

## 论著·基础研究

亚甲基蓝介导的光动力疗法诱导牙周炎中巨噬细胞凋亡的体内  
外研究姜春兰, 程惠娟<sup>#</sup>, 焦 婷<sup>#</sup>

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔修复科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 国家口腔疾病临床研究中心, 上海 200011

**[摘要]** **目的**·探讨亚甲基蓝介导的光动力疗法 (methylene blue-mediated photodynamic therapy, MB-PDT) 能否诱导牙周炎组织中巨噬细胞的凋亡并抑制牙槽骨吸收。**方法**·体外实验中, 将巨噬细胞分为 3 组: 对照组 (Control 组), 不接受治疗; MB 组, 只受 MB 处理; MB-PDT 组, MB 联合激光处理; 检测各组细胞的凋亡情况及凋亡相关基因的表达。体内实验中, 通过正畸钢丝结扎 SD 大鼠上颌双侧第一磨牙并接种牙周致病菌诱导牙周炎, 6 周后 12 只大鼠去除结扎丝并全部接受龈下刮治术和根面平整术 (scaling and root planning, SRP), 治疗后随机分为 3 组: SRP 组, 仅用生理盐水处理; MB 组, 仅用吩噻嗪染料 MB 处理; MB-PDT 组, 光敏剂联合激光治疗, 每周治疗 1 次。所有大鼠在接受治疗 3 周后处死, 采用免疫荧光实验和 Micro CT 分别检测各组大鼠牙周组织中巨噬细胞的凋亡情况和牙槽骨吸收水平。**结果**·体外实验结果显示 10  $\mu\text{mol/L}$  MB 和 40  $\text{J/cm}^2$  的光剂量组合可引起 50% 以上巨噬细胞死亡, 且此模式下的 MB-PDT 诱导巨噬细胞发生凋亡的现象最明显, 同时 MB-PDT 诱导巨噬细胞中促凋亡基因 *Bax*/抑制凋亡基因 *Bcl-2* 的比值上调。体内实验结果显示, 经 MB-PDT 处理后, 炎症牙周组织中浸润的巨噬细胞发生凋亡, 而 SRP 组和 MB 组大鼠牙周组织中浸润的巨噬细胞未出现凋亡。Micro CT 结果显示 MB-PDT 组大鼠的牙槽骨吸收程度较 SRP 组和 MB 组轻 ( $P<0.05$ ), 而 SRP 组和 MB 组大鼠间无明显差异。**结论**·MB 介导的光动力疗法可诱导牙周炎中过度增殖的巨噬细胞发生凋亡, 并抑制牙槽骨吸收, 较单纯的 SRP 治疗而言是一种良好的牙周炎辅助治疗方法。

**[关键词]** 牙周炎; 凋亡; 亚甲基蓝; 光动力疗法; 巨噬细胞**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.12.006 **[中图分类号]** R781.4 **[文献标志码]** A*In vitro and in vivo study of apoptotic macrophages induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in periodontitis*JIANG Chun-lan, CHENG Hui-juan<sup>#</sup>, JIAO Ting<sup>#</sup>

Department of Prosthodontics, the Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Research Institute of Stomatology, National Clinical Research Center of Stomatology, Shanghai 200011, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate whether methylene blue-mediated photodynamic therapy (MB-PDT) can induce the apoptosis of macrophages in periodontitis, and simultaneously reduce the bone absorption. **Methods**·For *in vitro* treatments, cells were divided into three experimental groups: control group, no treatment; MB group, methylene blue treatment; MB-PDT group, MB and laser irradiation treatment. Then apoptosis and apoptosis related genes were detected in each group. For *in vivo* treatments, periodontal disease in SD rats was orthodontic ligature and periodontal pathogen induced at the first maxillary molar. After 6 weeks, the ligature was removed and all animals received scaling and root planning (SRP) and were divided according to the following treatments: SRP group, saline solution; MB group, phenothiazinium dye; and MB-PDT group, MB and laser irradiation, once a week. All animals in each treatment were killed after 3 weeks. Immunofluorescence and Micro CT analyses were used to detect the apoptotic macrophages and alveolar bone resorption in periodontal tissues of rats in each group. **Results**·*In vitro* experiments showed that the combination of 10  $\mu\text{mol/L}$  MB and 40  $\text{J/cm}^2$  light dose could kill more than 50% macrophages, and the apoptosis of macrophages induced by MB-PDT in this mode was most obvious. Meanwhile, MB-PDT increased the expression ratio of proapoptotic gene *Bax*/antiapoptotic gene *Bcl-2* in macrophages. *In vivo* experiments showed that the macrophages infiltrated in tissues with periodontitis were apoptotic after MB-PDT treatment, while no obvious apoptosis of macrophages infiltrated in the periodontal tissues of SRP and MB rats was found. Micro CT analysis showed that the alveolar bone resorption in MB-PDT rats was less than that in SRP and MB rats ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference between SRP rats and MB rats. **Conclusion**·MB-PDT can induce the apoptosis of hyperproliferating macrophages in periodontitis and reduce the bone absorption. Compared with SRP, MB-PDT is an effective adjunctive treatment of periodontitis.

**[Key words]** periodontitis; apoptosis; methylene blue; photodynamic therapy; macrophages**[基金项目]** 上海市科学技术委员会项目 (114119a3900, 14411964200) (Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 114119a3900, 14411964200)。**[作者简介]** 姜春兰 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: jiangchunlan1993@163.com。**[通信作者]** 焦 婷, 电子信箱: jiao\_ting@126.com。程惠娟, 电子信箱: 1774605@qq.com。<sup>#</sup> 为共同通信作者。

牙周病是由牙周致病菌的局部作用及释放出严重损伤牙周组织的物质引起的牙周支持结构崩解所导致的。同时,宿主的炎症和免疫反应也可造成牙周组织的破坏<sup>[1]</sup>。巨噬细胞作为一种炎症细胞,在牙周炎的发生、发展过程中发挥着重要作用。一方面,巨噬细胞作为宿主固有免疫系统的重要组成部分,发挥防御功能,维持牙周组织的稳态<sup>[2]</sup>。另一方面,它可与局部细胞(包括牙龈上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞和成骨细胞)相互作用,分泌白介素(IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、前列腺素E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)和其他细胞因子,导致牙周组织炎症病变和牙槽骨吸收<sup>[3-4]</sup>。此外,Miyajima等<sup>[5]</sup>还发现牙周炎可通过激活单核细胞/巨噬细胞触发动脉粥样硬化的初始发病机制并引起血管的炎症。

近年来,光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)在牙周炎中的应用已取得了令人满意的结果<sup>[6-7]</sup>。PDT基于光敏剂在适当波长的低功率激光照射下活化后杀死细胞或微生物,光活化的光敏剂与底物反应可产生高活性氧成分,如自由基和单线态氧等皆对微生物有毒性作用<sup>[8]</sup>。应用于PDT中的光敏剂包括:①吩噻嗪染料,如亚甲基蓝(methylene blue, MB)和甲苯胺蓝O。②酞菁类。③细菌叶绿素衍生物。④卟啉类等<sup>[9]</sup>。最常应用于临床治疗牙周炎或种植体周围炎的光敏剂为吩噻嗪染料<sup>[10-12]</sup>。目前,大量的光动力研究是基于杀菌性能来探索其治疗牙周炎的功效<sup>[13-15]</sup>,其中Moreira等<sup>[14]</sup>发现MB介导的PDT(MB-PDT)辅助治疗牙周炎与单独使用龈下刮治术和根面平整术(scaling and root planning, SRP)比较,改善了牙周袋的探诊深度(probing depth, PD)并使深牙周袋患者(PD  $\geq$  7 mm)获得再附着,同时显著减少了红色复合体和橙色复合体细菌,并降低了IL-1b/IL-10比值。但以上研究皆未探讨PDT能否直接作用于牙周炎组织中过度增殖的炎症细胞,从而抑制其对牙周组织的破坏作用。

因此,本研究旨在探索MB-PDT能否诱导牙周炎组织中过度增殖的巨噬细胞的凋亡并抑制牙槽骨吸收。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与仪器

MB (Sangon Biotech, 中国), 660 nm 二极管激光(300 mW, 领越光电科技, 中国), RPMI-1640、佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) (Sigma-Aldrich, 美国), 青链霉素、EDTA 胰蛋白酶(Hyclone, 美国), 胎牛血清(BI, 以色列), MTT (Sigma-Aldrich,

美国), Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(YEASEN, 中国), TRIzol 试剂盒(Sigma-Aldrich, 美国), 反转录试剂盒(TAKARA, 日本), SYBR (YEASEN, 中国), 细胞培养皿、细胞培养板(Corning, 美国), CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermo Forma, 美国), 倒置显微镜、荧光显微镜(Zeiss, 德国), 温控超速离心机(Eppendorf, 德国), Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 II PCR System (Roche, 瑞士)。免疫荧光一抗CD68小鼠抗大鼠单克隆抗体(Abcam, 英国), 二抗Cy3标记山羊抗小鼠IgG (H+L)、TUNEL 凋亡检测试剂盒(YEASEN, 中国), Micro CT 扫描仪Latheta LCT-200 (Aloka, 日本), 三维重建软件VGStudio MAX2.2 (Volume Graphics, 德国)。

### 1.2 细胞培养

将THP-1细胞以含10%胎牛血清及1%青链霉素的RPMI1640细胞培养液,于37℃、5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中传代培养。细胞计数并调整密度为 $5 \times 10^5$ /mL后离心,将含有终质量浓度为100 ng/mL PMA的RPMI-1640完全培养液加入离心管重悬细胞,并吹打混匀,6孔板每孔加2 mL (100万细胞/孔),96孔板加入100  $\mu$ L (5万细胞/孔),置恒温培养箱中静置培养,48 h后诱导成巨噬细胞。

### 1.3 MTT 比色法检测巨噬细胞活性

培养在96孔板内的巨噬细胞与MB (0、5、10、15、20  $\mu$ mol/L)共同孵育10 min,弃去孔内培养液,用PBS冲洗2遍后施加或不施加波长660 nm的激光(40 J/cm<sup>2</sup>)照射,随后进行MTT检测。巨噬细胞经PDT治疗后继续于CO<sub>2</sub>孵箱避光孵育24 h,弃去孔内培养液,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20  $\mu$ L、RPMI-1640培养液80  $\mu$ L,37℃继续避光孵育4 h,终止培养,弃去孔内上清液。每孔加入100  $\mu$ L DMSO,摇床低速振荡10 min,使其充分溶解。选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(D)值。存活率=(实验组D值-空白对照组D值)/(对照组D值-空白对照组D值)  $\times$  100%。

### 1.4 体外巨噬细胞凋亡检测

培养在6孔板内的巨噬细胞与MB (0、5、10、15  $\mu$ mol/L)共同孵育10 min,弃去孔内培养液,用PBS冲洗2遍后施加或不施加660 nm的激光(40 J/cm<sup>2</sup>)照射,6 h后以Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒进行荧光染色,并于荧光显微镜下观察巨噬细胞是否发生凋亡。

### 1.5 凋亡相关基因表达检测

将培养在6孔板内的巨噬细胞分为3组:对照(control)组,不接受治疗;MB组,只接受光敏剂即MB处理;MB-PDT组,接受PDT。巨噬细胞经PDT治疗(MB 10  $\mu\text{mol/L}$ , 激光 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) 0、3、6、12 h后,分别收集上清及板底细胞,加入TRIzol裂解细胞,收集细胞裂解液,提取mRNA,反转录成cDNA后进行real-time PCR,检测促凋亡基因 *Bax* (上游引物为 5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT-3', 下游引物为 5'-TGA GACACTCGCTCAGCTTC-3') 和抑凋亡基因 *Bcl-2* (上游引物为 5'-TGAAGTCAACATGCCTGCCC-3', 下游引物为 5'-GCTGATTTCGACGTTTTGCCT-3') 的表达情况,内参基因为 *NAPDH* (上游引物为 5'-CCACTCCTCCACCTTTG AC-3', 下游引物为 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3')。

### 1.6 实验动物及牙周炎模型建立

SD大鼠(SPF级)12只,雄性,3月龄,由上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2013-0016,使用许可证号为SYXK(沪)2016-0016。通过双侧上颌第一磨牙牙颈部正畸钢丝结扎和涂牙周致病菌(牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌体积比1:1,浓度 $1 \times 10^9$  CFU/mL的混合菌液)诱导建立大鼠牙周炎模型。6周后,将建模成功的12只大鼠行SRP后随机分为3组,每组4只。①SRP组:仅用生理盐水冲洗。②MB组:仅用MB处理。③MB-PDT组:龈沟内注射0.1 mL质量浓度为10 g/L的MB后避光孵育3 min,联合波长660 nm、300 mW的二极管激光进行治疗,磨牙颊舌侧近中、中部、远中各光照10 s,即每颗磨牙光照1 min。PDT治疗每周1次,治疗3周后处死所有大鼠。

### 1.7 牙周炎中巨噬细胞凋亡检测

处死3组牙周炎大鼠后,采集上颌骨标本,4%多聚甲醛固定,石蜡切片,脱蜡复水后采用TUNEL和免疫荧光双重染色检测各组大鼠炎症牙周组织中巨噬细胞的凋亡情况。一抗CD68工作液4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,二抗工作液37  $^{\circ}\text{C}$  孵育1 h, TdT酶工作液37  $^{\circ}\text{C}$  孵育1 h, DAPI染核5 min,封片后荧光显微镜下观察。

### 1.8 Micro CT检测牙槽骨吸收度

处死大鼠后,采集上颌骨标本, Micro CT扫描离体骨组织,通过Latheta V3.52软件测量各组大鼠第一磨牙近中根釉牙骨质界至牙槽嵴顶的垂直距离,并使用软件

VGStudio MAX2.2 三维重建单侧上颌骨。

### 1.9 统计学方法

应用SPSS19.0软件进行统计学分析,各组实验数据均为正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2组样本间均数比较采用 $t$ 检验。多组样本间均数比较采用单因素方差分析,当组间数据符合方差齐性时采用LSD检验行两两比较,当组间数据方差不齐时采用Tamhane's  $T^2$  检验行两两比较。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PDT对巨噬细胞的毒性作用

巨噬细胞与不同浓度MB(0、5、10、15、20  $\mu\text{mol/L}$ )共孵育,发现随着MB浓度增高,细胞活性下降。巨噬细胞与相同浓度MB共孵育,经PDT治疗后,细胞活性较MB组显著下降;且随着MB浓度增高,MB-PDT组细胞活力大幅度下降。当MB浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ 时,MB-PDT组50%以上的细胞发生死亡。单纯激光照射(MB为0  $\mu\text{mol/L}$ , 激光为40  $\text{J}/\text{cm}^2$ )时未造成细胞活力降低(图1)。

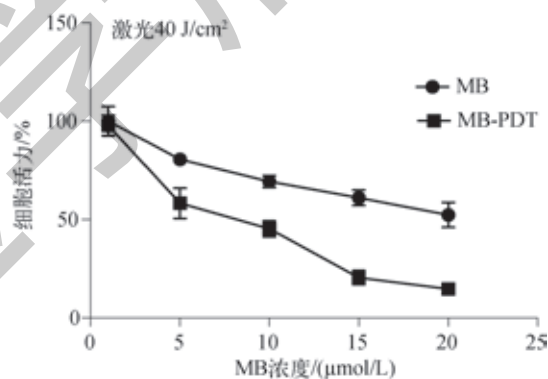


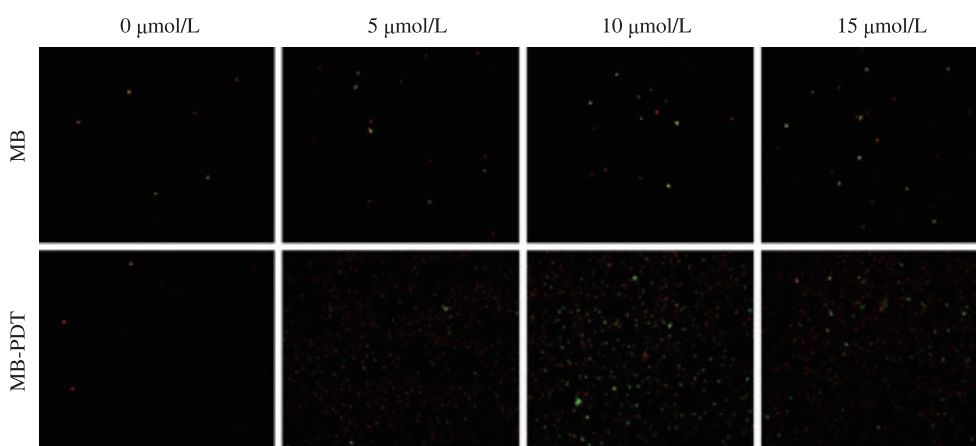
图1 PDT对巨噬细胞的毒性作用

Fig 1 Toxic effect of PDT on macrophages

### 2.2 PDT对体外巨噬细胞凋亡的影响

图2中,绿色荧光表示凋亡细胞,红色荧光表示坏死细胞。随着MB浓度增大,MB组巨噬细胞并未发生明显坏死及凋亡。而在MB-PDT组,当MB  $\leq 10$   $\mu\text{mol/L}$ 时,随着MB浓度的增大,巨噬细胞的凋亡数量显著增加;MB为15  $\mu\text{mol/L}$ 时,巨噬细胞的凋亡数量下降,而坏死细胞数量上升。单纯激光照射(MB为0  $\mu\text{mol/L}$ , 激光为40  $\text{J}/\text{cm}^2$ )时未引起巨噬细胞坏死及凋亡。

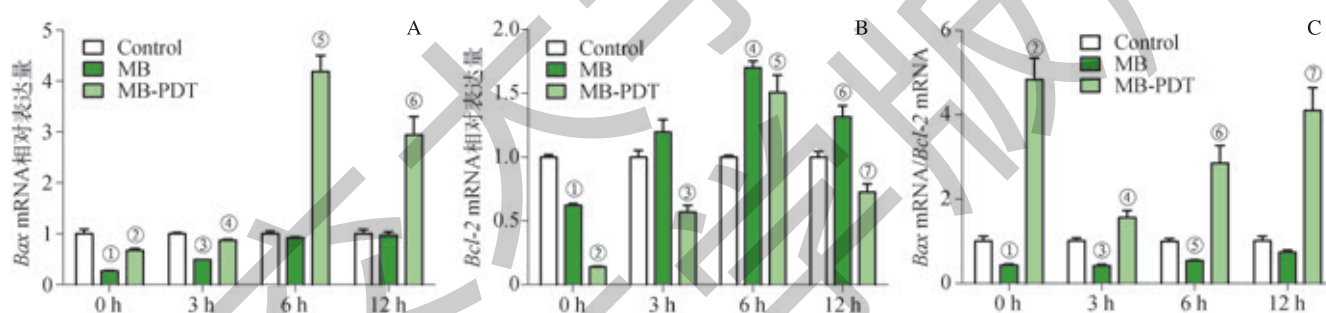


图2 PDT 诱导体外巨噬细胞凋亡 (Zeiss,  $\times 10$ )Fig 2 Apoptosis of macrophages *in vitro* induced by PDT (Zeiss,  $\times 10$ )

### 2.3 PDT 对巨噬细胞凋亡相关基因表达的影响

巨噬细胞经光动力 (MB 10  $\mu\text{mol/L}$ , 激光 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) 处理后, 促凋亡基因 *Bax* 表达先降低 (0、3 h), 随后显著上调 (6、12 h); 抑凋亡基因 *Bcl-2* 在 0、3、12 h 时表达降低, 而在 6 h 时表达升高; MB 组巨噬细胞在处理后的

0、3、6、12 h, 促凋亡基因 *Bax* 表达下降; 抑凋亡基因 *Bcl-2* 在 MB 处理后 0 h 表达下降, 而于 3、6、12 h 后表达上调 (图 3A、3B)。促凋亡基因 *Bax* 与抑凋亡基因 *Bcl-2* 的表达比值在 MB-PDT 组处理后的 4 个时间点皆上升, 而在 MB 组中与之相反 (图 3C)。



注: A. *Bax* mRNA ( $^{\circ}P=0.001$ ,  $^{\circ}P=0.030$ ,  $^{\circ}P=0.000$ ,  $^{\circ}P=0.023$ ,  $^{\circ}P=0.000$ ,  $^{\circ}P=0.006$ , 与 Control 组比较); B. *Bcl-2* mRNA ( $^{\circ}P=0.000$ ,  $^{\circ}P=0.000$ ,  $^{\circ}P=0.004$ ,  $^{\circ}P=0.000$ ,  $^{\circ}P=0.021$ ,  $^{\circ}P=0.032$ ,  $^{\circ}P=0.026$ , 与 Control 组比较); C. *Bax* mRNA 与 *Bcl-2* mRNA 的比值 ( $^{\circ}P=0.007$ ,  $^{\circ}P=0.001$ ,  $^{\circ}P=0.002$ ,  $^{\circ}P=0.037$ ,  $^{\circ}P=0.002$ ,  $^{\circ}P=0.012$ ,  $^{\circ}P=0.005$ , 与 Control 组比较)。

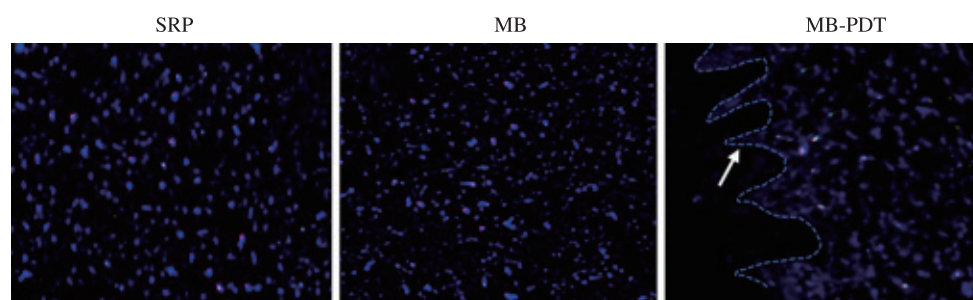
图3 PDT 诱导巨噬细胞凋亡相关基因的表达

Fig 3 Expression of apoptosis-related genes in macrophages induced by PDT

### 2.4 PDT 对炎症牙周组织中巨噬细胞凋亡的影响

图 4 中蓝色荧光为细胞核, 红色荧光为巨噬细胞表面标志物, 绿色荧光为细胞凋亡时染色体 DNA 双链断裂而产

生的大量的黏性 3'-OH 末端。可见, SRP 及 MB 组大鼠牙周组织中巨噬细胞浸润数量多于 MB-PDT 组大鼠, 且未见凋亡; 而 MB-PDT 组见浸润的巨噬细胞大部分发生了凋亡。



注: 箭头示上皮钉突。

图4 PDT 诱导大鼠炎症牙周组织中巨噬细胞凋亡 (Zeiss,  $\times 10$ )Fig 4 Apoptosis of macrophages in rats with periodontitis induced by PDT (Zeiss,  $\times 10$ )



## 2.5 PDT 对牙周炎大鼠牙槽骨吸收的抑制作用

经 SRP 治疗后的 SD 大鼠上颌第一磨牙近中根釉牙骨质界至牙槽嵴顶之间的垂直距离为  $(1.596 \pm 0.025)$  mm, MB 治疗后为  $(1.488 \pm 0.087)$  mm, MB-PDT 治疗后为

$(1.046 \pm 0.0345)$  mm。MB-PDT 组大鼠上颌第一磨牙牙槽骨的吸收度明显低于 SRP 组及 MB 组 ( $P=0.000$ ,  $P=0.003$ ), 而 MB 组与 SRP 组间差异无统计学意义 ( $P=0.601$ ) (图 5)。

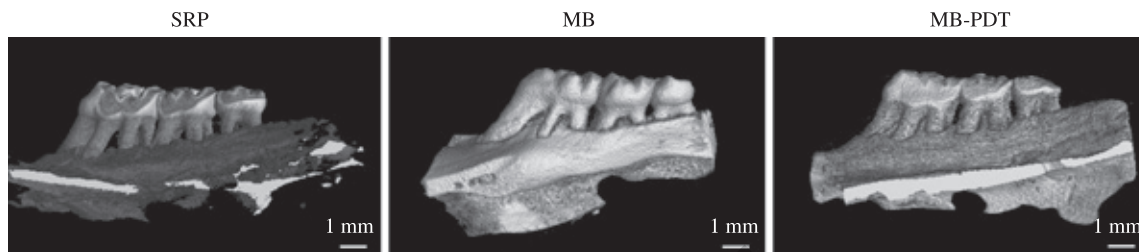


图 5 Micro CT 扫描后三维重建影像观察 PDT 对牙槽骨吸收的抑制作用

Fig 5 Inhibition of alveolar bone resorption by PDT through 3D reconstruction after Micro CT scanning

## 3 讨论

牙周病治疗以通过 SRP 而减少病原微生物为基础。但机械治疗存在局限性, 与器械型号、牙周致病菌侵入周围软组织或致病菌可能从其他病变部位的牙周袋再定植有关。与单纯 SRP 相比, 辅助以 PDT 的 SRP 治疗对牙周炎的疗效更高<sup>[16]</sup>。

PDT 发挥作用基于 3 个组成部分: 光、光敏剂和氧<sup>[17]</sup>, 缺一不可; 而且其产生的主要细胞毒性产物单线态氧迁移距离不超过  $0.2 \mu\text{m}$ , 这些特性保证了 PDT 不会造成非治疗区域的分子、细胞及器官损伤<sup>[18]</sup>。PDT 产生的氧自由基已经被证明对牙周致病菌是致命的, 例如牙龈卟啉单胞菌、福塞坦菌和齿垢密螺旋体<sup>[19-20]</sup>。同时, PDT 还可清除菌斑生物膜<sup>[21-23]</sup>。此外, 商业吩噻嗪染料如 MB, 是一种有效的光敏剂, 用于灭活病原生物, 包括病毒、细菌和酵母。MB 可与胞膜外的多磷酸盐结合, 在激光照射下对脂类和蛋白质 (包括膜结合酶) 造成损伤<sup>[24]</sup>。巨噬细胞可以被细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 激活, 如牙龈卟啉单胞菌脂多糖, 一种“经典”TLR4 配体<sup>[25-26]</sup>。因此, MB 可通过结合 LPS 靶向巨噬细胞。Lam 等<sup>[27]</sup>进一步研究发现牙龈卟啉单胞菌的感染主要诱导牙龈组织中 M1 型巨噬细胞形成, 并与牙槽骨吸收有显著相关性; 当用氯磷酸盐脂质体清除小鼠体内巨噬细胞后, 通过调节宿主的免疫反应减少了破骨细胞的活化、分化及牙龈卟啉单胞菌引起的牙槽骨破坏。

本实验结果显示 MB-PDT 可诱使体外巨噬细胞发生凋亡, 并检测到促凋亡基因 *Bax* 与抑凋亡基因 *Bcl-2* 的表达比值上升; 而单纯 MB 对巨噬细胞有毒性作用, 但随着巨噬细胞数量增加其毒性作用消失, 并降低了促凋亡基因 *Bax* 与抑凋亡基因 *Bcl-2* 的比值。同样, 在大鼠牙周炎模型中, MB-PDT 诱使牙周组织中过度增殖的巨噬细胞发生凋亡, 并抑制了牙槽骨的吸收。这其中的机制可能是由于

PDT 诱导巨噬细胞凋亡后, 减少了巨噬细胞分泌的 IL-1、TNF- $\alpha$  和 PGE2 等与骨吸收呈正相关的炎症因子<sup>[28-29]</sup>。而单纯的 MB 治疗未降低牙槽骨的吸收, 说明 PDT 发挥作用需要光敏剂联合激光照射。另外, 郭秋曼等<sup>[30]</sup>发现慢性牙周炎患者牙龈中 TLR-4 的表达显著高于侵袭性牙周炎患者。TLR4 是众多炎症细胞如巨噬细胞、中性粒细胞的表面模式识别抗体, 可识别牙龈卟啉单胞菌的 LPS。随后, 有学者研究得出 PDT 在慢性牙周炎治疗中效果良好, 而在侵袭性牙周炎的治疗中不能替代系统性阿莫西林和甲硝唑的应用<sup>[16]</sup>; 这或许与侵袭性牙周炎中低表达 TLR4, 光敏剂不能更好地靶向炎症细胞, 从而降低光动力疗效有关。

有学者<sup>[31]</sup>在 6 个月的研究中发现: 非手术治疗的抗菌 PDT 可阻止中度种植体周围骨缺损 ( $PD < 5 \text{ mm}$ ) 患者的牙槽骨吸收, 但不能阻止重度种植体周围骨缺损 ( $5 \text{ mm} < PD < 8 \text{ mm}$ ) 患者的牙槽骨吸收, 并猜测这可能与中、重度种植体周围袋内存在不同的可影响光动力疗效的细菌生物膜厚度 (光动力治疗借助二极管激光可杀灭生物膜表面  $< 10 \mu\text{m}$  的细菌)、pH 值和出血情况等有关。同时, 有研究<sup>[32]</sup>指出常规 PDT 的缺点是需要通过可见 (visible, VIS) 光或紫外线 (ultraviolet, UV) 直接照射组织来激发光敏剂, 并且由于生物组织吸收、散射光限制了激光的穿透深度, 从而导致无效的治疗结果。Lucky 等<sup>[33]</sup>利用上转换纳米粒子 (upconversion nanoparticles, UCNPs) 将近红外 (near-infrared, NIR) 激光转换成可活化光敏剂的可见光, 增加了激光穿透组织的深度, 从而加大了 PDT 对口腔鳞状细胞癌的杀伤作用。

因此, 未来关于光动力治疗牙周炎或种植体周围炎的研究焦点应是增加激光穿透炎症牙周组织或菌斑生物膜的深度, 提高光敏剂对牙周组织中致病菌和过度增殖的炎症细胞的靶向能力, 增加牙周袋内的氧含量。

## 参·考·文·献

- [1] Kaner D, Bernimoulin JP, Hopfenmüller W, et al. Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial[J]. J Clin Periodontol, 2007, 34(10): 880-891.
- [2] Sima C, Glogauer M. Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone[J]. Periodontology, 2013, 63(1): 80-101.
- [3] Koh TJ, Dipietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage[J]. Exp Rev Mol Med, 2011, 13(31): e23.
- [4] Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration[J]. Regeneration, 2017, 4(2): 39-53.
- [5] Miyajima S, Naruse K, Kobayashi Y, et al. Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation[J]. Sci Rep, 2014, 4(6): 5171.
- [6] Theodoro LH, Lopes AB, Cláudio MM, et al. Comparison of repeated applications of aPDT with amoxicillin and metronidazole in the treatment of chronic periodontitis: a short-term study[J]. J Photochem Photobiol B Biol, 2017, 174: 364-369.
- [7] Theodoro LH, Ferro-Alves ML, Longo M, et al. Curcumin photodynamic effect in the treatment of the induced periodontitis in rats[J]. Lasers Med Sci, 2017, 32(8): 1783-1791.
- [8] Bombeccari GP, Guzzi G, Gualini F, et al. Photodynamic therapy to treat periimplantitis[J]. Implant Dent, 2013, 22(6): 631-638.
- [9] 周盼, 谢小燕, 熊力, 等. 抗菌光敏剂的分类及研究进展[J]. 激光生物学报, 2017, 26(3): 193-197.
- [10] 程楠, 徐燕, 黄万元, 等. 光动力疗法辅助龈下刮治及根面平整术治疗轻中度牙周炎的临床研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2013, 23(4): 278-281.
- [11] Späth A, Leibl C, Cieplik F, et al. Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colored type-II photosensitizers [J]. J Med Chem, 2014, 57(12): 5157-5168.
- [12] Amri MDA, Kellesarian SV, Ahmed A, et al. Efficacy of periimplant mechanical debridement with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2016, 14: 166-169.
- [13] Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats[J]. J Periodontol Res, 2014, 49(5): 584-594.
- [14] Moreira AL, Jr NA, Grisi MF, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial[J]. J Periodontol, 2015, 86(3): 376-386.
- [15] Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, et al. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a splitmouth randomized clinical trial[J]. J Periodontol, 2014, 85(8): 277-286.
- [16] Sculean A, Aoki A, Romanos G, et al. Is photodynamic therapy an effective treatment for periodontal and peri-implant infections?[J]. Dent Clin North Am, 2015, 59(4): 831-858.
- [17] Leite IS, Geralde MC, Salina ACG, et al. Near-infrared photodynamic inactivation of *S. pneumoniae* and its interaction with RAW 264.7 macrophages[J]. J Biophotonics, 2017, 11(1): e201600283.
- [18] Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen[J]. Photochem Photobiol, 2010, 53(4): 549-553.
- [19] Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria[J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2013, 8(2): 108-120.
- [20] Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, in infected root canals: a systematic literature review[J]. Photodiagn Photodyn Ther, 2013, 10(4): 632-643.
- [21] Rogers S, Honma K, Mang TS. Confocal fluorescence imaging to evaluate the effect of antimicrobial photodynamic therapy depth on *P. Gingivalis* and *T. Denticola* biofilms[J]. Photodiagn Photodyn Ther, 2018, 23: 18-24.
- [22] Tokubo LM, Rosalen PL, Sardi JDCO, et al. Antimicrobial effect of the photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm[J]. Photodiagn Photodyn Ther, 2018, 23: 94-98.
- [23] Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy[J]. Photodiagn Photodyn Ther, 2015, 12(1): 131-135.
- [24] Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms[J]. Lasers Surg Med, 2001, 29(2): 165-173.
- [25] Jain S, Coats SR, Chang AM, et al. A novel class of lipoprotein lipase-sensitive molecules mediates Toll-like receptor 2 activation by *Porphyromonas gingivalis*[J]. Infect Immun, 2013, 81(4): 1277-1286.
- [26] Shen Y, Liu B, Mao W, et al. PGE2 downregulates LPS-induced inflammatory responses via the TLR4-NF- $\kappa$ B signaling pathway in bovine endometrial epithelial cells[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2018, 129: 25-31.
- [27] Lam RS, O'Briensimpson NM, Lenzo JC, et al. Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice[J]. J Immunol, 2014, 193(5): 2349-2362.
- [28] Cosyn J, Christiaens V, Koningsveld V, et al. An exploratory case-control study on the impact of IL-1 gene polymorphisms on early implant failure[J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2016, 18(2): 234-240.
- [29] 吴象宇. 巨噬细胞在牙周炎中作用的研究进展[J]. 中国保健营养旬刊, 2013(7): 121-122.
- [30] 郭秋曼, 束蓉. 牙周炎患者牙龈组织中 TLR-2 和 TLR-4 的表达[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(9): 1045-1048.
- [31] Deppe H, Mücke T, Wagenpfeil S, et al. Nonsurgical antimicrobial photodynamic therapy in moderate vs severe peri-implant defects: a clinical pilot study[J]. Quintessence Int, 2013, 44(8): 609-618.
- [32] Zhu X, Wang H, Zheng L, et al. Upconversion nanoparticle-mediated photodynamic therapy induces THP-1 macrophage apoptosis via ROS bursts and activation of the mitochondrial caspase pathway[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10(12): 3719-3736.
- [33] Lucky SS, Idris NM, Huang K, et al. *In vivo* biocompatibility, biodistribution and therapeutic efficiency of titania coated upconversion nanoparticles for photodynamic therapy of solid oral cancers[J]. Theranostics, 2016, 6(11): 1844-1865.

[收稿日期] 2018-06-18

[本文编辑] 吴洋