

慢性牙周炎患者龈沟液中 LF 的检测及临床意义

秦红霞, 王 鹏, 柯雅莉, 孔江涛, 郭春杰, 焦连龙

摘要 目的 检测慢性牙周炎患者龈沟液中乳铁蛋白(LF)浓度,并探讨其与牙周临床指标的关系。方法 收集慢性牙周炎患者基础治疗前、基础治疗后及健康对照者各位点的龈沟液样本,用ELISA法检测各样本中LF的浓度。结果 慢性牙周炎患者龈沟液中LF平均浓度显著高于健康对照者($P < 0.05$),牙周基础治疗可使慢性牙周炎患者龈沟液中LF含量显著下降($P < 0.05$),治疗前后LF的浓度与牙龈指数、探诊深度、附着丧失均呈正相关性($P < 0.05$)。结论 LF与慢性牙周炎的发生、发展过程关系密切,龈沟液中的LF可以作为一种生物标志物对慢性牙周炎进行疗效评估。

关键词 慢性牙周炎; 龈沟液; 乳铁蛋白

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1525-03

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.024

目前,对于慢性牙周炎的临床诊断主要是通过牙龈指数、探诊深度、附着丧失等牙周临床指标,这些指标能客观地反映牙周组织的破坏程度,但不能准确反映慢性牙周炎的炎症活动性。龈沟液是从牙龈结缔组织渗入到龈沟内的液体,反映牙周支持组织的代谢水平^[1]。因此,近年来许多学者试图从龈沟液中寻找某种物质作为评价牙周炎症程度的生物标志物。龈沟液中的乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是由中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)次级颗粒在脱颗粒过程中释放的^[2]。牙周炎症时PMN聚集在牙龈结缔组织中,其在脱颗粒过程中分泌大量的LF,并随龈沟液渗入牙周袋内,在一定程度上反映牙周炎症程度^[3]。该实验通过对比慢性牙周炎患者非手术治疗前后龈沟液中LF的水平变化,评估LF在慢性牙周炎发生发展中的作用,为牙周炎的临床防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2016年4月~8月于河南省

口腔医院就诊并愿意参加本研究的慢性牙周炎患者17例,其中男9例,女8例;年龄32~54(44.55 ± 5.89)岁。选择牙周健康志愿者20例,其中男10例,女10例;年龄22~34(26.47 ± 4.27)岁。排除标准:①患有系统性疾病史;②2个月内有急性炎症感染史;③6个月内服用过抗生素类药物、非甾体抗炎药物或激素类避孕药;④妊娠期或哺乳期女性;⑤吸烟者。

1.2 主要仪器和试剂 30#吸潮纸尖(美国登士柏公司);1.5 ml EP管(上海望星化工有限公司);LF ELISA试剂盒(上海纪宁生物科技有限公司);低温冰箱(青岛海尔集团);高速台式离心机(北京化工仪器公司);酶标仪(ELX-800型,美国BIO-TEK公司)。

1.3 提取位点的选择 将慢性牙周炎患者设为实验组,根据全口曲面断层片从每位患者口腔中选择1~3个不相邻的牙槽骨吸收较多的牙周位点,所选位点牙龈指数(gingival index, GI) > 1 ,牙周探诊深度(probing depth, PD) ≥ 4 mm,附着丧失(attachment loss, AL) ≥ 3 mm,共30个位点。

将牙周健康志愿者设为对照组,选择志愿者口腔中第一或第二磨牙的颊侧近中作为提取位点,所选位点GI ≤ 1 ,PD ≤ 3 mm,共20个位点。

1.4 龈沟液的提取 首先将30#吸潮纸尖尖端减去大约3 mm,然后消毒,两个一组放入无菌的EP管中,称重、标记备用。与患者做好沟通和解释,消除患者的紧张心理。用棉签拭去所选位点牙表面的食物残渣、软垢等,无菌棉卷隔湿,吹干牙面。吸潮纸尖轻轻插入牙周袋内或龈沟袋内,遇有轻微阻力时为止,停留30s后取出,观察吸潮纸尖表面是否有血液、唾液等污染物,如果没有则立即放入EP管中。若吸潮纸尖已被污染,则弃去该吸潮纸尖,重新选择牙位提取龈沟液。1 min后,待龈沟液再次充满龈沟时,重复上述方法,再次收集龈沟液,将同一部位两次取样的吸潮纸尖放入EP管中,电子天平称重,记录,根据其比重关系(约1 mg/ml)算出收集到龈沟液的体积。实验组待牙周基础治疗后6周在同一位点再次收集龈沟液。将装有龈沟液的EP管

2017-05-03 接收

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(编号:201403122)

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

加入 300 μl 的 PBS 缓冲液,放入 -20 °C 冰箱中保存,待样本完全收集完后统一进行实验室检测。

1.5 全口牙周状况检查和牙周检测指标记录 参照孟焕新^[4]主编的牙周病学教材,对实验组和对照组进行全口牙周检查,记录全口牙 GI、PD、AL。实验组患者接受全口超声龈上洁治、龈下刮治、根面平整等牙周基础治疗,同时进行口腔卫生宣教,指导患者掌握正确的刷牙方法,以及牙线和牙缝刷的使用。牙周基础治疗 6 周后,对实验组再次进行全口牙周检查,并记录上述牙周临床指标。

1.6 龈沟液中 LF 的检测 将样本从 -20 °C 冰箱中取出,室温下解冻,震荡,1 500 r/min 离心 3 min 后取上清液,用 ELISA 法测定样本中人 LF 水平,根据标准曲线计算样品中 LF 的浓度。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组定量资料比较采用 *t* 检验,三组定量资料比较采用方差分析,两组定量资料的关联性分析采用 Spearman 相关分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 龈沟液中 LF 水平的测量结果 检测结果显示,对照组、实验组患者治疗前,LF 平均浓度分别为 (143.75 ± 31.42)、(1 810.80 ± 155.97) μg/L,显著高于对照组 (*P* < 0.05);实验组经过牙周基础治疗后,龈沟液中 LF 浓度 (1 006.63 ± 158.82) μg/L 明显下降 (*P* < 0.05) (图 1)。

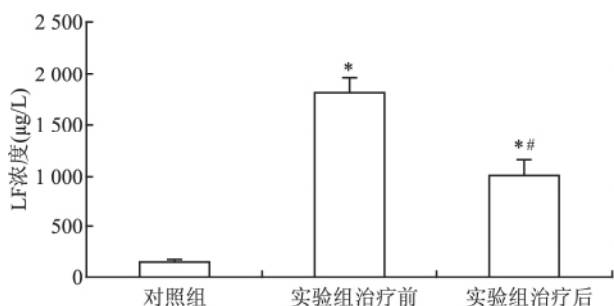


图 1 各组龈沟液中 LF 的平均浓度
与对照组比较: * *P* < 0.05; 与实验组治疗前比较: # *P* < 0.05

2.2 LF 水平与牙周临床指标的相关性 实验组患者经过牙周基础治疗后,龈沟液中 LF 浓度明显降低,GI、PD、CAL 各项牙周临床指标均明显改善 (*P* < 0.05) (表 1) 相关性分析显示,LF 与 GI、PD、AL 均呈明显正相关性 (*P* < 0.05) (表 2)。

表 1 基础治疗后牙周临床指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

临床指标	对照组 (<i>n</i> = 20)	实验组 (<i>n</i> = 30)		<i>P</i> 值
		治疗前	治疗后	
GI	0.52 ± 0.23	2.10 ± 0.54	1.27 ± 0.09	<0.001
PD (mm)	1.85 ± 0.58	4.36 ± 0.85	3.02 ± 0.78	<0.001
AL (mm)	-	2.47 ± 0.77	1.77 ± 0.43	<0.001

表 2 牙周基础治疗前后 LF 和各牙周临床指标相关性分析

临床指标	治疗前		治疗后	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
GI	0.535	0.021	0.472	0.008
PD	0.554	0.001	0.667	0.004
AL	0.686	<0.001	0.369	0.045

3 讨论

慢性牙周炎的主要临床特征是牙周支持组织的不可逆性损坏。细菌侵入牙周组织后进行定植和繁殖,其抗原成分、各种酶、毒素及代谢产物直接破坏牙周组织,引起牙周组织局部的免疫炎症反应,造成组织损伤。机体的 PMN、单核/巨噬细胞等防御细胞通过释放溶酶体酶和超氧离子来杀灭入侵的细胞,而过多活性氧的释放容易打破机体氧化和抗氧化系统之间的平衡,导致牙周局部发生氧化应激反应,进而加重牙周损伤^[5]。

LF 已被证明对机体有多种生物学功能,对牙周疾病的影响主要通过 3 种途径: ① LF 通过“铁剥夺”、“膜渗透”和“酶抑制”3 种机制杀灭或抑制牙周致病菌^[6]; ② LF 通过促进抗体生成、T 细胞成熟、淋巴细胞增殖、活化自然杀伤细胞等来增强宿主的免疫反应^[7]; ③ LF 可以与环境中游离铁离子螯合,控制铁离子催化的氧自由基形成,减少氧化应激反应,保护机体免受损伤^[8]。Friedman et al^[9]报道慢性牙周炎患者和侵袭性牙周炎患者龈沟液中 LF 水平相似,但均明显高于牙周健康者。Jentsch et al^[10]发现慢性牙周炎患者手术治疗后龈沟液和唾液中 LF 水平较手术治疗前明显减少。但是,对于慢性牙周炎患者非手术治疗前后龈沟液中 LF 水平变化尚未报道。

本实验结果显示,实验组龈沟液中 LF 平均浓度明显高于对照组,与 Glimvall et al^[11]得出的牙周炎位点 LF 浓度高于牙周健康位点结果一致。慢性牙周炎患者基础治疗后龈沟液中 LF 的浓度明显降低,主要是因为龈沟液中 PMN 的数量减少导致的。虽然慢性牙周炎组患者牙周基础治疗后龈沟液中 LF 水平有所下降,但仍高于对照组,可能是因为 LF

恢复到正常水平需要时间。Suomalaiene et al^[12] 研究发现侵袭性牙周炎经过牙周治疗后,患者龈沟液和唾液中的 LF 恢复到正常水平大概需要 24 个月。慢性牙周炎患者经过牙周基础治疗之后,牙周炎症得到控制,龈沟液中 LF 浓度降低,LF 浓度与牙周临床指标呈正相关性。这是因为龈沟液中的 LF 是由牙龈结合上皮下的结缔组织中的 PMN 分泌,并被龈沟液运送到牙周袋内的。当慢性牙周炎患者经过牙周基础治疗后,牙周炎症得到控制,牙龈结缔组织中 PMN 的活性降低,数量减少,从而导致 LF 的分泌减少。Buchmann et al^[13] 发现慢性牙周炎患者经过牙周治疗,牙周临床症状恢复正常后,PMN 表达下调。牙周组织中 PMN 的浓度决定牙周炎症的严重程度,LF 是牙周炎急性期时 PMN 次级颗粒过程中分泌的。因此,有学者认为 LF 反映的是牙龈结缔组织中正在脱颗粒的 PMN 量,即 LF 可能较好地反映了 PMN 的活动性,而不是 PMN 的总数,就某个特定部位而言,用 PMN 活动性/脱颗粒作为牙周病状态的测定可能比单纯测定 PMN 量更有意义^[14]。

本研究结果显示慢性牙周炎可以导致龈沟液中 LF 的浓度增加,经过牙周基础治疗可以使 LF 水平降低,炎症得到控制,说明 LF 在慢性牙周炎的发生和发展过程中起到重要作用,LF 可以作为一种生物标志物对慢性牙周炎患者基础治疗后的疗效进行评估。而 LF 在慢性牙周炎中具体的作用机制,还需进行更多的基础研究。

参考文献

[1] 赵蓝波,李响生. 牙周炎龈沟液成分检测的研究进展[J]. 医学综述 2014, 20(2): 4316-8.

- [2] Adonogianaki E, Moughal N A, Kinane D F. Lactoferrin in the gingival crevice as a marker of polymorphonuclear leucocytes in periodontal diseases [J]. *J Clin Periodontol*, 1993, 20(1): 26-31.
- [3] Ozdemir B, Ozcan G, Karaduman B, et al. Lactoferrin in gingival crevicular fluid and peripheral blood during experimental gingivitis [J]. *Eur J Dent* 2009, 3(1): 16-23.
- [4] 孟焕新. 牙周病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 127-35.
- [5] 张馨艺,李萌,陈秉东,等. 氧化应激及抗氧化防御系统在慢性牙周炎中的作用[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志 2015, 25(1): 52-6.
- [6] 康萍,印遇龙,黄瑞林. 乳铁蛋白的抑菌机制[J]. 中国饲料 2006, 15(10): 29-31.
- [7] Actor J K, Hwang S A, Krusel M L. Lactoferrin as a natural immune modulator[J]. *Curr Pharm Des* 2009, 15(17): 1956-73.
- [8] 李婷,王彩云,闫序东,等. 乳铁蛋白体外抗氧化性的研究[J]. 食品科学 2012, 33(21): 111-3.
- [9] Friedman S A, Mandel I D, Herrera M S. Lysozyme and lactoferrin quantitation in the crevicular fluid [J]. *J Periodontol*, 1983, 54(6): 347-50.
- [10] Jentsch H, Sievert Y, Göcke R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment [J]. *J Clin Periodontol* 2004, 31(7): 511-4.
- [11] Glimvall P, Wickström C, Jansson H. Elevated levels of salivary lactoferrin, a marker for chronic periodontitis [J]. *J Periodontol Res* 2012, 47(5): 655-60.
- [12] Suomalainen K, Saxen L, Vilja P, et al. Peroxidases, lactoferrin and lysozyme in peripheral blood neutrophils, gingival crevicular fluid and whole saliva of patients with localized juvenile periodontitis [J]. *Oral Dis*, 1996, 2(2): 129-34.
- [13] Buchmann R, Hasilik A, Nunn M E, et al. PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation by gingival crevicular fluid enzymes and elastase- α -1-proteinase inhibitor complex [J]. *J Clin Periodontol* 2002, 29(6): 563-72.
- [14] 段清宇. 乳铁蛋白是龈沟液中中性粒细胞活动的标志[J]. 国际口腔科学杂志, 1994, 21(4): 241-2.

Detection and clinical significance of LF in gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis

Qin Hongxia, Wang Peng, Ke Yali, et al

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

Abstract Objective To evaluate the concentration of lactoferrin (LF) in the gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis and its correlation with clinic periodontal parameters. **Methods** Gingival crevicular fluid (GCF) was collected from healthy control sites as well as periodontitis sites from chronic periodontitis patients, and the levels of LF was detected by ELISA. **Results** Concentration of LF in GCF was significantly higher in chronic patients ($P < 0.05$), and decreased significantly after initial therapy ($P < 0.05$), the variation of LF correlated positively with clinical parameters like gingival index, probing depth, attachment loss ($P < 0.05$). **Conclusion** LF is closely related to the occurrence and development of chronic periodontitis. LF in gingival crevicular fluid can be used as a biomarker for the evaluation of chronic periodontitis.

Key words chronic periodontitis; gingival crevicular fluid; lactoferrin