

• 临床论著 •

HIV⁺牙周炎患者龈沟液 IL-6 的检测分析

侯雯 贾洪诚 王璇 华文浩 付茜 李晓光

【摘要】 目的 初步探讨HIV⁺牙周炎患者龈沟液中IL-6和CD4⁺ T淋巴细胞计数与牙周临床指标的相关性,为临床提供参考。方法 记录20例HIV⁺牙周炎患者共120颗指数牙的牙周临床指标:菌斑指数(PLI)、出血指数(BI)、附着水平(AL)和牙周探诊深度(PD),用放射免疫法检测龈沟液中IL-6。计数受试者血液的CD4⁺ T淋巴细胞,并按其分组:A组(CD4计数>500 cells/mm³, 2例12颗牙),B组(CD4计数200~500 cells/mm³, 13例78颗牙),C组(CD4计数<200 cells/mm³, 5例30颗牙)。组间牙周临床指标和IL-6比较采用Mann-Whitney秩和检验,CD4⁺ T淋巴细胞计数和牙周临床指标的关系采用偏相关分析,IL-6和牙周临床指标的关系采用Spearman相关分析。结果 B组的BI值、GCF值、IL-6浓度分别为3.00(2.00)、4.80(2.20) ml、10.36(5.54) pg/μl。三组间的PD、AL差异均无统计学意义。B组和C组的CD4计数和BI有相关性($P<0.05$)。IL-6含量与各项牙周临床指标呈正相关($P<0.05$);IL-6浓度与各项牙周临床指标呈负相关($P<0.05$)。结论 HIV⁺牙周炎患者的牙周炎症程度与CD4⁺ T淋巴细胞计数有关,其龈沟液中IL-6水平与牙周临床指标有关。

【关键词】 CD4阳性T淋巴细胞; 白细胞介素6; HIV; 牙周炎

Analysis of IL-6 in gingival crevicular fluid of HIV-positive patients with periodontitis Hou Wen*, Jia Hongcheng, Wang Xuan, Hua Wenhao, Fu Qian, Li Xiaoguang. *Department of Stomatology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: Jia Hongcheng, Email: asdrtgf@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between IL-6, CD4⁺ T lymphocyte counts and periodontal status of HIV⁺ patients with periodontitis. **Methods** The gingival crevicular fluid were collected from 120 teeth of 20 patients. The levels of IL-6 were determined by RIA assays. Clinical measurements were recorded, including plaque index(PLI), bleeding index(BI), attachment level(AL) and probing depth(PD). The plasmatic CD4⁺ T lymphocytes were counted. All the individuals were divided into three groups: A group(CD4>500 cells/mm³), B group(200 cells/mm³≤CD4≤500 cells/mm³) and C group(CD4<200 cells/mm³). Mann-Whitney were used to compare groups. Partial correlations and Spearman correlations were applied to analyze the correlation of CD4 cell counts and IL-6 with periodontal status. **Results** BI, GCF, and IL-6 concentration were 3.00(2.00), 4.80(2.20)ml, and 10.36(5.54)pg/μl, in the B group. The differences of them were statistically significant between group B and A($P<0.05$). But the differences of PD and AL among three groups were of no statistical significance. The correlations were observed between CD4 cell counts and BI with group B and C($P<0.05$). IL-6 concentration was negatively correlated with BI, PD, GCF and AL($P<0.05$), while total IL-6 was positively correlated with them($P<0.05$). **Conclusion** The findings suggested that IL-6 might be associated with periodontal status of HIV⁺ patients with periodontitis. There was complex association between periodontal status and CD4 cell counts in HIV⁺ patients.

【Key words】 CD4-positive T-lymphocytes; Interleukin-6; HIV; Periodontitis

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.15.008

作者单位: 100015 首都医科大学附属北京地坛医院口腔科(侯雯、贾洪诚、华文浩、付茜、李晓光); 首都医科大学附属北京同仁医院口腔科(王璇)

通讯作者: 贾洪诚, Email: asdrtgf@sina.com

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者口腔中的病损最常见的是普通的牙周病。HIV感染是牙周病的危险因素^[1]。据国外文献报道,白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)能增强细胞内蛋白酶活性,从而启动静止的CD4⁺T淋巴细胞中HIV-1的表达和复制^[2-3]。且已有研究表明HIV⁺患者血浆中IL-6水平较正常人显著升高^[4-5]。而IL-6是研究龈沟液(gingival crevicular fluid, GCF)的主要细胞因子之一^[6]。通过研究GCF质和量的变化可以评估牙周局部的临床状况,检测牙周病易感程度^[7]。但目前关于HIV⁺患者GCF中IL-6的研究报道较少。本研究探讨HIV⁺牙周炎患者不同免疫状态、GCF中IL-6水平与牙周临床指标的相关性,为HIV感染者预防和有效治疗牙周疾病提供参考依据。

对象和方法

一、研究对象

HIV⁺牙周炎患者来自2012年1月至2013年4月首都医科大学附属北京地坛医院门诊,20例,均为男性,年龄20~50岁,平均26.5岁。纳入标准:未接受过抗病毒治疗;未接受过牙周治疗;口内存留牙齿不少于20颗,无修复体,左右两侧至少各有1颗牙齿的探诊深度(probing depth, PD)≥5 mm,且探诊出血(bleeding on probing, BOP)(+);无糖尿病、血液病等其他牙周病相关的系统性疾病;3个月内未服用抗生素或非甾体类抗炎药;不吸烟。排除标准:血小板计数异常;凝血酶原时间及活动度异常。牙周炎的诊断标准参照1999年牙周病分类法国际研讨会制定的标准^[8]。本研究通过北京地坛医院伦理委员会批准(批准号:北京地坛医院伦申第YN2011-06号),所有受试者均签署知情同意书。

二、CD4⁺T淋巴细胞计数

CD4⁺T淋巴细胞计数通过流式细胞仪测得,时间距离牙周检查不超过1个月。受试者按CD4⁺T淋巴细胞计数结果分为三组:A组为轻度免疫抑制组(CD4计数>500 cells/mm³, 2例12颗牙);B组为中度免疫抑制组(CD4计数200~500 cells/mm³, 13例78颗牙);C组为重度免疫抑制组(CD4计数<200 cells/mm³, 5例30颗牙)。

三、GCF采集

预先将6个2 mm×8 mm的Whatman3号滤纸条放入一个Eppendorf管中,用电子天枰(深圳华恒仪

器有限公司)称重并记录。取样时,嘱受试者漱口,棉卷隔湿取样牙(六颗指数牙:16、11、26、36、31、46)。记录取样位点的菌斑指数(plaque index, PLI)。探针去除牙面菌斑后用气枪轻轻吹干牙面,将6个滤纸条分别插入取样牙的近、远中颊侧及近、远中舌(腭)侧和颊、舌(腭)侧位点龈沟内,直至遇轻微阻力停滞30 s后取出,合并放回同一个Eppendorf管中。再次称取Eppendorf管的重量。两次重量之差即为GCF的量。称重后立即将Eppendorf管置于-70℃低温冰箱中冻存待检。

四、牙周检查

临床检查指标(除外PLI)的检测和记录均在取样后进行,以防临床检测影响GCF的质和量。牙周检查指标包括PLI,出血指数(bleeding index, BI),附着水平(attachment level, AL)和PD。PLI评分标准参照1964年Silness标准;BI评分标准参照1981年Mazza标准;AL和PD用Williams刻度牙周探针测量,以mm表示。临床检查由同一位牙周专业医师完成,经一致性校准。

五、IL-6检测方法

应用放射免疫分析法测定IL-6含量。操作严格按照IL-6放免药盒(北京华英生物技术研究所)操作说明书进行,结果由r-911全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司)读出。

六、统计学分析

所有数据录入SPSS 17.0数据库进行统计分析。CD4⁺T淋巴细胞计数和牙周临床指标的关系采用偏相关分析,IL-6和牙周临床指标的关系采用Spearman相关分析。不同CD4⁺T淋巴细胞计数组间的牙周临床指标和IL-6比较采用Mann-Whitney秩和检验。检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

结 果

20例HIV⁺牙周炎患者共检测牙120颗。其牙周临床指标、CD4⁺T淋巴细胞计数及IL-6检测结果呈非正态分布,采用中位数(四分位间距)[$M(Q)$]表示,见表1,2。按CD4⁺T淋巴细胞计数分为三组,每两组之间的牙周临床指标和IL-6检测结果进行秩和检验,发现B组的BI、GCF、IL-6浓度与A组的差异有显著统计学意义($P<0.05$);B组的BI($P<0.05$)与C组的差异有统计学意义。而A组与C组的各项指标的差异均无统计学意义。三组间的PD、AL差异均无统计学意义。

表1 各组受试者牙周临床参数检查结果[M(Q)]

组别	牙数	BI	PD(mm)	AL(mm)	GCF(ml)	PLI
A组	12	2.00(1.00) ^a	3.75(1.25)	4.00(1.46)	3.95(1.33) ^a	2.50(2.00)
B组	78	3.00(2.00)	3.83(0.88)	3.83(0.88)	4.80(2.20)	2.00(2.00)
C组	30	2.00(1.25) ^a	3.75(1.04)	3.92(1.17)	3.80(2.55)	2.00(1.25)

注:与相同指标B组相比, ^a $P < 0.05$

表3 各组受试者CD4⁺T淋巴细胞计数与牙周临床参数和实验室参数的相关性分析

组别	BI		PD		AL		IL-6浓度		IL-6含量	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
A组	0.166	0.625	0.262	0.436	-0.315	0.346	-0.268	0.425	0.114	0.738
B组	-0.369	0.001	0.007	0.949	0.095	0.410	-0.048	0.680	-0.101	0.382
C组	0.657	<0.001	-0.080	0.682	-0.169	0.380	-0.211	0.272	-0.290	0.127

表4 IL-6与牙周临床参数的相关性分析

参数	BI		PLI		PD		AL		GCF	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
IL-6浓度	-0.349	<0.001	-0.160	0.081	-0.467	<0.001	-0.320	<0.001	-0.676	<0.001
IL-6含量	0.092	0.319	0.187	0.041	0.357	<0.001	0.299	0.001	0.209	0.022

表2 各组受试者牙周实验室参数检测结果[M(Q)]

组别	CD4计数 (cells/mm ³)	IL-6浓度 (pg/μl)	IL-6含量 (pg)
A组	524.00(12.00)	12.39(3.55) ^a	49.49(25.27)
B组	386.00(144.00)	10.36(5.54)	49.60(19.83)
C组	35.00(40.00)	12.04(8.84)	49.62(16.32)

注:与相同指标B组相比, ^a $P < 0.05$

受试者按CD4⁺T淋巴细胞计数分组,各组CD4计数和各项检测指标的偏相关分析结果见表3。总的CD4计数与所有检测指标间均无相关性。对CD4计数分层,并控制菌斑指数进行偏相关分析,B组和C组的CD4计数和BI有相关性($P < 0.05$);A组的CD4计数和BI没有相关性;其余指标与CD4计数均无相关性。

受试者IL-6检测结果与牙周临床指标相关性分析见表4。IL-6含量与各项牙周临床指标呈正相关($P < 0.05$);IL-6浓度与各项牙周临床指标呈负相关($P < 0.05$)。

讨 论

Vernon等^[9]认为牙周炎的界定及研究对象的特征会影响HIV⁺患者牙周病水平。本研究对象的纳入标准,排除性别、吸烟及抗病毒治疗等的影响,并按CD4⁺T淋巴细胞计数进行分组。牙周炎的诊断标准参照1999年牙周病分类法国际研讨会制定的标准。研究结果显示:受试者按CD4⁺T淋巴细胞计数进行分组,当CD4计数 < 500 cells/mm³时,CD4⁺T

淋巴细胞计数与HIV⁺牙周炎患者的牙周局部炎症状态密切相关,中度免疫抑制组(CD4计数200~500 cells/mm³)的BI、GCF值最大,局部炎症最明显,与王璇等^[10]的研究结果相符。Alpagot等^[11]对25例HIV⁺牙周炎患者进行了6个月的纵向观察,显示PD、AL和CD4计数呈负相关,免疫状态对牙周炎的进展有影响,且活动期牙周炎组(平均年龄50.2岁)的CD4计数比静止期组(平均年龄35.47岁)低,病毒载量比静止期组高,随着病程的延长,活动期组CD4计数进一步降低,病毒载量进一步升高,推测牙周炎对病毒复制可能有影响。而本研究中PD、AL与CD4⁺T淋巴细胞计数没有显示出相关性。Gonçalves等^[12]对23例HIV⁺牙周炎患者(平均年龄33岁)进行研究,也没有观察到CD4计数和牙周参数的相关性。这可能是由于PD、AL是牙周炎症长期作用的结果,选取的受试者年龄偏小,没有足够的病程不能体现出差异。考虑到伦理因素,本研究没有观察在没有抗病毒和牙周治疗干预情况下活动期牙周炎和静止期牙周炎对CD4计数和IL-6的影响。

已有研究表明,病变的牙周组织中存在着IL-6的表达,且显著高于正常牙周组织^[13],并与牙周组织的破坏和牙周疾病的严重程度有关^[14-15]。IL-6参与牙周炎的各种病理过程,如:诱导牙周组织内的炎症细胞;抑制牙周膜细胞生长,抑制成骨作用及促进骨吸收和骨基质降解等^[16]。在HIV感染者病程进展的过程中,细胞免疫功能受损^[17],导致细胞因

子分泌不平衡。HIV⁺患者血浆IL-6水平较健康人显著升高^[5-18]。有学者^[19]认为, IL-6过量产生是由于抗原刺激、病毒感染本身的诱导和B细胞活化的结果, 以及HIV调节蛋白(如Tat)诱导T细胞或单核细胞表达IL-6^[20]。IL-6能增强细胞内的蛋白酶活性, 从而激活静止的CD4⁺ T淋巴细胞中HIV-1的表达与复制^[2-3]。可见, IL-6与牙周炎的发生、发展及HIV的表达和复制密切相关。因而本研究选取IL-6作为观察指标。本研究IL-6受牙周炎症及HIV感染引起的免疫反应双重影响。结果显示IL-6含量与牙周临床指标呈正相关, 提示IL-6与HIV⁺牙周炎患者的牙周局部炎症状态密切相关。而IL-6浓度与牙周临床指标呈负相关, 可能是因为GCF的体积增多, 起到一定的稀释作用。Lamster等^[21]和曹采方等^[22]认为, 牙龈炎症状态下GCF的体积往往增多, 可能会使总活性有明显增加的位点其浓度反而低于健康位点。Baqui等^[23]研究表明, HIV⁺牙周炎患者GCF中IL-6的水平较非感染者明显升高, 且表达水平与探诊深度、病毒载量相关。本研究对CD4⁺ T淋巴细胞计数进行分组比较, 发现中度免疫抑制组IL-6浓度较低, 与其余两组差异有统计学意义, 但轻度和重度免疫抑制组差异无统计学意义。Vastardis等^[24]认为CD4计数 $>500\text{ cells/mm}^3$ 时机体免疫反应正常, CD4⁺ T淋巴细胞数量减少时, 免疫反应和炎症反应程度增强, CD4计数 $<200\text{ cells/mm}^3$ 时, 免疫严重抑制, 对病原菌的反应则明显减弱。本研究中度免疫抑制组IL-6浓度较低, 可能为机体炎症反应程度增强, GCF的体积增多, 起到了稀释作用。而重度免疫抑制组在免疫严重抑制时IL-6浓度仍较高, 可能是因为机体的免疫系统是个复杂的网络, 在长期的HIV感染中, IL-6可受到许多因子的调控。Shive等^[25]的临床研究认为在长期的HIV感染中, 血浆中IL-6水平与sCD14水平相关, IL-6通过sCD14水平与HIV RNA水平相关。这也许就是当特异性细胞毒性T淋巴细胞功能严重受损时, IL-6并未同步减弱的原因, 因而当CD4计数 $<200\text{ cells/mm}^3$ 时, IL-6浓度仍较高。

综上所述, CD4⁺ T淋巴细胞计数与HIV⁺牙周炎患者的牙周炎症程度有关, GCF中IL-6水平与牙周临床指标有相关性。HIV⁺牙周炎患者可通过免疫反应和炎症反应的改变影响GCF中IL-6的水平从而影响牙周局部状况。

参 考 文 献

[1] Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, et al. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis[J]. *Periodontol*, 2000,

1997, 14: 173-201.

- [2] Ghose R, Liou LY, Herrmann CH, et al. Induction of TAK (cyclin T1/P-TEFb) in purified resting CD4(+) T lymphocytes by combination of cytokines[J]. *J Virol*, 2001, 75(23): 11336-11343.
- [3] 刘宏伍, 洪坤学, 邵一鸣. HIV 特异性 CTL 反应研究进展[J]. *国外医学:病毒学分册*, 2005, 12(1): 27-31.
- [4] Wang J, Crawford K, Yuan M, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 and CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages and microglia by T helper type 2 cytokines[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(7): 885-897.
- [5] 张尚红, 张远志, 周立平, 等. 新疆、辽宁地区 HIV-1 感染者细胞因子特征研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2003, 19(6): 418-420.
- [6] Gonzáles JR, Herrmann JM, Boedeker RH, et al. Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2001, 28(6): 544-549.
- [7] Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases[J]. *J Periodontol*, 1992, 63(4): 356-366.
- [8] 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999[J]. *Ann Periodontol*, 1999, 4(1): i, 1-112.
- [9] Vernon LT, Demko CA, Whalen CC, et al. Characterizing traditionally defined periodontal disease in HIV⁺ adults[J]. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2009, 37(5): 427-437.
- [10] 王璇, 刘静明, 贾洪诚, 等. HIV 感染者 CD4⁺ T 淋巴细胞计数与牙龈出血指数的关系[J]. *北京口腔医学*, 2011, 19(6): 326-328.
- [11] Alpagot T, Konopka K, Bhattacharyya M, et al. The association between gingival crevicular fluid TGF-beta1 levels and periodontal status in HIV-1(+) patients[J]. *J Periodontol*, 2008, 79(1): 123-130.
- [12] Gonçalves LS, Ferreira SM, Silva A Jr, et al. Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy: clinical results[J]. *J Periodontol*, 2005, 76(6): 915-922.
- [13] Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis[J]. *J Periodontol*, 1996, 67(5): 515-522.
- [14] Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease[J]. *J Periodontol*, 1994, 65(2): 147-153.
- [15] Mogi M, Ootogoto J, Ota N, et al. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease[J]. *Arch Oral Biol*, 1999, 44(6): 535-539.
- [16] 王磊, 彭式福, 刘青. 白细胞介素6与牙周炎的关系[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2003, 13(1): 53-56.
- [17] Shearer GM. HIV-induced immunopathogenesis[J]. *Immunity*, 1998, 9(5): 587-593.
- [18] Wang J, Crawford K, Yuan M, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 and CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages and microglia by T helper type 2 cytokine[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(7): 885-897.
- [19] Asadu K, 郝连杰. 细胞因子的测定——诊断应用的临床免疫学观点[J]. *德国医学*, 1999, 16(1): 42-45.
- [20] Hirano T, Kishimoto T. Molecular biology and immunology of interleukin-6[J]. *Res Immunol*, 1992, 143(7): 723-724.
- [21] Lamster IB, Oshrain RL, Fiorello LA, et al. A comparison of 4

methods of data presentation for lysosomal enzyme activity in gingival crevicular fluid[J]. J Clin Periodontol, 1988, 15(6): 347-352.

- [22] 曹采方, Smith QT. 龈沟液中髓过氧化物酶活性与牙周病的关系[J]. 中华口腔医学杂志, 1989, 24(4): 204-207.
- [23] Baqui AA, Meiller TF, Jabra-Rizk MA, et al. Enhanced interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid from periodontal pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1[J]. Oral Microbiol Immunol, 2000, 15(2): 67-73.

- [24] Vastardis SA, Yukna RA, Fidel PL Jr, et al. Periodontal disease in HIV-positive individuals: association of periodontal indices with stages of HIV disease[J]. J Periodontol, 2003, 74(9): 1336-1341.
- [25] Shive CL, Biancotto A, Funderburg NT, et al. HIV-1 is not a major driver of increased plasma IL-6 levels in chronic HIV-1 disease[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2012, 61(2): 145-152.

(收稿日期: 2014-04-21)

(本文编辑: 梁雷)

侯雯, 贾洪诚, 王璇, 等. HIV⁺牙周炎患者龈沟液 IL-6 的检测分析 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (15): 2795-2799.

