

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：双效阳离子纳米递送体系的免疫治疗策略用于牙周炎辅助治疗的研究
作者：朱语萌，柳岸
收稿日期：2026-06-20
网络首发日期：2026-07-30
引用格式：朱语萌，柳岸. 双效阳离子纳米递送体系的免疫治疗策略用于牙周炎辅助治疗的研究[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260730.1350.006>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

双效阳离子纳米递送体系的免疫治疗策略用于牙周炎辅助治疗的研究

朱语萌，柳 岸

（安徽医科大学口腔医学院，安徽医科大学附属口腔医院，安徽省口腔疾病研究重点实验室，合肥 230032）

摘要 目的 探讨负载小干扰 RNA (siRNA) 的双效阳离子核酸递送纳米载体 (DCNA) 通过调控 Bruton 酪氨酸激酶 (BTK) 表达对牙周炎免疫炎症微环境的影响。**方法** 采用双乳化溶剂挥发法制备 DCNA_{siBTK}，并检测其理化特性及缓释性能。通过细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法评价其细胞毒性；采用涂板法检测其对牙周致病菌的抗菌活性；实时荧光定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 及蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 BTK 表达；酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。构建小鼠牙周炎模型后给予 DCNA_{siBTK} 干预，采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR)、显微计算机断层扫描 (Micro-CT)、苏木精-伊红 (HE) 染色及免疫组织化学 (IHC) 染色评估其治疗效果及生物安全性。**结果** 成功制备粒径 (168.8 ± 2.2) nm、Zeta 电位 (17.9 ± 0.8) mV 的稳定 DCNA_{siBTK}，透射电子显微镜 (TEM) 显示颗粒规则球形，具有良好缓释性能。CCK-8 检测显示 DCNA_{siBTK} 在 0~100 nmol/L 范围内无明显细胞毒性。体外实验表明，DCNA_{siBTK} 可显著抑制牙龈卟啉单胞菌 (*Pg*)、伴放线聚集杆菌 (*Aa*) 及具核梭杆菌 (*Fn*) 生长，具有广谱抗菌活性。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示，DCNA_{siBTK} 剂量依赖性下调 BTK mRNA 及蛋白表达水平。ELISA 显示 DCNA_{siBTK} 可显著降低 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 分泌 ($P < 0.0001$)，减轻炎症反应。体内实验结果显示，DCNA_{siBTK} 可抑制牙周袋内厌氧菌增殖，减轻牙槽骨吸收及牙周组织炎症，且未见心、肝、脾、肺、肾等主要脏器明显病理损伤。**结论** DCNA_{siBTK} 高效负载并释放 siBTK，兼具抗菌与抗炎双重活性，可通过抑制 BTK 表达缓解牙周炎进展，为牙周炎临床辅助治疗提供新的思路。

关键词 牙周炎；纳米载体；Bruton 酪氨酸激酶；siRNA；抗菌抗炎

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A

The research on immune therapeutic strategy of dual-function cationic nanodelivery system for adjunctive treatment of periodontitis

2026-06-20 接收

基金项目：安徽省高等学校科学研究重点项目（编号：2022AH050656）

作者简介：朱语萌，女，硕士研究生；

柳 岸，女，博士，副教授，硕士生导师，通信作者，E-mail: 2021500223@ahmu.edu.cn

Zhu Yumeng, Liu An

(College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Anhui Provincial Key Laboratory
of Oral Diseases Research, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of a dual-functional cationic nucleic acid nanodelivery system (DCNA) loaded with small interfering RNA targeting Bruton's tyrosine kinase (siBTK) on the immune-inflammatory microenvironment of periodontitis by regulating BTK expression.

Methods DCNA_{siBTK} was prepared using a double-emulsion solvent evaporation method, and its physicochemical properties and sustained-release performance were characterized. Cytotoxicity was evaluated using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. Antibacterial activity against periodontal pathogens was assessed by colony-forming assays. BTK mRNA and protein expression levels were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting, respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to quantify the levels of inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, and TNF- α . A murine periodontitis model was established and treated with DCNA_{siBTK}. Therapeutic efficacy and biosafety were evaluated using qPCR, micro-computed tomography (micro-CT), hematoxylin-eosin (HE) staining, and immunohistochemistry (IHC).

Results Stable DCNA_{siBTK} nanoparticles with an average particle size of (168.8 ± 2.2) nm and a zeta potential of (17.9 ± 0.8) mV were successfully prepared. Transmission electron microscopy (TEM) revealed uniformly spherical morphology with favorable sustained-release properties. CCK-8 assays demonstrated no significant cytotoxicity of DCNA_{siBTK} within the concentration range of 0-100 nmol/L. *In vitro* studies showed that DCNA_{siBTK} effectively inhibited the growth of *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), and *Fusobacterium nucleatum* (Fn), indicating broad-spectrum antibacterial activity. qRT-PCR and Western blotting analyses demonstrated that DCNA_{siBTK} downregulated BTK mRNA and protein expression in a dose-dependent manner. ELISA results showed that DCNA_{siBTK} significantly reduced the secretion of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , thereby attenuating inflammatory responses. *In vivo* experiments further demonstrated that DCNA_{siBTK} suppressed anaerobic bacterial proliferation within periodontal pockets, alleviated alveolar bone resorption and periodontal inflammation, and caused no obvious pathological damage in major organs, including the heart, liver, spleen, lungs, and kidneys.

Conclusion DCNA_{siBTK} efficiently encapsulated and released siBTK, and exhibited dual antibacterial and anti-inflammatory activities. By suppressing BTK expression, DCNA_{siBTK}

effectively attenuated the progression of periodontitis, providing a promising novel strategy for adjunctive periodontal therapy.

Key words periodontitis; nanocarrier; Bruton's tyrosine kinase; siRNA; antibacterial and anti-inflammatory

Fund program Key Scientific Research Project of Higher Education Institutions in Anhui Province (No. 2022AH050656)

Corresponding author Liu An, E-mail: 2021500223@ahmu.edu.cn

牙周炎 (Periodontitis, PD) 是由牙周致病菌始动的慢性炎症性疾病, 以牙周组织炎症和牙槽骨吸收为主要特征, 是全球成年人失牙的首要原因之一^[1-3]。目前认为, 牙周致病菌感染诱发的宿主过度免疫是牙周炎持续进展和组织破坏的重要机制^[4, 5]。刮治联合根面平整术是牙周炎临床治疗的基础方案, 但受牙周袋深部微生物接触有限及牙齿解剖结构复杂性的影响^[6], 单纯机械治疗难以彻底清除病原体^[7]。辅助应用抗菌药物可有效抑制牙周致病菌增殖, 但全身用药会显著增加耐药^[8]和不良事件发生风险^[9]。因此, 开发兼具抗菌和免疫调节作用的新型治疗策略已成为牙周炎辅助治疗的重要研究方向。

Bruton 酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 是 B 细胞受体 (B-cell receptor, BCR) 与 Fc 受体 (Fc receptor, FcR) 信号通路核心激酶, 调控 B 细胞发育活化^[10]与 T 细胞增殖^[11, 12], 介导促炎因子分泌。然而, 现有 BTK 抑制剂因脱靶效应易引发全身免疫抑制^[13]。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 具有序列特异性沉默靶基因的优势^[14], 但其体内稳定性差、细胞摄取效率低等问题限制了临床应用^[15]。该研究通过构建负载 siBTK 的双效阳离子核酸递送纳米载体 (Dual-functional Cationic Nanodelivery, DCNA), 探讨其对牙周炎免疫炎症微环境、致病菌定植及牙槽骨吸收的调控作用, 以期为牙周炎的纳米辅助治疗提供新的理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 实验动物

6-8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 (体质量 20~25 g) 购自杭州子源实验动物科技有限公司, 所有动物饲养及实验操作均遵循《实验动物护理与使用指南》相关规定, 并经由安徽医科大学动物实验伦理委员会批准 (编号: LLSC20261935)。

1.1.2 主要试剂与仪器

氨基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物 ($\text{NH}_2\text{-PEG}_{5\text{K}}\text{-b-PLGA}_{10\text{K}}$, 聚乳酸/羟基乙酸 (Lactic acid/Glycolic acid, LA/GA) 摩尔比=50/50, 上海炎怡生物科技有限公司, Cat. No.: 67345K-754210K-1G), (2,3-二油酰基-丙基)-三甲基氯化铵 (1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride, DOTAP)(上海麦克林生化科技股份有限公司, Cat. No.: D890287), 靶向 BTK 的 siRNA(siBTK)R:5'-AAUCCAGCGCUUUCUCAGCdTdT-3'、乱序的对照 siRNA(siNC)R:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3')、Cy5 荧光标记的 siRNA (Cy5-siRNA, 乱序)(定制合成, 上海吉玛制药技术有限公司), Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司, Cat. No.: 11668019), PrimeScriptTM RT Reagent Kit (日本 TaKaRa 公司, Cat. No.: RR037Q), SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司, Cat. No.: AG11718), anti-mouse-BTK 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, Cat. No.: 21581-1-AP), anti-rabbit-IgG-HRP 二抗 (武汉亚科因生物技术有限公司, Cat. No.: A25222), 细胞增殖-毒性检测试剂盒(Cat. No.: BS350B)、4%PFA 固定液(Cat. No.: BL539A) (北京兰杰柯科技有限公司), 脑心浸液肉汤(Cat. No.: HB8297-5)、维生素 K1(Cat. No.: 2100501)、氯化血红素(Cat. No.: 2100500)、L-半胱氨酸盐酸盐(Cat. No.: HB8493a) (青岛海博生物技术有限公司), 脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) (北京索莱宝科技有限公司, Cat. No.: L8880), Mouse IL-1 β (Cat. No.: 1210122)、IL-6(Cat. No.: 1210602)、TNF- α ELISA(Cat. No.: 1217202)检测试剂盒 (深圳市达科为生物技术股份有限公司), DelivectorTM Avertin 阿佛丁 三溴乙醇 (上海多沃生物科技有限公司, Cat. No.: DW3101)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司, Cat. No.: DP302)。

超声波细胞粉碎机 Scientz-IID(宁波新芝生物科技股份有限公司), 旋转蒸发器 RE-52AA (上海亚荣生化仪器厂), Zetasizer Nano ZS90 (Malvern 公司, 英国), 透射电镜 Talos L120C G2 (Thermo 公司, 美国), UV1800 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津), High-Speed Refrigerated Centrifuge CR21N (Himac, 日本), C-MAG MS 4 磁力搅拌器 (德国 IKA)、Infinite 200 PRO 酶标仪 (瑞士 Tecan), 天能 Tanon 5200 发光成像系统 (上海天能生命科学有限公司), Agilent StrataGene Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦), Micro-CT VNC-102 (平生医疗科技 (昆山) 有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 DCNA 的合成与表征

DCNA 通过双乳化溶剂挥发法制备。取 400 μL $\text{NH}_2\text{-PEG}_{5\text{K}}\text{-b-PLGA}_{10\text{K}}$ (62.5 mg/mL, 氯仿溶液)、100 μL DOTAP (30 mg/mL, 氯仿溶液) 与 25 μL siRNA (40 $\mu\text{mol/L}$, 水溶液) 混

合, 在冰浴条件下采用 Scientz-IIID 型超声波细胞粉碎机以 80 W 功率超声乳化 1 min, 形成初乳; 随后, 向初乳液中加入 5 mL DEPC 水, 保持冰浴及 80 W 功率条件下超声乳化 2 min, 获得复乳; 最后采用 RE-52AA 型旋转蒸发器对复乳进行旋蒸处理, 去除有机相。采用 Malvern Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度仪在 25 °C 下测定纳米颗粒的粒径及 Zeta 电位; 通过紫外-可见分光光度计对 siRNA 的包载率进行定量分析; 在真空条件下, 采用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察颗粒的微观形貌。

为评估纳米颗粒的稳定性, 将 DCNA 分别置于 1×PBS 及含 10% FBS 的 1640 培养基中, 于 37 °C 下孵育 2 d, 并使用纳米粒度仪动态监测其粒径变化。为考察 siRNA 的体外释放行为, 将 DCNA 置于 PBS 缓冲液中, 在磁力搅拌条件下于 37 °C 进行释放实验。在预设时间点取样, 并同步补充等体积新鲜 PBS。采用紫外-可见分光光度计定量分析 siRNA 的累积释放率并绘制释放曲线。

1.2.2 DCNA 体外抗菌活性评价

将牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, Pg)、伴放线聚集杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Aa) 及具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, Fn) 菌株的菌液调整至 1×10^7 CFU/mL, 与对应材料按体积比 1:1 混合, 37 °C 厌氧条件下共培养 1 d, 以 PBS 处理组作为对照。取 40 μ L 处理后的菌悬液均匀涂布于血琼脂平板, 37 °C 厌氧环境孵育 21 d 后, 统计菌落形成单位 (Colony-Forming Unit, CFU) 并记录平板影像。

1.2.3 细胞培养

取 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠脾脏, 经尼龙网过滤及红细胞裂解处理后, 将细胞接种于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 2 d, 去除贴壁细胞后, 收集获得悬浮淋巴细胞。

1.2.4 体外检测 DCNA_{siBTK} 对 BTK mRNA 和蛋白表达的影响

将 C57BL/6 小鼠脾脏淋巴细胞接种于 12 孔板 (1×10^6 个/孔), 培养 24 h 后, 分别加入 siRNA 终浓度为 50、100 nmol/L 的 DCNA_{siBTK}。以 siRNA 终浓度 25 nmol/L 的 Lipofectamine 2000 介导 siBTK 转染组 (Lipo_{siBTK}) 作为阳性对照; 以 siRNA 终浓度 50 nmol/L 的游离 siBTK 组 (Free_{siBTK})、PBS 及 DCNA_{siN.C.} 组作为阴性对照。孵育 6 h 后, 更换为含 10% FBS 的新鲜培养基, 转染 48 h 后收集细胞。采用 RNA 快速提取试剂盒 (ES Science) 提取总 RNA, 使用 RIPA 裂解液 (Beyotime) 提取总蛋白。通过实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 BTK mRNA 表达水平, Western blot 检测 BTK 蛋白表达水平。

1.2.5 体外检测 DCNA_{siBTK} 对炎症相关因子分泌的影响

将 C57BL/6 小鼠脾脏淋巴细胞接种于 6 cm 培养皿 (4×10^6 个/皿), 加入 2 mg/mL LPS 体外模拟牙周炎炎症微环境, 孵育 2 h 后进行分组干预: 分别加入 PBS、游离 siBTK(Free_{siBTK})、Lipofectamine 2000 介导 siBTK 转染组 (Lipo_{siBTK})、DCNA_{siBTK} (siRNA 终浓度 50 nmol/L)、DCNA_{siBTK} (siRNA 终浓度 100 nmol/L) 及 DCNA_{siN.C.}。继续培养 10 h 后, 采用酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 试剂盒定量检测各组细胞分泌的炎症相关因子白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 的表达水平。

1.2.6 牙周炎动物模型

小鼠经阿佛丁腹腔注射麻醉后固定于手术操作台。以 5-0 外科缝线浸泡 *Pg* W83 菌液, 结扎右侧上颌第二磨牙牙颈部, 确保缝线位于龈下后于颊侧打结固定。正常饲养 1 周构建实验性牙周炎模型。建模后采用局部给药方式, 每隔 3 d 向牙周袋内注射 20 μ L 纳米溶液, 共计给药 5 次, 连续治疗 2 周。

1.2.7 体内检测 DCNA 对牙周炎的抗菌效果

将小鼠随机分为 3 组 (本实验每组初始纳入 5 只小鼠, 在牙周炎模型构建过程中, 部分动物未达到预设建模标准或未完成实验流程, 最终纳入统计分析的样本量为 3 只): PBS、NH₂-PEG_{5K}-b-PLGA_{10K} 及 NH₂-PEG_{5K}-b-PLGA_{10K}/DOTAP 组。每次给药前, 使用无菌牙周探针刮取各组小鼠相同牙周袋位点的菌斑, 混悬于 1 mL 生理盐水中; 取 100 μ L 菌液均匀涂布于血平板, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h 后统计各组菌落数。治疗结束后, 再次刮取牙周袋菌斑并接种于 BHI 液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h。收集菌体并提取基因组 DNA, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测 *Pg* W83 菌株特异性基因的表达水平。

1.2.8 体内检测 DCNA_{siBTK} 对牙周炎的抗炎效果

将小鼠随机分为 5 组 ($n=3$): 空白对照 (Negative Control, NC) 组、PD+PBS 组、PD+Free_{siBTK} 组、PD+DCNA_{siN.C.}组、PD+DCNA_{siBTK} 组。治疗 2 周后, 小鼠经安乐死处死, 收集上颌骨进行 Micro-CT 扫描重建, 并选取第二磨牙颊侧、腭侧近中、中点及远中 6 个位点, 测量釉牙骨质界至牙槽嵴顶距离 (Cemento-enamel Junction-Alveolar Bone Crest, CEJ-ABC), 以评估牙槽骨吸收程度。后续行苏木精-伊红染色 (Hematoxylin-Eosin, HE) 及炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 免疫组织化学染色 (Immunohistochemical staining, IHC), 进一步评估牙周软组织炎症浸润情况。

1.2.9 DCNA 体内生物安全性评价

收集各组小鼠主要脏器（心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏），进行组织学检测以评估生物相容性。

1.3 统计学处理

定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间两两比较采用 Tukey 多重比较检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DCNA_{siRNA} 的合成与表征

本研究将可降解的高分子材料 PEG_{5K}-b-PLGA_{10K} 末端修饰氨基后辅以阳离子脂质 DOTAP 通过双乳化溶剂挥发法自组装形成 DCNA，结构示意图见图 1A。利用动态光散射仪检测，纳米颗粒的粒径为 (168.8 ± 2.2) nm（图 1B），Zeta 电位为 (17.9 ± 0.8) mV（图 1C）。TEM 显示纳米颗粒呈规则球形，如图 1D。使用紫外分光光度计检测纳米颗粒对 siRNA 的包载效率约为 92.7%。

为了评估所制备纳米颗粒的稳定性，将 DCNA_{siRNA} 分别置于 1×PBS 及含 10% FBS 的 1640 培养基中，48 h 后检测颗粒的分散情况。如图 1E 所示，在 PBS 中 DCNA_{siRNA} 的粒径仅发生轻微变化，表明其在单纯缓冲体系中稳定性良好；而在含 FBS 的培养基中，由于带负电血清蛋白的吸附，粒径呈现先增大后减小的动态变化，最终趋于稳定（纳米颗粒多分散指数（Polydispersity Index, PDI）为 0.3）（图 1F）。进一步通过体外释放实验模拟生理环境，结果显示（图 1G），DCNA_{siRNA} 可在两周内实现 siRNA 的缓慢释放，提示其具备持续发挥作用的潜力。

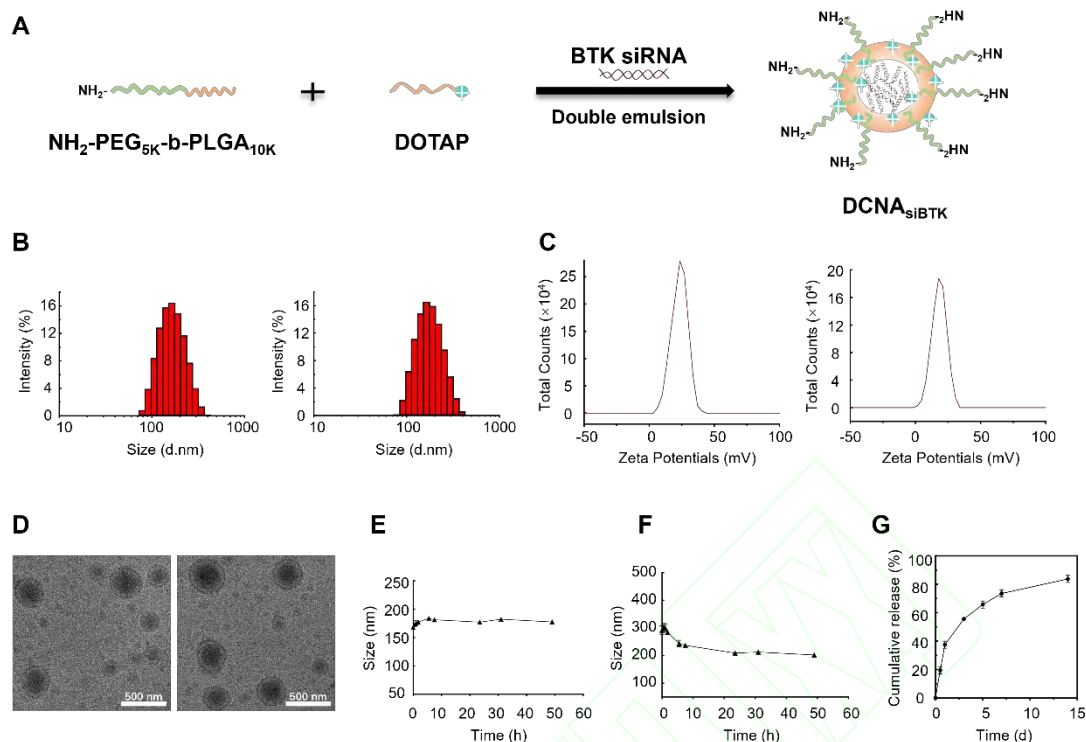


图 1 纳米颗粒的合成与表征

Fig. 1 Preparation and characterization of nanoparticle

(A) DCNA_{siBTK}的合成示意图。(B-D) 未包载 siRNA (左) 和包载 siRNA (右) 纳米颗粒的粒径 (B)、Zeta 电位 (C) 和 TEM 图象 (放大倍数: ×13,500) (D)。(E-F) DCNA_{siRNA} 在 PBS (E) 和 FBS (F) 中的稳定性。(G) DCNA_{siRNA} 在 PBS 中的释放曲线。

注: A: Schematic diagram depicting the synthesis procedure for DCNA_{siBTK}; B-D: The diameters (B), zeta potential (C), and TEM images (magnification ×13 500) (D) of nanoparticles without siRNA encapsulation (left) and with siRNA encapsulation (right); E, F: Stability of DCNA_{siRNA} in PBS (E) and FBS (F); G: *In vitro* release profile of DCNA_{siRNA} in PBS.

2.2 DCNA 在体外有效抑制牙周致病菌的生长

本研究通过细菌共培养检测正电性对载体抗菌能力的影响, *Pg*、*Aa* 及 *Fn* 的平板菌落生长结果如图 2A 所示。菌落定量统计结果显示 (图 2B), 经 DOTAP 修饰的颗粒表现出更强的抗菌效果, *Pg*、*Aa* 和 *Fn* 的菌落数较 PBS 对照组分别显著降低了 94.4%、86.0%及 71.3%, 该增强效应与动态光散射仪检测到的未修饰 DOTAP (10.4 ± 0.4) mV 和修饰 DOTAP 的空颗粒 (20.3 ± 0.7) mV Zeta 电位变化趋势相一致, 说明纳米颗粒本身具备明显的广谱抗牙周致病菌活性。CCK-8 细胞毒性实验结果 (图 3) 表明, 该纳米颗粒作用于淋巴细胞的最大安全浓度为 100 nmol/L; 在此浓度下, 颗粒能够在维持淋巴细胞细胞膜完整性的同时实现对牙

周致病菌的有效抑制，体现出良好的生物相容性与抗菌效能的统一。

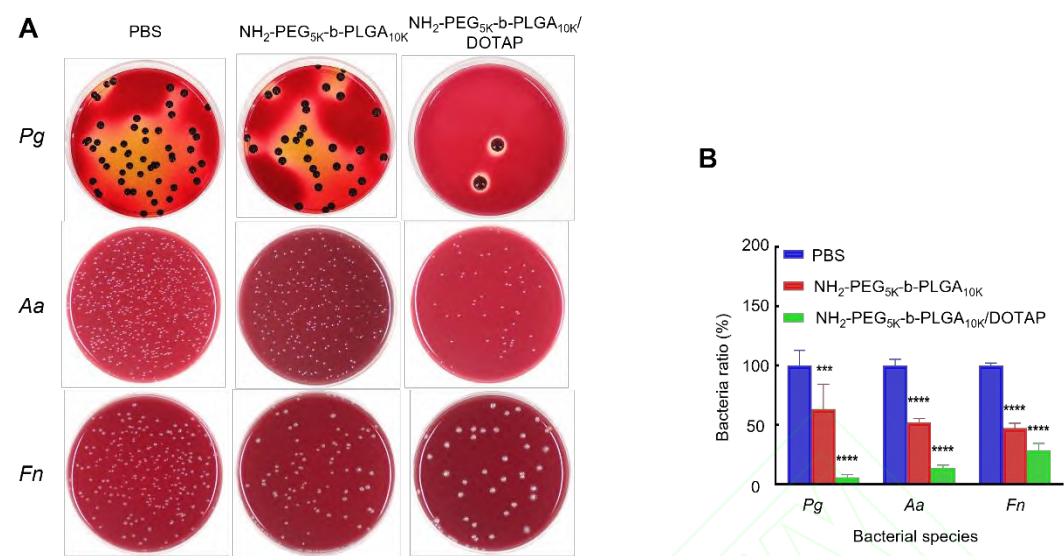


图 2 DCNA 体外抗菌活性评价

Fig. 2. Evaluation of the antibacterial efficacy of DCNA *in vitro*

注：A: Photographs of bacterial colony formation on agar plates across all experimental groups; B: Quantitative analysis of colony forming units (CFUs) for each group; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

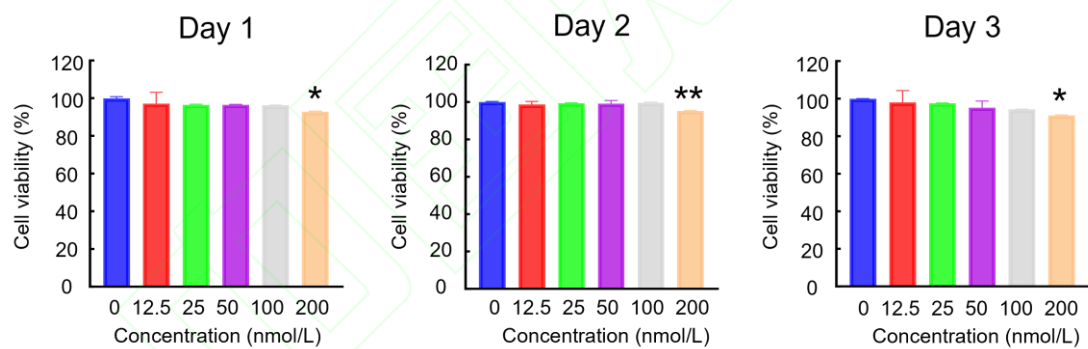


图 3 不同浓度 DCNA_{siBTK} 对淋巴细胞活力的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of DCNA_{siBTK} on lymphocyte viability

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 DCNA_{siBTK} 在体外下调 BTK mRNA 和蛋白的表达

BTK 在 T、B 细胞活化增殖及炎症因子分泌过程中发挥关键调控作用，沉默 T、B 细胞中 BTK 基因表达有望成为一种扭转失衡的牙周免疫微环境的方案。为了证明 DCNA 能够将 siBTK 递送到 T、B 细胞内发挥效应，本研究将纳米颗粒与小鼠脾源性淋巴细胞共孵育 6 h，并于转染 48 h 后检测 BTK 的 mRNA 及蛋白表达水平。qRT-PCR 结果显示(图 4A)，DCNA_{siBTK} 可剂量依赖性地抑制淋巴细胞中 BTK mRNA 的表达，解决游离 siRNA 无法被细胞摄取的问题。

题；在 100 nmol/L 浓度下，BTK mRNA 表达被敲低 72%。进一步通过蛋白质印迹分析证实，BTK 蛋白水平也呈现相应的剂量依赖性下调（图 4B）。综上，DCNA 纳米载体可将 siBTK 递送至 T、B 细胞内，并有效沉默 BTK 基因的表达和降低 BTK 蛋白的表达水平。

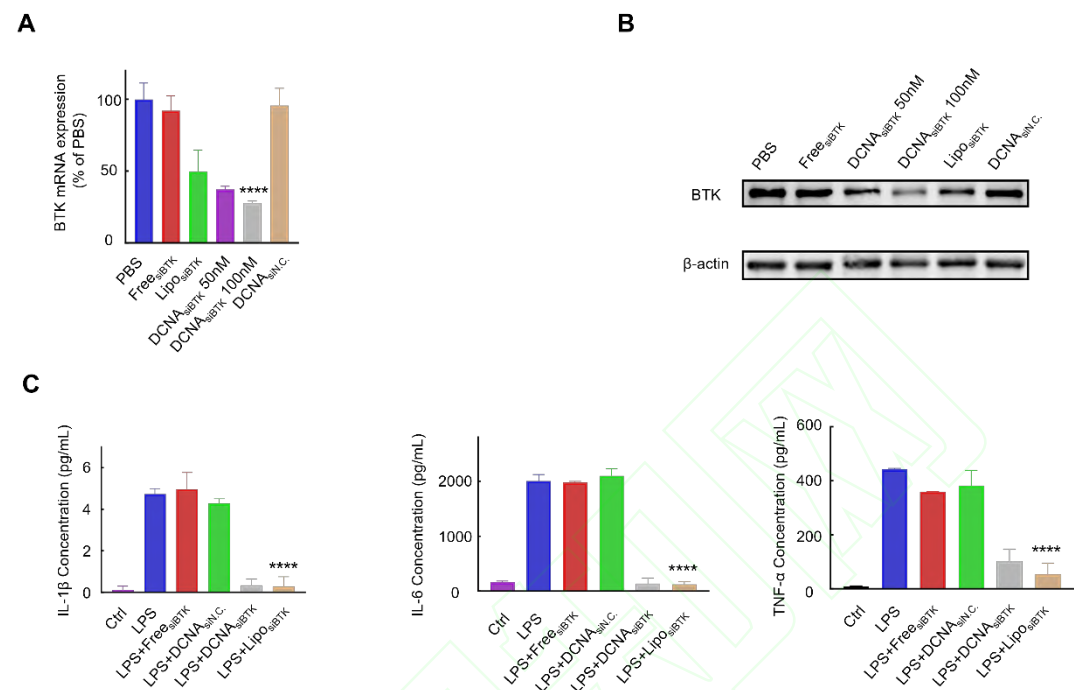


图 4 DCNA_{siBTK} 在淋巴细胞中的体外基因沉默效率、蛋白表达抑制及抗炎效果评估

Fig. 4 Assessment of *in vitro* gene silencing efficiency, protein inhibition, and anti-inflammatory effects of DCNA_{siBTK} in lymphocytes

(A) 通过 qRT-PCR 检测淋巴细胞 BTK mRNA 的相对表达水平。(B) 通过蛋白质印迹法分析淋巴细胞 BTK 蛋白的相对表达水平。(C) 通过 ELISA 分析细胞上清中 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的浓度。**** $P < 0.0001$ 。

注：A: Relative BTK mRNA expression levels in lymphocytes analyzed by qRT-PCR; B: Relative BTK protein expression levels in lymphocytes evaluated using Western blot technique; C: Assessment of IL-1β, IL-6, and TNF-α release into the extracellular medium using quantitative ELISA; **** $P < 0.0001$.

2.4 DCNA_{siBTK} 在体外减少炎症因子的分泌

为了评估 DCNA_{siBTK} 的体外抗炎效果，本研究使用 LPS 刺激淋巴细胞以模拟牙周炎相关炎症环境，随后加入纳米颗粒共培养 12 h，并通过 ELISA 检测细胞上清液中炎症因子的分泌水平。结果如图 4C 所示，与对照组（LPS 组）相比，DCNA_{siBTK} 处理组中 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的分泌量均显著降低，表明该递送系统在体外能有效抑制炎症因子的释放、降低

免疫细胞炎症反应，提示其在调控牙周炎相关炎症反应中具有潜在作用。

2.5 DCNA 在体内抑制牙周致病菌的生长

在 *Pg* W83 诱导的小鼠牙周炎模型中，对不同纳米载体治疗组牙周袋菌斑进行刮取并培养，各组厌氧菌生长结果如图 5A 所示。菌落定量分析结果显示（图 5B），两组纳米颗粒均展现出显著的抗菌活性，其中 DOTAP 修饰实验组的抗菌效果更为突出，可有效抑制牙周袋内厌氧菌增殖，且菌落数量随治疗时间呈持续性下降趋势（实验组首末时间点比较， $P<0.05$ ）。治疗 2 周后，进一步提取牙周袋菌斑总 DNA，通过 qPCR 技术检测主要致病菌 *Pg* W83 的相对表达水平。如图 5C 所示，NH₂-PEG_{5K}-PLGA_{10K} 组与 NH₂-PEG_{5K}-PLGA_{10K}/DOTAP 组的 *Pg* W83 相对表达量较 PBS 对照组显著降低，且后者的抑制作用更为明显。这一结果表明，DOTAP 可赋予纳米颗粒更具优势的正电性表面结构，从而更有效地抑制 *Pg* 在牙周局部的定植与生长。上述体内实验结果与体外抗菌研究结论高度一致，证实本研究设计的纳米颗粒具有优异的体内抗菌效能。

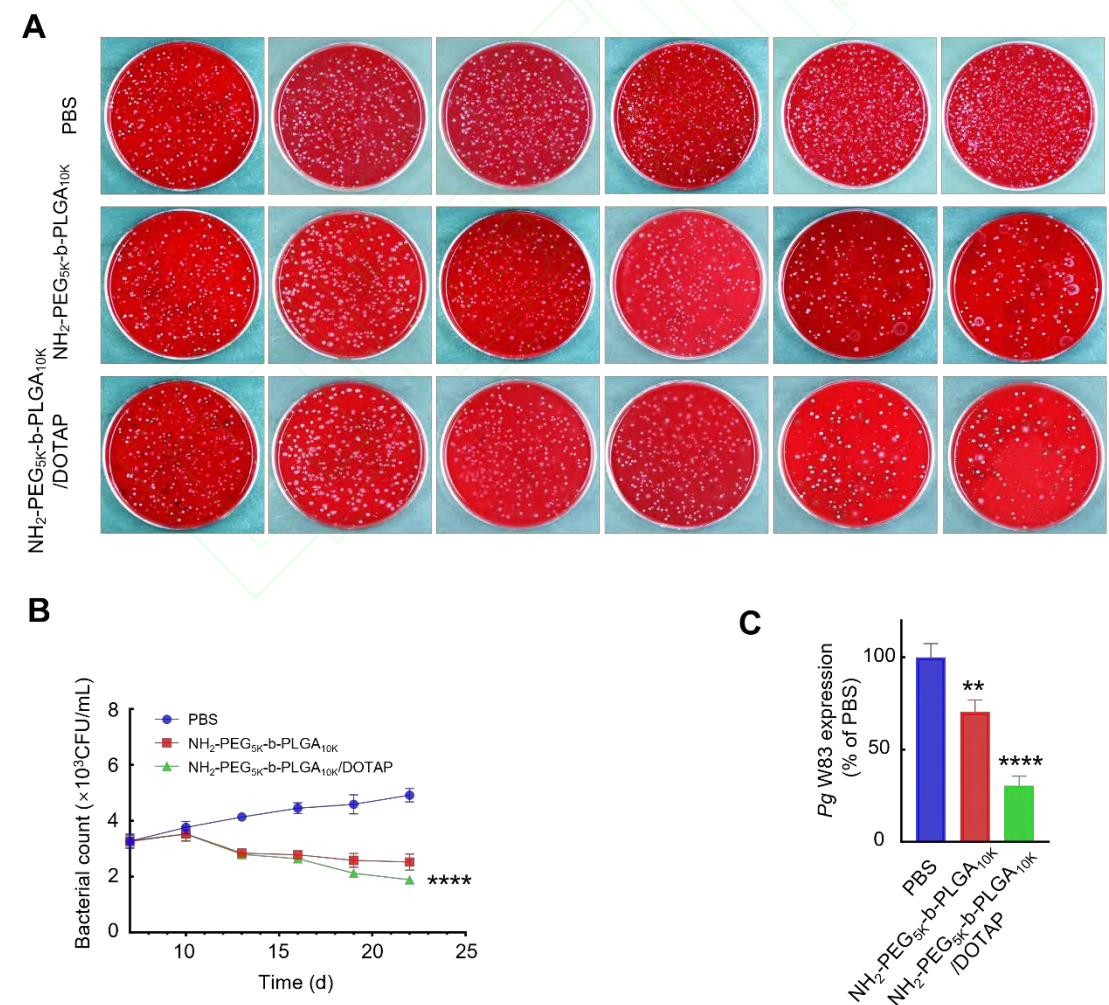


图 5 DCNA 的体内抗菌效果评估

Fig. 5 Evaluation of the antibacterial efficacy of DCNA *in vivo*

(A) 各组小鼠牙周袋内厌氧菌平板菌落形态图。(B) 各组小鼠牙周袋内厌氧菌菌落计数动态变化折线图。(C) qPCR 检测各组小鼠 *Pg* W83 菌株特异性基因的相对表达水平。(n=3)
** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

注: A: Representative images of anaerobic bacterial colonies in the periodontal pockets of mice from each group; B: Dynamic changes in anaerobic bacterial colony counts in the periodontal pockets of mice from each group; C: Relative expression level of *Pg* W83 strain-specific gene in mice from each group as measured *via* qPCR; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

2.6 DCNA_{siBTK} 在体内减轻牙周组织炎症症状

在 小鼠 牙周 炎 模型 中, 经 不同 纳米 颗粒 处理 组 治 疗 2 周 后, 采 用 IHC 染 色 检 测 牙 周 组 织 炎 症 相 关 细 胞 因 子 的 表 达, 典 型 染 色 结 果 如 图 6A 所 示。对 结 果 进 行 定 量 分 析 (图 6B-6D) 显 示, 与 未 干 预 的 牙 周 炎 模 型 组 (PD+PBS 组) 相 比, DCNA_{siBTK} 组 牙 周 组 织 中 促 炎 细 胞 因 子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的 阳 性 染 色 区 域 面 积 显 著 缩 小, 提 示 该 纳 米 颗 粒 可 有 效 抑 制 促 炎 因 子 在 牙 周 局 部 组 织 的 浸 润 与 表 达, 进 而 发 挥 抗 炎 作 用。上 述 结 果 证 实 了 DCNA_{siBTK} 能 减 轻 小 鼠 牙 周 组 织 的 炎 症 症 状, 为 载 体 在 体 内 的 抗 炎 疗 效 提 供 了 组 织 学 层 面 的 直 接 证 据。

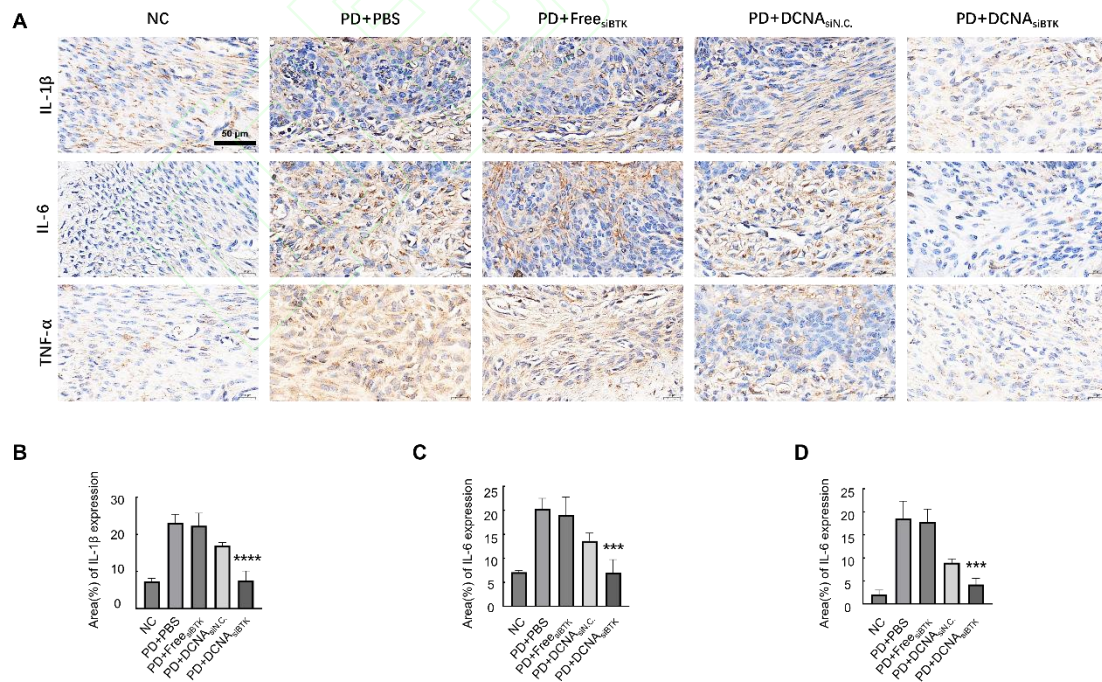


图 6 DCNA_{siBTK} 的体内抗炎效果评估

Fig. 6 Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of DCNA *in vivo*

(A) 各组小鼠牙周组织炎症相关促炎因子免疫组织化学 (IHC) 染色代表性图像 (放大倍数: $\times 80$)。 (B-D) IL-1 β 、IL-6、及 TNF- α 相对阳性染色面积定量分析结果。 (n=3) *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

注: A: Representative images showing IL-1 β , IL-6, and TNF- α expression in periodontal tissue sections via immunohistochemical (IHC) staining (magnification: $\times 80$); B-D: Quantification of the immunopositive area fraction for IL-1 β , IL-6, and TNF- α expression; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.7 DCNA_{siBTK} 在体内抑制牙槽骨吸收

为了进一步验证 DCNA_{siBTK} 的体内治疗效果, 治疗 2 周后, 对各组小鼠上颌骨进行了 Micro-CT 扫描及三维重建, 结果如图 7A 所示。健康对照组牙槽嵴顶高度接近釉牙骨质界; 牙周炎模型组中, PBS 组与 Free_{siBTK} 组牙槽骨吸收最为显著, 表现为颊侧牙槽骨呈凹坑状吸收, 根分叉区完全暴露; DCNA_{siN.C.}组及 DCNA_{siBTK} 组牙槽骨破坏程度均有所缓解, 其中 DCNA_{siBTK} 组改善最为明显。定量分析结果显示 (图 7B-7D), 与牙周炎对照组 (PD+PBS 组) 相比, DCNA_{siBTK} 组的 CEJ-ABC 距离显著降低, 而第二磨牙近中区域的骨体积分数 (Bone Volume/Total Volume, BV/TV) 及骨矿物质密度 (Bone Mineral Density, BMD) 明显升高。上述定量结果与三维重建图像呈现的趋势一致, 证实 DCNA_{siBTK} 纳米颗粒可显著抑制牙槽骨吸收进程。此外, HE 染色结果显示 (图 7E), 与牙周炎对照组相比, DCNA_{siBTK} 纳米溶液注射组牙周上皮完整性破坏减轻, 牙槽骨高度得到一定恢复。综上, DCNA_{siBTK} 纳米颗粒能有效抑制小鼠牙周炎相关性牙槽骨吸收, 显著缓解牙周炎病理进程。

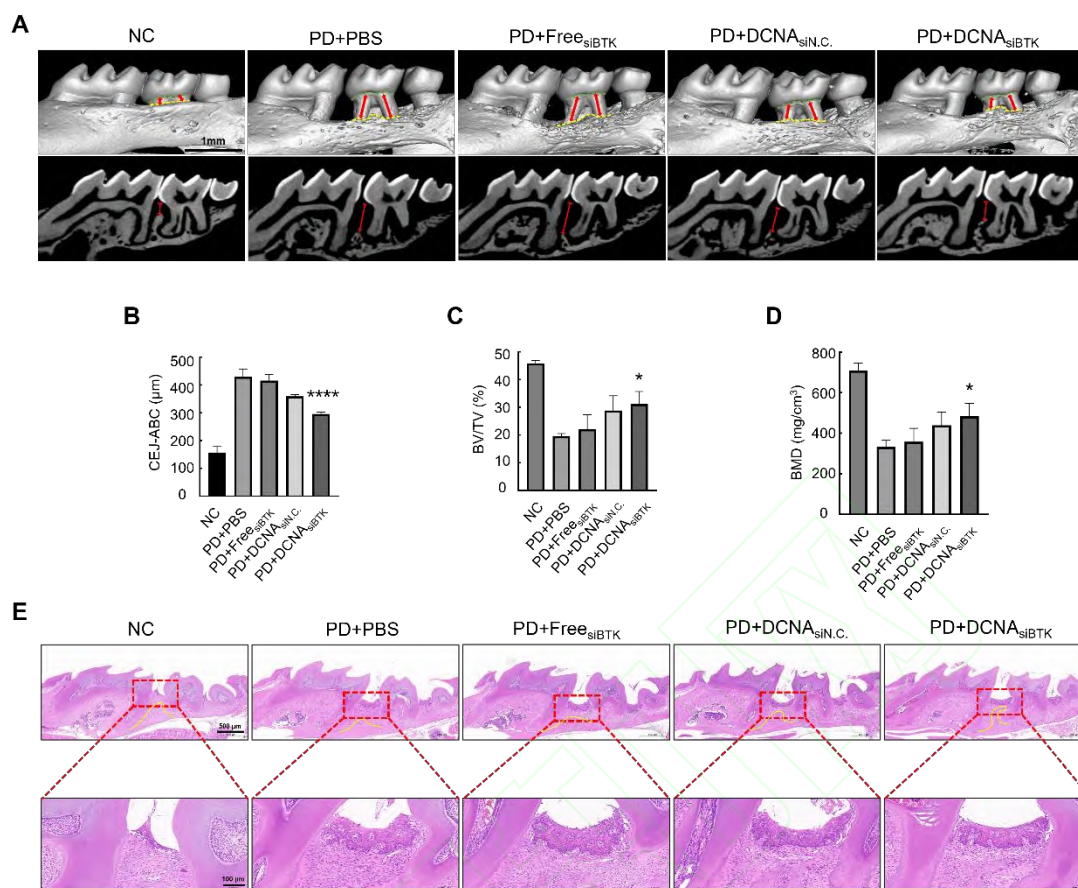


图 7 DCNA_{siBTK} 治疗小鼠牙周炎 2 周后的 Micro-CT 及组织学分析结果

Fig.7 Micro-CT imaging and histological staining of periodontal lesions in mice receiving DCNA_{siBTK} therapy for a two-week duration

(A) 治疗 2 周后小鼠上颌骨三维重建图 (上) 及矢状位截面图 (下)。(B) 各组小鼠 CEJ-ABC 的定量统计分析结果。(C) 各组小鼠第二磨牙近中区域 BV/TV 定量统计分析结果。(D) 各组小鼠第二磨牙近中区域 BMD 定量统计分析结果。(E) 各组小鼠牙周组织 HE 染色组织学切片结果。(n=3) * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

注: A: 3D reconstruction images (top) and sagittal cross-sectional views (bottom) of the maxillae; B: Quantitative assessment of CEJ-ABC distances across all experimental cohorts; C: Evaluation of BV/TV at the second molar mesial site; D: Determination of BMD localized to the mesial region of the second molar; E: Histological assessment of periodontal tissues following HE staining; * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

2.8 纳米颗粒的体内生物安全性评估

对接受体内治疗的小鼠主要脏器 (心、肝、脾、肺、肾) 进行 HE 染色观察治疗的安全性结果显示 (图 8), DCNA_{siBTK} 组各脏器组织结构清晰, 细胞形态与对照组相比均未观察到

明显病理改变。结果表明，该纳米颗粒在实验条件下未引起显著脏器毒性，表现出良好的生物安全性，为其进一步临床转化提供了实验依据。

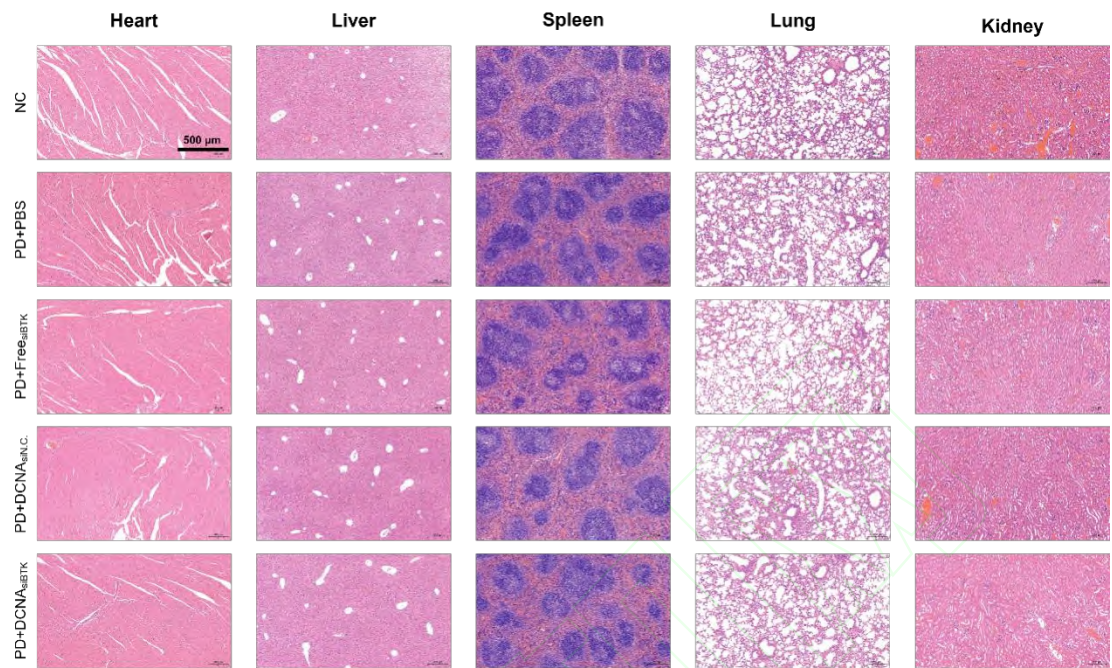


图 8 各组小鼠主要脏器的 HE 染色图像 $\times 10$

Fig. 8 HE staining images of major organs in mice from each group $\times 10$

3 讨论

牙周炎是公认的全球第六大非传染性慢性疾病，在发展中国家尤为高发，是造成成年人失牙的主要原因，已成为重要的公共卫生负担。其病理机制不仅涉及牙周致病菌感染，更与宿主免疫异常密切相关，过度活化的 T 细胞和 B 细胞可持续释放促炎因子，加速牙周组织的破坏。传统以机械刮治联合抗菌药物为主的治疗模式在清除生物膜、控制炎症及避免耐药方面均存在局限，难以从根本上逆转牙周组织破坏。

纳米递送体系的设计是本研究的核心创新。本研究以 $\text{NH}_2\text{-PEG}_{5\text{K}}\text{-b-PLGA}_{10\text{K}}$ 为骨架并辅以阳离子脂质 DOTAP，构建了一种双效阳离子核酸递送纳米载体 $\text{DCNA}_{\text{siBTK}}$ ，不仅改善了 siRNA 的稳定性与细胞摄取效率，还通过正电性增强对牙周致病菌 (*Pg*、*Aa*、*Fn*) 的抑制作用，实现了抗菌与基因调控的双重治疗模式。这种设计区别于传统纳米载体仅注重递送或单纯抗菌的策略，为牙周炎局部治疗提供新的解决方案。体外结果显示， $\text{DCNA}_{\text{siBTK}}$ 在安全浓度范围内对哺乳动物细胞无明显毒性，同时在炎症模型中实现了有效 BTK 沉默和促炎因子下降，体现出良好的选择性抗菌能力与生物相容性。

体内动物实验进一步证实了 $\text{DCNA}_{\text{siBTK}}$ 的综合治疗潜能。 $\text{DCNA}_{\text{siBTK}}$ 局部注射后，小鼠

牙周袋内厌氧菌的数量显著减少，炎症因子表达下调，Micro-CT 及组织学分析显示牙槽骨吸收减轻并改善骨结构参数。这表明 DCNA_{si}BTk 不仅通过调控免疫反应缓解炎症，还能间接保护牙周组织结构，验证了抗菌与免疫调控协同作用的可行性。安全性评价显示未见主要脏器病理损伤，为其临床转化提供了初步依据。该研究也存在一些局限性。细胞模型无法完全模拟牙周袋复杂的炎症微环境，未来应关注免疫微环境变化对巨噬细胞、牙龈成纤维细胞的影响。其次，本研究未对不同剂量 DCNA_{si}BTk 对免疫反应的潜在长期影响进行深入评估，未来还需关注其在免疫系统的长期作用和可能的副作用。

综上所述，DCNA_{si}BTk 通过协同抗菌与免疫调控，在体内外实验中均展现出优异的治疗效果，减轻牙槽骨吸收，显示出潜在临床应用价值，为牙周炎辅助治疗提供了具有潜在临床转化价值的纳米策略和理论基础。

参考文献

- [1] Heitz-Mayfield L J A. Conventional diagnostic criteria for periodontal diseases (plaque-induced gingivitis and periodontitis) [J]. *Periodontol* 2000, 2024, 95(1): 10-19. doi: 10.1111/prd.12579
- [2] Łasica A, Golec P, Laskus A, et al. Periodontitis: etiology, conventional treatments, and emerging bacteriophage and predatory bacteria therapies [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1469414. doi: 10.3389/fmicb.2024.1469414
- [3] Xiang D D, Sun Y X, Jiao C, et al. Diabetes and periodontitis: the role of a high-glucose microenvironment in periodontal tissue cells and corresponding therapeutic strategies [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 366. doi: 10.1186/s13287-025-04441-z
- [4] Slots J. Primer on etiology and treatment of progressive/severe periodontitis: A systemic health perspective [J]. *Periodontol* 2000, 2020, 83(1): 272-276. doi: 10.1111/prd.12325
- [5] Li J, Wang Y, Tang M, et al. New insights into nanotherapeutics for periodontitis: a triple concerto of antimicrobial activity, immunomodulation and periodontium regeneration [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 19. doi: 10.1186/s12951-023-02261-y
- [6] Steckiewicz K P, Ciecioriski P, Barcińska E, et al. Silver Nanoparticles as Chlorhexidine and Metronidazole Drug Delivery Platforms: Their Potential Use in Treating Periodontitis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 495-517. doi: 10.2147/ijn.S339046
- [7] Wei Y, Deng Y, Ma S, et al. Local drug delivery systems as therapeutic strategies against periodontitis: A systematic review [J]. *J Control Release*, 2021, 333: 269-282. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.03.041
- [8] Luan J, Li R, Xu W, et al. Functional biomaterials for comprehensive periodontitis therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(6): 2310-2333. doi: 10.1016/j.apsb.2022.10.026
- [9] Teughels W, Feres M, Oud V, et al. Adjunctive effect of systemic antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47 Suppl 22: 257-281. doi: 10.1111/jcpe.13264
- [10] Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks R W. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 57. doi: 10.1186/s12943-018-0779-z

- [11] Xia S, Liu X, Cao X, et al. T-cell expression of Bruton's tyrosine kinase promotes autoreactive T-cell activation and exacerbates aplastic anemia [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(10): 1042-1052. doi: 10.1038/s41423-019-0270-9
- [12] Pokhrel N K, Kim Y G, Kim H J, et al. A novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor, acalabrutinib, suppresses osteoclast differentiation and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced alveolar bone resorption [J]. *J Periodontol*, 2019, 90(5): 546-554. doi: 10.1002/jper.18-0334
- [13] Zhu S, Gokhale S, Jung J, et al. Multifaceted Immunomodulatory Effects of the BTK Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib on Different Immune Cell Subsets - Beyond B Lymphocytes [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 727531. doi: 10.3389/fcell.2021.727531
- [14] Kim B, Park J H, Sailor M J. Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(49): e1903637. doi: 10.1002/adma.201903637
- [15] Xiao B, Wang S, Pan Y, et al. Development, opportunities, and challenges of siRNA nucleic acid drugs [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2025, 36(1): 102437. doi: 10.1016/j.omtn.2024.102437