

IL-6 和 Shh 在种植体周围炎龈沟液中的表达及意义

程志芬¹ 崔连保² 玄延花^{3*}

(1. 郑州大学第一附属医院 郑州大学口腔医学院 河南 郑州 450001;

2. 山东济南雅宝特口腔门诊 山东 济南 25000;

3. 延边大学医学院 病理学教研部 吉林 延吉 133002)

[摘要] 目的:研究种植修复患者龈沟液中的 IL-6 和 Shh 的水平与种植体周围炎的关系及其意义。方法:根据 25 例种植体修复患者的种植体周围组织情况将其分为种植体健康组(10 例)和种植体周围炎组(15 例)。采用酶联免疫吸附试验(ELISA 法)检测 IL-6 和 Shh 在种植体周围炎龈沟液和正常种植体周围龈沟液中的浓度。结果:IL-6 和 Shh 在种植体周围炎组中的表达显著高于种植体健康组,且差异具有统计学意义($P < 0.001$)。IL-6 与 Shh 无相关性($P > 0.05$)。结论:种植体周围炎龈沟液中 IL-6 和 Shh 浓度的升高可以较好地反映种植体周围组织的健康状态。Shh 有可能成为评价种植体周围炎进展的生物标记物。

[关键词] IL-6 Shh 种植体周围炎 龈沟液

[中图分类号] R782.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2018)01-0087-03

[doi] 10.13701/j.cnki.kqyxj.2018.01.021

Expression of IL-6 and Shh in Gingival Crevicular Fluid of Patients with Peri-implantitis. CHENG Zhi-fen¹, CUI Lian-bao², XUAN Yan-hua^{3*}. 1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Stomatological College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. The Yabaote Dental Clinic, Jinan 250021, China; 3. Department of Pathology, Yanbian University College of Medicine, Yanji 133000, China.

[Abstract] **Objective:** To study the expression of IL-6 and Shh in patients with peri-implantitis. **Methods:** Twenty-five patients were included and divided into health implant group (10 cases) and peri-implantitis group (15 cases). The expressions of IL-6 and Shh in health implant group and peri-implantitis group were detected by ELISA assay. **Results:** The expressions of IL-6 and Shh in the peri-implantitis group were significantly higher than those in the health implant group ($P < 0.001$). There was no positive correlation between IL-6 and Shh ($P > 0.05$). **Conclusion:** IL-6 and Shh were increased in gingival crevicular fluid of patients with peri-implantitis, and Shh might be a marker to determine the progress of peri-implantitis.

[Key words] IL-6 Shh Peri-implantitis Gingival crevicular fluid

种植体周围炎促使种植体使用寿命降低,最终导致种植体松动乃至脱落,种植失败^[1]。IL-6 作为炎症因子,在炎症发展过程中起重要作用,而 Shh 作为 Hedgehog(Hh)信号通路配体之一,是整个信号通路启动者,据报道该信号通路参与了成骨细胞分化、矿化^[2]。本文探讨 IL-6 和 Shh 在种植体周围炎龈沟液中的表达及意义,及 Hh 信号通路对种植体周围炎可能存在的作用和影响。

1 材料与方法

1.1 病例选择 选择 2014 年 10 月~2017 年 1 月就诊于山东济南雅宝特口腔门诊种植体周围炎患者共 15 例,男性 9 例,女性 6 例,平均年龄(56.67±6.86)岁;种植体健康患者 10 例,男性 8 例,女性 2 例,平均年龄(55.30±7.42)岁(两组年龄比较无统计学差异 $P > 0.05$)。筛选标准:1)无种植体周围炎治疗史;2)无全身系统疾病;3)近 3 个月未服用抗生素及非甾体类药物;4)女性未妊娠;5)种植义齿行使功能半年以上,无创伤等。

1.2 试剂与仪器 生物洁净工作台(BCN-1360B)(北京东联哈尔仪器制造有限公司),MK2 酶标仪(德国 Eppendorf 公司),-80℃低温冰箱

基金项目 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目(编号:吉教科合字[2016]第 266 号)

作者简介 程志芬(1987~),女,吉林省人,硕士,医师,主要从事口腔疾病分子病理学研究。

* 通讯作者 玄延花,电话:0433-2435107

(日本三洋公司),脱色摆床(上海医疗器械工厂),核蛋白定量分析仪(SmartSpec™ 3000)(美国 BIO-RAD 公司),低速冷冻多管离心机(上海安亭科学仪器厂),ELISA 检测 IL-6、Shh 因子试剂盒(美国 R&D Systems 公司),Whatman3 号滤纸条(英国 Whatman 公司),电热恒温水温箱(上海医疗器械工厂),游标卡尺(温州三和量具仪器有限公司)等。

1.3 方法

1.3.1 分组 用牙周探针测量并记录待检种植体的颊侧、舌侧的近中、远中 4 个点的探诊深度值,以上临床检查均由同一名牙科医生完成,探诊使用 Willams 牙周探针。本实验分为种植体周围炎组和种植体健康组。根据牙周探针探诊龈袋探诊深度(probing depth, PD),牙龈指数(gingival index, GI),种植体周围炎症组 $PD \geq 4$ mm、 $GI \geq 2$;种植体健康组 $PD < 4$ mm、 $GI < 2$ 。

1.3.2 龈沟液收集与定量 将 Whatman 3 号滤纸裁成宽 2 mm×15 mm 的纸条,置于干净容器中备用。采集种植体龈沟液:棉卷隔湿,轻吹牙龈,避免唾液干扰,将制备好的滤纸条插入种植体颊、舌(腭)侧的近、远中龈沟中,30 s 后取出,用游标卡尺测量并记录浸湿长度,置于装有 500 μ L PBS 的 E_p 管中,4 $^{\circ}$ C 离心取上清液,-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。定量:健康人的血清与龈沟液成分相似,可依据血清体积来

确定龈沟液体积,而血清体积可用滤纸浸润面积来计算。将健康人血清从 1~11 μ L 分为 10 组,用 10 μ L 微量加样器取各组血清加样于滤纸上,每组用 3 条滤纸,取其平均值,绘制成图,计算龈沟液量。

1.3.3 ELISA 法 包被缓冲液将抗体稀释:IL-6 100 ng/L,Shh 500 ng/L。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 mL,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日,弃去孔内溶液缓冲液洗 3 次,加待检样品 0.1 mL,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,加酶标抗体 0.1 mL,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,清洗后加入 TMB 底物溶液 0.1 mL,37 $^{\circ}$ C 20 min,加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL,置于 450 nm 酶标仪中测量分析。

1.4 统计学方法 应用 SPSS16.0 软件进行数据处理。统计时计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间比较采用两个独立样本的 t 检验;3 组或 3 组以上的资料采用方差分析,组间俩俩比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

IL-6 在种植体周围炎组中表达为(148.77 \pm 7.20) ng/L,在种植体健康组表达为(39.49 \pm 3.92) ng/L,在种植体周围炎组中表达显著高于种植体健康组,且差异具有统计学意义($P < 0.001$)。Shh 同样在种植体周围炎组中的表达(123.87 \pm 6.14) ng/L 显著高于种植体健康组(16.34 \pm 3.13) ng/L,且差异具有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。

表 1 IL-6 和 Shh 在种植体周围炎组和种植体健康组中的表达

Table 1 The expressions of IL-6 and Shh in the peri-implantitis group and health implant group

分组	N	IL-6/ng · L ⁻¹	t 值 P 值	Shh/ng · L ⁻¹	t 值 P 值
种植体周围炎组	15	148.77 \pm 7.20	$t = 43.65$	123.87 \pm 6.14	$t = 57.53$
种植体健康组	10	39.49 \pm 3.92	$P < 0.001^{**}$	16.34 \pm 3.13	$P < 0.001^{**}$

注: ** $P < 0.001$ 与种植体健康组比较

表 2 IL-6 和 Shh 在种植体周围炎不同年龄组和性别中的表达

Table 2 The expressions of IL-6 and Shh in the peri-implantitis group divided by age and gender

例数	IL-6/ng · L ⁻¹	F/t 值	P 值	Shh/ng · L ⁻¹	F/t 值	P 值
年龄						
<50 岁	3	149.70 \pm 2.25	0.03	122.73 \pm 3.592	0.09	0.91
50~59 岁	5	148.68 \pm 9.984		123.54 \pm 5.910		
≥ 60 岁	7	148.44 \pm 7.231		124.59 \pm 7.690		
性别						
男性	9	150.26 \pm 7.575	0.98	122.48 \pm 6.285	1.08	0.30
女性	6	146.55 \pm 6.595		125.95 \pm 5.812		

但在种植体周围炎组 IL-6 和 Shh 两者的表达水平之间无相关性(r 值 0.10, P 值 0.73),两者与年龄也无相关性(IL-6: r 值 0.11, P 值 0.69; Shh: r 值 0.11, P 值 0.70),且两者的表达水平与患者的年龄及性别无显著性差异,见表 2。

3 讨论

种植义齿修复牙列缺损或缺失得到了广泛的应用,其修复原理是植入体与骨组织产生骨性结合,进而在植入体上方进行义齿修复,恢复缺失牙功能。当种植体周围组织发生炎症时,会进一步累及到种

种植体周围的牙槽骨,导致支持骨的丧失,最终种植义齿修复失败。而在此过程中有多种因素参与,如菌群的异常、骨代谢异常、细胞因子异常等,而各因素所做“贡献”不容忽视。目前国内外对种植体周围炎的研究主要集中于白介素(IL)和肿瘤坏死因子(TNF α)等细胞因子^[3~5]。Hh 信号通路对软组织和骨组织分化、形成与再生都具有重要的作用,但 Hh 信号通路相关因子 Shh 在种植体周围炎龈沟液中表达未见报道^[6]。

本实验通过 ELISA 法检测了种植体周围炎组和种植体健康组的龈沟液,发现 IL-6 和 Shh 在种植体周围炎组中均高表达。据报道 IL-6 作为炎症因子在种植体周围炎中,促进炎症发生发展,同时诱导骨再吸收,且与临床指标相关。本实验研究发现 IL-6 的表达与种植体周围炎患者的年龄、性别均无关。此外,在体外实验发现种植体周围炎和牙周炎周围的纤维母细胞比正常组分泌更多的 IL-6 和 IL-8^[7]。在种植体周围炎骨丧失过程中,骨组织吸收软组织侵入丧失部位,纤维母细胞分泌的 IL-6 可通过 NF- κ B 途径诱导破骨细胞分化,分化成熟的破骨细胞造成骨破坏,导致骨吸收。

在脊椎动物中,Shh 蛋白是 Hh 蛋白的家族成员,Hh 蛋白作为一种分泌蛋白,经过裂解和自身的催化修饰,使 C 端催化结构域可以共价结合胆固醇,再与软脂酰辅酶 A 发生反应,进一步完成 Hh 蛋白修饰,最后分泌到细胞外^[8]。Shh 与细胞膜上的 Ptch 结合,促使 Hh 信号通路激活。Hh 信号相关因子 Gli1 是急性肠炎反应的必需调节因子,但是降低其功能可能导致慢性肠炎^[9]。口腔微环境如同肠道同样有多种菌群定居,种植体周围炎必定有多种菌群参与。本文结果显示,在种植体周围炎组中的 Shh 表达高于健康的种植体组,说明 Hh 信号通路可能如其在肠道中作用,也参与调节种植体周围炎。

被 Shh 激活的 Hh 信号通路中,Gli2/3 可逃避泛素依赖性降解途径,而 Gli2 在瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症中与白介素 6 受体 α (IL-6R α)启动子结合,活化 IL-6R α 启动子^[10],IL-6 与 IL-6R α 结合后开启 IL-6 信号通路,参与机体炎症、骨吸收等调节。Su 在急性髓性白血病(AML)患者的骨髓和外周血中检测,发现 IL-6 表达增高,并在体外实验证实 IL-6 可上调 Shh 的表达,说明 IL-6 同时也

参与调节 Hh 信号通路。但是在本文 IL-6 与 Shh 虽然表达均增高,但两者表达之间却无相关性。此外,Hh 信号通路参与调节成骨细胞分化以及矿化,抑制成骨细胞内该信号通路则导致基质形成减少,活化该信号通路则促进基质沉淀^[2]。故在此提出假设,在种植体周围炎中,Hh 信号通路可能存在双重角色,即通过调节 IL-6 调控破骨细胞促进骨吸收;又通过调节成骨细胞促进骨形成。通过本实验发现种植体周围龈沟液中 IL-6 和 Shh 浓度的升高,可以较好地反映种植体周围组织的健康状态。Shh 有可能成为评价种植体周围炎进展的生物标记物。

参考文献

- [1] Emrani J, Chee W, Slots J. Bacterial colonization of oral implants from nondental sources [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2009,11(2): 106-112
- [2] Baht GS, Silkstone D, Nadesan P, et al. Activation of hedgehog signaling during fracture repair enhances osteoblastic-dependent matrix formation [J]. *J Orthop Res*, 2014,32(4): 581-586
- [3] 史秋涛,谷志远.肿瘤坏死因子- α 与种植体周围炎炎症骨吸收[J]. *口腔医学研究*,2015,31(7): 745-747
- [4] 郇兴.种植体周围炎龈沟液中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-6 的表达及临床意义[J]. *医学研究杂志*,2015,44(12):125-128
- [5] 古丽再努·依不拉音,吐逊阿依·阿迪力,任家卉等.维药买朱尼对种植体周围炎龈沟液中白细胞介素-1 β 和牙周指数的影响[J]. *口腔医学研究*,2017,33(7): 762-765
- [6] Liu PC, Liu K, Liu JF, et al. Transfection of the IHH gene into rabbit BMSCs in a simulated microgravity environment promotes chondrogenic differentiation and inhibits cartilage aging [J]. *Oncotarget*,2016,7(39): 62873-62885
- [7] Bordin S, Flemmig TF, Verardi S. Role of fibroblast populations in peri-implantitis [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*,2009,24(2): 197-20
- [8] Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway [J]. *Bioorg Med Chem*,2010,18(18): 6613-6624
- [9] Lees CW, Zacharias WJ, Tremelling M, et al. Analysis of germline GLI1 variation implicates hedgehog signaling in the regulation of intestinal inflammatory pathways [J]. *PLoS Med*,2008,5(12): e239
- [10] Jackson DA, Smith TD, Amarsaikhan N, et al. Modulation of the IL-6 Receptor α Underlies GLI2-mediated regulation of Immunoglobulin Secretion in Waldenström macroglobulinemia cells [J]. *J Immunol*,2015,195(6): 2908-2916

[收稿日期:2017-08-10]

(本文编辑 李四群)