

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.028

龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平与慢性牙周炎伴 2 型糖尿病患者牙周临床指标、口腔龈下菌群以及 Th17/Treg 失衡的相关性分析*

叶良静 李 慧 孙卫国 陈 艳 徐小倩

(安徽理工大学第一附属医院口腔科 安徽 淮南 232000)

摘要 目的:探讨龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平与慢性牙周炎伴 2 型糖尿病(T2DM)患者牙周临床指标、口腔龈下菌群以及外周血辅助性 T 细胞 17(Th17)/调节性 T 细胞(Treg)失衡的相关性。**方法:**选择 2018 年 1 月至 2022 年 1 月安徽理工大学第一附属医院口腔科收治的 86 例慢性牙周炎患者,根据是否伴 T2DM 将患者分为慢性牙周炎伴 T2DM 组 15 例和单纯慢性牙周炎组 71 例,另选择 65 例健康体检志愿者为对照组。检测龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平,口腔龈下菌群以及外周血 Th17 细胞占比、Treg 细胞占比、血清白细胞介素(IL)-17、转化生长因子- β (TGF- β)水平。Pearson 相关分析龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平与牙周临床指标、口腔龈下菌群、外周血 Th17/Treg 以及血清 IL-17、TGF- β 的相关性。**结果:**慢性牙周炎伴 T2DM 组、单纯慢性牙周炎组龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平高于对照组($P<0.05$),且慢性牙周炎伴 T2DM 组高于单纯慢性牙周炎组($P<0.05$)。慢性牙周炎伴 T2DM 组龈沟出血指数(SBI)、菌斑指数(PLI)、探诊深度(PD)、附着丧失(AL)、牙龈卟啉单胞菌、二氧化碳噬纤维菌、中间普氏菌、变黑普氏菌数量、外周血 Th17 细胞占比、Th17/Treg 比值、血清 IL-17 水平高于单纯慢性牙周炎组($P<0.05$),外周血 Treg 细胞占比低于单纯慢性牙周炎组($P<0.05$)。龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平与 PLI、SBI、AL、PD、牙龈卟啉单胞菌、二氧化碳噬纤维菌、中间普氏菌、变黑普氏菌数量、外周血 Th17 细胞占比、Th17/Treg 比值、血清 IL-17 水平呈正相关($P<0.05$),与外周血 Treg 细胞占比呈负相关($P<0.05$)。**结论:**慢性牙周炎伴 T2DM 患者龈沟液中 miR-155、miR-223 表达均上调,且与牙周组织破坏程度、龈下菌群紊乱和 Th17/Treg 失衡有关。

关键词:慢性牙周炎;2 型糖尿病;口腔菌群;牙周临床指标;辅助性 T 细胞 17;调节性 T 细胞;相关性

中图分类号:R587.2;R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)02-350-06

Correlation Analysis of the Expression Levels of miR-155 and miR-223 in Gingival Crevicular Fluid and Periodontal Clinical Indicators, Oral Subgingival Microbiota and Th17/Treg Imbalance in Patients with Chronic Periodontitis with Type 2 Diabetes Mellitus*

YE Liang-jing, LI Hui, SUN Wei-guo, CHEN Yan, XU Xiao-qian

(Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Technology, Huainan, Anhui, 232000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlation between the expression levels of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid and periodontal clinical indicators, oral subgingival microbiota and peripheral blood helper T cell 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) imbalance in patients with chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods:** 86 patients with chronic periodontitis who were admitted to the Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Science and Technology from January 2018 to January 2022 were selected, and they were divided into chronic periodontitis with T2DM group with 15 cases and simple chronic periodontitis group with 71 cases according to whether they had T2DM. In addition, 65 healthy volunteers were selected as the control group. The expression levels of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid, oral subgingival microbiota, the proportion of peripheral blood Th17 cells and proportion of Treg cells, serum interleukin (IL)-17 and transforming growth factor- β (TGF- β) were detected. Pearson correlation analysis was performed to analyze the correlation between the expression levels of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid and periodontal clinical indicators, oral subgingival microbiota, peripheral blood Th17/Treg, serum IL-17 and TGF- β . **Results:** The expression levels of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid in chronic periodontitis with T2DM group and simple chronic periodontitis group were higher than those in control group ($P<0.05$), and the chronic periodontitis with T2DM group was higher than the simple chronic periodontitis group ($P<0.05$). The gingival crevicular bleeding index (SBI), plaque index (PLI), probing depth (PD), attachment loss (AL), *Porphyromonas gingivalis*, *Carbon dioxide-eating fibroblasts*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, the proportion of peripheral blood Th17 cells, Th17/Treg ratio, and serum IL-17 level in chronic periodontitis with T2DM

* 基金项目:安徽省卫生计生委科研计划项目(2016qk1208)

作者简介:叶良静(1987-),女,本科,主治医师,主要从事口腔牙周方向的研究,E-mail: ylj5982@163.com

(收稿日期:2022-05-21 接受日期:2022-06-17)

group were higher than those in simple chronic periodontitis group ($P<0.05$), the proportion of peripheral blood Treg cells was lower than that in simple chronic periodontitis group ($P<0.05$). The expression levels of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid were positively correlated with PLI, SBI, AL, PD, *Porphyromonas gingivalis*, carbon dioxide-eating fibroblasts, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melanogra*, the proportion of peripheral blood Th17 cells, Th17/Treg ratio, and serum IL-17 level ($P<0.05$), they were negatively correlated with the proportion of peripheral blood Treg cells ($P<0.05$). **Conclusions:** The expressions of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis with T2DM are up-regulated, which are related to the degree of periodontal tissue destruction, subgingival microbiota disorder and Th17/Treg imbalance.

Key words: Chronic periodontitis; Type 2 diabetes; Oral flora; Periodontal clinical indicators; T helper cell 17; Regulatory T cells; Correlation

Chinese Library Classification(CLC): R587.2; R781.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)02-350-06

前言

慢性牙周炎是牙菌斑引起的口腔慢性感染性疾病,其发生和进展与全身性疾病有关,尤其是2型糖尿病(T2DM)^[1,2],研究显示T2DM患者血糖控制不佳是伴发慢性牙周炎的危险因素^[3]。现有报道显示与非T2DM患者比较,伴T2DM的慢性牙周炎患者龈下总细菌负荷量显著增加^[4],伴T2DM的慢性牙周炎患者外周血辅助性T细胞17(Th17)占比明显增高,Th17/调节性T细胞(Treg)比值增加,Th17/Treg失衡介导的免疫激活和炎症反应与T2DM患者发生慢性牙周炎风险增加有关^[5]。微小核糖核酸(miRNAs)通过调节靶信使RNA的转录后调节细胞增殖、分化、凋亡以及炎症反应、恶性肿瘤等多种病理生理过程,研究显示龈沟液中miRNAs表达异常可反映牙周组织的炎症状态,是慢性牙周炎的潜在生物学指标^[6]。miR-155是免疫系统的主要调节剂,可通过细胞因子信号传导抑制剂1(SOCS1)、SMAD、叉头框转录因子O3a(FOXO3a)等多种信号通路调控杀伤性淋巴细胞成熟和稳态增殖,促使成熟B细胞发育,诱导幼稚T细胞分化并调节T淋巴细胞亚群之间平衡,与口腔疾病密切相关^[7]。miR-223是免疫细胞分化和炎症的调节剂,通过与特定靶标结合来调节粒细胞、巨噬细胞和树突细胞的分化和增殖,激活炎症信号通路^[8],研究显示miR-223可调控人牙周膜成纤维细胞中RANKL表达^[9]。本研究拟通过检测慢性牙周炎伴T2DM患者龈沟液miR-155、miR-223表达水平,分析其与牙周临床指标、口腔龈下菌群以及外周血Th17/Treg失衡的相关性,以期临床诊治提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2018年1月至2022年1月安徽理工大学第一附属医院口腔科收治的86例慢性牙周炎患者,纳入标准:①符合第4版《牙周病学》中慢性牙周炎诊断标准^[10];②年龄18周岁以上,近半年内未接受牙周治疗;③至少存留20颗牙齿。排除标准:①种植牙、佩戴义齿;②近1周接受抗生素或免疫抑制剂治疗;③颌面创伤或既往颌面部手术史;④口腔癌或合并其它部位恶性肿瘤、自身免疫疾病。根据是否伴T2DM将患者分为慢性牙周炎伴T2DM组15例和单纯慢性牙周炎组71例,T2DM参考《中国2型糖尿病防治指南(2017年版)》诊断标准^[11]。慢性牙周炎伴T2DM组:男9例,女6例,年龄52~67岁,平均

(58.15±5.01)岁,患牙数量1~5颗,平均(2.02±0.65)颗,慢性牙周炎病程2~6年,平均(4.39±1.03)年,T2DM病程2~8年,平均(5.42±1.68)年。单纯慢性牙周炎组:男40例,女31例,年龄49~65岁,平均(57.89±5.12)岁,患牙数量1~4颗,平均(1.91±0.60)颗;慢性牙周炎病程1~5年,平均(4.02±1.05)年。另选择65例健康体检志愿者为对照组(无口腔疾病,血糖正常),男36例,女29例,年龄47~66岁,平均(58.05±6.39)岁。三组性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已获得安徽理工大学第一附属医院伦理委员会批准,所有受试者均知情同意并签署同意书。

1.2 龈沟液 miR-155、miR-223 检测

所有受试者均使用吸潮纸尖法采集龈沟液置入无菌EP管,收集龈沟液之前,去除牙龈上的菌斑,并用棉卷仔细隔离牙龈缝隙以防止唾液污染。通过Direct-Zol RNA MiniPrep(美国Zymo Research公司)分离龈沟液中总RNA,Nanodrop分光光度计选择260/280 nm处吸光度值在1.8~2.0的RNA,通过Mir-X miRNA First-Strand合成试剂盒(美国Clontech公司)将总RNA逆转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA)。采用7500实时聚合酶链式反应(PCR)系统(美国Applied Biosystems公司)进行实时定量PCR检测,反应体系:cDNA 1 μL,上下游引物0.4 μL,2×TransTaq® Tip Green qPCR SuperMix 10 μL,Passive Reference Dye(50×) 0.4 μL,最后添加双蒸水(ddH₂O)至20 μL。PCR反应条件:95℃初始变性2 min,然后是40个循环的95℃ 10 s、55℃ 30 s和72℃ 30 s。PCR引物序列:miR-155,正向引物为5'-CGCCGTTAATGCTAATTGTGA-3',反向引物为5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';miR-223,正向引物为5'-GCGTGTATTTGACAAGCTGAGTT-3',反向引物为5'-GTGTCAGTTTGTCAAATACCCCA-3';U6正向引物:5'-AGAGAAGATTAGCATGGCCCCCTG-3',反向引物:5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'。以U6为内参,使用2^{-ΔΔCt}计算miR-155、miR-223相对表达水平。

1.3 牙周临床指标

慢性牙周炎患者入组当日测定牙周临床指标,包括龈沟出血指数(SBI)、菌斑指数(PLI)、探诊深度(PD)、附着丧失(AL)。SBI评估采用探针探入龈沟内探诊,0分:无出血;1分:散性出血;2分:线性出血;3分:自发性出血^[12]。PLI评估采用碱性品红染色,0分:无菌斑;1分:少量菌斑;2分:中量菌斑;3分:大量菌斑^[13]。PD为探针沿牙齿长轴至内龈沟底的距离,AL是指釉

牙骨质界到上皮冠方的距离。

1.4 口腔龈下菌群检测

慢性牙周炎患者入组当日采集口腔龈下菌群,选择磨牙 PD $\geq$ 4 mm 且存在 AL 的位点采样,无菌刮治器刮取龈下菌斑置于无菌容器(装有 1 mL 无菌生理盐水),涡旋式混匀震荡 30 s 后取菌液分别接种于 CDC 厌氧血琼脂培养基和牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、变黑普氏菌、具核梭杆菌、伴放线杆菌、二氧化碳噬纤维菌、黏性放线菌、口腔链球菌培养基中,微需氧菌培养 2 d,厌氧菌培养 5 d。20-A 鉴定系统(美国 API 公司)计数龈下菌斑菌落。

1.5 外周血 Th17/Treg 及其细胞因子检测

慢性牙周炎患者入组当日采集外周静脉血 2 mL 注入肝素抗凝试管混匀,3 mL 注入干燥试管,抗凝试管血标本采用 Ficoll 密度梯度离心分离外周血单个核细胞,37℃ 培养箱培养 4 h,分别加入两个流式管。一管加入 PerCP 小鼠抗人 CD4、PE 小鼠抗人白细胞介素(IL)-17A 抗体,室温下孵育 30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,离心弃上清,重悬细胞,上机检测。另一管加入 PerCP 小鼠抗人 CD4、FITC 小鼠抗人 CD25,室温下孵育 30 min,加入 2 mL 裂解液,室温下避光孵育 10 min,避光下加入 PE 小鼠抗人 Foxp 3 抗体染色 20 min,经洗涤和重悬上机检测。FACSCalibur 流式细胞仪(配 Cell Quest 软件)检测

Th17、Treg 细胞百分比,计算 Th17/Treg 比值,抗体购自美国 BD 公司。干燥试管血标本待血液凝固后取上层液离心,分离血清,-80℃ 保存备检。取血清样本,采用 Varioskan LUX 全自动酶标仪(美国赛默飞公司)运用酶联免疫吸附试验检测血清 IL-17、转化生长因子- β (TGF- β)水平,IL-17 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,TGF- β 试剂盒购自武汉赛培生物科技有限公司。

1.6 统计学分析

SPSS 25.00 软件录入和分析数据,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(两两对比采用 LSD-t 检验)或独立样本 t 检验。以率(%)表示计数资料并采用 χ^2 检验。Pearson 相关分析龈沟液 miR-155、miR-223 表达与牙周临床指标、口腔龈下菌群以及外周血 Th17、Treg 及其细胞因子的相关性,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 三组龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平比较

慢性牙周炎伴 T2DM 组、单纯慢性牙周炎组龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平均高于对照组($P<0.05$),慢性牙周炎伴 T2DM 组龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平高于单纯慢性牙周炎组($P<0.05$),见表 1。

表 1 三组龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the expression levels of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid of the three groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	miR-155($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	miR-223($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Control group	65	0.53 $\pm$ 0.17	0.72 $\pm$ 0.20
Simple chronic periodontitis group	71	1.25 $\pm$ 0.28 [°]	1.54 $\pm$ 0.36 [°]
Chronic periodontitis with T2DM group	15	3.11 $\pm$ 0.64 ^{° °}	3.54 $\pm$ 0.71 ^{° °}
F		471.129	396.385
P		0.000	0.000

Note: Compared with the control group, [°] $P<0.05$. Compared with the simple chronic periodontitis group, [°] $P<0.05$.

2.2 两组牙周临床指标比较

慢性牙周炎伴 T2DM 组 PLI、SBI、AL、PD 均高于单纯慢

性牙周炎组($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组牙周临床指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of periodontal clinical indicators between the two groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	PLI(scores)	SBI(scores)	AL(mm)	PD(mm)
Simple chronic periodontitis group	71	1.95 $\pm$ 0.43	3.21 $\pm$ 0.62	3.24 $\pm$ 0.69	3.89 $\pm$ 0.71
Chronic periodontitis with T2DM group	15	2.42 $\pm$ 0.59	3.85 $\pm$ 0.79	3.97 $\pm$ 0.85	4.46 $\pm$ 0.92
t		-3.591	-3.457	-3.572	-2.678
P		0.001	0.001	0.001	0.006

2.3 两组口腔龈下菌群比较

慢性牙周炎伴 T2DM 组牙龈卟啉单胞菌、二氧化碳噬纤维菌、中间普氏菌、变黑普氏菌数量均高于单纯慢性牙周炎组($P<0.05$),两组具核梭杆菌、伴放线杆菌、黏性放线菌、口腔链球菌比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.4 两组外周血 Th17/Treg 以及血清 IL-17、TGF- β 水平比较

慢性牙周炎伴 T2DM 组外周血 Th17 细胞占比、Th17/Treg 比值、血清 IL-17 水平高于单纯慢性牙周炎组($P<0.05$),外周血 Treg 细胞占比低于单纯慢性牙周炎组($P<0.05$),两组血清 TGF- β 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 3 两组口腔龈下菌群比较($\bar{x} \pm s$, CFU/mL)Table 3 Comparison of oral subgingival microbiota between the two groups($\bar{x} \pm s$, CFU/mL)

Groups	n	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Actinobacillus concomitans</i>	<i>Carbon dioxide-eating fibroblasts</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
Simple chronic periodontitis group	71	1.50± 0.29	1.69± 0.29	1.47± 0.33	1.42± 0.26	1.80± 0.41	2.02± 0.35	2.31± 0.25	2.95± 0.41
Chronic periodontitis with T2DM group	15	1.75± 0.32	1.70± 0.30	1.69± 0.41	1.65± 0.38	1.81± 0.43	2.42± 0.51	2.32± 0.26	2.96± 0.42
t		-2.980	-0.121	-2.246	-2.854	-0.085	-3.691	-0.140	-0.085
P		0.004	0.904	0.027	0.005	0.932	0.000	0.889	0.932

表 4 两组外周血 Th17/Treg 以及血清 IL-17、TGF-β 水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of peripheral blood Th17/Treg and serum IL-17 and TGF-β levels between the two groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Proportion of Th17 cells(%)	Proportion of Treg cells(%)	Th17/Treg ratio	IL-17(pg/mL)	TGF-β(pg/mL)
Simple chronic periodontitis group	71	0.72± 0.21	4.12± 1.35	0.17± 0.03	25.41± 5.03	412.35± 42.09
Chronic periodontitis with T2DM group	15	1.35± 0.34	3.02± 0.62	0.45± 0.11	34.35± 6.09	410.15± 41.41
t		-9.367	3.077	-18.733	-6.025	0.184
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.854

2.5 龈沟液 miR-155、miR-223 表达与牙周临床指标、口腔龈下菌群以及外周血 Th17/Treg 及其细胞因子的相关性

龈沟液 miR-155、miR-223 表达水平与 PLI、SBI、AL、PD、牙龈卟啉单胞菌、二氧化碳噬纤维菌、中间普氏菌、变黑普氏菌

数量、外周血 Th17 细胞占比、Th17/Treg 比值、血清 IL-17 水平呈正相关($P < 0.05$), 与外周血 Treg 细胞占比呈负相关($P < 0.05$), 与具核梭杆菌、伴放线杆菌、黏性放线菌、口腔链球菌、血清 TGF-β 水平无关($P > 0.05$), 见表 5。

表 5 龈沟液 miR-155、miR-223 表达与牙周临床指标、口腔龈下菌群以及外周血 Th17/Treg 及其细胞因子的相关性(r, P)Table 5 Correlation between the expressions of miR-155 and miR-223 in gingival crevicular fluid and periodontal clinical indicators, oral subgingival microbiota, Th17/Treg and its cytokines in peripheral blood(r, P)

Indicators	miR-155		miR-223	
	r	P	r	P
PLI	0.506	0.000	0.511	0.000
SBI	0.475	0.000	0.492	0.000
AL	0.419	0.000	0.433	0.000
PD	0.532	0.000	0.508	0.000
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.468	0.000	0.452	0.000
<i>Carbon dioxide-eating fibroblasts</i>	0.575	0.000	0.563	0.000
<i>Prevotella intermedia</i>	0.521	0.000	0.517	0.000
<i>Prevotella nigrescens</i>	0.539	0.000	0.524	0.000
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.056	0.574	0.071	0.421
<i>Actinobacillus concomitans</i>	0.073	0.415	0.065	0.513
<i>Actinomyces viscosus</i>	0.107	0.253	0.115	0.295
<i>Streptococcus oralis</i>	0.096	0.352	0.083	0.395
Proportion of Th17 cells	0.496	0.000	0.413	0.000
Proportion of Treg cells	-0.417	0.000	-0.403	0.000
Th17/Treg ratio	0.603	0.000	0.583	0.000
IL-17	0.513	0.000	0.493	0.000
TGF-β	0.038	0.675	0.051	0.596

3 讨论

慢性牙周炎是影响牙齿支撑结构即牙周组织的常见疾病之一,与 T2DM 之间存在相互促进作用,T2DM 增加罹患慢性牙周炎的风险,并加重牙周炎的病变程度,同时慢性牙周炎作为 T2DM 的高危因素,重度牙周炎或未控制的牙周炎可导致血糖控制不佳,增加 T2DM 患者心血管疾病、糖尿病肾病等相关并发症风险^[14]。宿主免疫和病原微生物间失衡是慢性牙周炎发病的关键,牙菌斑是慢性牙周炎发病的始动因子,龈下菌群数量增加、毒力增强与牙槽骨破坏密切相关,宿主免疫反应失调可导致机体抵御病原微生物的能力下降,病原微生物大量入侵,加剧感染进程^[15],Th17/Treg 失衡是宿主免疫反应失调的机制之一,Th17 细胞因子 IL-17 大量合成,诱导大量炎症细胞因子生成,同时 Treg 分化减少,其细胞因子 TGF- β 释放降低,致使宿主免疫耐受和抗炎能力减弱,最终诱发和扩大局部炎症反应,导致局部组织缺氧,继而有利于厌氧菌繁殖,进一步影响龈下菌群稳态,导致菌群紊乱^[5]。miRNA 在人体几乎所有种类的体液中表达稳定,并且在疾病发生时会发生明显改变,是疾病诊断、病情分析以及预后判断的颇具前景的标志物^[16]。牙周炎龈沟液中 miRNA 的相关研究显示多种 miRNA 在表达上调或下调,参与牙周炎先天免疫和适应性免疫、炎症级联反应等调节,与牙周炎发生和进展密切相关^[17]。

miR-155 是一种多功能 miRNA,来源于 B 细胞整合簇基因的外显子,具有调节免疫、炎症、细胞增殖分化等多种功能,研究显示 miR-155 是 T 细胞免疫的重要调节因子,在激活的免疫细胞中表达上调并调控 CD4⁺T 淋巴细胞分化为 Th1、Th2、Th17,影响 Treg 发育,miR-155 还可调节 CD8⁺T 细胞,在 B 细胞分化和抗体产生中发挥必不可少的作用^[18,19]。miR-155 还参与炎症反应调节,炎症反应期间 miR-155 被核因子- κ B 迅速上调,随后通过靶向含有 SH2 结构域的肌醇 5 位磷酸酶 1 以磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 依赖性方式激活 I κ B 激酶信号体复合物,形成炎症信号放大所必需的正反馈回路,促进炎症反应^[20]。本研究显示慢性牙周炎患者龈沟液中 miR-155 表达水平显著高于健康体检者,且伴 T2DM 患者 miR-155 表达水平更高,miR-155 表达水平与 PLI、SBI、AL、PD 呈正相关,表明 miR-155 过表达可能促使伴 T2DM 的慢性牙周炎牙周组织破坏加重。体外研究显示 miR-155 在高糖培养基培养的细胞中表达上调,比正常葡萄糖培养基培养的细胞高 24.03 倍,miR-155 表达上调依次诱导肌腱蛋白-C、Toll 样受体 4 和核因子- κ B 的表达,刺激炎症信号通路激活,导致炎症级联反应,促使糖尿病病情进展^[21]。miR-155 参与慢性牙周炎的机制可能为:首先,miR-155 通过靶向 sirtuin-1 表达调节慢性牙周炎中 Th17/Treg 平衡,miR-155 过表达抑制 sirtuin-1 表达,促使 Th17/Treg 向 Th17 偏移,诱导牙周炎症环境和牙周组织破坏^[22]。其次,miR-155 通过激活 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体,促使牙龈卟啉单胞菌感染早期巨噬细胞焦亡^[23],参与慢性牙周炎发病过程。本研究相关性分析结果也显示 miR-155 表达与牙龈卟啉单胞菌、二氧化碳纤维菌、中间普氏菌、变黑普氏菌、外周血 Th17 细胞占比、Th17/Treg 比值、血清 IL-17 水平呈正相关,与外周血 Treg 细胞占比呈负相关,提示 miR-155 可能参与

通过诱导 Th17/Treg 失衡、免疫失调,导致龈下菌群紊乱和牙周组织破坏。

miR-223 是 miRNA 家族的重要成员,位于人类 X 染色体,在粒细胞、巨噬细胞、树突细胞、T 细胞、内皮细胞和上皮细胞等各种类型细胞中广泛表达,并在上述细胞炎症反应期间发生显著改变,调节中性粒细胞、祖细胞增殖和粒细胞分化,炎症巨噬细胞极化,树突细胞极化以及幼稚 CD4⁺T 细胞增殖分化及其介导的炎症反应^[24,25]。研究表明 miR-223 在慢性阻塞性肺疾病患者和暴露于香烟烟雾的小鼠肺组织中表达增加,且与支气管肺泡灌洗液中性粒细胞计数增加有关,miR-223 过表达可诱导中性粒细胞、单核细胞、树突状细胞和 T 淋巴细胞在肺组织浸润,加剧肺部炎症反应^[26]。在 T2DM 发病过程中,miR-223 通过靶向调控 NLRP3 炎性小体诱导炎症环境加重,促进胰岛 β 细胞焦亡,促进 T2DM 发生和进展^[27]。本研究显示 miR-223 在慢性牙周炎中表达上调,伴 T2DM 的患者中 miR-223 表达水平更高,miR-223 与 PLI、SBI、AL、PD 有关,表明 miR-223 可能参与伴 T2DM 的慢性牙周炎发病过程。miR-223 可能通过直接靶向 NLRP3 激活其下游炎症介质 IL-1 β 和 IL-6 表达,诱导牙龈组织炎症反应^[28]。进一步相关性分析发现 miR-223 与龈下菌群紊乱、Th17/Treg 失衡有关。miR-223 可能通过破坏免疫稳态,诱导炎症反应,促使龈下菌群失调导致牙菌斑形成以及牙周炎的发生。研究显示 miR-223 在 CD4⁺T 细胞中表达上调,并通过调节趋化因子信号促进 Th17 细胞表达并抑制 Treg 分化,导致 Th17/Treg 失衡^[29]。miR-223 还可调节髓样树突状细胞激活和促进病理性 Th17 细胞分化,导致免疫功能紊乱^[30]。微生物菌群在对宿主全身或局部感染的炎症反应中起重要作用,微生物菌群紊乱可降低微生物菌群的多样性和有益菌群丰度,破坏 Th17/Treg 平衡^[31],推测 miR-223 可能通过扰乱 Th17/Treg 平衡,导致龈下菌群紊乱。

综上,慢性牙周炎患者龈沟液中 miR-155、miR-223 表达均上调,且在伴 T2DM 的患者中 miR-155、miR-223 表达水平更高,miR-155、miR-223 表达水平与慢性牙周炎患者牙周组织破坏程度、龈下菌群紊乱、Th17/Treg 失衡有关。

参考文献(References)

- [1] Saxena S, Venugopal R, Chandrayan Rao R, et al. Association of chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus with salivary Del-1 and IL-17 levels[J]. J Oral Biol Craniofac Res, 2020, 10(4): 529-534
- [2] Ding W, Xiao Z, Wen C, et al. Correlation between salivary developmental endothelial locus-1, interleukin 17 expression level and severity of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(10): 11704-11710
- [3] 王海英,洪滔,高永博. 2 型糖尿病患者伴慢性牙周炎的危险因素分析[J]. 2020, 30(18): 2281-2283
- [4] Montecvecchi M, Valeriani L, Gatto MR, et al. Subgingival pathogens in chronic periodontitis patients affected by type 2 diabetes mellitus: a retrospective case-control study [J]. J Periodontal Implant Sci, 2021, 51(6): 409-421
- [5] Li J, Wang J, Song X, et al. Effect of type 2 diabetes mellitus and periodontitis on the Th1/Th2 and Th17/Treg paradigm[J]. Am J Dent, 2022, 35(1): 55-60
- [6] Fujimori K, Yoneda T, Tomofuji T, et al. Detection of Salivary

- miRNAs Reflecting Chronic Periodontitis: A Pilot Study [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1034
- [7] Tao Y, Ai R, Hao Y, et al. Role of miR-155 in immune regulation and its relevance in oral lichen planus [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1): 575-586
- [8] Jiao P, Wang XP, Luoreng ZM, et al. miR-223: An Effective Regulator of Immune Cell Differentiation and Inflammation [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2308-2322
- [9] 杨迷芳, 王珏, 马兰, 等. miR-223 调控人牙周膜成纤维细胞中 RANKL 表达的功能初探[J]. *口腔生物医学*, 2016, 7(4): 183-186
- [10] 孟焕新. 牙周病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 177
- [11] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版) [J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(4): 292-344
- [12] Benamghar L, Penaud J, Kaminsky P, et al. Comparison of gingival index and sulcus bleeding index as indicators of periodontal status[J]. *Bull World Health Organ*, 1982, 60(1): 147-151
- [13] Santoro R, Mancini G, Balducci D. Plaque cinetic index in cultures under agar[J]. *Experientia*, 1965, 21(5): 279-280
- [14] Kocher T, König J, Borgnakke WS, et al. Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge[J]. *Periodontol* 2000, 2018, 78(1): 59-97
- [15] Li L, Zhang YL, Liu XY, et al. Periodontitis Exacerbates and Promotes the Progression of Chronic Kidney Disease Through Oral Flora, Cytokines, and Oxidative Stress [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12(11): 656372
- [16] 侯云华, 周肖英, 林彬, 等. 慢性牙周炎患者唾液中 IL-17, miR-146a 表达水平与疾病程度的相关性分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(9): 1721-1725
- [17] Amaral SA, Pereira TSF, Brito JAR, et al. Comparison of miRNA expression profiles in individuals with chronic or aggressive periodontitis[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(2): 561-568
- [18] Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, et al. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease [J]. *Immunology*, 2014, 142(1): 32-38
- [19] Vigorito E, Kohlhaas S, Lu D, et al. miR-155: an ancient regulator of the immune system[J]. *Immunol Rev*, 2013, 253(1): 146-157
- [20] Mahesh G, Biswas R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2019, 39(6): 321-330
- [21] Zhou Y, Ma XY, Han JY, et al. Metformin regulates inflammation and fibrosis in diabetic kidney disease through TNC/TLR4/NF- κ B/miR-155-5p inflammatory loop [J]. *World J Diabetes*, 2021, 12(1): 19-46
- [22] Zheng Y, Dong C, Yang J, et al. Exosomal microRNA-155-5p from PDLSCs regulated Th17/Treg balance by targeting sirtuin-1 in chronic periodontitis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20662-20674
- [23] Li C, Yin W, Yu N, et al. miR-155 promotes macrophage pyroptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* through regulating the NLRP3 inflammasome[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(8): 2030-2039
- [24] He Y, Rodrigues RM, Wang X, et al. Neutrophil-to-hepatocyte communication via LDLR-dependent miR-223-enriched extracellular vesicle transfer ameliorates nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(3): e141513
- [25] Zhang D, Lee H, Wang X, et al. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation [J]. *Thorax*, 2019, 74(9): 865-874
- [26] Roffel MP, Maes T, Brandsma CA, et al. MiR-223 is increased in lungs of patients with COPD and modulates cigarette smoke-induced pulmonary inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(6): L1091-L1104
- [27] Niu B, Yao L, Zhang Y, et al. LncRNA KCNQ1OT1 promoted hepatitis C virus-induced pyroptosis of β -cell through mediating the miR-223-3p/NLRP3 axis[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(17): 1387
- [28] Xia Y, Zhou K, Sun M, et al. The miR-223-3p Regulates Pyroptosis Through NLRP3-Caspase 1-GSDMD Signal Axis in Periodontitis[J]. *Inflammation*, 2021, 44(6): 2531-2542
- [29] Hosseini A, Ghaedi K, Tanhaei S, et al. Upregulation of CD4⁺T-Cell Derived MiR-223 in The Relapsing Phase of Multiple Sclerosis Patients[J]. *Cell J*, 2016, 18(3): 371-380
- [30] Ifergan I, Chen S, Zhang B, et al. Cutting Edge: MicroRNA-223 Regulates Myeloid Dendritic Cell-Driven Th17 Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2016, 196(4): 1455-1459
- [31] Liu H, Bai C, Xian F, et al. A high-calorie diet aggravates LPS-induced pneumonia by disturbing the gut microbiota and Th17/Treg balance[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112(1): 127-141