

• 论 著 •

慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 水平与牙周指标、炎性细胞因子及蛋白酶相关分子的相关性研究^{*}

罗业姣, 龚仁国[△], 陈 齐, 张 静, 王君莲
(成都医学院第一附属医院口腔科, 四川成都 610500)

摘 要:目的 研究慢性牙周炎患者唾液中微小 RNA(miR)-21 水平与牙周指标、炎性细胞因子及蛋白酶相关分子水平的相关性。方法 选择 2016 年 3 月至 2019 年 3 月该院收治的 50 例慢性牙周炎患者作为慢性牙周炎组, 同期体检的 50 例健康志愿者作为健康对照组, 检测唾液中 miR-21、炎症细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、蛋白酶相关分子基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-8、MMP 组织抑制物(TIMP)-1 水平及牙周指标菌斑指数(PLI)、牙龈指数(GI)、牙周探诊深度(PD)、附着丧失(AL)。结果 慢性牙周炎组唾液中 miR-21、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、MMP-1、MMP-8、TIMP-1 水平及牙周指标 PLI、GI、PD、AL 均高于健康对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); Pearson 相关性分析显示, 慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 水平与 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、MMP-1、MMP-8、TIMP-1、PLI、GI、PD、AL 的水平呈正相关($P < 0.05$)。结论 慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 水平异常升高, 且与牙周指标、炎性因子、蛋白酶分子水平存在一定的相关性, 其可能参与了慢性牙周炎的发生、发展过程。

关键词:慢性牙周炎; 微小 RNA-21; 炎性细胞因子; 基质金属蛋白酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.24.013

中图法分类号:R781.4+2

文章编号:1673-4130(2020)24-2994-04

文献标识码:A

Study on the correlation between the levels of miR-21 in saliva and periodontal indexes, inflammatory cytokines, protease-related molecules in patients with chronic periodontitis^{*}

LUO Yejiao, GONG Renguo[△], CHEN Qi, ZHANG Jing, WANG Junlian
(Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China)

Abstract: **Objective** To study the correlation between the levels of microRNA(miR)-21 in saliva and periodontal indexes, inflammatory cytokines, protease-related molecules in patients with chronic periodontitis. **Methods** A total of 50 cases of patients with chronic periodontitis admitted to the hospital from March 2016 to March 2019 were selected as the chronic periodontitis group and 50 cases of healthy volunteers who underwent physical examination at the same time were taken as the healthy control group. miR-21 in saliva, inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-17, tumor necrosis factor- α (TNF- α), protease-related molecules matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-8 and tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) and periodontal index plaque index (PLI), gingival index (GI), periodontal exploration depth (PD) and attachment loss (AL) were measured. **Results** The levels of miR-21, IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , MMP-1, MMP-8, TIMP-1 in saliva and the levels of periodontal indexes PLI, GI, PD and AL in chronic periodontitis group were higher than those of healthy control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the levels of miR-21 in saliva of patients with chronic periodontitis positively correlated with the levels of IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , MMP-1, MMP-8, TIMP-1, PLI, GI, PD, AL ($P < 0.05$). **Conclusion** The level of miR-21 in saliva of patients with periodontitis increase abnormally, and has a certain correlation with periodontal index, inflammatory factors, protease molecular level, which may be involved in the occurrence and development of chronic periodontitis.

Key words: chronic periodontitis; microRNA-21; inflammatory cytokines; matrix metalloproteinase

^{*} 基金项目: 四川省教育厅科研课题(18ZA0156)。

作者简介: 罗业姣, 女, 主治医师, 主要从事慢性牙周炎方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: gongrg123@163.com。

本文引用格式: 罗业姣, 龚仁国, 陈齐, 等. 慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 水平与牙周指标、炎性细胞因子及蛋白酶相关分子的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(24): 2994-2997.

慢性牙周炎是口腔科的常见疾病,表现为牙周组织慢性炎症性破坏,严重危害口腔健康,同时也是导致成年人牙缺失的主要原因之一。牙菌斑被认为与慢性牙周炎的发病密切相关,其可引起牙周组织炎症反应激活^[1-2],但牙菌斑激活炎症反应的机制仍不明确。近年来,微小 RNA(miR)在多种炎症性疾病中的作用受到了越来越多的关注^[3-4],其中 miR-146a 已经被证实慢性牙周炎患者的唾液中存在异常表达,并且与多项牙周指标、炎症细胞因子均存在相关性^[5];miR-21 则被证实慢性牙周炎中存在异常表达^[6],但国内关于 miR-21 在慢性牙周炎中的变化及意义鲜见报道。为此,本研究拟分析慢性牙周炎唾液中 miR-21 水平与牙周指标、炎症细胞因子及蛋白酶相关分子水平的相关性,旨在阐明 miR-21 在慢性牙周炎发生及病情发展中的作用,进而为将来探究慢性牙周炎发病机制,寻找慢性牙周炎新的诊疗靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 3 月至 2019 年 3 月本院收治的 50 例慢性牙周炎患者作为慢性牙周炎组,纳入标准:(1)经临床判断为慢性牙周炎且至少一颗牙探诊深度超过 5 mm;(2)首次诊断,入组前未接受过牙周治疗;(3)临床资料及唾液标本完整。排除标准:(1)合并慢性咽炎、扁桃体炎等口腔局部炎症;(2)近 3 个月接受过抗菌药物、免疫抑制剂治疗;(3)合并恶性肿瘤、自身免疫性疾病、糖尿病。选择同期体检的 50 例健康志愿者作为健康对照组。慢性牙周炎组中男 29 例,女 21 例;年龄 34~59 岁,平均(44.58±8.12)岁。健康对照组中男 27 例,女 23 例;年龄 33~60 岁,平均(46.17±9.67)岁。两组间一般资料的比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究取得研究对象的知情同意及本院伦理委员会批准,审批号为伦审(H20151223)。

1.2 仪器与试剂 miRNA 提取试剂盒、miRNA cDNA 第一链合成试剂盒、miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒购自北京康为世纪公司,白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-8、MMP 组织抑制物-1(TIMP-1)的酶联免疫吸附试剂盒购自上海西唐公司。

1.3 方法

1.3.1 唾液标本的收集 慢性牙周炎组在治疗前进行标本收集,健康对照组在体检时进行标本收集,晨起后用蘸有 2%枸橼酸的棉签擦拭口腔,然后用 1.5 mL 的 EP 管收集唾液约 1 mL,在 4℃离心机中 3 000 r/min 离心 15 min,取唾液上清并分为两份,放置在一80℃保存。

1.3.2 唾液中 miR-21 表达水平的检测 取一份唾液标本,采用 miRNA 提取试剂盒提取标本中的 miRNA,采用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒将 miR-

NA 反转录为 cDNA,采用 miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒对 cDNA 中的 miR-21 及 U6 进行荧光定量 PCR 扩增,miR-21 的上游引物序列为 5'-TAGCTAGCGTAGCTAGCT-3',下游引物为试剂盒通用引物;U6 的上游引物序列为 5'-GCATGTAGCTAGCTAGCTAA-3',下游引物序列为 5'-TGCTAGCTTAGCTAGAACTG-3'。PCR 程序为 95℃预变性 5 min 后 95℃ 5 s、60℃ 20 s 重复 40 个循环,反应完成后在软件中自动生成循环曲线及循环阈值(Ct),以 U6 为内参、计算 miR-21 的表达量,用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算, $\Delta Ct=Ct_{miR-21}-Ct_{U6}$ 。

1.3.3 唾液中炎症细胞因子及蛋白酶相关分子的检测 取另一份唾液标本,采用酶联免疫吸附试剂盒检测 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、MMP-1、MMP-8、TIMP-1 的水平,均按试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 牙周指标的检测 由主治医师级别以上的医生进行牙周指标的检测,具体指标包括菌斑指数(PLI)、牙龈指数(GI)、牙周探诊深度(PD)、附着丧失(AL)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据处理和统计分析,计量资料均为符合正态分布的连续变量,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关分析各指标之间的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性牙周炎组与健康对照组唾液中 miR-21 表达水平比较 健康对照组唾液中 miR-21 的表达水平为 0.95 ± 0.18 ,慢性牙周炎组唾液中 miR-21 的表达水平为 2.11 ± 0.52 ;与健康对照组比较,慢性牙周炎组唾液中 miR-21 的表达水平明显升高,差异有统计学意义($t=14.906,P<0.001$)。

2.2 慢性牙周炎组与健康对照组牙周指标比较 与健康对照组比较,慢性牙周炎组的 PLI、GI、PD、AL 均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 慢性牙周炎组与健康对照组牙周指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PLI	GI	PD(mm)	AL(mm)
慢性牙周炎组	50	3.29±0.62	3.51±0.84	6.58±0.94	7.79±1.21
健康对照组	50	0.91±0.15	1.14±0.24	1.89±0.51	0.77±0.22
<i>t</i>		26.493	19.182	31.076	40.420
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 慢性牙周炎组与健康对照组唾液中炎症细胞因子水平比较 与健康对照组比较,慢性牙周炎组唾液中 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 水平均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.4 慢性牙周炎组与健康对照组唾液中蛋白酶相关分子水平比较 与健康对照组比较,慢性牙周炎组唾

液中 MMP-1、MMP-8、TIMP-1 水平均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 2 慢性牙周炎组与健康对照组唾液中炎性细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-17(pg/mL)	TNF-α(ng/mL)
慢性牙周炎组	50	3.59±0.72	5.85±0.94	12.75±3.12	2.41±0.62
健康对照组	50	2.09±0.41	3.16±0.62	7.79±1.18	0.87±0.18
<i>t</i>		12.801	16.892	10.514	16.867
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 慢性牙周炎组与健康对照组唾液中蛋白酶相关分子水平比较($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	<i>n</i>	MMP-1	MMP-8	TIMP-1
慢性牙周炎组	50	3.85±0.85	32.49±7.24	4.24±0.85
健康对照组	50	1.77±0.35	12.57±2.58	3.12±0.67
<i>t</i>		15.933	18.326	7.317
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.5 慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 水平与其他指标的相关性 慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 水平与 IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α、MMP-1、MMP-8、TIMP-1、PLI、GI、PD、AL 呈正相关($P<0.05$),见表 4。

表 4 慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 水平与其他指标的相关性($n=50$)

指标	<i>r</i>	<i>P</i>
PLI	0.347	0.006
GI	0.295	0.017
PD	0.241	0.022
AL	0.329	0.015
IL-1β	0.432	<0.001
IL-6	0.266	0.019
IL-17	0.241	0.039
TNF-α	0.265	0.032
MMP-1	0.394	<0.001
MMP-8	0.218	0.047
TIMP-1	0.285	0.029

3 讨 论

慢性牙周炎的发病机制复杂,涉及多因素及多环节,牙周组织在牙菌斑作用下出现炎症反应的过度激活是其基本的病理变化,阐明在牙菌斑促进炎症反应激活过程中的关键分子有助于深入认识慢性牙周炎的发病机制,进而也为探寻新的诊疗靶点提供依据[7]。miR 是近年来口腔科领域的研究热点,miR 本身不具备编码氨基酸的功能,需要通过与靶基因 mRNA 结合来改变靶基因表达,进而产生相应的生物学作用。miR-21 是一类参与炎症反应调控的 miR,但目前关于 miR-21 在炎症反应中的具体调控作用尚无定论。有研究认为,miR-21 通过靶向 JNK 及 TSG4 发挥抑炎作用[8-9];另有研究认为,miR-21 通过上调

NLRP3 及 IL-8 的表达发挥促炎作用[10-11]。

吴丽娜等[6]以侵袭性牙周炎患者为对象的研究结果显示,侵袭性牙周炎患者的龈沟液中 miR-21 表达水平明显升高,且与疾病的严重程度相关。本研究结果显示,慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 的表达水平明显升高,提示 miR-21 表达水平升高与慢性牙周炎的病情加重有关。进一步通过牙周指标的检查来评价慢性牙周炎的病情,发现 PLI、GI、PD、AL 4 项指标均发生了明显变化,且 miR-21 的表达水平与 4 项牙周指标均呈正相关,提示 miR-21 可能在一定程度上影响了慢性牙周炎的发生、发展,发生这一变化可能与 miR-21 促进炎症反应激活有关,也可能与 miR-21 抑制炎症反应,并在牙周炎发生、发展过程中代偿性表达增多有关,但 miR-21 在慢性牙周炎中起到促炎作用还是抑炎作用,仍需后续细胞或动物实验来验证。

牙周组织在牙菌斑刺激下发生炎症反应的激活是慢性牙周炎基本的病理改变,IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α 等多种炎症细胞因子在牙周组织炎症反应激活的过程中被大量释放。已有多项研究证实,牙周炎患者龈沟液中上述几种炎症细胞因子的水平明显升高[12-14],本研究的分析结果与既往研究结果一致。进一步相关性分析发现,慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 的表达水平与 IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α 的水平呈正相关,说明 miR-21 表达水平升高可能与炎症细胞因子的释放、炎症反应的激活有关。牙周组织中炎症反应的激活能够使多种炎症细胞在局部浸润,进而释放 MMP-1、MMP-8、TIMP-1 等蛋白酶及抑制分子并介导牙周组织的水解和破坏[15-17]。本研究结果显示,慢性牙周炎组唾液中 MMP-1、MMP-8、TIMP-1 的水平升高且与 miR-21 呈正相关,说明 miR-21 表达水平升高可能与慢性牙周炎病程中蛋白酶介导的牙周组织破坏有关。

4 结 论

慢性牙周炎患者唾液中 miR-21 表达水平异常升高,且与牙周指标、炎症细胞因子及蛋白酶分子水平均有一定相关性,提示其可能在慢性牙周炎的发生、发展过程中发挥了一定作用。但是,miR-21 在慢性牙周炎中具体发挥促炎还是抑炎的作用有待进一步

的细胞实验或动物实验来验证。

参考文献

- [1] ARAÚJO M M, ALBUQUERQUE B N, COTA L, et al. Periodontitis and periodontopathogens in individuals hospitalized in the intensive care unit: a case-control study [J]. *Braz Dent J*, 2019, 30(4): 342-349.
- [2] 侯云华, 周肖英, 林彬, 等. 慢性牙周炎患者唾液中 IL-17、miR-146a 表达水平与疾病程度的相关性分析[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(9): 1721-1725.
- [3] SAITO A, HORIE M, EJIRI K, et al. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(7): 981-994.
- [4] AMARAL S A, PEREIRA T, BRITO J, et al. Comparison of miRNA expression profiles in individuals with chronic or aggressive periodontitis[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(2): 561-568.
- [5] 高颖, 郝晨笛. 慢性牙周炎患者唾液中 miR-146a 的表达及其与龈沟炎症、MMP-8/TIMP-1 水平的关系[J]. *上海口腔医学*, 2018, 27(3): 309-312.
- [6] 吴丽娜, 陈耀忠, 王一霖. 侵袭性牙周炎患者龈沟液中 miR-21 表达及与 MMP-9 水平相关性分析[J]. *河北医学*, 2019, 25(3): 592-595.
- [7] 李沫, 沈陆, 漆正楠, 等. 中国人群慢性牙周炎患者龈下菌斑中的细菌群落结构分析[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2017, 40(6): 40-43.
- [8] YANG Q, ZHANG Z, XU H, et al. Lidocaine alleviates cytotoxicity-resistance in lung cancer A549/DDP cells via down-regulation of miR-21[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 456(1/2): 63-72.
- [9] LIU J, MA Z, RAN Z. MiR-21-3p modulates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis via targeting TGS4 in retinal pigment epithelial cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(10): 883-889.
- [10] XUE Z, XI Q, LIU H, et al. miR-21 promotes NLRP3 in-

flammasome activation to mediate pyroptosis and endotoxic shock[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 461-465.

- [11] PACE E, DI VINCENZO S, DI SALVO E, et al. MiR-21 upregulation increases IL-8 expression and tumorigenesis program in airway epithelial cells exposed to cigarette smoke[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 22183-22194.
- [12] ABBASI Z A, HADI N I, ZUBAIRI A M, et al. Salivary Interleukin 1-beta levels and clinical periodontal parameters in habitual naswar users and non-users [J]. *Pak J Med Sci*, 2019, 35(3): 674-679.
- [13] SANTOS-LIMA E, OLIVEIRA Y, SANTOS R, et al. Production of interferon-gamma, interleukin-6, and interleukin-1 β by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with novel lys-gingipain synthetic peptides [J]. *J Periodontol*, 2019, 90(9): 993-1001.
- [14] SONG L, TAN J, WANG Z, et al. Interleukin 17A facilitates osteoclast differentiation and bone resorption via activation of autophagy in mouse bone marrow macrophages[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 4743-4752.
- [15] TAYLOR J J, JAEDICKE K M, VAN DE MERWE R C, et al. A prototype antibody-based biosensor for measurement of salivary MMP-8 in periodontitis using surface acoustic wave technology[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11034-11051.
- [16] WANG F, GUAN M, WEI L, et al. IL-18 promotes the secretion of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts by activating NF- κ B signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 703-710.
- [17] SCHMALZ G, DAVARPANAH I, JÄGER J, et al. MMP-8 and TIMP-1 are associated to periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis under methotrexate immunosuppression-first results of a cross-sectional study [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2019, 52(3): 386-394.

(收稿日期: 2020-02-21 修回日期: 2020-07-16)

(上接第 2993 页)

- [11] 罗欢欢. 超声引导下连续股神经阻滞在全膝关节置换术后镇痛中的应用[J]. *吉林医学*, 2019, 40(2): 332-334.
- [12] 曾敏, 李露, 柳春玲, 等. 超声联合神经刺激仪引导下股神经联合腓窝坐骨神经阻滞在髌骨手术中的应用[J]. *临床医药实践*, 2019, 46(10): 742-744.
- [13] 胡小玲, 杨小敏. 超声引导坐骨神经和股神经阻滞在老年患者膝部以下手术中的应用[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(8): 126-130.
- [14] 马俊峰, 雷育华. 超声联合神经刺激仪引导腓窝坐骨神经、股神经及隐神经阻滞的效果观察[J]. *临床医学研究与实践*, 2017, 2(36): 54-55.
- [15] 王育东. 超声引导下股神经结合侧入路腓窝坐骨神经阻滞在膝关节镜手术中的麻醉效果[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25(S2): 25-27.
- [16] 嵇湘林, 马晓军, 殷积慧, 等. 超声引导不同浓度罗哌卡因坐骨神经复合股神经阻滞对膝关节置换术后的镇痛效果

[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2018, 54(2): 193-196.

- [17] 李炳辉, 王强. 老年下肢骨折手术行超声介导的坐骨神经联合股神经阻滞麻醉的疗效评价[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2017, 11(22): 2403-2406.
- [18] 刘妃妃, 王云. 超声定位股神经及坐骨神经阻滞在大隐静脉曲张高位结扎剥脱术中的应用[J]. *北京医学*, 2018, 40(6): 543-546.
- [19] 周飞人, 蓝英年. 超声引导下股神经联合侧入路腓窝坐骨神经阻滞应用于下肢手术的临床效果观察[J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(8): 1127-1129.
- [20] 王远彬, 刘盼盼, 叶润娣, 等. 超声引导髂腹股沟-髂腹下神经联合股神经及腓窝坐骨神经阻滞在老年病人大隐静脉曲张手术中的应用[J]. *实用老年医学*, 2018, 32(10): 983-985.

(收稿日期: 2020-02-25 修回日期: 2020-06-20)