

武金强, 谷若萌, 马子安. 慢性牙周炎牙龈卟啉单胞菌感染患者 NLRP3 炎症小体与炎症反应及焦亡指标的相关性[J]. 中南医学科学杂志, 2024, 52(1): 113-115, 134.

DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2024.01.027

· 临床医学 ·

慢性牙周炎牙龈卟啉单胞菌感染患者 NLRP3 炎症小体与炎症反应及焦亡指标的相关性

武金强, 谷若萌, 马子安

廊坊市人民医院口腔科, 河北廊坊 065000

[摘要] **目的** 研究慢性牙周炎牙龈卟啉单胞菌感染患者 NLRP3 炎症小体与炎症反应及焦亡指标的相关性。**方法** 选择 300 例慢性牙周炎患者, 按照牙龈卟啉单胞菌感染情况分为阳性组和阴性组。比较两组牙周健康指标、牙周组织 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、Caspase-1 mRNA 和 GSDMD-N 蛋白表达水平, 以及龈沟液白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。采用 Pearson 检验进行相关性分析。**结果** 阳性组菌斑指数(PLI)、牙龈指数(GI)、附着丧失(AL)、牙周袋深度(PD)、牙周组织 NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA、GSDMD-N 蛋白, 以及龈沟液 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平均高于阴性组($P<0.05$)。NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平与 PLI、GI、AL、PD、GSDMD-N 蛋白、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平均呈正相关($P<0.05$)。**结论** 慢性牙周炎患者牙龈卟啉单胞菌感染加重病情、炎症反应及细胞焦亡, 其作用可能与激活 NLRP3 炎症小体有关。

[关键词] 慢性牙周炎; NLRP3 炎症小体; 炎症反应; 细胞焦亡; 卟啉单胞菌感染

[中图分类号] R781.42

[文献标识码] A

The correlation between NLRP3 inflammasome, inflammatory response, and pyroptosis markers in patients with chronic periodontitis and Porphyromonas gingivalis infection

WU Jinqiang, GU Ruomeng, MA Zi'an

Department of Stomatology, Langfang People's Hospital, Langfang 065000, Hebei, China

[ABSTRACT] **Aim** To study the correlation between NLRP3 inflammasome, inflammatory response, and pyroptosis markers in patients with chronic periodontitis and Porphyromonas gingivalis infection. **Methods** 300 patients with chronic periodontitis were selected and divided into a positive group and a negative group based on the infection status of Porphyromonas gingivalis. The expression levels of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), Caspase-1 mRNA and GSDMD-N protein in periodontal tissue, as well as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8, tumor necrosis factor- α (TNF- α) in gingival crevicular fluid between two groups were measured. Correlation analysis was done by using Pearson test. **Results** Plaque index (PLI), gingival index (GI), attachment loss (AL), pocket depth (PD), periodontal tissue NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA, GSDMD-N protein, and gingival crevicular fluid IL-1 β , IL-18, TNF- α levels in positive groups were higher than those in the negative group ($P<0.05$). The expression levels of NLRP3, ASC, and Caspase-1 mRNA were positively correlated to PLI, GI, AL, PD, GSDMD-N proteins, IL-1 β , IL-18, and TNF- α levels ($P<0.05$). **Conclusion** The infection of Porphyromonas gingivalis in patients with chronic periodontitis exacerbates the condition, inflammatory response, and necrosis, and its effect may be related with the activation of NLRP3 inflammasomes.

[KEY WORDS] chronic periodontitis; NLRP3 inflammasome; inflammatory response; cell pyroptosis; Porphyromonas infection

慢性牙周炎是菌斑微生物导致的牙周组织慢性炎症性疾病,持续激活的炎症反应会导致牙周组织发生不可逆破坏,严重时会造成牙齿松动和脱落,其机制目前尚不十分清楚。牙龈卟啉单胞菌是

慢性牙周炎常见致病菌,局部组织中存在的模式识别受体能识别该病原菌,并通过下游信号通路激活炎症反应、细胞凋亡及焦亡等,进而导致组织损伤和破坏^[1-2]。NLRP3 是一类模式识别受体,以 NLRP3

[收稿日期] 2023-04-20

[修回日期] 2023-12-08

[基金项目] 廊坊市科技计划项目(2017013052)

[作者简介] 武金强,副主任医师,研究方向为口腔修复,E-mail 为 miccrose@163.com。

为核心的炎症小体可介导炎症反应和细胞焦亡,牙龈卟啉单胞菌导致的牙周膜细胞损害与激活 NLRP3 炎症小体有关^[3]。为深入认识 NLRP3 炎症小体在牙龈卟啉单胞菌感染导致慢性牙周炎中的作用,本研究分析慢性牙周炎牙龈卟啉单胞菌感染患者 NLRP3 炎症小体与炎症反应及焦亡指标的相关性,为临床提供参考。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择本院 2020 年 2 月—2022 年 2 月收治的慢性牙周炎患者 300 例,按照牙龈卟啉单胞菌感染情况分为阳性组 194 例和阴性组 106 例。阳性组男 101 例、女 93 例,年龄 (48.31 ± 7.71) 岁;轻度 138 例,重度 56 例,病程 1~4 年;发生全口牙槽骨吸收 22 例,磨牙牙槽骨吸收 67 例,前牙牙槽骨吸收 72 例。阴性组男 64 例、女 42 例,年龄 (48.09 ± 7.45) 岁;轻度 76 例,重度 30 例,病程 1~4 年;发生全口牙槽骨吸收 10 例,磨牙牙槽骨吸收 31 例,前牙牙槽骨吸收 40 例。两组一般资料比较差异无显著性($P>0.05$)。纳入标准:①符合慢性牙周炎诊断标准^[4];②均进行牙龈卟啉单胞菌检测^[4];③均通过正畸治疗或拔除患牙获得牙龈组织标本;④均留取龈沟液标本。排除标准:①近 3 个月接受过抗感染治疗、免疫治疗;②糖尿病、自身免疫性疾病;③恶性肿瘤;④妊娠或哺乳者。本研究获得本院医学伦理委员会批准,取得患者或家属知情同意,签署知情同意书。

1.2 牙周健康指标的评估

在治疗前检测两组牙周健康指标菌斑指数(plaque index, PLI)、牙龈指数(gingival index, GI)、附着丧失(attachment loss, AL)、牙周袋深度(pocket depth, PD)。

1.3 荧光定量 PCR 检测牙周组织 NLRP3 炎症小体 mRNA

提取牙周组织总 RNA,将总 RNA 反转录为 cDNA,采用荧光定量检测试剂盒(北京天根生化科技公司)对 cDNA 中的目标基因 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、Caspase-1 进行荧光定量 PCR 扩增,按照试剂盒说明书操作,以 β -actin 为内参,计算 NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平。

1.4 ELISA 检测龈沟液中炎症因子水平

将无菌纸放置在牙周袋底部 10 s,取出放入

1 mL 无菌生理盐水中,室温下洗脱 40 min,4 ℃ 3 000×g 离心 5 min,收集上清液即为龈沟液。采用酶联免疫吸附测定试剂盒(上海西唐生物科技公司)检测龈沟液中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平。

1.5 Western blotting 检测牙周组织中焦亡标志基因蛋白水平

采用组织裂解液对牙周组织进行匀浆,提取蛋白,Western blotting 检测牙周组织中焦亡标志基因 GSDMD-N 蛋白水平。以 β -tubulin 为内参计算 GSDMD-N 蛋白表达水平。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验,相关性分析采用 Pearson 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组牙周健康指标的比较

阳性组 PLI、GI、AL、PD 高于阴性组($P<0.05$;表 1)。

表 1 两组牙周健康指标的比较

分组	PLI	GI	AL/mm	PD/mm
阴性组	1.05 $\pm$ 0.14	1.01 $\pm$ 0.17	4.24 $\pm$ 0.71	4.31 $\pm$ 0.78
阳性组	1.25 $\pm$ 0.19 ^a	1.18 $\pm$ 0.14 ^a	4.86 $\pm$ 0.84 ^a	5.14 $\pm$ 0.91 ^a

注:a 为 $P<0.05$,与阴性组比较。

2.2 两组 NLRP3 炎症小体 mRNA 的比较

阳性组牙周组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平高于阴性组($P<0.05$;表 2)。

表 2 两组牙周组织中 NLRP3 炎症小体 mRNA 的比较

分组	NLRP3	ASC	Caspase-1
阴性组	1.00 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.23
阳性组	1.81 $\pm$ 0.39 ^a	1.52 $\pm$ 0.28 ^a	1.77 $\pm$ 0.34 ^a

注:a 为 $P<0.05$,与阴性组比较。

2.3 两组炎症因子水平的比较

阳性组龈沟液中 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平高于阴性组($P<0.05$;表 3)。

2.4 两组 GSDMD-N 蛋白水平的比较

阳性组牙周组织中焦亡标志基因 GSDMD-N 蛋白表达水平高于阴性组($P<0.05$;图 1)。

表 3 两组龈沟液中炎症因子水平的比较

分组	IL-1 β /(μ g/L)	IL-18/(ng/L)	TNF- α /(μ g/L)
阴性组	6.48 $\pm$ 0.95	48.51 $\pm$ 7.85	3.76 $\pm$ 0.62
阳性组	9.13 $\pm$ 1.35 ^a	63.46 $\pm$ 9.32 ^a	5.51 $\pm$ 0.84 ^a

注:a 为 $P<0.05$,与阴性组比较。

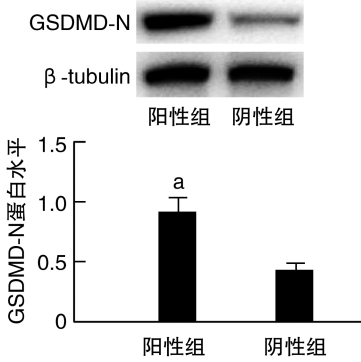


图 1 两组 GSDMD-N 蛋白水平的比较
a 为 $P<0.05$,与阴性组比较。

2.5 NLRP3 炎症小体与牙周健康指标、炎症因子、焦亡标志基因的相关性

NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平与 PLI、GI、AL、PD、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、GSDMD-N 蛋白表达水平均呈正相关($P<0.05$;表 4)。

表 4 NLRP3 炎症小体与牙周健康指标、炎症因子、焦亡标志基因的相关性

指标	NLRP3		ASC		Caspase-1	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
PLI	0.423	<0.001	0.298	<0.001	0.326	<0.001
GI	0.391	<0.001	0.341	<0.001	0.284	<0.001
AL	0.277	<0.001	0.277	<0.001	0.314	<0.001
PD	0.321	<0.001	0.392	<0.001	0.351	<0.001
IL-1 β	0.374	<0.001	0.417	<0.001	0.368	<0.001
IL-18	0.409	<0.001	0.366	<0.001	0.429	<0.001
TNF- α	0.384	<0.001	0.409	<0.001	0.376	<0.001
GSDMD-N	0.319	<0.001	0.284	<0.001	0.419	<0.001

3 讨论

牙龈卟啉单胞菌是促进慢性牙周炎的致病菌,相关研究证实,牙龈卟啉单胞菌的菌毛、荚膜、膜内成分及其释放的脂多糖、外膜蛋白等参与炎症反应、细胞凋亡及焦亡、氧化应激、内质网应激等生物学环节的调控^[5],但具体的生物学机制尚不清楚。

病原菌调控宿主细胞炎症反应、凋亡及焦亡的过程涉及模式识别受体对病原菌成分的识别及细

胞内信号转导^[6-7]。NLRP3 是具有广泛生物学活性的模式识别受体,其与细胞内 ASC、Caspase-1 共同组成炎症小体,一方面直接参与细胞炎症反应及焦亡的调控,另一方面通过复杂的生物信号转导网络参与氧化应激、内质网应激、凋亡等的调控。慢性牙周炎发病过程中 NLRP3 炎症小体表达增加已有相关报道^[8];另有细胞实验证实牙龈卟啉单胞菌感染能够激活牙周膜细胞中 NLRP3 炎症小体^[4]。本研究证实,合并牙龈卟啉单胞菌感染的慢性牙周炎牙周组织中 NLRP3 炎症小体的表达高于未感染牙龈卟啉单胞菌的牙周组织,并且 NLRP3 炎症小体的表达与牙周炎病情指标 PLI、GI、AL、PD 呈正相关,提示慢性牙周炎发病过程中牙龈卟啉单胞菌感染对 NLRP3 炎症小体具有激活作用,并且这一激活作用可能造成牙周炎病情加重。

NLRP3 炎症小体在识别病原菌的多种成分后通过细胞内 ASC 招募 Caspase-1,后者一方面能够促进 IL-1 β 、IL-18 的成熟和释放,进而介导炎症反应激活,增加其他炎症因子如 TNF- α 释放^[9];另一方面能够裂解 GSDMD 的氨基末端、生成 GSDMD 并介导细胞焦亡^[10]。在慢性牙周炎的多种模型中均存在炎症反应和细胞焦亡的过度激活^[11-12]。本研究证实,合并牙龈卟啉单胞菌感染的慢性牙周炎龈沟液中 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平及牙周组织中 GSDMD-N 水平高于未感染牙龈卟啉单胞菌的牙周组织,提示牙龈卟啉单胞菌感染加重了慢性牙周炎的炎症反应和细胞焦亡。本研究进一步通过相关性分析证实,NLRP3 炎症小体表达与 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、GSDMD-N 水平呈正相关,这一结果符合 NLRP3 炎症小体介导炎症反应和细胞焦亡的生物学特性,进而也提示激活 NLRP3 炎症小体与牙龈卟啉单胞菌感染加重慢性牙周炎的炎症反应和细胞焦亡有关。

本研究仅仅通过临床样本的检测结果展开讨论分析,虽然能够初步揭示 NLRP3 炎症小体在牙龈卟啉单胞菌感染加重慢性牙周炎病情、炎症反应和细胞焦亡中的作用,但未能通过细胞实验、动物实验获得 NLRP3 炎症小体对牙周组织健康状况影响的直接证实。此外,牙龈卟啉单胞菌是慢性牙周炎常见的致病菌,除此之外也存在其他致病菌,今后可进一步探索牙周炎发病过程中不同类型致病菌激活 NLRP3 的特点,进而有助于全面认识牙周炎的分子生物学机制。

(下转第 134 页)

乳腺组织及脂肪组织有明显硬度差异。腋窝淋巴结转移患者的腋窝淋巴结边缘在 SWE 图像上观察到有明显特征性的局部彩色局域呈硬环状^[12]。而 SWE 参数中的 E_{mean} 、 E_{max} 、SD 能反映淋巴结硬度及异质程度, E_{mean} 、 E_{max} 、SD 值越高代表淋巴结硬度及异质程度越高^[13]。陈佳等^[14]研究发现, 腋窝淋巴结转移组患者 E_{max} 、 E_{mean} 明显高于未转移组, 而本研究亦得到相同结论。

本文 ROC 曲线结果显示, 组织学分级为Ⅲ级、存在淋巴管血管侵犯、 $E_{\text{max}} \geq 45.635$ kPa、SD ≥ 8.450 的联合预测效能高于各指标单独预测效能。

综上所述, 临床病理特征联合 SWE 参数对乳腺癌腋窝淋巴结转移具有一定预测价值, 值得在临床中推广应用。

[参考文献]

- [1] ZHANG Z Y, ZHANG Y X, SUN X C. Therapeutic options for contralateral axillary lymph node metastasis in breast cancer[J]. *Curr Probl Cancer*, 2021, 45(5): 100706.
- [2] 谢玉海, 周运锋, 韩剑剑, 等. 影像组学在乳腺癌腋窝淋巴结转移评估中的研究进展[J]. *放射学实践*, 2023, 38(1): 117-120.
- [3] DUAN Y, ZHU Y Y, NIE F, et al. Predictive value of combining clinicopathological, multimodal ultrasonic characteristics in axillary lymph nodal metastasis burden of patients with cT1-2N0 breast cancer[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2022, 81(3): 255-269.
- [4] XU Y J, GONG H L, HU B, et al. Role of "stiff rim" sign obtained by shear wave elastography in diagnosis and guiding therapy of breast cancer[J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(15): 3615-3623.
- [5] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2019 年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(8): 609-679.
- [6] 桑田, 康燕飞, 曹玉文, 等. 乳腺癌肿块弹性特征及免疫组化指标预测腋窝淋巴结转移的价值[J]. *中国医学影像学杂志*, 2022, 30(8): 776-782.
- [7] SONG B I. A machine learning-based radiomics model for the prediction of axillary lymph-node metastasis in breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2021, 28(3): 664-671.
- [8] 梅丽丽, 曾书娥, 袁峰, 等. 经皮超声造影在浸润性乳腺癌前哨淋巴结转移评估中的应用价值[J]. *川北医学院学报*, 2021, 36(11): 1455-1457, 1487.
- [9] CHENG Y, XU S, WANG H, et al. Intra-and peri-tumoral radiomics for predicting the sentinel lymph node metastasis in breast cancer based on preoperative mammography and MRI[J]. *Front Oncol*, 2022: 1047572.
- [10] 陈洁文, 李姣, 马微妹, 等. 早期浸润性乳腺癌腋窝淋巴结转移与术前 MRI 及临床病理特征的相关性分析[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2020, 31(9): 618-623, 654.
- [11] WANG L N, LI J T, QIAO J H, et al. Establishment of a model for predicting sentinel lymph node metastasis in early breast cancer based on contrast-enhanced ultrasound and clinicopathological features[J]. *Gland Surg*, 2021, 10(5): 1701-1712.
- [12] 陈思思, 于粒粒, 黄薪儒, 等. 剪切波弹性成像预测乳腺癌前哨淋巴结转移的临床价值[J]. *临床超声医学杂志*, 2021, 23(10): 747-750.
- [13] 吴延琴, 赵巧玲, 辛亚军. 超声诊断乳腺癌腋窝淋巴结转移的影像学表现及其临床效果观察[J]. *影像研究与医学应用*, 2022, 6(3): 53-55.
- [14] 陈佳, 黎玲. SWE 参数弹性模量值在乳腺癌发生腋窝淋巴结转移诊断中的价值[J]. *影像科学与光化学*, 2021, 39(4): 533-537.

(此文编辑 蒋湘莲)

(上接第 115 页)

[参考文献]

- [1] KAUR J, CHAHAL G S, GROVER V, et al. Immediate implant placement in periodontally infected sites: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Int Acad Periodontol*, 2021, 23(2): 115-137.
- [2] HSU Y T, HUANG N C, WONG A, et al. Periodontal risk assessment based on dental and gingival morphology: a comparative analysis of African versus Asian American cohorts[J]. *Clin Adv Periodontics*, 2020, 10(4): 224-230.
- [3] 苏阳. 牙龈卟啉单胞菌感染通过激活 NLRP3 小体诱导牙周膜细胞炎症反应及凋亡效应[J]. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(1): 40-43.
- [4] 孟焕新. 中国牙周病防治指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 45-49.
- [5] XU W Z, ZHOU W, WANG H Z, et al. Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 120: 45-84.
- [6] LUKOVA O A, ZASLAVSKAYA M I, MAKHROVA T V, et al. Expression of toll-like and adhesive receptors on epithelial cells of the oral mucosa in periodontitis[J]. *Klin Lab Diagn*, 2020, 65(10): 645-648.
- [7] KARLIS G D, SCHÖNINGH E, JANSEN I D C, et al. Chronic exposure of gingival fibroblasts to TLR2 or TLR4 agonist inhibits osteoclastogenesis but does not affect osteogenesis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1693.
- [8] SURLIN P, LAZAR L, SINCAR C, et al. NLRP3 inflammasome expression in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis and chronic hepatitis C[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 6917919.
- [9] WANG F, GUAN M, WEI L T, et al. IL-18 promotes the secretion of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts by activating NF- κ B signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 703-710.
- [10] CHENG R, FENG Y C, ZHANG R, et al. The extent of pyroptosis varies in different stages of apical periodontitis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(1): 226-237.
- [11] ABBASI Z A, HADI N I, ZUBAIRI A M, et al. Salivary interleukin 1-beta levels and clinical periodontal parameters in habitual naswar users and non-users[J]. *Pak J Med Sci*, 2019, 35(3): 674-679.
- [12] SANTOS-LIMA E K N, OLIVEIRA Y A, SANTOS R P B, et al. Production of interferon-gamma, interleukin-6, and interleukin-1 β by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with novel lys-gingipain synthetic peptides[J]. *J Periodontol*, 2019, 90(9): 993-1001.

(此文编辑 朱雯霞)