

## Th17 及其相关因子在不同牙周炎症状态龈沟液中的检测

杨栋<sup>1,2</sup> 李红梅<sup>2</sup> 刘林花<sup>2</sup> 董维理<sup>1,2\*</sup>

(1. 武汉大学口腔医学院牙周科 湖北 武汉 430079;

2. 口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和  
口腔生物医学教育部重点实验室 湖北 武汉 430079)

**[摘要]** **目的:**探讨 Th17 及其相关因子在慢性牙周炎发病中的作用。**方法:**选择 46 例牙周科患者分为 4 组:慢性牙周炎活动型位点组、慢性牙周炎静止型位点组、牙龈炎组和健康对照组,应用酶联免疫法检测各组龈沟液中 IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  和 IL-4 的含量并进行分析。**结果:**IL-17 和 RORC2 的表达趋势相似,活动型位点组明显高于其他 3 组,静止型位点组明显高于健康对照组;健康对照组的 IFN- $\gamma$  明显低于其他 3 组;活动型位点组 IL-4 明显低于其他 3 组;IL-17 和 RORC2 呈正相关,IL-17 和 IL-4 呈负相关;IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  与临床指标 BI、PD 和 AL 呈正相关,IL-4 与 BI、PD 和 AL 呈负相关。**结论:**Th17 在慢性牙周炎活动型中占优势,随着附着丧失增加,龈沟液中含量升高;IFN- $\gamma$  可能参与了牙龈炎症和非炎症的状态转化。

**[关键词]** 牙周炎 IL-17 RORC2 IFN- $\gamma$  IL-4 龈沟液

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2017)11-1161-04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.11.007

**Detection of Th17 and Related Factors in Gingival Crevicular Fluid of Patients with Different Periodontal Inflammatory Status.** YANG Dong<sup>1,2</sup>, LI Hong-mei<sup>2</sup>, LIU Lin-hua<sup>2</sup>, DONG Wei-li<sup>1,2\*</sup>. 1. School and Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China; 2. The State Key Laboratory Breeding Base of Basic Science of Stomatology (Hubei-MOST) & Key Laboratory of Oral Biomedicine Ministry of Education, School and Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan, 430079, China.

**[Abstract]** **Objective:** To study the correlation of Th17 and related factors in the gingival crevicular fluid (GCF) of the patients with different periodontal inflammatory status. **Methods:** Forty-six patients were divided into four groups: periodontitis active site group, non-active site group, gingivitis group, and healthy group. IL-17, RORC2, IFN- $\gamma$ , and IL-4 in GCF were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The expression trend of IL-17 and RORC2 were similar. The levels of IL-17 and RORC2 in active site group were significantly higher than those of other three groups, and the levels of non-active site group were significantly higher than that of healthy group ( $P < 0.05$ ). The expression of IFN- $\gamma$  in healthy group was significantly lower than those of other three groups ( $P < 0.05$ ). In active periodontal site group, the expression level of IL-4 was significantly lower than those of other three groups ( $P < 0.05$ ). IL-17 level was positively correlated with RORC2, and negatively correlated with IL-4 ( $P < 0.05$ ). The levels of IL-17, RORC2 and IFN- $\gamma$  were positively correlated with those of BI, PD and AL. The level of IL-4 was negatively correlated with those of BI, PD and AL ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of Th17 was strong in active site group, and it increased with the aggravation of attachment loss. IFN- $\gamma$  might be involved in the transformation of gingival inflammation and non-inflammation status.

**[Key words]** Periodontitis IL-17 RORC2 IFN- $\gamma$  IL-4 GCF

牙周炎是菌斑引起的以牙周软硬组织破坏为病

理特点的炎症反应性疾病<sup>[1]</sup>,导致宿主免疫调节与炎症反应的平衡被打破,T 细胞在其中发挥至关重要作用。幼稚的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞可分化为 I 型 T 辅助细胞(T-helper type 1, Th1)和/或 Th2。近年新发现 Th17 在免疫反应过程中也发挥重要作用,也

**基金项目** 湖北省卫生计生科研基金(编号:WJ2015MB040)

**作者简介** 杨栋(1986~),男,博士,主治医师,主要从事牙周病的病因研究与临床。

**\* 通讯作者** 董维理, E-mail: zdw1ss272@whu.edu.cn

就是说牙周炎的调控很大程度依赖 Th1 - Th2/Th17 之间的相互制约和平衡,最终以决定是保护性的反应还是破坏性的反应<sup>[2,3]</sup>。

在临床上牙周炎可表现为活动期与静止期交替出现。牙周炎处于活动期时,表现为牙龈炎症反应明显和附着组织破坏加重<sup>[4]</sup>。本研究对 Th1 诱导的免疫反应产物 IFN- $\gamma$ , Th2 诱导的免疫反应产物 IL-4, 以及 Th17 细胞标志性转录因子维甲酸相关孤儿核受体 C2 (retinoic acid receptor-related orphan receptor C2, RORC2) 和其分泌物 IL-17, 在不同牙周炎症状态龈沟液 (gingival crevicular fluid, GCF) 中的含量进行检测, 并初步探讨它们与牙周临床指标的相关性<sup>[5,6]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 实验对象的选择 随机选取 2015 年 12 月 1 日~2016 年 11 月 30 日武汉大学口腔医院牙周科门诊 46 例患者作为实验对象, 平均年龄为 (31.18 $\pm$ 9.89) 岁。慢性牙周炎 22 例, 牙龈炎 11 例, 健康对照 13 例。所有患者均知情同意。纳入标准为: 口内至少余留 20 颗天然牙齿, 无明显咬合异常和正畸治疗史, 3 月内未使用过抗生素, 半年内未接受过牙周治疗, 妇女无妊娠, 牙颈部无龋坏及充填体的患牙。同时排除吸烟、侵袭性牙周炎、全身疾病史等。以单个牙的单个位点作为观察对象, 所有患者均检查位点相关的临床指标, 记录菌斑指数 (plaque index, PLI)、出血指数 (bleeding index, BI)、牙周探诊深度 (probing depth, PD)、附着丧失 (attachment loss, AL)。根据牙周临床指标分为 4 组 (详见表

1), 选取慢性牙周炎患者口腔中附着丧失最严重的位点设定为活动型位点组; 选取同一患者其他象限同名牙的相同位点作为静止型位点组<sup>[4]</sup>, 具体参数如下: 1) 活动型位点组: BI $\geq$ 3, PD $\geq$ 6 mm, AL $\geq$ 6 mm, 牙周袋内有或无溢脓, 牙齿松动; 2) 静止型位点组: BI: 2~3, PD $\leq$ 4 mm, AL $\leq$ 4 mm; 3) 牙龈炎组: BI: 2~3, PD $\leq$ 3 mm, AL: 0; 4) 健康对照组: BI: 0~1, PD $\leq$ 3 mm, AL: 0。

1.2 龈沟液取样 取 30 号蓝色吸潮纸尖, 尖端剪去 1 mm, 放入 EP 管中; 消毒, 称重; 无菌棉卷隔湿, 气枪沿牙面向冠方轻轻吹干 10 s; 将纸尖取出并轻轻插入患者所测试位点的龈沟内, 至遇到轻微阻力则停止, 20 s 后取出纸尖置于原 EP 管中; 取样中, 若出现唾液污染, 则直接弃用; 间隔 1 min 后, 重复取样, 共取样 3 次; -80 $^{\circ}$ C 冻存待检。

1.3 ELISA 检测龈沟液中 IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  和 IL-4 的含量 样本室温复融后加入 150  $\mu$ L PBS 缓冲液, 并用漩涡混匀器震荡; 离心取上清液, 采用酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA 法) 测定 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 及 RORC2 的表达水平。试剂购自 R&D System 公司, 所有操作均按 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析, 计量资料采用单因素方差分析、Pearson 相关性检验, 等级资料采用秩和检验及 Spearman 相关性检验。以  $P < 0.05$  为有统计学差异, 所有数据采用  $\bar{x} \pm s$ 。

表 1 各组牙周临床指标比较

Table 1 Clinical periodontal parameters of the sampling sites

牙周临床指标	活动型位点组	静止型位点组	牙龈炎组	健康对照组
位点个数	22	22	11	13
PLI	2.41 $\pm$ 0.91	1.82 $\pm$ 0.73	1.91 $\pm$ 0.53	1.46 $\pm$ 0.52
BI	3.77 $\pm$ 0.53 <sup>*1*2*3</sup>	1.91 $\pm$ 0.61 <sup>*1*2</sup>	2.45 $\pm$ 0.52 <sup>*1</sup>	0.31 $\pm$ 0.48
PD	7.91 $\pm$ 1.15 <sup>*1*2*3</sup>	2.86 $\pm$ 0.77 <sup>*1</sup>	2.81 $\pm$ 0.60 <sup>*1</sup>	1.46 $\pm$ 0.66
AL	8.64 $\pm$ 1.29 <sup>*1*2*3</sup>	3.05 $\pm$ 0.84 <sup>*1*2</sup>	0	0

注: 与健康对照组比较, \*1  $P < 0.05$ ; 与牙龈炎组比较, \*2  $P < 0.05$ ; 与静止型位点组比较, \*3  $P < 0.05$

表 2 龈沟液中 IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$ 、IL-4 的水平比较

Table 2 The expression levels of IL-17, RORC2, IFN- $\gamma$  and IL-4 in GCF

项目	活动型位点组	静止型位点组	牙龈炎组	健康对照组
IL-17	200.08 $\pm$ 56.30 <sup>*1*2*3</sup>	134.82 $\pm$ 35.86 <sup>*1</sup>	120.44 $\pm$ 38.39	95.96 $\pm$ 40.10
RORC2	12.99 $\pm$ 4.53 <sup>*1*2*3</sup>	9.03 $\pm$ 4.44 <sup>*1</sup>	6.80 $\pm$ 1.35	4.89 $\pm$ 2.34
IFN- $\gamma$	52.17 $\pm$ 15.11 <sup>*1</sup>	45.92 $\pm$ 17.38 <sup>*1</sup>	48.08 $\pm$ 10.02 <sup>*1</sup>	29.94 $\pm$ 9.36
IL-4	41.66 $\pm$ 9.05 <sup>*1*2*3</sup>	65.50 $\pm$ 19.02	63.05 $\pm$ 19.51	81.91 $\pm$ 21.67

注: 与健康对照组比较, \*1  $P < 0.05$ ; 与牙龈炎组比较, \*2  $P < 0.05$ ; 与静止型位点组比较, \*3  $P < 0.05$

表 3 龈沟液中 IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平与临床指标的相关性Table 3 Correlation between the levels of IL-17, RORC2, IFN- $\gamma$ , IL-4 and clinical periodontal parameters

牙周临床指标	IL-17		RORC2		IFN- $\gamma$		IL-4	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
BI	0.620	0.000	0.577	0.000	0.493	0.000	-0.626	0.000
PD	0.610	0.000	0.545	0.000	0.338	0.005	-0.606	0.000
AL	0.604	0.000	0.587	0.000	0.343	0.017	-0.593	0.000

注:IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  水平与 BI、PD、AL 正相关;IL-4 水平与 BI、PD、AL 负相关( $P < 0.05$ )

## 2 实验结果

2.1 牙周临床指标的比较 活动型位点组的 BI、PD 和 AL 明显高于其他 3 组;静止型位点组 BI、AL 明显高于牙龈炎和健康对照组,PD 明显高于健康对照组;牙龈炎组 BI、PD 明显高于健康对照组( $P < 0.05$ ),见表 1。

2.2 龈沟液 IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  和 IL-4 表达水平的比较 ELISA 测定显示各组间均有显著性差异;两两比较显示,IL-17 和 RORC2 的表达趋势相似,活动型位点组明显高于其他 3 组,静止型位点组明显高于健康对照组;活动型位点组、静止型位点组、牙龈炎组 IFN- $\gamma$  明显高于健康对照组;活动型位点组 IL-4 明显低于其他 3 组( $P < 0.05$ )。同时,IL-17 和 RORC2 呈正相关,IL-17 和 IL-4 呈负相关,见表 2、图 1。

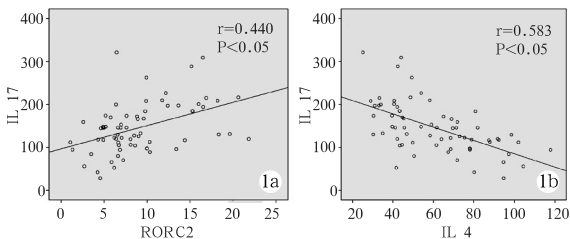


图 1 IL-17、RORC2 和 IL-4 表达水平相关性

Fig. 1 Relationship between the levels of IL-17 and RORC2 (1a) and IL-4 (1b) by Pearson's correlation coefficient.

2.3 龈沟液中 IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平与牙周临床指标的相关性 GCF 中 IL-17、RORC2、IFN- $\gamma$  水平与 BI、PD 和 AL 呈正相关;IL-4 水平与 BI、PD 和 AL 呈负相关,见表 3。

## 3 讨论

当菌斑作为始动因素引起牙周组织炎症后,Th 细胞的免疫应答即参与到牙周组织炎症反应中。以 Th2 主导的保护性应答和以 Th1 主导的破坏性应答的平衡转变,都可能导致牙周病发生和发展<sup>[7]</sup>。IFN- $\gamma$  是 Th1 细胞分泌的最特性细胞因子,促进细胞毒性 T 细胞、自然杀伤细胞及巨噬细胞活化和增殖,介导细胞毒效应;IL-4 是 Th2 的代表性细胞因子,通过刺激 B 细胞增值、产生抗体来参与体液

免疫<sup>[2,3,8]</sup>。

Th17 细胞以产生有高度致炎作用的 IL-17 为特征,可刺激上皮细胞、内皮细胞及成纤维细胞产生 IL-6、IL-8 和 PGE2,刺激临近宿主细胞放大炎症反应<sup>[9,10]</sup>。Ohyama 等在 15 例慢性牙周炎患者的牙龈组织中,发现 IL-17 上调 NF-KB 受体活化因子配体和其功能性受体,从而间接诱导骨吸收<sup>[11,12]</sup>。

牙周活动性破坏并不是同时发生在同一口腔所有牙位,而是具有牙和位点的特异性。当开始骨和结缔组织附着丧失以及牙周袋加深时,则称活动型;静止型的特征是炎症反应轻,没有或很少有骨或结缔组织的附着丧失<sup>[4]</sup>。本实验选择以牙位点作为观察对象,更能精准地反应在不同牙周炎症状态下 GCF 中各种因子水平的差异。

许多研究表明 IL-17 在牙周炎患者牙槽骨中高表达,而在健康组表达则较低<sup>[13,14]</sup>。本研究发现,仅活动型位点组的 RORC2 及 IL-17 与其他各组间有显著性差异,而静止型位点组虽高于健康对照组,但与牙龈炎组无显著性差异,表明 Th17 在慢性牙周炎活动型中占优势;同时,本研究显示随着牙龈炎症、牙周探诊深度及附着丧失增加,IL-17 及 RORC2 的含量显著升高,提示 RORC2 及 IL-17 反映牙周病损状态,它们可作为判断牙周组织炎症程度的客观指标之一。

GCF 中 IFN- $\gamma$  含量在活动型位点、稳定型位点和牙龈炎组均显著高于健康组,但 3 组间无统计学差异。与牙周临床指标 BI、PD 和 AL 呈正相关,表明 IFN- $\gamma$  含量随牙龈炎症增加而显著上升。而 IL-4 则相反,GCF 中含量在活动型位点组显著低于其他 3 组,但稳定型位点、牙龈炎及健康对照组间无统计学差异,与牙周临床指标 BI、PD 和 AL 呈负相关,表明 IL-4 含量随牙龈炎症,牙周袋深度和附着丧失的增加而显著降低。提示当 IL-4 水平升高,意味牙周状况趋于稳定。

综上所述,本研究提示 Th17 可能在附着丧失增加过程中发挥着重要作用,而 IFN- $\gamma$  可能参与

了牙龈炎症和非炎症的状态转化。

## 参考文献

- [1] Gonzales JR, Michel J, Dietsch A, et al. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis [J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2002, 29(9): 816-822
- [2] Mosmann TR. Human Th1 and Th2 subsets—doubt no more—comment [J]. *Immunol Today*, 1991, 12(8): 256-257
- [3] Campbell L, Millhouse E, Malcolm J, et al. T cells, teeth and tissue destruction—what do T cells do in periodontal disease [J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2016, 31(6): 445-456
- [4] 孟焕新. 牙周病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008, 125
- [5] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1121-1133
- [6] Unutmaz D. RORC2: the master of human TH17 cell programming [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39: 1452-1455
- [7] Chen XT, Chen LL, Tan JY, et al. Th17 and Th1 lymphocytes are correlated with chronic periodontitis [J]. *Immunological Investigations*, 2016, 45(3): 243-251
- [8] Bartova J, Kratka-Opatrna Z, Prochazkova J, et al. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings [J]. *Mediators Inflamm*, 2000, 9(2): 115-120
- [9] Cheng WC, Hughes FJ, Taams LS. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis [J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2014, 41(6): 541-549
- [10] Takahashi K, Azuma T, Motohira H, et al. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease [J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2010, 37(4): 369-374
- [11] Ohya H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis [J]. *J Dent Res*, 2009, 88(7): 633-638
- [12] Sato, K, et al. TH17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction [J]. *J. Exp. Med.* 203, 2673-2682
- [13] 杨斯惠, 钟良军. Th17 细胞与牙周病相关性研究进展 [J]. *口腔医学研究*, 2013, 29(1): 92-94
- [14] Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease [J]. *Oral Microbiology & Immunology*, 2010, 24(1): 1-6

[收稿日期: 2017-08-09]

(本文编辑 汪喻忠)

## 欢迎订阅 2018 年《口腔医学研究》杂志

《口腔医学研究》为武汉大学口腔医学院主办、国内外公开发行的口腔医学专业学术期刊。是科技部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》2014 年版核心期刊, 美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼索引》(国际医学科学数据库)收录期刊。

《口腔医学研究》创刊于 1985 年 6 月, 主编为陈智教授, 编委会由全国各大口腔医学院校各学科专家组成。《口腔医学研究》创刊 30 多年来, 始终坚持刊物的科学性、实用性, 面向院、系和基层, 以普及、提高、服务为宗旨。最快捷地报道国内外口腔医学的新进展、新技术, 为口腔医学临床和科研及教学服务, 为读者服务; 辟有专家论坛、基础研究论著、临床研究论著、讲座、临床经验交流、专业英语、综述、病例报道、学术动态、会务消息等栏目, 读者对象为全国各地口腔医疗、教学、科研人员, 口腔专业学生、护理、医技人员等。《口腔医学研究》也可为国内外各医疗器械、材料、药品和保健牙膏生产商或经营商刊登广告, 是国家认定的处方药广告的宣传媒体。

《口腔医学研究》为月刊, 每月 28 日出版。每期定价 7.00 元, 全年 12 期, 共 84.00 元(含邮资), 欢迎广大读者到当地邮局订阅。如错过邮局订阅时间, 可随时向编辑部邮购。编辑部地址: 武汉市洪山区珞瑜路 237 号武汉大学口腔医学院, 邮政编码: 430079。电话: 027-87686117, 传真: 027-87873260。http://www.kqxyj.com, E-mail: kqxyj@163.com。国内统一刊号: CN 42-1682/R, 国际标准出版物号: ISSN 1671-7651。国内总发行: 湖北省邮政报刊发行局, 邮发代号 38-119。国外总发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱), 国外代号 6427BM。广告经营许可证号: 4201004000419。