网络出版时间:2018-3-16 9:33 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.030.html

慢性牙周炎中龈沟液的 S100A12 和 MMP-8 浓度变化及两者关系探究

秦红霞[1],柯雅莉[1],郭春杰[1],王 鹏[2]

摘要 **目的** 初步探讨钙结合蛋白 S100A12(S100A12)作为评价牙周疾病生化指标的可行性及与基质金属蛋白酶-8(MMP-8)的关系。**方法** 实验分健康对照组、轻度、中度、重度慢性牙周炎组,收集各组患者各位点龈沟液样本。通过 ELISA 法检测收集的龈沟液中 S100A12 和 MMP-8 的浓度,比较不同程度慢性牙周炎中 S100A12 和 MMP-8 的浓度情况以及两者的关系。**结果** 4 组样本中除了健康对照组与轻度慢性牙周炎组比较得出 MMP-8 及 S100A12 的浓度差异无统计学意义外,其余各组两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),两个指标和牙周临床指标如 GI、PD 和 AL 比较均呈正相关性($P<0.001$)。**结论** S100A12 能作为诊断牙周炎症程度的辅助性生化指标,并且与 MMP-8 的水平和各临床指标有一定的相关性。

关键词 慢性牙周炎;龈沟液;钙结合蛋白 S100A12;基质金属蛋白酶-8

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0467-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.030

目前通过对人类龈沟液(gingival crevicular fluid,GCF)中生化因子的检测来研究牙周病的报道越来越多,其能特异性的反映局部位点牙周组织的活动状态,存在大量牙周检测指标[1]。基质金属酶-8(matrix metalloproteinase-8,MMP-8)是慢性牙周炎的重要标记物[2],主要由中性多形核粒细(polymorphonuclear neutrophils,PMN)分泌,破坏胶原纤维,促进骨吸收[3]。钙结合蛋白是一个约 36 ku 蛋白[4],主要存在于胞质蛋白中,属于 S100 蛋白家族[5]。钙结合蛋白 S100A12(S100 calcium binding protein A12,S100A12),是钙结合蛋白 S100 多基因家族中的一员,由 PMN 分泌。S100A12 是 1995 年首次在人体中发现的[6],目前为止,关于 S100A12 与慢性牙周炎的相关研究仍很少。该实验通过检测 S100A12 和 MMP-8 在不同程度牙周炎龈沟液中的浓度,来探讨 S100A12 作为评价牙周疾病的生化指标的可行性以及 S100A12 与 MMP-8 的相关性。

2017-11-27 接收

基金项目:河南省卫计委科技攻关项目(编号:201702051)

作者单位:郑州大学第一附属医院口腔预防科,郑州 450052

作者简介:秦红霞,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:651354253@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料 0.5 ml EP 管(河南天驰生物有限公司);30 号吸潮纸尖(美国登士柏公司);200 μl 加样枪头和移液器(美国吉尔森公司);全自动酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);37 ℃恒温水浴箱(XMTD-204,余姚兴泰仪表有限公司);高速台式离心机(德国艾本德公司);牙周探针(德国 INGUN 公司);-80 ℃冰箱(MDF-U53V,日本三洋电器有限公司);电子天平(北京赛多斯科学仪器有限公司);人 MMP-8 ELISA 检测试剂盒和人 S100A12 ELISA 检测试剂盒(上海纪宁生物科技有限公司)。

1.2 收集样本 随机选取 2016 年 12 月~2017 年 5 月就诊于郑州大学第一附属医院口腔科的慢性轻度、中度和重度牙周炎患者各 20 例,年龄(41.85±7.77)岁,男女比例均衡。从医院职工中随机选取牙周组织健康者 20 例,年龄(30.25±4.19)岁,男女比例均衡。选择每个受试者的第一或第二磨牙的近中颊侧位点收集 GCF(若是牙周炎患者,则从中选炎症最重的一颗牙的近中颊侧位点收集)。纳入标准:① 无吸烟史或已戒烟 1 年;② 3 个月内未使用过抗生素类药物、非甾体类抗炎药;③ 6 个月内无牙周治疗史且无正畸治疗史;④ 慢性轻度牙周炎患者探诊深度(probing depth,PD)≤4 mm,附着丧失(attachment loss,AL)1~2 mm,牙槽骨吸收≤1/3;慢性中度牙周炎患者 PD≤6 mm,AL 3~4 mm,牙槽骨吸收≤1/2;慢性重度牙周炎患者 PD>6 mm,AL≥5 mm,牙槽骨吸收>1/2;牙周健康者牙龈色形质正常,探诊很少出血,无附着丧失和牙槽骨吸收。排除标准:① 患有全身系统性疾病,如高血压、糖尿病等;② 长期用药史如口服阿司匹林、激素类、免疫抑制剂等;③ 妊娠期或哺乳期的妇女;④ 侵袭性牙周炎患者;⑤ 受检牙牙颈部有龋或充填体、修复体。

1.3 龈沟液的收集 先准备吸潮纸尖:将 30 号的

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

吸潮纸尖尖端剪去 3 ~ 5 mm,两根纸尖同时放入一个 EP 管中,高温高压消毒、烘干后备用。然后收集龈沟液:去除龈上的菌斑和牙结石,吹干牙面,棉卷隔湿,将纸尖轻轻放入袋内,遇到阻力时停止,静置 30 s,取出(有血液或唾液污染的丢弃)。30 s 后用同样的方法将第二根纸尖插入,放置 30 s,取出。最后称重:将盛有取样后纸尖的 EP 管于电子天平上称重,减去原重量即为采集到的 GCF 重量,称重后将样本立即放入 -80 ℃冰箱中冻存。

1.4 牙周检查 记录受试牙的出血指数(bleeding index,BI)、PD、AL。BI 是 Mazza 在 1981 年采用的改良出血指数,分 6 个等级。PD 与 AL 均以 mm 为单位,四舍五入取整数。临床指标的检测应在取完龈沟液样本后进行,防止探诊出血,污染龈沟液。

1.5 龈沟液的提取 将冻存样本在室温下解冻 20 min,加入 200 μl PBS 缓冲液,用高速台式离心机 5 000 r/min 离心 15 min,之后将吸潮纸尖丢弃。

1.6 龈沟液中 S100A12 和 MMP-8 的浓度 按照 ELISA 试剂盒说明操作,得出光密度(optical density,OD)值,计算标准曲线的直线回归方程,将 OD 值带入方程求得被稀释后的样本浓度。根据稀释倍数(稀释 100 倍),计算出龈沟液中 MMP-8 以及 S100A12 的实际浓度。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析,多组独立样本的 χ^2 检验检测每组患者性别的构成比。K-S 法检验每组数据呈正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。Levene 法检验数据方差不齐,应用非参数秩和检验(Kruskal-Wallis)分别比较 4 组样本中 S100A12、MMP-8 有无差异,S100A12 和 MMP-8 的相关性比较用 Pearson 积矩相关分析。$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组受试者的基本情况和各检测指标的结果 每组受试者男女比例均衡($P = 0.940$),但健康对照组中受试者平均年龄与其他 3 组比较偏低($P < 0.05$)。慢性牙周炎组的各项临床检测指标均明显高于健康对照组($P < 0.001$),见表 1、2。

2.2 龈沟液中 S100A12 和 MMP-8 水平的比较 运用 Kruskal-Wallis 检验分析,得出 $P < 0.001$,认为总体有差别。4 组间 MMP-8 和 S100A12 浓度进行两两比较,结果:健康对照组与轻度慢性牙周炎组比较,差异无统计学意义,其余各组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3、图 1、图 2。

2.3 S100A12 和 MMP-8 水平及各临床指标相关性分析 总的样本量都大于 50,认为总体服从正态分布,所以相关性比较用 Pearson 积矩相关分析。龈沟液中 MMP-8 与 S100A12 的水平呈正相关性($P < 0.001$),相关性较强($r = 0.832$)。同时,龈沟液中 MMP-8 的水平与 GCF 的量、GI、AL、PD 呈正相关性($r = 0.825$、0.780、0.742、0.775,$P < 0.001$),S100A12 的水平与 GCF 的量、GI、AL、PD 也呈正相关性($r = 0.895$、0.821、0.776、0.851,$P < 0.001$)。

表 1 受试者性别与年龄情况

项目	健康对照组	轻度牙周炎组	中度牙周炎组	重度牙周炎组	*P* 值
性别(男/女,*n*)	9/11	10/10	11/9	10/10	0.940
年龄(岁,$\bar{x} \pm s$)	30.25 ± 4.19	30.25 ± 4.19	43.00 ± 8.55	44.10 ± 7.55	< 0.05

表 2 实验组各指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

项目	健康对照组	轻度牙周炎组	中度牙周炎组	重度牙周炎组	*P* 值
GCF(mg)	0.97 ± 0.24	1.23 ± 0.24	1.84 ± 0.31	2.85 ± 0.41	< 0.001
GI	0.40 ± 0.60	1.70 ± 0.66	2.55 ± 0.76	3.45 ± 0.76	< 0.001
PD(mm)	2.00 ± 0.86	3.10 ± 0.85	4.75 ± 1.02	7.60 ± 1.35	< 0.001
AL(mm)	0	1.20 ± 0.77	2.90 ± 0.72	3.90 ± 1.02	< 0.001
S100A12(μg/L)	9.63 ± 3.48	13.74 ± 1.67	22.35 ± 2.99	31.51 ± 4.69	< 0.001
MMP-8(μg/L)	151.79 ± 47.15	204.08 ± 26.16	263.03 ± 32.37	359.24 ± 48.21	< 0.001

表 3 总体及四组间 MMP-8 和 S100A12 水平的比较结果(*P* 值)

项目	总体	1、2 组	1、3 组	1、4 组	2、3 组	2、4 组	3、4 组
S100A12	< 0.001	0.511	< 0.001	< 0.001	0.005	< 0.001	0.031
MMP-8	< 0.001	0.412	< 0.001	< 0.001	0.025	< 0.001	< 0.001

1、2、3、4 组分别代表健康对照组,轻度、中度、重度慢性牙周炎组

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

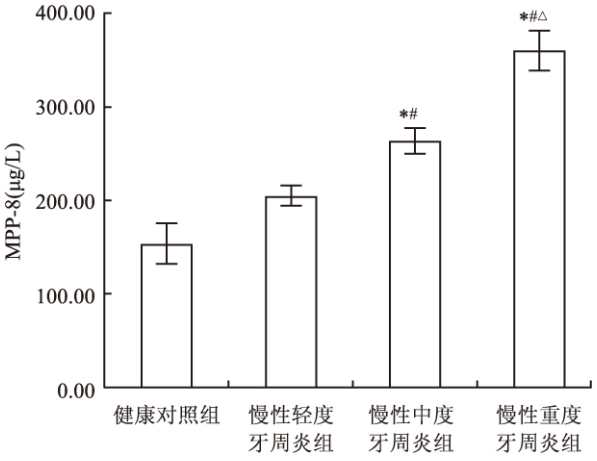

图1 各组龈沟液中 MMP-8 水平的比较

与健康对照组比较: $^{*}P<0.05$; 与慢性轻度牙周炎组比较: $^{\#}P<0.05$; 与慢性中毒牙周炎组比较: $^{\triangle}P<0.05$

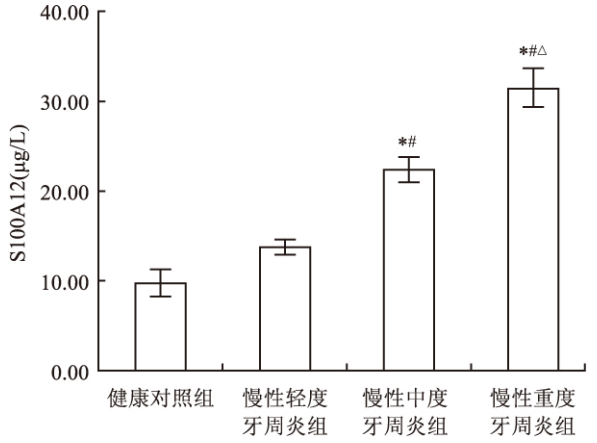

图2 各组龈沟液中 S100A12 水平的比较

与健康对照组比较: $^{*}P<0.05$; 与慢性轻度牙周炎组比较: $^{\#}P<0.05$; 与慢性中毒牙周炎组比较: $^{\triangle}P<0.05$

3 讨论

S100A12 主要由 PMN 分泌,参与了早期炎症的体内免疫反应。当前的研究中 S100A12 在诸多疾病中的价值已得到证实[7]。S100A12 蛋白能够调节许多基因的表达,激活炎性细胞,有化学趋化和抗微生物作用。其水平在慢性炎症如类风湿性关节炎、肠胃炎性疾病和囊性纤维病中有所上升[8]。同时,S100A12 与其晚期糖基化终末产物受体(RAGE)在促炎性反应中起到重要作用,两者结合后通过核因子 κB(NF-κB)和丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)通路进行信号传导,使单核吞噬细胞、淋巴细胞和内皮细胞活化,导致促炎性细胞因子的合成与分泌[9]。另外,S100A12 与锌离子的亲和力也较高[10]。本研究结果中健康对照组、轻、中、重慢性牙周炎组的龈沟液中 S100A12 的浓度呈逐渐增加趋势,并且除了健康对照组和轻度慢性牙周炎组差异无统计学意义外,其余各组两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。由此推测,S100A12 牙周炎中起着一定的作用,能作为判定炎性牙周疾病的潜在指标。

MMP-8 由骨髓分化的粒细胞合成,也称胶原酶,存在于中性粒细胞中,激活后能降解细胞外基质、促进新生血管形成、调节细胞黏附、激活蛋白。其主要由 PMN 分泌,与锌有一定的亲和力,催化机制都依赖于活性中心的锌离子存在[11-12]。研究[13]证实 MMP-8 与牙龈炎密切相关。有学者用小鼠建立牙周炎模型[3],研究 MMP-8 水平的改变,结果显示该蛋白在急性炎症期明显升高;当病程进入慢性期,炎细胞浸润减少,牙周组织中 MMP-8 的表达也明显降低。之后又有学者发现,即使是炎症由急性期转为慢性期,龈沟液内的蛋白水平仍较健康组织高出许多[14]。说明 MMP-8 水平与组织损伤密切相关,牙周组织损伤在牙周袋底,也是分泌龈沟液和产生 MMP-8 的地方。MMP-8 广泛存在于血清、龈沟液、唾液等中[2]。Gupta et al[15]研究发现 MMP-8 牙周临床指标高度相关。大量的研究证实了 MMP-8 可以作为牙周炎症进展期的一个重要标志。本实验结果与之前的研究相吻合,随着炎症加重,MMP-8 的浓度逐渐增高。

本研究结果显示从健康对照组到慢性牙周炎组,S100A12 和 MMP-8 水平明显升高,并且除健康对照组和轻度慢性牙周炎组比较差异无统计学意义外,其余各组差异均有统计学意义($P<0.05$),说明 S100A12 和 MMP-8 都能作为炎性牙周疾病潜在的生化指标。其中健康对照组和轻度慢性牙周炎组比较差异无统计学意义,这可能是由于轻度慢性牙周炎炎症较轻,对患者牙周组织破坏程度不重导致。

龈沟液中 S100A12、MMP-8 与牙周临床指标均呈正相关性,且相关性较强,说明两者的浓度与牙周临床指标密切相关。龈沟液中 S100A12 和 MMP-8 水平呈正相关且相关性大。通过之前对两者生化性能的分析,发现两者有很多相似之处。S100A12 和 MMP-8 都由 PMN 分泌,存在于血液、唾液、龈沟液等体液中,锌离子的亲和力大,都通过与 RAGE 结合,在炎性疾病中发挥作用。然而,目前还没有文献提及在牙周炎中两者相互作用关系及机制,有待于进一步实验研究。

本次实验以牙位为单位,样本量较小,可能导致

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结果有一定的偏差,需要扩大样本量,使结果更具有说服力。

参考文献

[1] 郑云飞,彭 磊,张 欣,等. 人重组 S100A8 对牙周膜细胞增殖和迁移活性影响[J]. 北京大学学报,2013,45(2):269 - 73.

[2] Rathnayake N, Gieselmann D R, Heikkinen A M, et al. Salivary diagnostics-point-of-care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine[J]. Diagnostics,2017, 7(7):1 - 12.

[3] 孟 姝,陈 宇, 吴亚菲,等. MMP-1 及 MMP-8 在大鼠牙周炎模型牙周组织中的表达与分布[J]. 实用口腔医学杂志,2016, 22(6):859 - 62.

[4] Pietzsch J, Hoppmann S. Human S100A12: a novel key player in inflammation[J]. Amino Acids,2009,36:381 - 9.

[5] Kajiura Y, Bando M, Inagaki Y, et al. Glycated albumin and calprotectin levels in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis and type 2 diabetes[J]. J Periodontol, 2014, 85(12): 1667 - 75.

[6] Guignard F, Mauel J, Markert M. Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family [J]. Biochem J,1995,309:395 - 401.

[7] 侯 斐,王 红,谷俊朝. 与炎症反应相关的钙结合蛋白 S100A12 研究进展[J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(18): 1507 - 10.

[8] Pradeep A R, Martande S S, Singh S P, et al. Correlation of human S100A12(EN-RAGE) and high-sensitivity C-reactive protein as gingival crevicular fluid and serum markers of inflammation in chronic periodontitis and type 2 diabetes[J]. Inflamm Res, 2014, 63(4):317 - 23.

[9] 雍 康,张传师,杨庆稳,等. 钙结合蛋白 S100A12 研究进展[J]. 湖北农业科学, 2014,53(8):1742 - 61.

[10] Butler G S, Overall C M. Matrix etalloproteinase rocessing of signaling molecules to regulate inflammation[J]. Periodontology 2000, 2013,63(1):123 - 48.

[11] 刘丰彬,段立公. 基质金属蛋白酶研究进展[J]. 山西体育科技,2015,25(3):1 - 4.

[12] Ramseier C A, Kinney J S, Herr A E, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease[J]. J Periodontol,2009,80(3):436 - 46.

[13] Aiba T, Akeno N, Kawane T, et al. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae[J]. J Oral Science,1996,104(5 - 6):562 - 9.

[14] Sorsa T, Gursoy U K, Nwhator S, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases[J]. Periodontology 2000, 2016,70(1):142 - 63.

[15] Gupta N, Gupta N D, Goyal L, et al. The influence of smoking on the levels of matrix metalloproteinase-8 and periodontal parameters in smoker and nonsmoker patients with chronic periodontitis: A clinicobiochemical study[J]. J Oral Craniofac Res,2016,6(1): 39 - 43.

Changes of S100A12 and MMP-8 concentration in GCF in chronic periodontitis and exploration of their relationship

Qin Hongxia, Ke Yali, Guo Chunjie, et al

(*Dept of Preventive Dentistry, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou* 450052)

Abstract ***Objective*** To study the feasibility of S100A12 which act as a biochemical indicator of evaluating periodontal disease and the relationship with MMP-8. ***Methods*** Experiment was divided into healthy control group, mild chronic periodontitis group, moderate chronic periodontitis group and severe chronic periodontitis group, and collected GCF in each point of groups of patients. The concentration of S100A12 and MMP-8 in the gingival crevicular fluid was measured by ELISA, and the concentrations of S100A12 and MMP-8 in different chronic periodontitis were compared and analyzed. ***Results*** The concentration of MMPs and S100A12 had significantly differences ($P<0.05$) except in healthy control group and mild chronic periodontitis group, and the two indicators were positively correlated($r=0.832$, $P<0.001$). At the same time, the value of periodontal clinical indicators such as GI, PD and AL were positively correlated with S100A12 and MMP-8 levels as well($P<0.001$). ***Conclusion*** The results indicates that S100A12 can be used as the auxiliary biochemical diagnosis marker of periodontal disease, and have certain correlation with the level of MMP-8 and clinical indicators.

Key words chronic periodontitis; gingival crevicular fluid; S100 calcium binding protein A12; matrix metalloproteinase-8

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net