

巨细胞病毒对植入聚甲基丙烯酸甲酯小鼠部分免疫指标的抑制作用

江 蓉¹, 张齐梅²

(1. 四川省阿坝藏族羌族自治州人民医院口腔科, 阿坝藏族羌族自治州 624000;

2. 西南医科大学附属口腔医院牙周黏膜科, 泸州 646000)

[摘要] 目的 研究巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)对植入聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)后小鼠免疫反应的抑制作用。方法 腹腔接种病毒悬液构建CMV感染小鼠模型。病毒接种7 d后, 将PMMA植入到小鼠背部皮下; 流式细胞术检测外周血中单核/巨噬细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和调节性T细胞(Treg细胞)所占比例; 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的含量。结果 相对于植入对照组, 植入CMV组小鼠外周血中M1型单核/巨噬细胞的比例降低了73.18% ($t=5.896$, $P=0.004$), M2型单核/巨噬细胞的比例则升高了2.18倍 ($t=7.971$, $P=0.001$), CD4⁺/CD8⁺T细胞比值降低了42.91% ($t=6.468$, $P=0.003$), 而Treg细胞比例升高了2.49倍 ($t=4.495$, $P=0.011$)。相对于植入对照组, 植入CMV组小鼠外周血中TNF- α 和IL-1 β 的浓度分别降低了71.65%和57.95% ($t=7.236$, $P=0.019$; $t=7.543$, $P=0.002$)。结论 CMV能够显著抑制PMMA植入后的免疫反应, 这为CMV感染患者口腔生物材料植入后的抗病毒治疗提供了理论依据。

[关键词] 巨细胞病毒; 口腔植入材料; 免疫抑制; 聚甲基丙烯酸甲酯

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)04-0322-06

科学技术的飞速发展, 使得越来越多的医用生物材料进入了口腔临床和颌面部修复的领域。相对于传统的金属或者非金属陶瓷材料, 新型生物材料具有很强的抗冲击性和抗摩擦性, 在使用过程中磨损率也很低^[1]。目前高分子材料是各种口腔科生物医学材料的首选^[2]。聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)具有透明性极好、强度高、耐光老化和质轻坚韧等优点。近期的研究发现PMMA植入后, 其细

胞毒性和对机体免疫系统的影响均很小, 因此被认为是牙修复材料很好的选择^[3-4]。巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)是一种常见的机会性感染病毒, 在人群中感染非常普遍, 与口腔溃疡和急性牙周炎等口腔疾病的发生紧密相关^[5-7]。然而, CMV感染对口腔生物材料植入后免疫系统的作用, 目前研究还很少。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

SPF级雄性BALB/c小鼠45只, 4周龄, 体重12~15 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011]; CMV购自生工生物工程(上海)有限公司, 将CMV进行10倍稀释后定量接种细胞, 按Reed-Muench法

[收稿日期] 2020-03-13

[基金项目] 四川省科技计划项目(2015SZ0108)

[作者简介] 江 蓉(1973—), 女, 本科, 副主任医师, 主要从事口腔全科研究。E-mail: jiangg66@126.com

[通信作者] 张齐梅(1983—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 牙周和口腔黏膜。

E-mail: 2465472105@qq.com

计算病毒致半数细胞感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 为 10⁵ U/0.1 mL; PMMA 购自上海众荣新材料科技有限公司; 小鼠淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司; CD68、CD206、CCR7、CD3、CD4、CD8、CD25 和 Foxp3 抗体均购自美国 BD 公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒均购自欣博盛生物科技有限公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 酶标仪购自美国 Biotek 仪器有限公司。

1.2 动物模型的构建^[8]

本实验在西南医科大学口腔医院实验中心内开展[SYXK(川)2018-213], 设施达到 ABSL-2 级实验室相关生物安全要求。小鼠随机分为空白对照组 ($n=30$) 和病毒感染组 ($n=15$)。病毒感染组于腹腔内接种 10⁶ U/mL 的病毒悬液 10 μ L, 建立 CMV 感染小鼠模型, 空白对照组以相同方法注射相同体积的生理盐水。模型建立 7 d 后, 在无菌操作下取小鼠尾静脉血 0.1 mL, 采用酶联免疫吸附试剂盒 (南京建成生物研究所) 检测 CMV IgM 和 IgG。CMV IgM、IgG 均阳性者判断为 CMV 感染, 即模型建立成功。建模 7 d 后, 模型组小鼠死亡 2 只, 造模不成功 2 只, 空白对照组 30 只小鼠和病毒感染组 11 只小鼠用于后续研究。

1.3 PMMA 的植入

接种病毒后 7 d, 采用 1% 的戊巴比妥钠麻醉小鼠, 将 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.1 cm 的 PMMA 植入到小鼠背部皮下。小鼠共分为 3 组: 空白对照组 15 只小鼠进行假手术, 作为对照组; 空白对照组小鼠 15 只皮下植入 PMMA, 作为植入对照组; 病毒感染组小鼠 11 只皮下植入 PMMA, 作为植入 CMV 组。植入 PMMA 后 7 d, 对照组和植入对照组小鼠分别死亡 2 只, 植入 CMV 组小鼠死亡 1 只。

1.4 单核/巨噬细胞、T 细胞亚群及调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 的检测

小鼠植入 PMMA 后 7 d, 采用 1% 的戊巴比妥钠麻醉小鼠, 打开胸腔, 暴露心脏, 用针头刺入右心室, 收集小鼠的心脏血, 用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞。采用流式细胞术分别进行单核/巨噬细胞、T 细胞亚群及 Treg 细胞的检

测, 三项检测对应的流式抗体分别是 CD68、CD206 和 CCR7 抗体, CD3、CD4 和 CD8 抗体, 以及 CD4 和 CD25 抗体, 均室温孵育 20 min。采用流式细胞术分别检测 M1 型单核/巨噬细胞 (CD68⁺CCR7⁺ 细胞) 和 M2 型单核/巨噬细胞 (CD68⁺CD206⁺ 细胞) 的比例, CD4⁺T 细胞 (CD3⁺CD4⁺ 细胞) 和 CD8⁺T 细胞 (CD3⁺CD8⁺ 细胞) 的比例, 以及 Treg 细胞 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞) 的比例。

1.5 炎症因子的检测

小鼠植入 PMMA 后 7 d, 收集小鼠的心脏血, 分离出血浆, ELISA 检测 TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

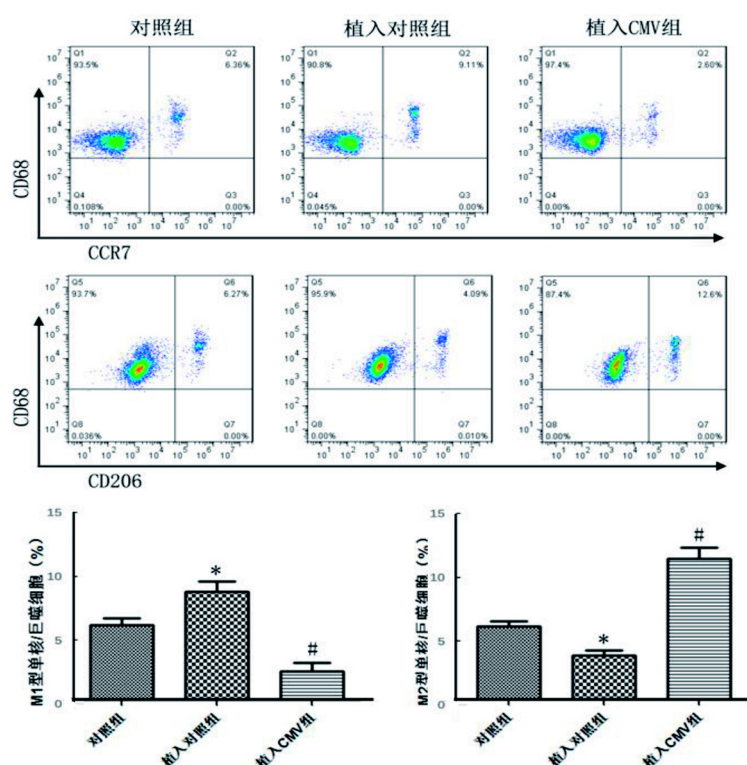
2 结果

2.1 CMV 抑制小鼠植入 PMMA 后的 M1 型单核/巨噬细胞比例升高

流式细胞术结果显示, 与对照组比较, 植入对照组外周血中 CD68⁺CCR7⁺M1 型单核/巨噬细胞的比例升高了 44.63% ($t = 2.794$, $P = 0.049$), CD68⁺CD206⁺M2 型单核/巨噬细胞的比例降低了 39.71% ($t = 3.806$, $P = 0.019$); CMV 能够显著抑制 PMMA 引起的 M1 型单核/巨噬细胞比例升高, 与植入对照组比较, 植入 CMV 组外周血中 CD68⁺CCR7⁺M1 型单核/巨噬细胞的比例降低了 73.18% ($t = 5.896$, $P = 0.004$), CD68⁺CD206⁺M2 型单核/巨噬细胞的比例则升高了 2.18 倍 ($t = 7.971$, $P = 0.001$) (图 1)。

2.2 CMV 抑制小鼠植入 PMMA 后 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值

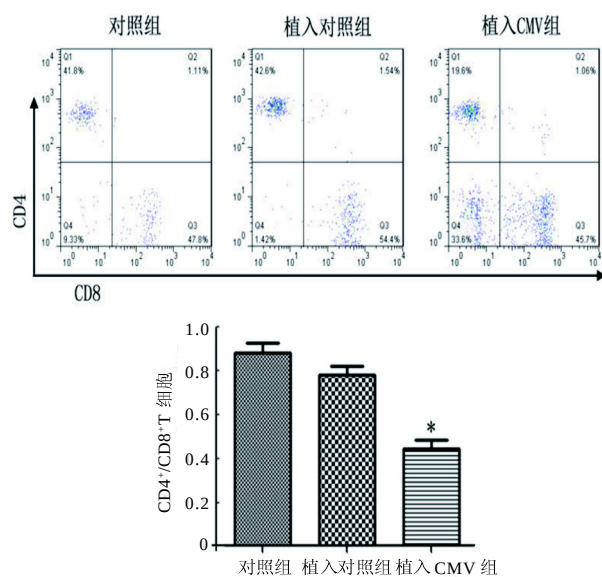
流式细胞术结果显示, 对照组与植入对照组外周血中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值没有明显差异 ($t = 1.564$, $P = 0.193$); CMV 能够显著抑制 PMMA 植入后 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值, 相对于植入对照组, 植入 CMV 组外周血中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值降低了 42.91% ($t = 6.468$, $P = 0.003$) (图 2)。



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与植入对照组比较, # $P < 0.05$ 。

图1 CMV抑制PMMA引起的小鼠M1型单核/巨噬细胞比例升高

Figure 1 Cytomegalovirus (CMV) inhibits PMMA-induced increase of the proportion of M1 monocyte/macrophage ratio in mice



与植入对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图2 CMV抑制PMMA植入后小鼠CD4⁺/CD8⁺T细胞比值

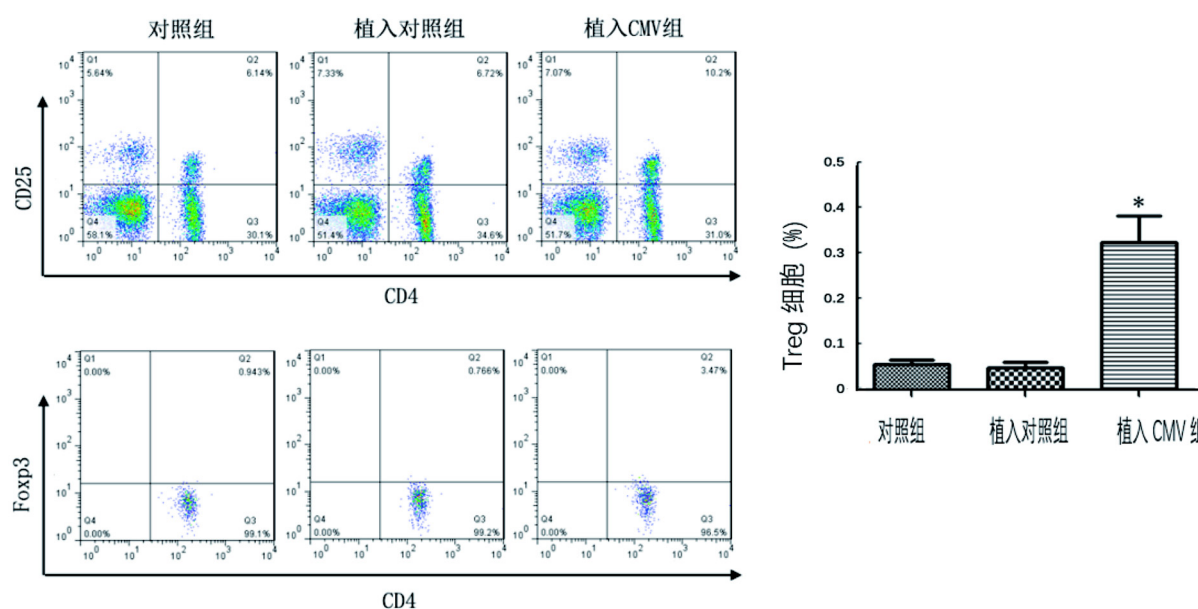
Figure 2 Cytomegalovirus (CMV) inhibits the ratio of CD4⁺/CD8⁺T cells in mice after PMMA implantation

2.3 CMV促进PMMA植入后小鼠Treg细胞比例升高

流式细胞术结果显示, 对照组与植入对照组外周血中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例没有明显差异 ($t = 0.464$, $P = 0.667$); CMV能够显著促进Treg细胞比例升高, 相对于植入对照组, 植入CMV组外周血中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例升高了2.49倍 ($t = 4.495$, $P = 0.011$) (图3)。

2.4 CMV抑制PMMA引起小鼠炎性因子含量的升高

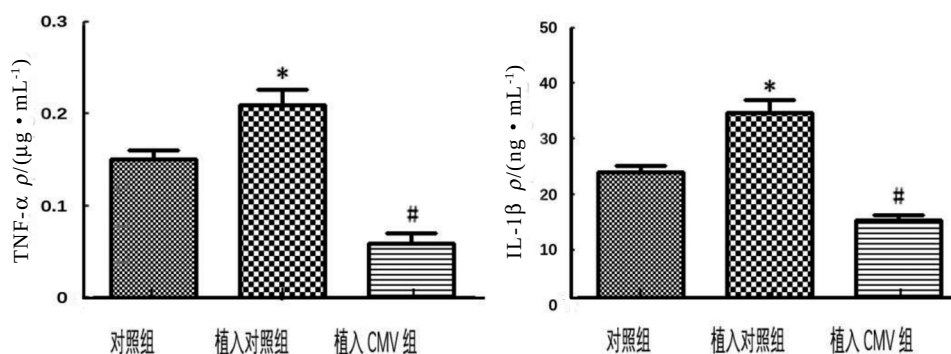
ELISA结果显示, 相对于对照组, 植入对照组外周血中TNF- α 和IL-1 β 含量分别上升39.56%和46.78% ($t = 2.897$, $P = 0.044$ 和 $t = 4.023$, $P = 0.016$); CMV能够抑制PMMA引起的炎性因子含量升高, 相对于植入对照组, 植入CMV组外周血中TNF- α 和IL-1 β 的含量分别降低了71.65%和57.95% ($t = 7.236$, $P = 0.019$ 和 $t = 7.543$, $P = 0.002$) (图4)。



与植入对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图3 CMV促进PMMA植入后小鼠Treg细胞比例升高

Figure 3 Cytomegalovirus (CMV) promotes an increase of the proportion of Treg cells in mice after PMMA implantation



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与植入对照组比较, # $P < 0.05$ 。

图4 CMV抑制PMMA引起的炎症因子含量升高

Figure 4 Cytomegalovirus (CMV) inhibits PMMA-induced increase of the concentration of inflammatory factors in mice

3 讨论

目前, 有大量的生物材料被应用于口腔医学领域, 这些材料在应用于临床前需要经过各项生物性能检测, 很多都具有良好的生物相容性和物理特性^[9]。据统计, 超过 50% 的人群感染 CMV, 在免疫力低下的情况下, CMV 可引起多种口腔疾病, 因此接受口腔植入物的患者至少有一半存在 CMV 感染^[10]。PMMA 是目前使用最多的高分子材料之一。本研究发现在正常生理情况下 PMMA

不会引起显著的炎症反应, 适度的炎症反应有利于组织的修复及清除植入局部的病原微生物; 然而在 CMV 感染的情况下, PMMA 植入后 CMV 会显著抑制局部的免疫反应, 这可能不利于损伤组织的修复。

单核 / 巨噬细胞是机体固有免疫的重要细胞, 按照其表型可以分为 M1 型和 M2 型。M1 型单核 / 巨噬细胞是主要的炎症细胞, 能够分泌炎症因子或者直接吞噬并清除植入物局部的坏死组织, 此外还能启动组织局部的修复和血管生成。

M2 型单核 / 巨噬细胞是抑制性细胞, 能够分泌免疫抑制因子, 抑制局部的炎性反应。研究发现 PPMA 植入后, 会轻微引起 M1 型单核 / 巨噬细胞升高, 降低 M2 型单核 / 巨噬细胞, 这有利于局部坏死组织的清除并抑制病原微生物的增殖^[11-13]。然而 CMV 的感染会大大降低 M1 型单核 / 巨噬细胞比例, 促进 M2 型单核 / 巨噬细胞比例的升高, 使得植入物局部成为一个免疫抑制的微环境, 不利于坏死组织的清除, 还可能引起局部感染的加重。

T 细胞是机体细胞免疫的主要细胞, CMV 感染会引起 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值下降, Treg 细胞比例升高, 使整个机体处于免疫抑制的状态。Treg 细胞是机体的主要免疫抑制细胞, 能够通过分泌 IL-10 和转化生长因子- β , 促进病原微生物的逃逸, 可能会引起或者加重机体的感染^[14-16]。本研究发现, PPMA 植入后, CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值以及 Treg 细胞比例均没有显著变化。CMV 感染会显著降低 PPMA 植入后 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值, 而 Treg 细胞比例则会显著升高, 这使得材料植入局部免疫力十分低下, 不利于坏死组织和病原微生物的清除。

本研究结果提示, CMV 能够显著抑制 PPMA 植入后的免疫反应, 可为 CMV 感染患者口腔生物材料植入后的抗病毒治疗提供参考依据。

参考文献:

- [1] Kim YJ, Lee HJ, Ryu JS, et al. Prospective clinical trial of corneal reconstruction with biomaterial-free cultured oral mucosal epithelial cell sheets[J]. *Cornea*, 2018, 37(1):76-83.
- [2] Gholamreza M, Mohammadreza M, Amir EL, et al. Organoclay nanoparticles interaction in PU:PMMA IPN foams: Relationship between the cellular structure and damping-acoustical properties[J]. *Appl Acoust*, 2020, 164(7):12-19.
- [3] Xu Y, Qin JX, Zhang XF, et al. Enhancing scratch damage resistance of PMMA via layer assembly with PVDF: Numerical modeling prediction and experimental verification[J]. *Polymer*, 2020, 194(40):5854-5867.
- [3] Chen Y, Fuchise K, Narumi A, et al. Core-first synthesis of three-, four-, and six-armed star-shaped poly(methyl methacrylate)s by group transfer polymerization using phosphazene base[J]. *Macromolecules*, 2016, 44(44):9091-9098.
- [4] Yehonatan P, Michal TO, Ella M, et al. Diagnosing congenital cytomegalovirus by saliva on Guthrie paper[J]. *J Clin Virol*, 2020, 510(1):323-335.
- [5] Åsberg A, Humar A, Rollag H, et al. Lessons learned from a randomized study of oral valganciclovir versus parenteral ganciclovir treatment of cytomegalovirus, disease in solid organ transplant recipients: The VICTOR Trial[J]. *CID*, 2016, 62(9):1154-1160.
- [6] Popovic J, Gasic J, Zivkovic S, et al. Prevalence of human cytomegalovirus and Epstein-barr virus in chronic periapical lesions[J]. *Intervirology*, 2015, 58(5):271-277.
- [7] Torres MN, Valdes NB, Almirall JR. Comparison of portable and benchtop GC-MS coupled to capillary microextraction of volatiles (CMV) for the extraction and analysis of ignitable liquid residues[J]. *Forensic Chem*, 2020, 74(14):57-60.
- [8] 季育华, 朱月秋, 陈淑云. 小鼠巨细胞病毒模型的建立[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1998, 28(1):58-60.
- [9] Stavropoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, et al. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models[J]. *Periodontology*, 2015, 68(1):55-65.
- [10] Swanson EC, Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy [J]. *PCNA*, 2013, 60(2):335-349.
- [11] Teixeira D, Marques C, Pestana D, et al. Effects of xenoestrogens in human M1 and M2 macrophage migration, cytokine release, and estrogen-related signaling pathways[J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(11):1496-1509.
- [12] Rojas A, Delgado-López F, Perez-Castro R, et al. HMGB1 enhances the protumoral activities of M2 macrophages by a RAGE-dependent mechanism[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3):3321-3329.
- [13] Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, et al. DPP-4 inhibition by linagliptin attenuates obesity-related inflammation and insulin resistance by regulating M1/M2 macrophage polarization [J]. *Diabetes*, 2016, 65(10):2966-2979.
- [14] Gerriets VA, Kishton RJ, Johnson MO, et al. Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(12):1459-1466.
- [15] Zheng Y. A rogue Foxp3 mutant undermines treg cell function[J]. *Immunity*, 2017, 47(2):211-214.
- [16] Wu M, Lou J, Zhang S, et al. Gene expression profiling of CD8⁺ T cells induced by ovarian cancer cells suggests a possible mechanism for CD8⁺ Treg cell production[J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(6):669-677.

Inhibiting Effects of Cytomegalovirus on Partial Immune Index of Mice Implanted with Methacrylate

JIANG Rong¹, ZHANG Qimei²

(1. Department of Dental, People's Hospital of Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture, Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture 624000, China;

2. Department of Periodontal Mucosa, Southwest Medical University Affiliated Stomatological Hospital, Luzhou 646000, China)

[Abstract] Objective To study the effect of cytomegalovirus (CMV) on the immune response after polymethyl methacrylate (PMMA) implantation. **Methods** A mouse model of CMV infection was constructed by intraperitoneal injection. After 7 days of inoculation, PMMA was implanted into the subcutaneous of back in mice. The proportion of monocytes / macrophages, CD4⁺T cells, CD8⁺T cells and regulatory T cells (Treg cells) in peripheral blood was detected by flow cytometry, and the concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin -1 β (IL-1 β) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the implantation control group, the proportion of M1 mononuclear / macrophages in peripheral blood decreased by 73.18% ($t=5.896$, $P=0.004$), the proportion of M2 monocytes / macrophages increased by 2.18 times ($t=7.971$, $P=0.001$), and the CD4⁺/CD8⁺T cell ratio decreased by 42.91% ($t=6.468$, $P=0.003$), while the Treg cell proportion increased by 2.49 times ($t=4.495$, $P=0.011$). Compared with the implanted control group, the concentrations of TNF- α and IL-1 β in peripheral blood of implanted CMV group were reduced by 71.65% and 57.95% ($t=7.236$, $P=0.019$; $t=7.543$, $P=0.002$), respectively. **Conclusion** The CMV can significantly inhibit the immune response after PPMA implantation, which provides theory evidence for the treatment of CMV-infected patients after oral biomaterials implantation.

[Key words] Cytomegalovirus; Oral implant materials; Immunosuppression; Polymethyl methacrylate