

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.13.011

## 慢性牙周炎合并 2 型糖尿病患者龈沟液 miR-21、miR-34a 表达水平 与牙周指标和 Th1/Th2/Th17 失衡的关系研究 \*

连晓萌<sup>1</sup> 王鹏程<sup>1</sup> 黄 港<sup>1</sup> 李志华<sup>1</sup> 梁 超<sup>2Δ</sup>

(1 首都医科大学附属北京世纪坛医院口腔科 北京 100038; 2 首都医科大学附属北京口腔医院种植中心 北京 100050)

**摘要** 目的:探讨慢性牙周炎(CP)合并 2 型糖尿病(T2DM)患者龈沟液微小核糖核酸(miR)-21、miR-34a 表达水平与牙周指标和辅助性 T 细胞(Th)1/Th2/Th17 失衡的关系。方法:选取 2020 年 3 月~2022 年 3 月首都医科大学附属北京世纪坛医院口腔科收治的 114 例 CP 患者,根据是否合并 T2DM 分为 CP 合并 T2DM 组 36 例和单纯 CP 组 78 例,另选取 60 名健康体检者为对照组。对比三组牙周指标、龈沟液 miR-21、miR-34a 表达和外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17、血清 Th1、Th2、Th17 相关细胞因子水平,采用 Spearman 相关性分析 CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21、miR-34a 表达与牙周指标和外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细胞因子水平的相关性。采用 Pearson/Spearman 相关性分析 CP 合并 T2DM 患者牙周指标与外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细胞因子水平的相关性。结果:对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组菌斑指数(PLI)、牙龈出血指数(BI)、附着丧失(AL)、探诊深度(PD)依次增加,龈沟液 miR-21 和外周血 Th2 及血清白细胞介素(IL)-2、干扰素- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )依次降低,龈沟液 miR-34a 和外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 及血清 IL-4、IL-10、IL-17、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )依次升高( $P<0.05$ )。Spearman 相关性分析显示,CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21 表达与 PLI、BI、AL、PD 和外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 及血清 IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  呈负相关,与外周血 Th2 和血清 IL-2、INF- $\gamma$  呈正相关( $P<0.05$ );而 miR-34a 则与之相反。Pearson/Spearman 相关性分析显示,CP 合并 T2DM 患者 PLI、BI、AL、PD 与外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 和血清 IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  呈正相关,与外周血 Th2 和血清 IL-2、INF- $\gamma$  呈负相关( $P<0.05$ )。结论:CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21 低表达和 miR-34a 高表达,与牙周状况差有关,可能通过调节 Th1/Th2/Th17 失衡参与 CP 合并 T2DM 进展。

**关键词:**慢性牙周炎; 2 型糖尿病; miR-21; miR-34a; 牙周指标; Th1/Th2/Th17 失衡

**中图分类号:**R781.4; R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)13-2454-06

## Relationship Study between miR-21 and miR-34a Expression Levels in Gingival Sulcus Fluid and Periodontal Indicators and Th1/Th2/Th17 Imbalance in Patients with Chronic Periodontitis Complicated with Type 2 Diabetes Mellitus\*

LIAN Xiao-meng<sup>1</sup>, WANG Peng-cheng<sup>1</sup>, HUANG Gang<sup>1</sup>, LI Zhi-hua<sup>1</sup>, LIANG Chao<sup>2Δ</sup>

(1 Department of Stomatology, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100038, China;

2 Dental Implant Center, Beijing Stomatological Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100050, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the relationship between the microribonucleic acid (miR)-21 and miR-34a expression levels in gingival sulcus fluid and the periodontal indicators and helper T cells (Th)1/Th2/Th17 imbalance in patients with chronic periodontitis (CP) complicated with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods:** 114 patients with CP who were admitted to Department of Stomatology, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University from March 2020 to March 2022 were selected, according to whether they had T2DM, patients were divided into CP complicated with T2DM group with 36 cases and CP alone group with 78 cases. Another 60 healthy subjects were selected as control group. The periodontal indexes, miR-21 and miR-34a expression in gingival sulcus fluid and Th1, Th2, Th17, Th1/Th2/Th17, serum Th1, Th2, and Th17 related cytokines levels in the three groups were compared. Spearman correlation was used to analyze the correlation between the miR-21 and miR-34a expression in gingivicular sulcus fluid of patients with CP complicated with T2DM and the periodontal indicators, Th1, Th2, Th17, Th1/Th2/Th17 and their related cytokines levels in peripheral blood. Pearson/Spearman correlation was used to analyze the correlation between periodontal indicators and Th1, Th2, Th17, Th1/Th2/Th17 in peripheral blood and related cytokines levels in patients with CP complicated with T2DM. **Results:** Plaque index (PLI), gingival bleeding index (BI), attachment loss (AL), probing depth (PD) increased sequentially in the control group, CP alone group, CP

\* 基金项目:北京市医管局青年人才培养计划 "青苗" 计划项目(QML20231503)

作者简介:连晓萌(1988-),女,硕士,住院医师,研究方向:慢性牙周炎、口腔颌面部组织再生, E-mail: lxm18801026547@126.com

Δ 通讯作者:梁超(1992-),男,博士,主治医师,研究方向:2 型糖尿病患者骨髓干细胞功能及种植体-骨结合, E-mail: lcjims@163.com

(收稿日期:2023-02-20 接受日期:2023-03-16)

complicated with T2DM group, and both miR-21 in gingival sulcus fluid and Th2 in peripheral blood and serum Interleukin (IL) - 2 and Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) decreased sequentially, miR-34a in gingival sulcus fluid and Th1, Th17, Th1/Th2/Th17 in peripheral blood and serum IL-4, IL-10, IL-17, Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) elevated sequentially ( $P < 0.05$ ). Spearman correlation analysis showed that miR-21 expression in gingival sulcus fluid of patients with CP complicated with T2DM was negatively correlated with PLI, BI, AI, PD and peripheral blood Th1, Th17, Th1/Th2/Th17 as well as serum IL-4, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , and was positively correlated with peripheral Th2 and serum IL-2, INF- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ); while miR-34a did the opposite. Pearson / Spearman correlation analysis showed that PLI, BI, AI, PD were positively correlated with peripheral blood Th1, Th17, Th1/Th2/Th17 and serum IL-4, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  in patients with CP complicated with T2DM, and were negatively correlated with Th2 in peripheral blood and serum IL-2 and INF- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The low expression of miR-21 and high expression of miR-34a in gingival sulcus fluid of patients with CP complicated with T2DM are related to poor periodontal status, which may be involved in the progression of patients with CP complicated with T2DM by regulating Th1/Th2/Th17 imbalance.

**Key words:** Chronic periodontitis; Type 2 diabetes mellitus; miR-21; miR-34a; Periodontal indicators; Th1/Th2/Th17 imbalance

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

**Article ID:** 1673-6273(2023)13-2454-06

## 前言

慢性牙周炎(CP)是菌斑微生物引起的感染性疾病,可引起牙槽骨、牙骨质、牙周膜等牙周支持组织不可逆破坏,是导致成年人牙齿丧失的重要原因<sup>[1]</sup>。2型糖尿病(T2DM)是胰岛素抵抗或分泌不足引起的代谢性疾病,可引起危及心、脑、肾、四肢等重要器官的泛血管疾病,是导致成人心血管疾病死亡的重要原因之一<sup>[2]</sup>。目前,CP和T2DM尚无根治方法,且二者呈相互影响的双向关系,其病理生理机制是研究热点<sup>[3]</sup>。CD4<sup>+</sup>T细胞介导的免疫炎症参与CP和T2DM发生发展,其中辅助性T细胞(Th)1/Th2/Th17失衡处于关键环节<sup>[4]</sup>。研究表明,微小核糖核酸(miRNA)参与免疫炎症调控,与CP和T2DM发生发展密切相关<sup>[5]</sup>。miR-21<sup>[6]</sup>和miR-34a<sup>[7]</sup>是两个参与T细胞功能调控的miRNA。同时研究报道,miR-21<sup>[8,9]</sup>、miR-34a<sup>[10]</sup>参与CP和T2DM病理过程。然而关于miR-21、miR-34a与CP合并T2DM患者T辅助细胞Th1/Th2/Th17失衡的关系尚不清楚,本研究就通过检测CP患者龈沟液中miR-21、miR-34a表达水平,分析两者与牙周指标和Th1/Th2/Th17失衡的关系,以期CP合并T2DM防治提供参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2020年3月~2022年3月首都医科大学附属北京世纪坛医院口腔科收治的114例CP患者,根据是否合并T2DM分为CP合并T2DM组(36例)和单纯CP组(78例)。其中CP合并T2DM组女13例、男23例;年龄( $53.42 \pm 6.44$ )岁;体质指数( $22.10 \pm 1.74$ )kg/m<sup>2</sup>;CP病程( $3.44 \pm 0.91$ )年。单纯CP组中女28例、男50例;年龄( $51.14 \pm 6.36$ )岁;体质指数( $22.49 \pm 1.85$ )kg/m<sup>2</sup>;CP病程( $3.32 \pm 0.86$ )年。纳入标准:(1)CP符合《牙周和种植体周围疾病和状况的新分类方案》<sup>[11]</sup>诊断标准;(2)T2DM符合《2型糖尿病基层诊疗指南(实践版·2019)》<sup>[12]</sup>诊断标准。排除标准:(1)侵袭性CP或其他非牙周原因所致附着丧失;(2)年龄 $< 18$ 岁;(3)合并造血、免疫、神经系统损害、恶性肿瘤;(4)近6个月内接受免疫调节剂、抗菌药物、牙周治疗;(5)妊娠及哺乳期妇女;(6)合并其他感染性疾病;(7)有严重的糖尿病泛血管疾病。另选取60名健康体检者为对照组,

女22例、男38例;年龄( $50.98 \pm 5.87$ )岁;体质指数( $22.23 \pm 2.20$ )kg/m<sup>2</sup>。三组性别、年龄、体质指数比较无差异( $P > 0.05$ ),CP合并T2DM组和单纯CP组CP病程比较无差异( $P > 0.05$ )。本研究患者或其家属均知情研究,经首都医科大学附属北京世纪坛医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 牙周指标检查** 所有研究对象入院后行口腔X线(德国Kavo口腔X射线机,型号:FOCUS)检查,记录菌斑指数(PLI)、牙龈出血指数(BI)、附着丧失(AL)和探诊深度(PD)。

**1.2.2 实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测龈沟液miR-21、miR-34a表达** 使用35号吸潮纸尖轻插入研究对象牙龈下,静止30s后收集龈沟液,离心法提取龈沟液后3000 r/min离心10 min(半径8 cm),取上清液保存于-80℃冰箱中。使用Trizol试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,编号:ALH011)提取龈沟液总RNA,Takara反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,编号:AG11705)合成cDNA。按照SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒(上海赫果生物科技有限公司,编号:DRR820A)说明,采用PCR仪(美国ABI,型号:ABI7500)进行PCR扩增,反应条件:95℃ 90 s,95℃ 30 s,63℃ 30 s,72℃ 15 s,循环40次后收集Ct值,以U6为内参校正,2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算龈沟液miR-21、miR-34a相对表达量。miR-21引物:上游5'-GGGGGTAGGATTGACAGGAT-3',下游5'-CTCCAGGAG-GGTATTACCA-3';miR-34a引物:上游5'-UUAAGACU-UGCAGUGAUGUUU-3',下游5'-AAACAUCACUGCAAGU-CUUA-3';U6引物:上游5'-UAGC GACUAAACACAUCAA-3',下游5'-UGUCCGAGUUGCUUCCCGA-3'。

**1.2.3 外周血Th1、Th2、Th17检测** 采集研究对象空腹外周静脉血3 mL,经体积稀释、加入抗体、孵育后使用全自动流式细胞仪(美国BD,型号:FACSCelesta)检测外周血Th1、Th2、Th17百分比,并计算Th1/Th2/Th17比值。

**1.2.4 血清Th1、Th2、Th17相关细胞因子检测** 采集研究对象空腹静脉血3 mL,3000 r/min离心10 min(半径8 cm),取上清液采用酶联免疫吸附法(江西江蓝纯生物试剂有限公司,货号:JLC-R13164、JLC-R12910、JLC-R13628、JLC-R12839、JLC-R13245、JLC-R13506)检测白细胞介素(IL)-2、干扰素- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )、IL-4、IL-10、IL-17、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS26.0 统计学软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  或  $M(P_{25}, P_{75})$  表示, 多组间采用 F 或 H 检验, 组间两两比较采用 LSD-t 或 Z 检验; CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21、miR-34a 表达与牙周指标和外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细胞因子水平的相关性采用 Spearman 相关性分析; CP 合并 T2DM 患者牙周指标与外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细

胞因子水平的相关性采用 Pearson/Spearman 相关性分析;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三组牙周指标比较

对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组 PLI、BI、AL、PD 依次增加 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 三组牙周指标比较

Table 1 Comparison of periodontal indicators in the three groups

| Indicators                  | CP complicated with T2DM group (n=36) | CP alone group (n=78)          | Control group (n=60) | F/H      | P      |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------|--------|
| PLI [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] | 1.25 (1.15, 1.48) <sup>ab</sup>       | 1.15 (1.04, 1.29) <sup>a</sup> | 0.75 (0.65, 0.86)    | 110.269  | <0.001 |
| BI ( $\bar{x} \pm s$ )      | 1.62 ± 0.23 <sup>ab</sup>             | 1.09 ± 0.20 <sup>a</sup>       | 0.51 ± 0.14          | 390.153  | <0.001 |
| AL (mm, $\bar{x} \pm s$ )   | 4.65 ± 0.65 <sup>ab</sup>             | 4.08 ± 0.46 <sup>a</sup>       | 0.47 ± 0.10          | 1583.107 | <0.001 |
| PD (mm, $\bar{x} \pm s$ )   | 5.37 ± 0.77 <sup>ab</sup>             | 4.85 ± 0.67 <sup>a</sup>       | 1.90 ± 0.31          | 543.653  | <0.001 |

Note: Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with CP alone group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

### 2.2 三组龈沟液 miR-21、miR-34a 表达和外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 比较

外周血 Th2 依次降低, 龈沟液 miR-34a 和外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 依次升高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组龈沟液 miR-21 和

表 2 三组龈沟液 miR-21、miR-34a 表达和外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 比较

Table 2 Comparison of miR-21 and miR-34a expression in gingival sulcus fluid and Th1, Th2, Th17, Th1/Th2/Th17 in peripheral blood in the three groups

| Indicators                           | CP complicated with T2DM group (n=36) | CP alone group (n=78)          | Control group (n=60) | F/H     | P      |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------|---------|--------|
| miR-21 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ]       | 1.25 (1.06, 1.51) <sup>ab</sup>       | 1.51 (1.29, 1.77) <sup>a</sup> | 1.91 (1.37, 2.27)    | 26.158  | <0.001 |
| miR-34a [ $M(P_{25}, P_{75})$ ]      | 1.75 (1.39, 1.90) <sup>ab</sup>       | 1.31 (1.11, 1.45) <sup>a</sup> | 1.09 (0.97, 1.22)    | 59.374  | <0.001 |
| Th1 (% $\bar{x} \pm s$ )             | 2.62 ± 0.53 <sup>ab</sup>             | 1.73 ± 0.44 <sup>a</sup>       | 0.71 ± 0.18          | 276.775 | <0.001 |
| Th2 [% $M(P_{25}, P_{75})$ ]         | 1.06 (0.89, 1.45) <sup>ab</sup>       | 1.34 (1.18, 1.56) <sup>a</sup> | 1.83 (1.55, 2.11)    | 69.710  | <0.001 |
| Th17 (% $\bar{x} \pm s$ )            | 1.14 ± 0.20 <sup>ab</sup>             | 0.81 ± 0.12 <sup>a</sup>       | 0.48 ± 0.11          | 263.965 | <0.001 |
| Th1/Th2/Th17 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] | 2.02 (1.58, 2.67) <sup>ab</sup>       | 1.62 (1.16, 2.12) <sup>a</sup> | 0.81 (0.62, 1.07)    | 81.188  | <0.001 |

Note: Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with CP alone group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

### 2.3 三组血清 Th1、Th2、Th17 相关细胞因子水平比较

次降低, IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  依次升高 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组血清 IL-2、INF- $\gamma$  依

表 3 三组血清 Th1、Th2、Th17 相关细胞因子水平比较

Table 3 Comparison of serum Th1, Th2 and Th17 related cytokines in the three groups

| Indicators                              | CP complicated with T2DM group (n=36) | CP alone group (n=78)             | Control group (n=60) | F/H     | P      |
|-----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------|--------|
| IL-2 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$ )          | 14.93 ± 4.61 <sup>ab</sup>            | 27.78 ± 5.21 <sup>a</sup>         | 35.92 ± 5.26         | 189.729 | <0.001 |
| INF- $\gamma$ (ng/mL, $\bar{x} \pm s$ ) | 29.24 ± 8.58 <sup>ab</sup>            | 51.47 ± 16.84 <sup>a</sup>        | 90.13 ± 29.87        | 104.479 | <0.001 |
| IL-4 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$ )          | 25.86 ± 3.70 <sup>ab</sup>            | 20.02 ± 5.23 <sup>a</sup>         | 14.39 ± 2.18         | 207.170 | <0.001 |
| IL-10 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$ )         | 32.87 ± 1.52 <sup>ab</sup>            | 25.67 ± 2.69 <sup>a</sup>         | 19.93 ± 2.92         | 285.327 | <0.001 |
| IL-17 [ng/mL, $M(P_{25}, P_{75})$ ]     | 32.95 (31.94, 33.75) <sup>ab</sup>    | 25.48 (23.59, 27.46) <sup>a</sup> | 20.13 (17.54, 22.24) | 130.457 | <0.001 |
| TNF- $\alpha$ (ng/mL, $\bar{x} \pm s$ ) | 93.23 ± 21.20 <sup>ab</sup>           | 56.43 ± 15.06 <sup>a</sup>        | 29.23 ± 8.43         | 211.789 | <0.001 |

Note: Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with CP alone group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

#### 2.4 CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21、miR-34a 表达与牙周指标和外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细胞因子水平的相关性

Spearman 相关性分析显示,CP 合并 T2DM 患者龈沟液

miR-21 表达与 PLI、BI、AL、PD 和外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 及血清 IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  呈负相关,与外周血 Th2 和血清 IL-2、INF- $\gamma$  呈正相关( $P<0.05$ );而 miR-34a 则与之相反。见表 4。

表 4 CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21、miR-34a 表达与牙周指标和外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细胞因子水平的相关性  
Table 4 Correlation between the miR-21 and miR-34a expression in gingival sulcus fluid of patients with CP complicated with T2DM and the periodontal indicators, Th1, Th2, Th17, Th1/Th2/Th17 and their related cytokines levels in peripheral blood

| Indicators    | miR-21 |          | miR-34a |          |
|---------------|--------|----------|---------|----------|
|               | $r_s$  | $P$      | $r_s$   | $P$      |
| PLI           | -0.656 | $<0.001$ | 0.651   | $<0.001$ |
| BI            | -0.602 | $<0.001$ | 0.627   | $<0.001$ |
| AL            | -0.668 | $<0.001$ | 0.691   | $<0.001$ |
| PD            | -0.697 | $<0.001$ | 0.669   | $<0.001$ |
| Th1           | -0.776 | $<0.001$ | 0.704   | $<0.001$ |
| Th2           | 0.801  | $<0.001$ | -0.797  | $<0.001$ |
| Th17          | -0.735 | $<0.001$ | 0.733   | $<0.001$ |
| Th1/Th2/Th17  | -0.812 | $<0.001$ | 0.839   | $<0.001$ |
| IL-2          | 0.715  | $<0.001$ | -0.766  | $<0.001$ |
| INF- $\gamma$ | 0.801  | $<0.001$ | -0.718  | $<0.001$ |
| IL-4          | -0.668 | $<0.001$ | 0.684   | $<0.001$ |
| IL-10         | -0.715 | $<0.001$ | 0.629   | $<0.001$ |
| IL-17         | -0.666 | $<0.001$ | 0.678   | $<0.001$ |
| TNF- $\alpha$ | -0.676 | $<0.001$ | 0.638   | $<0.001$ |

#### 2.5 CP 合并 T2DM 患者牙周指标与外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细胞因子水平的相关性

Pearson/Spearman 相关性分析显示,CP 合并 T2DM 患者

PLI、BI、AL、PD 与外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 和血清 IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  呈正相关,与外周血 Th2 和血清 IL-2、INF- $\gamma$  呈负相关( $P<0.05$ )。见表 5。

表 5 CP 合并 T2DM 患者牙周指标与外周血 Th1、Th2、Th17、Th1/Th2/Th17 及其相关细胞因子水平的相关性  
Table 5 Correlation between periodontal indicators in patients with CP complicated with T2DM and Th1, Th2, Th17, Th1/Th2/Th17 and their related cytokines in peripheral blood

| Indicators    | PLI    |          | BI      |          | AL      |          | PD      |          |
|---------------|--------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
|               | $r_s$  | $P$      | $r_s$   | $P$      | $r_s$   | $P$      | $r_s$   | $P$      |
| Th1           | 0.669  | $<0.001$ | 0.708   | $<0.001$ | 0.644   | $<0.001$ | 0.706   | $<0.001$ |
| Th2           | -0.571 | $<0.001$ | -0.690* | $<0.001$ | -0.620* | $<0.001$ | -0.678* | $<0.001$ |
| Th17          | 0.666  | $<0.001$ | 0.711   | $<0.001$ | 0.682   | $<0.001$ | 0.705   | $<0.001$ |
| Th1/Th2/Th17  | 0.733  | $<0.001$ | 0.737*  | $<0.001$ | 0.650*  | $<0.001$ | 0.695*  | $<0.001$ |
| IL-2          | -0.601 | $<0.001$ | -0.738  | $<0.001$ | -0.655  | $<0.001$ | -0.681  | $<0.001$ |
| INF- $\gamma$ | -0.656 | $<0.001$ | -0.690  | $<0.001$ | -0.624  | $<0.001$ | -0.696  | $<0.001$ |
| IL-4          | 0.649  | $<0.001$ | 0.777   | $<0.001$ | 0.645   | $<0.001$ | 0.732   | $<0.001$ |
| IL-10         | 0.690  | $<0.001$ | 0.787   | $<0.001$ | 0.694   | $<0.001$ | 0.675   | $<0.001$ |
| IL-17         | 0.685  | $<0.001$ | 0.780*  | $<0.001$ | 0.641*  | $<0.001$ | 0.713*  | $<0.001$ |
| TNF- $\alpha$ | 0.633  | $<0.001$ | 0.772   | $<0.001$ | 0.691   | $<0.001$ | 0.657   | $<0.001$ |

Note: \* was Spearman correlation analysis.

### 3 讨论

菌斑是 CP 的始动因素,菌斑可引起和加重宿主免疫反应,随着牙龈炎症向牙周深部组织发展导致牙周支持组织破坏<sup>[13]</sup>。T2DM 患者由于唾液内葡萄糖浓度升高和唾液量、流率降低,使口腔自洁能力下降,易促使各种病原微生物滋生和繁殖,导致 CP 发生;同时 CP 作为一种慢性炎症,也能通过减少胰岛  $\beta$  细胞数量和引起胰岛  $\beta$  细胞凋亡导致 T2DM 发生<sup>[13]</sup>。虽然牙周治疗联合血糖控制能清除菌斑和降低血糖水平,但合并 T2DM 将改变口腔微生物组成、损害 CP 骨修复过程、增强炎症反应等,影响 CP 治疗效果,同时 CP 介导的炎症又会增加血糖控制难度,形成恶性循环,严重影响患者生活质量<sup>[14]</sup>。

近年研究表明,CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的免疫应答在牙周炎合并糖尿病中起关键作用,Th 是 CD4<sup>+</sup>T 细胞中调控免疫的重要细胞,当 Th1/Th2/Th17 失衡时则会增加 CP 合并 T2DM 风险<sup>[15]</sup>。寻找 CP 合并 T2DM 患者 Th1/Th2/Th17 失衡相关分子机制,对纠正 Th1/Th2/Th17 失衡和促进患者牙周功能改善、血糖达标以及预后改善具有重要意义。Th1、Th2、Th17 均为初始 T 细胞分化的效应性辅助细胞,其中 Th1 和 Th17 主要负责对抗细胞免疫反应,能分别通过分泌 IL-2、INF- $\gamma$  与 IL-17、TNF- $\alpha$  等因子参与炎症反应,Th2 主要负责对抗体液免疫反应,能通过分泌 IL-4、IL-10 等因子抑制炎症反应,生理正常状态下三者处于平衡状态,当 Th1/Th2/Th17 失衡则会导致 T 细胞过度活化和促进 CP 合并 T2DM 进展<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 依次升高,Th2 依次降低,说明 CP 患者 Th1/Th2/Th17 明显失衡,且合并 T2DM 后失衡加重。同时结果显示,对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组血清 IL-2、INF- $\gamma$  依次降低,IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  依次升高,符合 Th1/Th2/Th17 失衡变化。

近年来随着生命科学的快速发展,有研究证实 miRNA 作为表观遗传学调控分子能通过调控免疫功能参与 CP 合并 T2DM 进展<sup>[17]</sup>。miR-21 最初被作为恶性肿瘤相关 miRNA 进行研究,近年研究发现 miR-21 还参与调控免疫细胞增殖、分化和存活<sup>[18]</sup>。Smigielska-Czepiel 等<sup>[19]</sup>研究报道,激活 miR-21 能促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞存活,抑制 miR-21 将导致 CD4<sup>+</sup>T 细胞凋亡。同时研究发现,miR-21 缺乏可导致 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th1、Th17 表型转化,上调 miR-21 能促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th2 表型转化<sup>[20]</sup>。提示 miR-21 还参与调控 Th 细胞的分化。本研究结果显示,对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组龈沟液 miR-21 依次降低,提示龈沟液 miR-21 低表达参与 CP 合并 T2DM 发生。结果还显示,CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21 表达与外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 和血清 IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  呈负相关,与外周血 Th2 和血清 IL-2、INF- $\gamma$  呈正相关,这说明龈沟液 miR-21 低表达可能通过调节 Th1/Th2/Th17 失衡介导的炎症反应参与 CP 合并 T2DM 发生。分析其机制可能是 miR-21 低表达可导致 CD4<sup>+</sup>T 细胞功能缺陷,促进初始 T 细胞向 Th1、Th17 转化并抑制 Th2 转化,导致 Th1/Th2/Th17 失衡<sup>[21]</sup>。

miR-34a 是一种广泛保守的 miRNA,因其受到癌基因 p53 的直接调控,故既往研究主要报道 miR-34a 与恶性肿瘤的关系<sup>[22]</sup>。近年研究发现,miR-34a 在 T 细胞、B 细胞、肥大细胞、巨

噬细胞、树突状细胞等免疫细胞中广泛表达,并调节其发育、功能和存活<sup>[23]</sup>。Ping 等<sup>[24]</sup>研究报道,miR-34a 表达降低可导致 T 细胞功能受损,抑制其向 Th1 分化。Dang 等<sup>[25]</sup>研究报道,抑制 miR-34a 表达能下调 Th1、Th17 百分比和上调 Th2 百分比,改善胶原诱导的小鼠关节炎。本研究结果显示,对照组、单纯 CP 组、CP 合并 T2DM 组龈沟液 miR-34a 依次升高,提示龈沟液 miR-34a 高表达参与 CP 合并 T2DM 发生。结果还显示,CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-34a 表达与外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 和血清 IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  呈正相关,与外周血 Th2 和血清 IL-2、INF- $\gamma$  呈负相关,这说明龈沟液 miR-34a 高表达可能通过调节 Th1/Th2/Th17 失衡介导的炎症反应参与 CP 合并 T2DM 发生。分析其机制可能是 miR-34a 高表达可导致 CD4<sup>+</sup>T 细胞功能缺陷,促进初始 T 细胞向 Th1、Th17 转化并抑制 Th2 转化,导致 Th1/Th2/Th17 失衡<sup>[26]</sup>。

结果还显示,CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21 表达与 PLI、BI、AL、PD 呈负相关,miR-34a 表达与 PLI、BI、AL、PD 呈正相关,而 PLI、BI、AL、PD 与外周血 Th1、Th17、Th1/Th2/Th17 和血清 IL-4、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$  呈正相关,与外周血 Th2 和血清 IL-2、INF- $\gamma$  呈负相关,这进一步说明 miR-21 低表达和 miR-34a 高表达还可能通过调节 Th1/Th2/Th17 失衡参与 CP 合并 T2DM 进展。

综上所述,CP 合并 T2DM 患者龈沟液 miR-21 表达降低,miR-34a 表达升高,与牙周指标密切相关,并可能通过调节 Th1/Th2/Th17 失衡参与 CP 合并 T2DM 进展。但本研究结果还需大样本研究证实,并深入研究 miR-21、miR-34a 参与 CP 合并 T2DM 的机制。

### 参考文献(References)

- [1] 孙取念,葛颂. 幽门螺杆菌与慢性牙周炎相关临床流行病学研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(3): 190-192
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409
- [3] 胡琮佼. 2 型糖尿病与慢性牙周炎关联机制的研究进展 [J]. 重庆医学, 2021, 50(21): 3755-3759
- [4] 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
- [5] 刘昭娜,高惠红,武鸿毅,等. 2 型糖尿病伴慢性牙周炎患者血清及龈沟液 LncRNA MIR155HG、miR-155 水平及临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(21): 2674-2677
- [6] 刘芮伶,刘超予,阮庆国. miR-21 调控调节性 T 细胞发育和功能的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2018, 41(6): 665-669
- [7] Hart M, Walch-Rückheim B, Krammes L, et al. miR-34a as hub of T cell regulation networks[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 187
- [8] 许诺,曹蓁,李晓杰,等. MiR-21 可调控牙周炎破骨细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(8): 1225-1230
- [9] Yazdanpanah Z, Kazemipour N, Kalantar SM, et al. Plasma miR-21 as a potential predictor in prediabetic individuals with a positive family history of type 2 diabetes mellitus [J]. Physiol Rep, 2022, 10 (2): e15163
- [10] 刘京津,马欣,陶鹏辉. 慢性牙周炎合并 2 型糖尿病患者唾液 miR-34a 表达与炎症因子水平的关系 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2022, 36(3): 263-267

- [11] Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification [J]. J Periodontol, 2018, 89(Suppl 1): S1-S8
- [12] 中华医学会, 中华医学杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 2型糖尿病基层诊疗指南 (实践版·2019)[J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(9): 810-818
- [13] Qin H, Li G, Xu X, et al. The role of oral microbiome in periodontitis under diabetes mellitus[J]. J Oral Microbiol, 2022, 14(1): 2078031
- [14] 朱顺云, 谢如钢, 张文, 等. 老年牙周病与糖尿病的相关性分析[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(7): 1323-1324, 1328
- [15] 邓秋艳, 车英林. 2型糖尿病伴慢性牙周炎患者 Th 细胞及其细胞因子水平的变化[J]. 广东医学, 2018, 39(24): 3673-3676
- [16] Samuel RO, Ervolino E, de Azevedo Queiroz FO, et al. Th1/Th2/Th17/Treg balance in apical periodontitis of normoglycemic and diabetic rats[J]. J Endod, 2019, 45(8): 1009-1015
- [17] Tang B, Yan C, Shen X, et al. The bidirectional biological interplay between microbiome and viruses in periodontitis and type-2 diabetes mellitus[J]. Front Immunol, 2022, 13(9): 885029
- [18] Jin S, Chen H, Li Y, et al. Maresin 1 improves the Treg/Th17 imbalance in rheumatoid arthritis through miR-21 [J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(11): 1644-1652
- [19] Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, et al. Dual role of miR-21 in CD4<sup>+</sup>T-cells: activation-induced miR-21 supports survival of memory T-cells and regulates CCR7 expression in naive T-cells[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76217
- [20] Sun J, Liu R, He X, et al. MicroRNA-21 regulates diametrically opposed biological functions of regulatory T cells[J]. Front Immunol, 2021, 12(11): 766757
- [21] Sun J, Wu M, Wang L, et al. miRNA-21, which disrupts metabolic reprogramming to facilitate CD4<sup>+</sup>T cell polarization toward the Th2 phenotype, accelerates arsenite-induced hepatic fibrosis [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 46(248): 114321
- [22] 曹颖, 陈化禹. miR-34a 在肿瘤中的作用机制研究进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2022, 27(11): 1047-1051
- [23] Taheri F, Ebrahimi SO, Shareef S, et al. Regulatory and immunomodulatory role of miR-34a in T cell immunity [J]. Life Sci, 2020, 48(262): 118209
- [24] Ping W, Senyan H, Li G, et al. Increased lactate in gastric cancer tumor-infiltrating lymphocytes is related to impaired T cell function due to miR-34a deregulated lactate dehydrogenase A [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(2): 828-836
- [25] Dang Q, Yang F, Lei H, et al. Inhibition of microRNA-34a ameliorates murine collagen-induced arthritis [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2): 1633-1639
- [26] Xie M, Wang J, Gong W, et al. NF- $\kappa$ B-driven miR-34a impairs Treg/Th17 balance via targeting Foxp3 [J]. J Autoimmun, 2019, 32(102): 96-113

(上接第 2502 页)

- [20] Shanmugasundaram U, Bucsan AN, Ganatra SR, et al. Pulmonary Mycobacterium tuberculosis control associates with CXCR3- and CCR6-expressing antigen-specific Th1 and Th17 cell recruitment[J]. JCI Insight, 2020, 5(14): e137858
- [21] 叶静, 吴琦, 杜钟珍, 等. 耐多药结核患者外周血 Th1、Th2、Th17 细胞及其细胞因子水平变化[J]. 山东医药, 2019, 59(26): 76-78
- [22] 谢明, 邓葵珍, 谭晴心, 等. 外周血血清 sTREM-1、Treg/Th17、miR-99b 与耐多药结核病相关性及其联合预测疗效的 ROC 分析[J]. 现代医学, 2021, 49(10): 1176-1182
- [23] 束沛, 郑忻, 席瑞, 等. 百部治疗结核病的网络药理学分子机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(3): 107-113
- [24] 张瑞华, 张静文, 刘玲, 等. 黄芪及其有效组分药理作用与临床应用现状[J]. 陕西中医, 2021, 42(8): 1138-1141, 1146
- [25] 管斯琪, 陈培丰, 祝雨田, 等. 熟地黄多糖对阿霉素致小鼠骨髓抑制及免疫功能损伤的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(3): 312-315
- [26] 王晓琴, 苏柯萌. 北沙参化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(3): 466-474
- [27] 赵思远, 吴楠, 孙佳明, 等. 近 10 年牡蛎化学成分及药理研究[J]. 吉林中医药, 2014, 34(8): 821-824
- [28] Gao W, Yang N, Mei X, et al. Influence of anti-tuberculosis drugs plus cycloserine on sputum negative conversion rate, adverse reactions and inflammatory factors in multi-drug resistant tuberculosis[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(8): 9332-9339
- [29] Intini E, Kishore G, Richeldi L, et al. Neuropsychiatric reactions induced by cycloserine in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: what an Indian female patient tells us[J]. BMJ Case Rep, 2019, 12(12): e230993
- [30] 史敏双, 翁春霞, 项辉, 等. 莫西沙星联合结核丸治疗耐多药肺结核的临床观察[J]. 中国药房, 2015, 26(36): 5092-5094