

- [18] ZHOU H, PU S, ZHOU H, et al. Klotho as potential autophagy regulator and therapeutic target[J]. Front Pharmacol, 2021, 12(1):755366.
- [19] KANBAY M, DEMIRAY A, AFSAR B, et al. Role of klotho in the development of essential hypertension[J]. Hypertension, 2021, 77(3):740-750.
- [20] LANDRY T, LAING B T, LI P, et al. Central α -Klotho suppresses NPY/AgRP neuron activity and regulates me-

tabolism in mice[J]. Diabetes, 2020, 69(7):1368-1381.

- [21] MA Z, LI J, JIANG H, et al. Expression of α -Klotho is downregulated and associated with oxidative stress in the lens in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Curr Eye Res, 2021, 46(4):482-489.

(收稿日期:2023-11-12 修回日期:2024-05-03)

• 短篇论著 •

慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143、miR-375 表达及与疾病严重程度的关系*

王 贺¹, 赵 哲², 包晶晶¹

1. 呼和浩特市第一医院口腔科, 内蒙古呼和浩特 010010; 2. 呼和浩特口腔医院正畸科, 内蒙古呼和浩特 010000

摘要:目的 探讨慢性牙周炎患者龈沟液微小核糖核酸(miR)-143、miR-375 表达及与疾病严重程度的关系。方法 选取 2022 年 1 月至 2023 年 7 月在呼和浩特市第一医院确诊的 135 例慢性牙周炎患者作为研究组, 根据疾病严重程度分为轻度组($n=58$)、中度组($n=37$)和重度组($n=40$)。另选同期在该院体检的健康志愿者 127 例作为对照组。实时荧光定量 PCR 检测 miR-143、miR-375 相对表达水平, 酶联免疫吸附试验试剂盒测定龈沟液炎症因子[白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、C-反应蛋白(CRP)]水平。Pearson 相关性分析龈沟液 miR-143、miR-375 表达与临床指标及炎症因子水平的相关性。**结果** 对照组与研究组年龄、性别、刷牙次数、吸烟占比比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较, 研究组龈沟液 miR-143 相对表达水平显著升高, miR-375 相对表达水平显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与中度组比较, 重度组出血指数(BI)、牙龈指数(GI)、牙周袋探针深度(PD)、附着丧失(AL)显著增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与中度组比较, 重度组 IL-6、TNF- α 、CRP 水平显著升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143 相对表达水平与 BI、GI、PD、AL 及龈沟液 CRP、TNF- α 、IL-6 水平均呈正相关($P<0.05$); 龈沟液 miR-375 相对表达水平与 BI、GI、PD、AL 及龈沟液 CRP、TNF- α 、IL-6 水平均呈负相关($P<0.05$)。**结论** 慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143、miR-375 表达可评估患者疾病严重程度, 对慢性牙周炎病情判断具有参考价值。

关键词:慢性牙周炎; 微小核糖核酸-143; 微小核糖核酸-375; 疾病严重程度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.15.022

文章编号:1673-4130(2024)15-1909-04

中图法分类号:R781.42

文献标志码:A

慢性牙周炎是一种炎症性疾病, 由牙菌斑感染和宿主防御系统免疫反应失衡引发, 会导致牙槽骨破坏、牙齿支撑组织破坏和牙齿脱落, 影响患者口腔健康和生活质量^[1]。微小核糖核酸(miRNA, 简称 miR)是一类调节基因表达的非编码小 RNA 分子, 参与调节多种生理过程如生长、增殖和凋亡基因的表达, 研究表明其可能与牙周炎的发病机制有关^[2]。牙周炎发生时, 牙周膜干细胞(PDLSCs)成骨分化能力和增殖活性受到抑制, 有研究报道, 与健康外泌体相比, miR-143-3p 在炎症 PDLSCs 衍生的外泌体中高表达, 此外 miR-143-3p 在小鼠牙周炎模型中驱动 M1 巨噬细胞极化并加重牙周炎症^[3]。也有研究显示, miR-143-5p 下调是促进人牙髓干细胞成牙细胞分化所必

需的^[4]。WANG 等^[5]研究显示 miR-375 能促进人 PDLSCs 的增殖和成骨分化, 在人 PDLSCs 成骨分化过程中其表达水平呈时间依赖性升高。基于此, 本研究探讨慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143、miR-375 表达及与疾病严重程度的关系, 为慢性牙周炎的病情诊断提供参考依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 1 月至 2023 年 7 月在呼和浩特市第一医院(简称本院)确诊的 135 例慢性牙周炎患者作为研究组, 另选同期在本院体检的健康志愿者 127 例作为对照组。纳入标准:(1)符合文献[6]慢性牙周炎诊断标准;(2)未进行治疗的患者。排除标准:(1)近期接受药物等治疗;(2)患有糖尿病等

疾病;(3)患有恶性肿瘤。本研究经本院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 临床指标检测 对患者进行牙周检查,采用牙周探针检测附着丧失(AL)、牙周袋探针深度(PD)、出血指数(BI)及牙龈指数(GI)。

1.2.2 炎症因子、miR-143、miR-375 表达检测 研究组入院及对照组体检时采集龈沟液样本,对两组牙面及牙龈进行清洁后,将吸潮纸尖插入患者及志愿者牙龈沟内,30 s 后取出,置于试管中(含 PBS 缓冲液),3 000 r/min 离心 5 min,取上清液于-80 ℃冰箱保存备用。龈沟液炎症因子[白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死

因子 α (TNF- α)、C-反应蛋白(CRP)]水平通过人 IL-6(CB10116-Hu)、TNF- α (CB11762-Hu)、CRP(CB10373-Hu)酶联免疫吸附试验试剂盒(上海科艾博生物技术有限公司)测定。采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测龈沟液 miR-143、miR-375 相对表达水平,使用 Trizol 试剂提取龈沟液总 RNA。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。U6 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算相对表达水平。每个 PCR 包含 10 μ L SYBR 预混物、0.5 μ L 正向引物、0.5 μ L 反向引物、1 μ L 模板 cDNA、8 μ L 的 DDW,最大体积为 20 μ L。qPCR 程序:预变性 95 ℃,10 min;变性 94 ℃,5 s;退火 60 ℃,35 s;延伸 72 ℃,5 s,共 40 循环。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

项目	上游(5'-3')	下游(5'-3')
miR-143	AGTGCGTGTCGTGGGTGT	GCCTGAGATGAAGCACGTG
miR-375	TTTGTTTCGTTCCGGCTCGC	CGCTTCGGCAGCACATATAC
U6	TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT

1.2.3 病情严重程度 慢性牙周炎患者根据病情严重程度^[7]分为轻度组 58 例($GI<1$, $PD<4$ mm, $AL<2$ mm)、中度组 37 例($1\leq GI<2$, 4 mm $\leq PD<6$ mm, 2 mm $\leq AL<4$ mm)和重度组 40 例($GI\geq 2$, $PD\geq 6$ mm, $AL\geq 4$ mm)。

1.3 统计学处理 采用统计软件 SPSS22.0 进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对照组和研究组比较采用 t 检验。轻度组、中度组和重度组比较采用单因素方差分析,SNK- q 检验进行组间两两比较;计数资料以例数或百分率表示,组间比较行 χ^2 检验;采用 Pearson 相关性分析 miR-143、miR-375 表达与临床指标及炎症因子水平的相关性。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组与研究组一般资料比较 对照组与研究组年龄、性别、刷牙次数、吸烟占比比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2 对照组与研究组龈沟液 miR-143、miR-375 相对表达水平比较 与对照组比较,研究组龈沟液 miR-143 相对表达水平显著升高,miR-375 相对表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.3 轻度组、中度组、重度组临床指标比较 与轻度组比较,中度组、重度组 BI、GI、PD、AL 显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与中度组比较,重度组 BI、GI、PD、AL 显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

2.4 轻度组、中度组、重度组炎症因子水平比较 与轻度组比较,中度组、重度组 IL-6、TNF- α 、CRP 水平

显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与中度组比较,重度组 IL-6、TNF- α 、CRP 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

2.5 龈沟液 miR-143、miR-375 相对表达水平与临床指标及炎症因子水平的相关性 慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143 相对表达水平与 BI、GI、PD、AL 及龈沟液 CRP、TNF- α 、IL-6 水平均呈正相关($P<0.05$);龈沟液 miR-375 相对表达水平与 BI、GI、PD、AL 及龈沟液 CRP、TNF- α 、IL-6 水平均呈负相关($P<0.05$)。见表 6。

表 2 对照组与研究组一般资料比较[$\bar{x}\pm s$ 或 n/n 或 $n(\%)$]

组别	n	年龄(岁)	性别 (男/女)	刷牙次数 (≤ 1 次/天)	吸烟
对照组	127	44.15 $\pm$ 7.34	62/65	67(52.76)	70(55.12)
研究组	135	45.43 $\pm$ 6.82	77/58	75(55.56)	82(60.74)
t/χ^2		-1.463	1.774	0.207	0.849
P		0.145	0.183	0.649	0.357

表 3 对照组与研究组龈沟液 miR-143、miR-375 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-143/U6	miR-375/U6
对照组	127	1.02 $\pm$ 0.13	0.98 $\pm$ 0.11
研究组	135	1.45 $\pm$ 0.17	0.49 $\pm$ 0.08
t		-22.894	41.411
P		<0.001	<0.001

表 4 轻度组、中度组、重度组临床指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	BI	GI	PD(mm)	AL(mm)
轻度组	58	1.39±0.41	0.92±0.15	3.85±0.62	1.96±0.54
中度组	37	2.26±0.57 ^a	1.83±0.64 ^a	4.14±0.71 ^a	3.12±0.79 ^a
重度组	40	3.75±0.82 ^{ab}	2.67±0.95 ^{ab}	6.06±1.25 ^{ab}	4.95±0.83 ^{ab}
<i>F</i>		183.523	109.780	75.562	211.883
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与轻度组比较,^a*P*<0.05;与中度组比较,^b*P*<0.05。

表 5 轻度组、中度组、重度组炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-6(ng/mL)	TNF-α(ng/mL)	CRP(mg/L)
轻度组	58	3.41±1.07	5.37±0.72	19.35±2.62
中度组	37	5.06±1.32 ^a	7.42±0.91 ^a	21.49±3.08 ^a
重度组	40	7.83±1.94 ^{ab}	9.06±1.15 ^{ab}	25.62±4.17 ^{ab}
<i>F</i>		111.246	196.496	43.755
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与轻度组比较,^a*P*<0.05;与中度组比较,^b*P*<0.05。

表 6 龈沟液 miR-143、miR-375 相对表达水平与临床指标及炎症因子水平的相关性

项目	miR-143		miR-375	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
BI	0.499	<0.001	-0.809	<0.001
GI	0.427	<0.001	-0.555	<0.001
PD	0.365	<0.001	-0.439	<0.001
AL	0.312	<0.001	-0.608	<0.001
CRP	0.504	<0.001	-0.404	<0.001
TNF-α	0.486	<0.001	-0.630	<0.001
IL-6	0.452	<0.001	-0.553	<0.001

3 讨 论

慢性牙周炎是细菌引起的炎症,其特征是牙周组织的不可逆和进行性退化,并导致牙齿脱落和牙槽骨缺损,是最常见的口腔疾病之一。越来越多的研究表明,牙周炎与心血管疾病、糖尿病、慢性肾病等一些非传染性疾病有关,严重牙周炎对健康造成了巨大影响,并带来了极大的社会经济负担^[8]。细菌和牙菌斑是慢性牙周炎的主要诱因,目前通常采用非手术方法清除细菌沉积,消除牙根表面污染物来治疗,虽然其方法具有普遍性及安全性但仍存在许多局限性。龈沟液中含有多种导致牙周破坏的免疫和炎症因素,龈沟液为口腔健康提供条件,并参与疾病的进展,因此本研究探讨慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143、miR-375 表达及与疾病严重程度的关系,对慢性牙周炎疾病严重程度判断及诊断治疗具有重要意义。

miRNA 是体内平衡、细胞增殖和分化、癌变和炎

症的关键调节因子,在调节生理和病理过程中具有重要性、低分子毒性和其他有利特性。有研究表明,miRNA 在牙周炎进展中发挥关键的调节作用^[9]。miR-143 是 miR-143/miR-145 簇的一部分,miR-143 可作为全身性炎症和感染的生物标志物^[10]。有研究显示,miR-143-3p 是一种炎症性 miRNA,与正常样本相比,在牙周炎组织中 miR-143-3p 水平上调,在脂多糖(LPS)处理的 PDLSCs 中,miR-143-3p 水平上调^[11]。本研究结果显示,与对照组比较,研究组龈沟液 miR-143 相对表达水平显著升高,miR-375 相对表达水平显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),与文献[12]研究结果一致。表明 miR-143 在牙周炎的进展中具有重要作用,miR-143 参与慢性牙周炎的发生。据报道牙周组织的修复与再生与人 PDLSCs 成骨分化能力密切相关,miR-143 被证明是成骨分化的抑制因子^[13]。刘沛等^[14]研究也表明 miR-143-3p 在 LPS 诱导的人 PDLSCs 细胞中高表达,抑制 miR-143-3p 能减轻 LPS 诱导的人 PDLSCs 炎症和凋亡。

miR-375 可调控多种功能基因,其异位表达通常与病理改变有关,其表达调控机制主要与启动子甲基化或 circRNA 有关^[15]。有研究显示 miR-375-3p 对炎症反应具有保护作用,能减轻炎症的严重程度^[16]。据报道 miR-375 能促进成骨分化,miR-375 在人 PDLSCs 中表达下调,过表达 miR-375 能够促进人 PDLSCs 的增殖和成骨分化^[5]。王艳华等^[17]研究显示 miR-375 参与调节人 PDLSCs 成骨分化,其过表达对 PDLSCs 成骨分化表现出抑制作用。李鲲鹏等^[18]研究表明通过上调 miR-375 能促进人 PDLSCs 的增殖和成骨分化。本研究中结果显示,龈沟液 miR-375 相对表达水平与 BI、GI、PD、AL 及龈沟液 CRP、TNF-α、IL-6 水平均呈负相关(*P*<0.05),表明 miR-375 参与慢性牙周炎进展。

TNF-α、IL-6、CRP 等炎症因子在慢性牙周炎的病理中起重要作用,因为其对牙周组织造成继发性损伤,从而加剧牙周组织的破坏^[19]。CUEVAS-GONZÁLEZ 等^[20]研究表明 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17 在慢性牙周炎患者中高表达,且表达水平随炎症程度的加重而升高。还有研究报道,BI、GI、PD、AL 等

临床指标能反映慢性牙周炎疾病严重程度^[21]。本研究结果显示,与中度组比较,重度组 IL-6、TNF- α 、CRP 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143 相对表达水平与 BI、GI、PD、AL 及龈沟液 CRP、TNF- α 、IL-6 水平均呈正相关($P<0.05$);龈沟液 miR-375 相对表达水平与 BI、GI、PD、AL 及龈沟液 CRP、TNF- α 、IL-6 水平均呈负相关($P<0.05$),提示 miR-143、miR-375 表达可反映慢性牙周炎疾病严重程度。

综上所述,慢性牙周炎患者龈沟液 miR-143、miR-375 表达可评估患者疾病严重程度,对慢性牙周炎病情判断具有参考价值。

参考文献

[1] WANG Y,ZENG J,YUAN Q,et al. Efficacy of (-)-epigallocatechin gallate delivered by a new-type scaler tip during scaling and root planing on chronic periodontitis;a split-mouth, randomized clinical trial [J]. BMC Oral Health,2021,21(1):79-89.

[2] MAHENDRA J,MAHENDRA L,FAGEEH H N,et al. miRNA-146a and miRNA-126 as potential biomarkers in patients with coronary artery disease and generalized periodontitis[J]. Materials (Basel),2021,14(16):4692-4702.

[3] WANG Y,ZHANG X,WANG J,et al. Inflammatory periodontal ligament stem cells drive M1 macrophage polarization via exosomal miR-143-3p-mediated regulation of PI3K/AKT/NF- κ B signaling [J]. Stem Cells, 2023, 41 (2):184-199.

[4] WANG B L,WANG Z,NAN X,et al. Downregulation of microRNA-143-5p is required for the promotion of odontoblasts differentiation of human dental pulp stem cells through the activation of the mitogen-activated protein kinases 14-dependent p38 mitogen-activated protein kinases signaling pathway[J]. J Cell Physiol,2019,234(1):4840-4850.

[5] WANG Y H,LI S Y,YUAN S J,et al. MiR-375 promotes human periodontal ligament stem cells proliferation and osteogenic differentiation by targeting transducer of ERBB2,2 [J]. Arch Oral Biol, 2020, 117 (1): 104818-104826.

[6] 中华口腔医学会牙周病学专业委员会. 重度牙周炎诊断标准及特殊人群牙周病治疗原则的中国专家共识[J]. 中华口腔医学杂志,2017,52(2):67-71.

[7] 孟焕新. 牙周病学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2012:169.

[8] QIAN S J,HUANG Q R,CHEN R Y,et al. Single-cell RNA sequencing identifies new inflammation-promoting cell subsets in asian patients with chronic periodontitis

[J]. Front Immunol,2021,12(1):711337-711347.

[9] JIN S H,ZHOU J G,GUAN X Y,et al. Development of an miRNA-array-based diagnostic signature for periodontitis[J]. Front Genet,2020,11(1):577585-577595.

[10] RODERBURG C,KOCH A,BENZ F,et al. Serum levels of miR-143 predict survival in critically ill patients[J]. Dis Markers,2019,2019(1):4850472-4850482.

[11] DONG Y,FENG S,DONG F. Maternally-expressed gene 3 (MEG3)/miR-143-3p regulates injury to periodontal ligament cells by mediating the AKT/inhibitory κ B kinase (IKK) pathway[J]. Med Sci Monit, 2020, 26 (1): 922486-922496.

[12] NISHA K J,JANAM P,HARSHAKUMAR K. Identification of a novel salivary biomarker miR-143-3p for periodontal diagnosis;a proof of concept study[J]. J Periodontol,2019,90(10):1149-1159.

[13] WANG Z K,LAI Z,LU Z,et al. MiR-143-3p inhibits osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells by targeting KLF5 and inactivating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Front Physiol, 2021, 11 (1): 606967-606977.

[14] 刘沛,王清芝. miR-143-3p 通过 SIRT2 调控 LPS 诱导牙周膜细胞炎症、凋亡的研究[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2022,23(3):176-182.

[15] LIU Y,WANG Q,WEN J,et al. MiR-375:a novel multifunctional regulator[J]. Life Sci, 2021, 275 (1): 119323-119333.

[16] CHENG S,DI Z,HIRMAN A R,et al. MiR-375-3p alleviates the severity of inflammation through targeting YAP1/LEKT1 pathway in HaCaT cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2020,84(10):2005-2013.

[17] 王艳华,袁淑静,潘裕兴,等. miR-375 靶向锌指蛋白 470 对人牙周膜干细胞成软骨分化的调控作用[J]. 山东医药,2022,62(17):28-32.

[18] 李鲲,谢陆莉,邓琳. 黄芪多糖对人牙周膜干细胞生物学特性的影响[J]. 医学分子生物学杂志,2022,19(6):496-500.

[19] EMFIETZOGLOU R,PACHYMANOLIS E,PIPERI C. Impact of epigenetic alterations in the development of oral diseases[J]. Curr Med Chem,2021,28(6):1091-1103.

[20] CUEVAS-GONZÁLEZ M V,SUASTE-OLMOS F,GARCÍA-CALDERÓN A G. Expression of microRNAs in periodontal disease;a systematic review[J]. Biomed Res Int,2021,2021:2069410.

[21] 张婧,汪静. 慢性牙周炎患者龈沟液 LF、Shh 蛋白、TREM-1 水平与牙周临床指标和炎症因子的相关性研究[J]. 检验医学与临床,2023,20(13):1859-1863.