

## 叉头样转录因子3在粪肠球菌感染模型大鼠难治性根尖周炎病变中的表达

李梦菲<sup>1</sup>, 仇红<sup>2</sup>, 赵少剑<sup>1</sup>, 殷广浩<sup>1</sup>, 王其宝<sup>2</sup><https://doi.org/10.12307/2022.943>

投稿日期: 2021-12-23

采用日期: 2022-02-09

修回日期: 2022-04-21

在线日期: 2022-05-30

中图分类号:

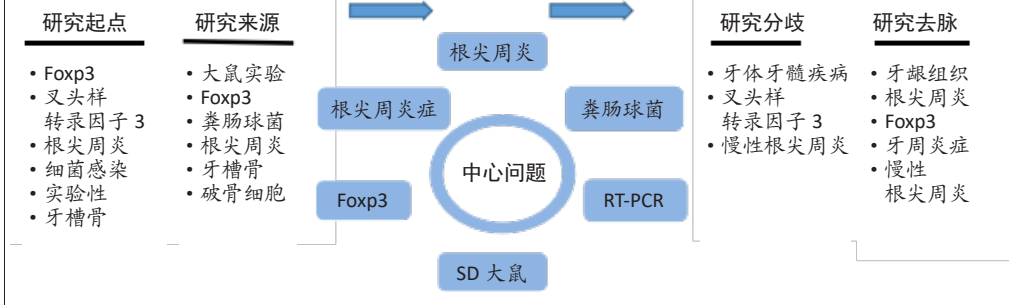
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2023)08-01187-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读: Fcpx3在粪肠球菌感染大鼠难治性根尖周炎病变中的作用



## 文题释义:

**难治性根尖周炎:**慢性根尖周炎持续发展,表现为复发性的根尖周脓肿并导致严重的牙槽骨破坏,临床上对其的常规治疗为根管治疗,但经过反复数次治疗仍然迁延不愈的被称为难治性根尖周炎。

**叉头样转录因子3(forkhead box protein 3, Fcpx3):**调节性T细胞(Treg)在机体自身免疫调节中充当着关键角色,其标志性分子之一是核转录因子Fcpx3, Fcpx3是Fcpx家族中一位重要成员,可以直接通过调节各种各样特殊基因来影响调节性T细胞的活性。该基因缺失可以引起不同程度的免疫性疾病。

## 摘要

**背景:**粪肠球菌作为优势菌的难治性根尖周炎是一种经过反复多次的根管治疗之后仍然伴随着持续性炎症和骨吸收的疾病。多种实验表明,叉头样转录因子3(forkhead box protein 3, Fcpx3)通过影响机体自身免疫反应参与各种炎症疾病。

**目的:**观察Fcpx3在粪肠球菌感染的大鼠难治性根尖周炎病变中的表达情况。

**方法:**6周龄SD大鼠32只,随机各挑选16只分成未封菌组和封菌组。将32只大鼠在无痛条件下行双侧下颌第1磨牙中央窝开髓,未封菌组放入PBS小棉球,封菌组放入粪肠球菌混悬液小棉球,随后在双侧髓腔放置流动树脂后光固化。常规水食室温饲养,于1, 2, 3, 4周两组各随机选取4只大鼠取下颌骨组织;并以0周大鼠未做开髓处理为空白对照组。用苏木精-伊红染色观察大鼠根尖周部位的炎症组织病理变化;RT-PCR和免疫组织化学检测根尖周组织Fcpx3的表达变化。

**结果与结论:**①苏木精-伊红染色显示:未封菌组、封菌组大鼠根尖周炎的动物模型均建立成功,根尖周围组织区域均可见到明显的炎症细胞的浸润;②RT-PCR结果显示:Fcpx3在未封菌组根尖周组织区域的mRNA表达水平呈现1-4周逐步递增,封菌组根尖区组织Fcpx3的mRNA表达水平在3周达到高峰后下降,在2, 4周与未封菌组比较,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );③免疫组织化学结果显示:未封菌组中Fcpx3的阳性细胞表达量随着时间递增,封菌组在第3周表达高峰后第4周下降,与RT-PCR的结果一致( $P < 0.05$ );④结论:Fcpx3参与慢性根尖周炎和难治性根尖周炎的进展过程;在炎症慢性期,Fcpx3在难治性根尖周炎中表达明显降低,提示其可能与粪肠球菌有一定的关系。

**关键词:**慢性根尖周炎;难治性根尖周炎;粪肠球菌;FOXP3;大鼠

**缩略语:**叉头样转录因子3: forkhead box protein 3, Fcpx3;调节性T细胞: regulatory T cell, Treg

Expression of forkhead box protein 3 in refractory periapical periodontitis in rats with *Enterococcus faecalis* infectionLi Mengfei<sup>1</sup>, Zhang Hong<sup>2</sup>, Zhao Shaojian<sup>1</sup>, Yin Guanghao<sup>1</sup>, Wang Qibao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Stomatology, Binzhou Medical University, Yantai 264000, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Second Department of Dentistry and Endodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China

Li Mengfei, Master, School of Stomatology, Binzhou Medical University, Yantai 264000, Shandong Province, China

**Corresponding author:** Wang Qibao, Master, Associate professor, Second Department of Dentistry and Endodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Refractory periapical periodontitis, with *Enterococcus faecalis* as a dominant bacterium, is a disease that continues with persistent inflammation and bone resorption after repeated and multiple root canal treatments. Multiple experiments have shown that forkhead box protein 3 (Fcpx3) is involved in

<sup>1</sup>滨州医学院口腔医学院,山东省烟台市 264000; <sup>2</sup>济南市口腔医院牙体牙髓病二科,山东省济南市 250000

第一作者:李梦菲,女,1993年生,河北省永清县人,汉族,2022年滨州医学院毕业,硕士,主要从事牙体牙髓病学的研究。

通讯作者:王其宝,硕士,副教授,济南市口腔医院牙体牙髓病二科,山东省济南市 250000

<https://orcid.org/0000-0003-3728-090X> (李梦菲)

基金资助:山东省医药卫生科技发展计划(2018ws483),项目负责人:王其宝

引用本文:李梦菲,仇红,赵少剑,殷广浩,王其宝.叉头样转录因子3在粪肠球菌感染模型大鼠难治性根尖周炎病变中的表达

[J].中国组织工程研究,2023,27(8):1187-1192.



various inflammatory diseases by influencing the body's autoimmune response.

**OBJECTIVE:** To observe the expression of Foxp3 in refractory periapical periodontitis in *Enterococcus faecalis*-infected rats.

**METHODS:** Thirty-three Sprague-Dawley rats at the age of 6 weeks were selected as experimental objects, 32 of which were randomly selected and divided into control and experimental groups. These 32 rats were submitted to open pulp in the central fossa of bilateral mandibular first molars under painless conditions. PBS pellets and *Enterococcus faecalis* suspension pellets were placed into the pulp in the control and experimental groups, respectively, followed by light curing after placing flowing resin in the bilateral inner medullary cavities. At 1, 2, 3, 4 weeks after regular water and food feeding in room temperature, four rats from each group were randomly selected for euthanasia. Rats aged 0 week without dental pulp opening were used as blank controls. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the inflammatory histopathological changes in the experimental periapical sites of rats. RT-PCR and immunohistochemical detection were used to detect the expression of Foxp3 in the periapical tissue.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Hematoxylin-eosin staining results showed that: the animal models of periapical periodontitis were successfully established in the control and experimental groups and obvious inflammatory cell infiltration was seen in the periapical tissue. The results of RT-PCR showed that the mRNA expression level of Foxp3 in the periapical tissue in the control group rose in a stepwise manner from 1 to 4 weeks, while the mRNA expression level of Foxp3 in the periapical tissue in the experimental group decreased after peaking at 3 weeks ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical results showed that the Foxp3-positive cell expression in the control group increased with time, while that in the experimental group decreased at the 4<sup>th</sup> week after the expression peaked at the 3<sup>rd</sup> week, which was consistent with the results of RT-PCR ( $P < 0.05$ ). To conclude, Foxp3 is involved in the progression of chronic and refractory periapical periodontitis. In the chronic phase of inflammation, the expression of Foxp3 is significantly decreased in refractory periapical periodontitis, suggesting that it may have some relationship with *Enterococcus faecalis*.

**Key words:** chronic periapical periodontitis; refractory periapical periodontitis; *Enterococcus faecalis*; FOXP3; rat

**Funding:** Shandong Provincial Pharmaceutical Health Science and Technology Development Program, No. 2018ws483 (to WQB)

**How to cite this article:** LI MF, ZHANG H, ZHAO SJ, YIN GH, WANG QB. Expression of forkhead box protein 3 in refractory periapical periodontitis in rats with *Enterococcus faecalis* infection. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(8):1187-1192.

## 0 引言 Introduction

慢性根尖周炎是一种慢性炎症性疾病，是发生在牙齿根尖组织并由混合细菌感染所导致。临床上根管治疗是慢性根尖周炎的最佳治疗方法，然而这种治疗可能会失败。这可能是粪肠球菌作为优势菌群造成的，这类疾病被称为难治性根尖周炎<sup>[1]</sup>。研究表明，粪肠球菌是迁延不愈的难治性根尖周炎的优势菌群<sup>[2-3]</sup>。

叉头样转录因子 3(forkhead box protein 3, Foxp3) 是 Foxp 大家族中十分重要的一员，参与调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg) 的活性调节。研究发现，在细胞核中特异性表达 Foxp3 的天然 Treg 存在于正常个体中，并积极参与抑制针对自身、微生物和环境抗原的异常或过度的免疫反应，在感染性疾病中，像疟疾、血吸虫病、RSV 感染、肝炎、艾滋病、新型冠状病毒肺炎，以及非感染性疾病中的 IPEX、克罗恩肠病、帕金森等，特异性表达 Foxp3 的天然 Treg 与机体病情发展息息相关，Tregs 有显著的适应环境的能力，不仅通过控制炎症，还通过更特殊的机制，如生长因子的产生，促进组织稳态<sup>[4-6]</sup>。最近的研究结果揭示了对 Treg 及其微环境的认识，以及炎症过程中稳态的潜在动力学<sup>[7]</sup>。根管治疗失败所导致的难治性根尖周炎与细菌及其毒性产物的持久性有关，它们会改变宿主的防御系统，例如，YOSHIDA 等<sup>[8]</sup>报道，超声处理的粪肠球菌提取物可以抑制或刺激牙髓干细胞中的 Tregs 增殖。

研究表明，FOXP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞(FOXP3<sup>+</sup>Treg) 参与慢性牙周炎的致病过程，其介导的免疫炎症反应减弱，会促进疾病的发生发展<sup>[9-10]</sup>。Foxp3 在动物实验性根尖周炎中的表达随着时间的发展而上升，以及在慢性根尖周炎中的高表达，推测其在慢性根尖周炎中介导免疫反应增强<sup>[11]</sup>，可能是因为 Foxp3 和 Th17(辅助性 T 细胞 17) 的失衡所致<sup>[12]</sup>。虽然 Foxp3 在慢性根尖周炎等慢性炎症中有过相关研究，但其在难治性根尖周炎中的研究较少。目前，国内外很多学者都致力于研究免疫疗法在根尖周病治疗中的应用以及细胞因子在根尖周病发生发展中的作用。因此该研究通过粪肠球菌建立大鼠难

治性根尖周炎，以 Foxp3 作为检测因子，研究其在根尖周疾病中的作用，探讨 Foxp3 与粪肠球菌、难治性根尖周炎的关系。应用组织学以及荧光定量 PCR(RT-PCR) 技术，对难治性根尖周炎中 Foxp3 的变化趋势进行了简单的观察并分析 Foxp3 在难治性根尖周炎病中可能的相关因素，为日后进一步探讨其具体作用机制以及为难治性根尖周炎的临床治疗提供医学基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，进行 One-way ANOVA 和多重比较 LSD-t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2020-2021 年在山东省口腔组织再生重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 32 只 6 周龄雄性 SD 大鼠，SPF 级，体质量 200 g 左右，健康状况可，购买于济南朋悦实验动物繁育有限公司，许可证号：SCXK(鲁)20190003。于山东省口腔重点实验室动物实验中心常规水食饲养。实验方案经济南市口腔医学院动物实验伦理委员会批准。

1.3.2 主要实验仪器 便携式电动牙科手机(啄木鸟 HL11-M4, 中国); 电热恒温培养箱(天津市中环实验电炉有限公司 HH.B11-420, 中国); 石蜡切片机(LEICA 2235, 德国); 光学显微照相系统(OLYMPUS BX-51, 日本); Real Time PCR 仪(LIGHTCYCLER96, 瑞士); 石蜡包埋机(SLEE MPS-P, 德国); 烘片仪(孝感市诺普电子科技有限公司 NP-P2, 中国)。

1.3.3 主要实验试剂 粪肠球菌[微生物菌种保存中心(ATCC29212), 中国]; DAB 显色试剂盒(中杉金桥, 中国); 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(Solarbio, 中国); Foxp3 多克隆抗体(博奥森 bs-10211R, 中国); 小鼠/兔链霉卵白素-生物素法检测系统(中杉金桥 SP-9000, 中国); PrimeScript<sup>TM</sup>RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa No.RR047A, 日本); TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (TaKaRa No.RR820A, 日本); 柱式

Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (生工生物 UNIQ-10, 中国)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 建立实验动物模型** 选取 6 周龄左右的 SD 大鼠, 随机各选 16 只为未封菌组和封菌组。建立实验模型: 未封菌组大鼠两侧下颌第 1 磨牙开髓后用根管锉探查根管, 确保开髓成功, 髓腔中封入含有 PBS 无菌缓冲液的棉球; 封菌组大鼠相同方法开髓后封入含有粪肠球菌悬液 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL) 的棉球。两组的冠方封闭均用流动树脂充填, 光固化灯光照固化。水食室温条件喂养, 时间截点选择 1, 2, 3, 4 周, 收集大鼠下颌骨组织, 空白对照组不予开髓处理, 设成 0 周组。

#### 组织工程实验动物造模中的相关问题

造模目的	观察大鼠难治性根尖周炎中 Foxp3 的表达
借鉴已有标准动物实验造模	参考文献 [13] 建立大鼠下颌第 1 磨牙难治性根尖周炎模型
动物来源及品系	SPF 级 SD 大鼠购于济南朋悦实验动物繁育有限公司
造模技术描述	全麻后在大鼠双侧下颌第 1 磨牙中央窝开髓, 未封菌组封 PBS 小棉球, 封菌组封粪肠球菌 PBS 混悬液小棉球, 分别于 1, 2, 3, 4 周取材
动物数量及分组方法	32 只 SD 大鼠, 随机分成未封菌组、封菌组, 并以 0 周未开髓处理为空白对照组
造模成功评价指标	通过苏木精-伊红染色观察根尖周部位的组织学变化
造模后实验观察指标	①根尖病损区域 Foxp3 阳性细胞的表达量; ②根尖周组织 Foxp3 mRNA 的表达
造模后动物处理	大鼠在全麻下处死, 分离下颌骨, 待检测
伦理委员会批准	实验方案经过济南市口腔医院动物实验伦理委员会批准

**1.4.2 制备标本及石蜡切片** 3% 戊巴比妥钠按 0.01 mL/g 进行腹腔注射麻醉, 40 g/L 多聚甲醛进行组织内固定, 见大鼠四肢呈僵直状态剥离大鼠双侧下颌骨, 放入甲醛固定 24-48 h。10%EDTA(pH 值 7.2-7.4) 中磁力搅拌器上室温脱钙 2 个月, 梯度乙醇脱水后透明浸蜡, 制作石蜡包块, 3 个月内进行石蜡切片, 厚度 5  $\mu$ m, 4  $^{\circ}$ C 保存。

**1.4.3 苏木精-伊红染色观察根尖周组织学变化** 常温下石蜡切片脱蜡复水; 苏木精染色 1 min, 自来水浸泡 3 min; 伊红复染 3 min, 自来水浸泡; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明; 中性树胶封固; 于通风橱晾干后显微镜下拍照, 观察根尖周组织的变化, 判断模型是否建立成功。

**1.4.4 免疫组织化学 (IHC) 染色观察根尖部位 Foxp3 的表达** 石蜡切片烤片后脱蜡复水, 室温下 PBS 清洗 3 次, 5 min/次; 0.1% 胰酶进行抗原修复, 37  $^{\circ}$ C, 15 min; 室温下 PBS 清洗 3 次, 5 min/次; 体积分数 3%  $H_2O_2$  孵育, 37  $^{\circ}$ C, 20 min; 室温下 PBS 清洗 3 次, 5 min/次; 山羊血清封闭液封闭, 37  $^{\circ}$ C, 30 min; 滴加 Foxp3 抗体 (1 : 150) 孵育过夜, 4  $^{\circ}$ C; 次日取出后室温下 PBS 清洗 3 次, 5 min/次; 滴加生物素标记抗小鼠 / 兔 IgG 聚合物孵育, 37  $^{\circ}$ C, 30 min; 室温下 PBS 清洗 3 次, 5 min/次; 滴加辣根酶标记链卵白素工作液, 37  $^{\circ}$ C, 20 min; 室温下 PBS 清洗 3 次, 5 min/次; 镜下控制 DAB 显色,

苏木精复染, 温水返蓝后梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 显微镜计数。镜下显示成黄褐色或者棕褐色颗粒的记为阳性细胞个数。低倍镜下寻找到实验牙位的根尖周病变区域, 每个根尖周围随机选取 5 个高倍镜 (400x) 下该区域内非连续视野进行拍照, 对阳性细胞计数后取均值, 每组实验重复 3 次。

**1.4.5 RT-PCR 检测根尖周部位 Foxp3 的表达** 大鼠处死后在冰上立即取下下颌第 1 磨牙根尖组织样本, 用 TRIZOL 法提取动物组织 RNA, 根据 RNA 浓度进行稀释, -80  $^{\circ}$ C 储存备用, 进行反转录成 cDNA 保存在 -20  $^{\circ}$ C。取材流程可见图 1。

由苏州金唯智生物科技有限公司设计并合成引物。Foxp3 上游引物序列: CCT GCC ACC TGG GAT CAA TG, 下游引物序列: CGT GGG AAG GTG CAG AGT AG; 选取 GAPDH 为设定内参, 其上游引物序列: TCT CTG CTC CTC CCT GTT CT, 下游引物序列: ATC CGT TCA CAC CGA CCT TC。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s; 循环 40 次。每个样本设 3 个复孔, 20  $\mu$ L 反应体系, 通过熔融曲线分析确定引物的特异性。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算样本 mRNA 的相对变化量, 每组实验重复 3 次。

**1.5 主要观察指标** ①大鼠根尖周组织病损区 Foxp3 阳性细胞的表达量; ②大鼠根尖周组织病损区 Foxp3 的 mRNA 表达情况。

**1.6 统计学分析** 结果中相关数据全部用  $\bar{x} \pm s$  表示, 通过 Graphpad Prism 8.0 软件进行分析, 同时运用 One-way ANOVA 法和多重比较 LSD-t 检验, 比较两组之间 Foxp3 的表达情况。P < 0.05 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经滨州医学院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 32 只大鼠分为 2 组, 全部纳入统计分析。

**2.2 苏木精-伊红染色结果** 大鼠 0 周时正常根尖周范围未见明显炎症。未封菌组和封菌组开髓术后 1 周, 可见少量以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润, 并且炎症浸润范围比较小, 未见明显骨破坏区域; 术后 2 周, 牙槽骨吸收明显, 并且炎症浸润带扩大, 出现了淋巴细胞、巨噬细胞; 术后 3 周, 炎症进入慢性期, 虽然牙槽骨吸收加剧, 炎症反应继续加重, 同时也伴有毛细血管与成纤维细胞增生的机体修复状态; 术后 4 周, 炎性细胞可见明显减少, 且局限在根尖部位, 可见散在淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润, 表现慢性浸润状态, 牙槽骨破坏最严重。苏木精-伊红染色结果显示, 封菌组和未封菌组均成功构建根尖周炎, 见图 2。

**2.3 免疫组织化学染色结果** 通过免疫组织化学染色检测 Foxp3 在大鼠根尖周的表达, 其主要定位于淋巴细胞, 表达在淋巴细胞核内, 阳性细胞的染色呈黄褐色和深褐色, 低倍镜下寻找到实验牙位的根尖周病变区域, 随后对阳性细胞计数后取均值, 观察 Foxp3 的表达变化, 见图 3。

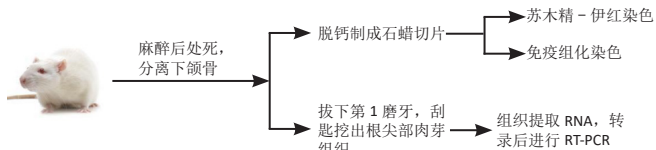
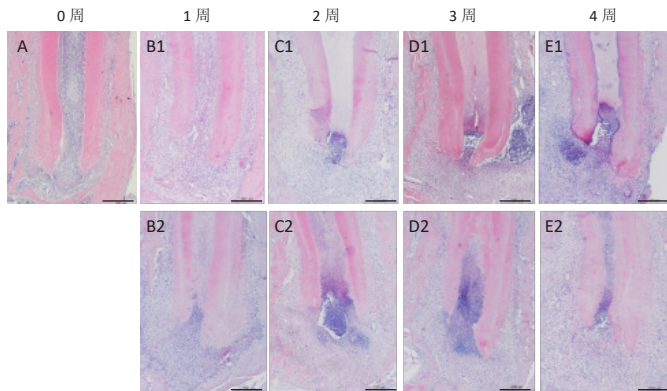


图 1 | 实验大鼠取材流程

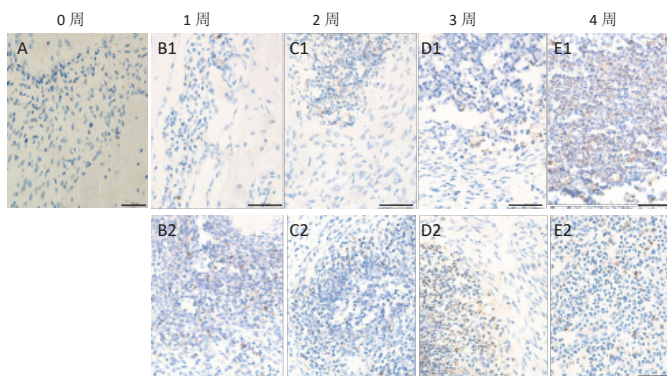
Figure 1 | Preparation of raw materials from rats



图注：图 A 为空白对照组，B1-E1 为未封菌组；B2-E2 为封菌组。结果显示：0 周时根尖周膜宽度正常，未见明显炎症细胞；未封菌组和封菌组 1 周时根尖周组织区域炎症范围散在分布，2, 3 周时炎症范围进一步扩大，炎症进入进展期，4 周时炎症细胞可见明显减少，且局限在根尖部位，可见散在淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润，表现慢性浸润状态，牙槽骨破坏最严重

图 2 | 大鼠根尖周组织苏木精-伊红染色图片 (标尺=200 μm)

Figure 2 | Hematoxylin-eosin staining of rat periapical tissues in control and experimental groups (scale bar=200 μm)



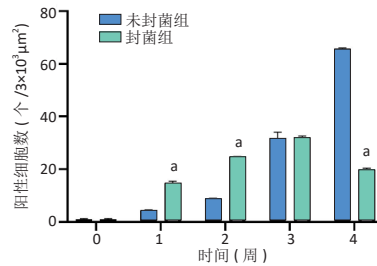
图注：图 A 为空白对照组，B1-E1 为未封菌组；B2-E2 为封菌组。结果显示：未封菌组中 Foxp3 在 4 周时表达量最多；在封菌组中 Foxp3 在 3 周时表达量最多

图 3 | 大鼠根尖周组织免疫组化染色观察 Foxp3 的表达 (标尺=20 μm)

Figure 3 | Immunohistochemical detection of the expression of Foxp3 in the rat periapical tissue (scale bar=20 μm)

0 周组大鼠根尖周几乎无 Foxp3 的表达；未封菌组大鼠 Foxp3 在 1, 2 周表达量较低，3 周开始上升，4 周达到高峰；封菌组大鼠 Foxp3 在 1, 2 周表达较低，3 周时到达高峰，4 周时降低，低于未封菌组；1, 2, 4 周大鼠 Foxp3 表达两组间比较差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )；3 周时 Foxp3 表达两组差异之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，见图 4。

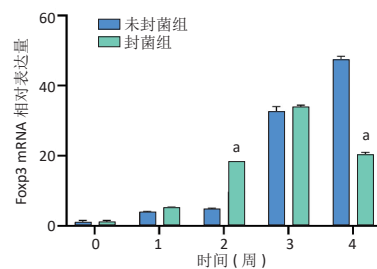
2.4 RT-PCR 结果 通过 RT-PCR 检测 Foxp3 在大鼠根尖周组织部位 mRNA 表达情况。未封菌组和封菌组根尖周组织区域中的 Foxp3 均较 0 周时高 ( $P < 0.05$ )；未封菌组大鼠 1, 2, 3 周



图注：与未封菌组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 4 | 未封菌组和封菌组大鼠 Foxp3 的免疫组织化学染色的统计学分析  
Figure 4 | Statistical analysis results of immunohistochemical staining of Foxp3 in control and experimental groups

时轻微增高，4 周时达到峰值；封菌组大鼠 1, 2, 3 周逐步增高，且均比未封菌组高，3 周到达峰值后开始降低，2 周封菌组大鼠 Foxp3 mRNA 表达显著高于未封菌组，差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )，见图 5。



图注：与未封菌组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 5 | 未封菌组和封菌组大鼠 Foxp3 mRNA 相对表达量的统计学分析  
Figure 5 | Statistical analysis results of the relative Foxp3 mRNA expression in control and experimental groups

### 3 讨论 Discussion

根尖周疾病的临床治疗主要目的是清除引起根管感染的细菌。然而，在某些情况下，根管治疗并不能完全将感染彻底清除，在 X 射线片上的根尖周围组织仍表现为持续性低密度影像。粪肠球菌是在根管治疗仍未痊愈的根管内最常检测出的细菌，在难治性根尖周炎病例中的检出率为 22%–77%，因此被认为是难治性根尖周炎的主要致病菌<sup>[3, 14-15]</sup>。粪肠球菌极容易获得耐药性，因为它可以在根管冲洗和药物的苛刻条件下生存，所以根管治疗并不能解决其根本问题。粪肠球菌通过黏附于宿主细胞表面释放毒性，不仅有脂磷壁酸 (LTA) 具有代表性的毒力因子，也包括聚集物质、表面黏附素和透明质酸酶等通过作用宿主炎症免疫应答的多个元件，从而不断入侵宿主的免疫防御，影响根尖周区的病变愈合<sup>[16-18]</sup>。在根尖周微环境中，有很多组织破坏与重建过程中的主要调节剂如转化生长因子、肿瘤坏死因子、白细胞介素等是影响炎症免疫反应的重要因素<sup>[19-20]</sup>。

在根尖周炎中公认的很重要是 Th1 和 Th2 样细胞因子的发病机制<sup>[21]</sup>，然而最近研究发现根尖周病变发病机制中免疫调节机制和效应 T 细胞反应之间的相互作用是至关重要的，CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>Treg 和辅助性 T 细胞 (Th17) 的失调模式改变了以往大家固有的 Th1/Th2 模式的思路。Treg/Th17 解释了越来越多疾病的免疫及炎症过程，包括牙周病和其他涉及进行性

骨吸收的疾病<sup>[22]</sup>。

Foxp3 是一个独特和精确的标记物,其决定着 Treg 细胞分化和功能,即 Foxp3 是公认的 Treg 标志性基因,因此可以作为这种细胞类型的一个关键性转录调控蛋白<sup>[23]</sup>。Foxp3 基因在小鼠身上被证明了其缺失会导致全身各种免疫炎症反应甚至导致死亡<sup>[24]</sup>。Foxp3 分泌的白细胞介素 10、转化生长因子  $\beta$  能抑制效应 T 细胞的增殖分化,发挥免疫抑制、诱导免疫耐受和抗炎效应,同时大量的转化生长因子  $\beta$  也可以激活原始 T 细胞中释放 Foxp3,继续产生抗炎反应<sup>[25]</sup>。Th17 依赖维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$ t (retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t, ROR $\gamma$ t) 分化后可以聚集中性粒细胞和巨噬细胞,促进炎症发展,而 ROR $\gamma$ t 是由白细胞介素 6 和白细胞介素 23 通过激活信号转导子和转录激活子 (STAT3) 诱导的<sup>[26]</sup>,然而,白细胞介素 6 的存在却抑制了 Foxp3 的表达<sup>[27]</sup>,同时白细胞介素 6 竞争结合转化生长因子  $\beta$ ,诱导 ROR $\gamma$ t 并导致 Th17 分化。所以说 Foxp3<sup>+</sup>Treg 和 Th17 的失衡会导致多种炎症性疾病。

近几年, Foxp3 在慢性牙周炎中的研究成为热点,所以此次实验研究 Foxp3 在慢性根尖周炎以及难治性根尖周炎病程变化中不同时间截点中的表达量变化,利用苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色、RT-PCR 方法对成功建立的大鼠实验性根尖周炎以及口腔内粪肠球菌感染的模型中做了表达检测,对 Foxp3 在难治性根尖周炎发展中的作用以及其可能性进行了初步的探讨。此次实验发现, Foxp3 的表达在实验性根尖周炎以及难治性根尖周炎的动物模型中,会随着病情发展变化呈现出一定的规律性表现:1 周,根尖区均可见免疫炎症反应,是少量中性粒细胞浸润的轻度炎症表现;2 周,根尖区中性粒细胞以及淋巴细胞等大量炎症细胞较大范围浸润,同时开始伴随着轻微骨破坏,炎症开始进入急性期;3 周,两组根尖周围病变均开始慢慢发展为慢性炎症阶段,可见病损周围的纤维结缔组织增生与骨吸收的机体修复与破坏方式并行;4 周,可见根尖周围破坏严重,明显形成了炎症灶,炎症范围慢慢局限在了根尖周区域,淋巴细胞、中性粒细胞等炎症细胞散在浸润。与此同时,发现大鼠根尖病损区域的 Foxp3 阳性表达水平在未封菌组中 4 周到达峰值,但是在封菌组中 3 周达到峰值,然后开始降低,4 周时明显低于未封菌组;RT-PCR 检测 Foxp3 在两种根尖周病损组织中表达情况与免疫组织化学检测结果基本相似;同时,未封菌组呈上升趋势,4 周达到高峰,而封菌组呈倒“V”型,3 周到达高峰后降低,各组之间比较差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。对于封菌组 3 周组可能由于 RNA 反转录以及翻译成蛋白质时有一些情况,干扰了 Foxp3 在基因和蛋白水平上表达的一致性。封菌组前 3 周相较未封菌组增长快速,范围更大的原因可能是粪肠球菌作为一个炎性毒力因子在刺激中性粒细胞淋巴细胞巨噬细胞等免疫炎症细胞从骨髓间释放出来,更快激活了机体的细胞及体液免疫机制。而在 4 周时两实验组同时进入了慢性炎症期。

此次实验中发现术后 3 周,炎症开始进入慢性阶段,大量淋巴细胞在此聚集,淋巴细胞是机体免疫应答功能的重要细胞组成,对抗外界感染,是一种具有免疫识别功能的细胞系, Foxp3<sup>+</sup>Treg 是其中重要的一个分类。但奇怪的是同样处于慢性期炎症,封菌组的 Foxp3 的表达量明显低于未封菌组,这值得去思考是否因为 Foxp3 与粪肠球菌所导致的慢性炎症有某些特异性相关因素。研究发现, Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞在细菌、真菌、病毒等感染中具有保护宿主的作用。有证据证明,在沙门氏菌感染期间, Treg 抑制能力的动态调节与炎症细胞因子和纯化的 Toll 样受体配体在体外刺激后控制 Treg 抑制的能力一致<sup>[28]</sup>。Toll 样受体 2 是最早被发现的 Toll 样受体之一,位于细胞表面,可识别多种病原相关分子模式,是革兰阳性菌的主要识别受体。同样为革兰菌的粪肠球菌也通过 Toll 样受体和其他模式识别受体,刺激免疫细胞对 Treg 的刺激,对其产生巨大的抑制作用<sup>[29-30]</sup>。假设在持续感染期间,单个、多个或累积 Toll 样受体配体表达的变化控制着介导抑制的 Treg 相关分子的相对表达,沙门氏菌在这种持续感染的进展中的特异性配体及其相应的宿主受体指示减少这些 Treg 抑制<sup>[31-32]</sup>。已知粪肠球菌可以激活 Toll 样受体<sup>[5, 33-34]</sup>,从而推测其在体内通过抑制 Foxp3<sup>+</sup>Treg,继而影响了 Treg 和 Th17 之间的平衡,使得机体对抗细菌感染的能力减弱。所以此次实验中借鉴已有成熟实验,通过髓腔内封含有粪肠球菌混悬液的体内模型<sup>[13, 35]</sup>,观察发现在慢性期的难治性根尖周炎模型中, Foxp3 的表达量明显低于普通根尖周炎模型的慢性期,进而推测因为粪肠球菌的毒力因子脂磷壁酸的刺激下,导致炎症细胞因子 Toll 样受体激活,抑制 Foxp3<sup>+</sup>Treg 的细胞增殖,导致了 Foxp3<sup>+</sup>Treg 和 Th17 的失衡,影响 T 细胞发挥自身免疫抗炎,使得根尖周的一种持续性骨破坏以及根尖周的生物膜难以轻易消除,从而成为了难治性根尖周炎。但是,该实验仍存在一定的局限性,并未具体研究难治性根尖周炎中 Foxp3 和 Th17 的关系,因此对于 Foxp3 在难治性根尖周炎中的调节剂机制仍尚不明确,今后课题组将继续研究粪肠球菌抑制 Foxp3 的机制,为难治性根尖周炎的临床治疗提供新思路。

通过该实验得出 Foxp3 不仅同时参与了慢性根尖周炎和难治性根尖周炎的致病过程。同时在难治性根尖周炎的慢性期, Foxp3 与难治性根尖周炎的优势菌——粪肠球菌密切相关。综合以往关于 Foxp3 的免疫炎症相关的复杂相关研究考虑,需要进一步认识到该转录因子的多种生物学功能,认清其在难治性根尖周炎中作用机制,以促进全新或更有效的治疗策略发展。

致谢:首先感谢我的导师对我的悉心指导,感谢师姐师弟的帮助使论文更加完善。

作者贡献:实验设计由第一作者和通讯作者,实施为全体作者,第一作者成文,通讯作者评估。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**出版规范:** 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- [1] 凌均荣, 韦曦, 刘红艳. 难治性根尖周炎的病因及防治策略 [J]. 中华口腔医学杂志, 2010,45(1):52-57.
- [2] ZHANG C, DU J, PENG Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod.* 2015;41(8):1207-1213.
- [3] PERSOON IF, ÖZOK AR. Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections. *Curr Oral Health Rep.* 2017;4(4):278-285.
- [4] 张昱佳, 钱友坤, 朱一成, 等. FOXP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与非感染性炎症疾病 [J]. 生命科学, 2020,32(9):879-889.
- [5] 严妍, 那迪娜·帕尔哈提, 车千纪, 等. FOXP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与人体传染性疾病 [J]. 生命科学, 2020,32(11):1159-1175.
- [6] SAKAGUCHI S, MIKAMI N, WING JB, et al. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:541-566.
- [7] 伊刚, 赵毅, 解丰, 等. 单细胞 RNA 测序揭露人 FOXP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞稳定性的关键调控分子 (英文) [J]. *Science Bulletin.* 2020,65(13):1114-1124.
- [8] YOSHIDA H, JONTELL M, SUNDQVIST G, et al. Effect of sonicated material from *Fusobacterium nucleatum* on the functional capacity of accessory cells derived from dental pulp. *Oral Microbiol Immunol.* 1995;10(4):208-212.
- [9] 张文娟, 谭昭, 蔡如佳, 等. 调节性 T 细胞在慢性牙周炎小鼠模型中的作用 [J]. 中国医科大学学报, 2021,50(2):135-140.
- [10] 李宝坤, 陈晓涛, 杨柯, 等. 慢性牙周炎患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞表达 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019,33(5):487-490.
- [11] 吕广应, 刘乙臻, 张秀梅, 等. 叉头样转录因子 3 和白细胞介素 10 在慢性根尖周炎组织中的表达研究 [J]. 实用口腔医学杂志, 2019, 35(5):653-657.
- [12] YANG S, ZHU L, XIAO L, et al. Imbalance of interleukin-17<sup>+</sup> T-cell and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod.* 2014;40(1):56-62.
- [13] WANG L, JIN H, AO X, et al. JAK2-STAT3 signaling pathway is involved in rat periapical lesions induced by *Enterococcus faecalis*. *Oral Dis.* 2019;25(7):1769-1779.
- [14] STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93-98.
- [15] ZHANG C, DU J, PENG Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod.* 2015;41(8):1207-1213.
- [16] 李莹雪, 王雨霏, 张凌琳. 粪肠球菌在牙髓根尖周病中致病机制及抗菌治疗的研究进展 [J]. 口腔疾病防治, 2019,27(8):535-540.
- [17] GOMES BPFA, HERRERA DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res.* 2018;32(suppl 1):e69.
- [18] KINANE DF, LAPPIN DF, KOULOURI O, et al. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(3):534-541.
- [19] GRAVES DT, OATES T, GARLET GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;3:10.3402/jom.v3i0.5304.
- [20] COLIĆ M, GAZIVODA D, VUCEVIĆ D, et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009;47(1):101-113.
- [21] DE CARVALHO FRAGA CA, ALVES LR, DE SOUSA AA, et al. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod.* 2013;39(4):453-455.
- [22] NAUFEL AO, AGUIAR MCF, MADEIRA FM, et al. Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review. *Braz Oral Res.* 2017;31:e103.
- [23] HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science.* 2003; 299:1057-1061.
- [24] VAN DER VEEKEN J, GLASNER A, ZHONG Y, et al. The Transcription Factor Foxp3 Shapes Regulatory T Cell Identity by Tuning the Activity of trans-Acting Intermediaries. *Immunity.* 2020;53(5):971-984.e5.
- [25] 周欣. Th17 细胞和 Treg 细胞在大鼠实验性牙周炎牙周组织中的分布和意义 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- [26] STADHOUDERS R, LUBBERTS E, HENDRIKS RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2018; 87:1-15.
- [27] LI Y, WEI C, XU H, et al. The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection. *Mediators Inflamm.* 2018;2018: 6587296.
- [28] ROWE JH, ERTELT JM, WAY SS. Foxp3(+) regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. *Immunology.* 2012; 136(1):1-10.
- [29] PENG G, GUO Z, KINIWA Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science.* 2005;309(5739):1380-1384.
- [30] FORWARD NA, FURLONG SJ, YANG Y, et al. Signaling through TLR7 enhances the immunosuppressive activity of murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):117-125.
- [31] 纪周新, 贺德. 粪肠球菌脂磷壁酸激活 Toll 样受体 2 抑制胰腺导管癌 BxPC-3 细胞的增殖、侵袭和迁移 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021,28(5):477-481.
- [32] JOHANNES TM, ERTELT JM, ROWE JH, et al. Regulatory T cell suppressive potency dictates the balance between bacterial proliferation and clearance during persistent *Salmonella* infection. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):e1001043.
- [33] 税钰森, 吕满颖, 李静雅, 等. 粪肠球菌在口腔及全身系统性疾病中的致病相关因素及其机制的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2020,47(2):225-234.
- [34] 孟磊, 刘雪, 张蕾, 等. 压力状态下粪肠球菌培养上清液诱导人牙周膜细胞炎症反应的研究 [J]. 中华口腔医学杂志, 2021,56(4):335-341.
- [35] DONG M, JIN H, ZUO M, et al. The potential effect of Bruton's tyrosine kinase in refractory periapical periodontitis. *Biomed Pharmacother.* 2019;112:108710.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)