肉汤加至牙龈卟啉单胞菌标准菌株保存管中，混匀后移至厌氧血培养瓶，于35 ℃厌氧培养箱中培养3~5 d。取1 mL上述菌液接种于厌氧血培养瓶中进行扩大培养，于35 ℃继续厌氧培养5~7 d；另取少量菌液采用四区划线法接种于预还原厌氧血培养平板，检查有无杂菌污染。培养结束后，牙龈卟啉单胞菌菌液于4 ℃、16 200×*g*离心30 min，取上清液，用于分离纯化OMV。

1.2.2 牙龈卟啉单胞菌OMV分离与纯化

采用ExoBacteria™ OMV分离试剂盒提取OMV，严格按说明书操作。将OMV结合树脂充分混匀，取1 mL树脂加至层析柱。用10 mL 1×结合缓冲液平衡层析柱，待液体完全流出后，向树脂中加入20 mL牙龈卟啉单胞菌上清液，4 ℃孵育30 min以促进OMV结合，弃去流出液。用15 mL 1×结合缓冲液洗涤树脂2次，加入1.5 mL OMV洗脱缓冲液，室温

孵育 2 min，收集含 OMV 的洗脱液，用于表征验证，包括 Bradford 蛋白质定量、透射电镜检查和 GroEL 检测等。

1.2.3 OMV 蛋白质组分与 RNA 组分提取

取 100 μL OMV，加入 50 μL RIPA 裂解液（pH 7.5，50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液包含 0.25% 去氧胆酸钠、0.1% NP-40 和 1×蛋白酶抑制剂 Cocktail）和 1 U RNase A 酶，冰浴 5 min 后采用超声波细胞粉碎机裂解。于 4 ℃、16 200×*g* 离心 30 min，弃沉淀，收集上清液即为 OMV 蛋白质组分。另取 100 μL OMV，采用 miRNeasy 试剂盒，按说明书提取 RNA，收集洗脱液即为 OMV RNA 组分。

1.2.4 THP-1 细胞培养与巨噬细胞诱导分化

THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 ℃，5% CO_2 条件下培养和传代。取对数生长期细胞，以 5×10^5 个细胞/孔接种于 24 孔板，同时加入 1 μg/mL 的佛波酯，培养过夜以诱导分化为 THP-1 巨噬细胞。

1.2.5 细胞因子检测

按 1.2.4 方法诱导分化 THP-1 巨噬细胞，次日，弃培养上清液，用无血清 RPMI 1640 培养液洗涤 1 次，各孔加入 500 μL 新鲜含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液，设加 50 μg OMV 的 THP-1 巨噬细胞孔为 OMV 组，仅加等体积培养液 THP-1 巨噬细胞孔对照组，混匀后继续培养 18~24 h，各组均设 3 个复孔。收集培养上清液，于 4 ℃、16200×*g* 离心 10 min，取上清液用于细胞因子检测。采用人 Th1/Th2/Th17 亚群检测试剂盒（流式荧光发光法），按照多重细胞因子检测试剂盒说明书操作，采用 FACSCanto Ⅱ流式细胞仪检测 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、γ-干扰素（IFN-γ）和 TNF-α 7 个细胞因子。绘制标准曲线，计算各细胞因子的浓度。

1.2.6 OMV 不同组分对细胞因子的影响

按 1.2.4 方法诱导分化 THP-1 巨噬细胞，次日，弃培养上清液，用无血清 RPMI 1640 培养基洗涤细胞 1 次。每孔更换为 500 μL 含 10% 胎牛血清的新鲜 RPMI 1640 培养液，仅加入 50 μL 无血清 RPMI 1640 培养液的 THP-1 巨噬细胞孔为对照组，加入 6 μL OMV 蛋白质组分与 44 μL 无血清 RPMI 1640 培养液的 THP-1 巨噬细胞孔为 OMV 蛋白质组分组，加入 1 μL OMV RNA 与 2 μL Lipofectamine 2000 分别稀释后混合的转染复合物（总体积 50 μL）的 THP-1 巨噬细胞孔为 OMV RNA 组分组。混匀后继续培养 18~24 h，各组均设 3 个复孔，按 1.2.5 方法检测细胞因子。

1.2.7 蛋白免疫印迹法

以 2.5×10^6 个细胞/孔接种 6 孔板，按 1.2.4 方法进行诱导分化，按 1.2.5 方法处理，采用蛋白免疫印迹法检测 p38、p-p38、JNK、p-JNK、p65 和 p-p65。按 1.2.4 方法进行诱导分化，分别加入 50 μg OMV+ 10 μmol/L DMSO（OMV + DMSO 组）或 50 μg OMV+10 μmol/L p38 抑制剂（OMV + p38 抑制组），混匀后继续培养 18~24 h。处理结束后，用预冷的磷酸盐缓冲液（pH 7.4）洗涤细胞 3 次，每孔加入 150 μL RIPA 裂解液，10 min 后用细胞刮刀回收细胞，收集细胞悬液，进一步采用超声波细胞粉碎机裂解。于 4 ℃、16 200×*g* 离心 30 min 弃沉淀，收集上清液，制备蛋白样品。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，在冰浴条件下以 300 mA 恒流转膜 90 min，5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。洗膜后加入特异性一抗 4 ℃孵育过夜，洗膜后与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h，洗涤 3～5 次后在化学发光成像仪中曝光并采集图像。

1.3 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布的采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）描述，不服从正态分布的经对数转换后采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）描述；不同组分组与对照组比较采用 Dunnett's *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 牙龈卟啉单胞菌 OMV 表征

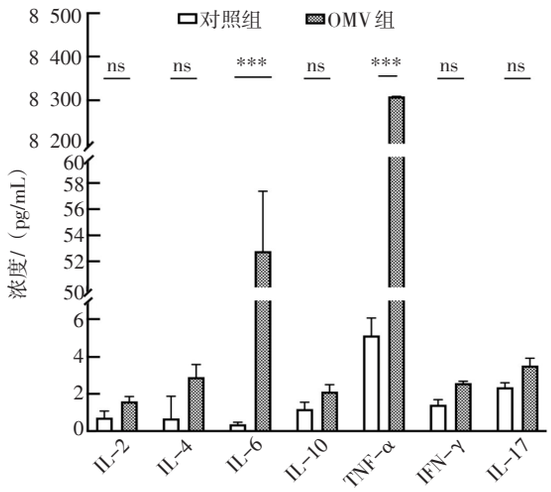
牙龈卟啉单胞菌培养上清液 100 mL 可分离纯化（0.87±0.14）mg OMV；透射电镜显示，纯化的 OMV 呈杯状或球状形态，粒径分布在 80~120 nm 之间；蛋白免疫印迹法检测其表达标志性分子伴侣蛋白 GroEL（约 58 kDa）。

2.2 OMV 对 THP-1 巨噬细胞分泌细胞因子的影响

OMV 组 TNF-α、IL-6 水平分别为（8 309.97±0.15）和（5.13±0.93）pg/mL，高于对照组的（52.78±4.59）和（0.37±0.10）pg/mL，差异有统计学意义（均 $P<0.001$）。对照组与 OMV 组的 IL-2、IL-4、IL-10、IL-17 和 IFN-γ 水平比较，差异无统计学意义（$P=0.980$、0.305、0.971、0.911 和 0.911）。见图 1。

2.3 OMV 蛋白质组分与 RNA 组分对 THP-1 巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-6 的影响

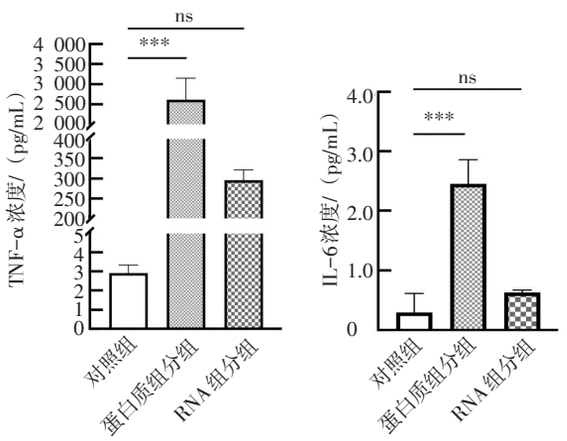
OMV 蛋白质组分诱导 THP-1 巨噬细胞分泌



注：***表示 P<0.001，ns 表示差异无统计学意义。

图 1　牙龈卟啉单胞菌 OMV 对 THP-1 巨噬细胞分泌细胞因子的影响

Figure 1　Effects of *Porphyromonas gingivalis* OMV on cytokine secretion by THP-1 macrophages



注：***表示 P<0.001，ns 表示差异无统计学意义。

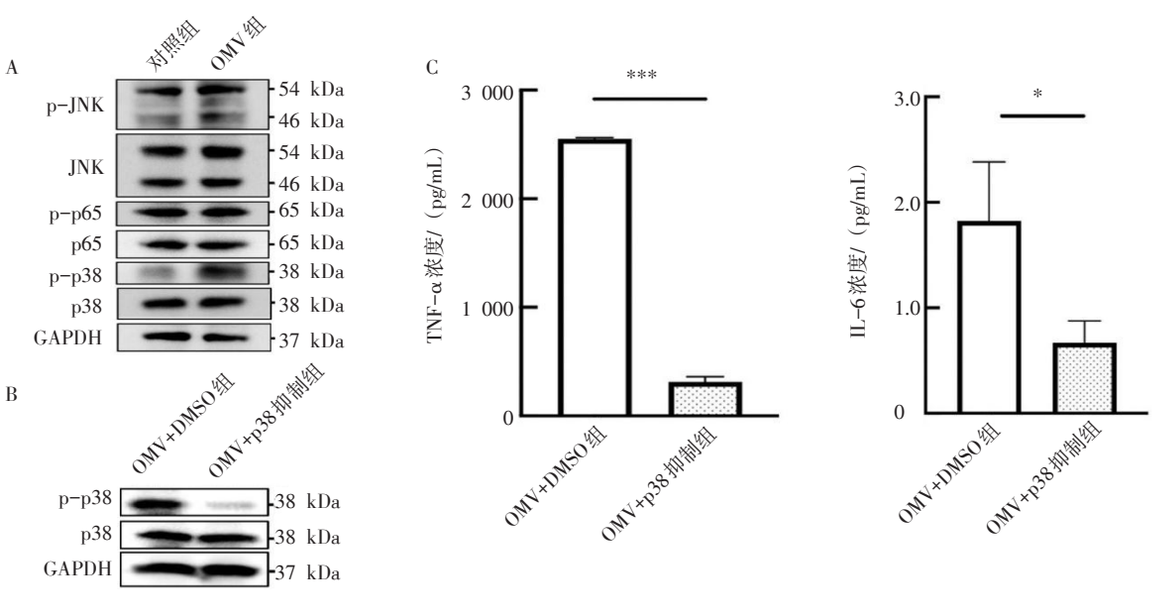
图 2　牙龈卟啉单胞菌 OMV 蛋白质与 RNA 组分对 THP-1 巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-6 的影响

Figure 2　Effects of *Porphyromonas gingivalis* OMV protein and RNA components on TNF-α and IL-6 secretion by THP-1 macrophages

TNF-α、IL-6 水平分别为（2 614.67±536.10）和（2.45±0.41）pg/mL，高于对照组（均 P<0.001）。OMV RNA 组分诱导 THP-1 巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-6 水平分别为(296.51±26.02)和(0.63±0.04)pg/mL，与对照组比较，差异无统计学意义（P=0.516、0.406）。见图 2。

2.4　OMV 对炎症相关通路活性的影响

OMV 组 p38 磷酸化水平高于对照组；对照组和 OMV 组 JNK、p65 磷酸化水平无明显变化。使用特异性抑制剂阻断 p38 活性后，结果显示，OMV+DMSO 组 p38 磷酸化水平高于 OMV + p38 抑制组，表明特异性抑制剂有效阻断 p38 活性。细胞因子检测结果显示，OMV+DMSO 组 TNF-α、IL-6 水平分别为（2 552.23±12.70）和（1.82±0.56）pg/mL，高于 OMV + p38 抑制组的（314.20±46.38）和（0.67±0.21）pg/mL，差异有统计学意义（P<0.001、P=0.029）。见图 3。



注：*表示 P<0.05，***表示 P<0.001，ns 表示差异无统计学意义。图 A 为蛋白免疫印迹法检测 p38、JNK 和 p65 蛋白表达水平，图 B 为验证 p38 抑制剂对 p38 蛋白表达水平的影响，图 C 为抑制 p38 活性前后 THP-1 巨噬细胞分泌 TNF-α 和 IL-6 水平。

图 3　牙龈卟啉单胞菌 OMV 对炎症相关通路活性影响

Figure 3　Effects of *Porphyromonas gingivalis* OMV on inflammatory pathway activity

3 讨 论

牙龈卟啉单胞菌是慢性牙周炎的关键致病菌，其毒力因子在免疫调控中的作用备受关注[3]。近年来，细菌 OMV 作为细菌-宿主相互作用的介质，逐渐成为研究热点[10]。本研究以佛波酯诱导分化的 THP-1 巨噬细胞为体外实验模型，检测牙龈卟啉单胞菌 OMV 对细胞因子水平和炎症相关通路活性的影响，明确 OMV 对巨噬细胞促炎能力的影响。结果显示，牙龈卟啉单胞菌 OMV 的蛋白质组分可上调 THP-1 巨噬细胞分泌的 TNF-α、IL-6 水平，并激活 p38 MAPK 通路，提示 OMV 通过蛋白质组分介导的 p38 MAPK 通路激活，驱动巨噬细胞向促炎表型极化。

透射电镜显示，纯化的牙龈卟啉单胞菌 OMV 呈杯状或球状形态，粒径分布在 80~120 nm 之间，可检测到其标志性分子伴侣蛋白 GroEL，表明 OMV 分离纯化成功。OMV 可上调 THP-1 巨噬细胞分泌的 TNF-α、IL-6 促炎因子水平，而对 IL-2、IL-4、IL-10、IL-17 和 IFN-γ 的分泌无显著影响。进一步解析活性成分发现，OMV 的蛋白质组分诱导 THP-1 巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-6 水平高于对照组，而 RNA 组分作用不明显，表明 OMV 的蛋白质组分是诱导巨噬细胞促炎反应的主要活性成分。该结果与既往研究报道的牙龈卟啉单胞菌牙龈蛋白酶等蛋白质相关分子可激活宿主免疫细胞的结果[4-5]一致，进一步支持了蛋白质组分在 OMV 致病性的核心作用。

p38 MAPK、JNK 和 p65 通路是调控炎症反应及促炎因子释放的关键通路。牙龈卟啉单胞菌 OMV 处理后，THP-1 巨噬细胞中仅 p38 MAPK 磷酸化水平显著升高，而对 JNK 和 p65 通路影响不明显。为进一步验证 p38 MAPK 通路在 OMV 诱导促炎反应中的作用，采用 p38 MAPK 特异性抑制剂处理细胞，结果显示，OMV + p38 抑制组的 TNF-α、IL-6 水平低于 OMV+DMSO 组，表明激活 p38 MAPK 通路在 OMV 诱导的促炎反应中发挥关键作用。这一发现与既往关于其他细菌来源 OMV（如大肠杆菌、幽门螺杆菌）的研究结果[11]相似，提示 p38 MAPK 通路可能是多种病原体 OMV 共用的免疫激活枢纽，但 OMV 激活 p38 MAPK 通路的关键蛋白或蛋白质复合物仍需进一步鉴定。

本研究揭示了牙龈卟啉单胞菌 OMV 可能通过蛋白质组分激活 p38 MAPK 通路促进巨噬细胞分泌促炎因子 TNF-α、IL-6，提示 p38 MAPK 通路可能是未来预防和治疗牙周炎的潜在干预靶点。本研究存在一定局限性：实验均基于 THP-1 巨噬细胞体外模型，尚缺乏进一步的体内动物实验验证；OMV 的蛋白质组分在激活 p38 MAPK 中起关键作用，其关键作用蛋白尚不清楚；p38 MAPK 特异性抑制剂 SB 202190 能有效控制炎症，但 SB 202190 的毒性作用限制了其进一步的临床使用。未来可构建牙周炎动物模型，验证 OMV 的致病作用，并结合蛋白质组学技术鉴定关键活性蛋白，为牙周炎的靶向治疗提供明确的分子靶点。

参考文献

[1] Bartold P M.Lifestyle and periodontitis: the emergence of personalized periodontics [J].Periodontology, 2000, 2018, 78 (1): 7-11.

[2] Wang M, Liu Y B, Tong W M, et al.Periodontitis history shapes the early peri-implant microbiome formation: a metagenomic analysis [J].J Clin Periodontol, 2025, 52 (7): 1011-1023.

[3] Buonavoglia A, Latronico F, Pirani C, et al.Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation [J]. Odontology, 2013, 101 (1): 84-88.

[4] Farrugia C, Stafford G P, Murdoch C. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles increase vascular permeability [J]. J Dent Res, 2020, 99 (13): 1494-1501.

[5] Xie H.Biogenesis and function of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles[J].Future Microbiol, 2015, 10(9): 1517-1527.

[6] Gui M J, Dashper S G, Slakeski N, et al.Spheres of influence: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles [J]. Mol Oral Microbiol, 2016, 31 (5): 365-378.

[7] Zhuang Z, Yoshizawa-Smith S, Glowacki A, et al. Induction of M2 macrophages prevents bone loss in murine periodontitis models [J].J Dent Res, 2019, 98 (2): 200-208.

[8] Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, et al.RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis [J].FASEB J, 2006, 20 (2): 401-403.

[9] Wu Z X, Long W, Yin Y, et al.Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis: recent advances in pathogenicity and associated mechanisms [J/OL].Front Microbiol, 2025, 16 [2026-07-05].https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1555868.

[10] Ma D X, Zhang Y X, Zhang J, et al.Outer membrane vesicles derived from probiotic Escherichia coli Nissle 1917 promote metabolic remodeling and M1 polarization of $RAW_{264.7}$ macrophages [J/OL].Front Immunol, 2025, 16 [2026-07-05].https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1501174.

[11] Li J, Liao T T, Chua E G, et al.Helicobacter pylori outer membrane vesicles: biogenesis, composition, and biological functions [J].Int J Biol Sci, 2024, 20 (10): 4029-4043.

收稿日期：2026-04-30　**修回日期**：2026-07-05　**本文编辑**：徐亚慧