

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.16.005
文章编号: 1005-8982 (2020) 16-0028-05

慢性牙周炎患者外周血单核细胞 Notch1 mRNA 的表达及与疾病严重程度的相关性

付海标¹, 闫俊杰²

(1. 浙江中医药大学研究生院, 浙江 杭州 310053; 2. 丽水市人民医院 口腔科, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 探讨慢性牙周炎患者外周血单核细胞 Notch1 mRNA 的表达及与疾病严重程度的相关性。**方法** 选取 2017 年 1 月—2018 年 12 月丽水市人民医院口腔科收治的慢性牙周炎患者 150 例作为观察组, 另取同期该院 150 例健康体检者作为对照组。观察组根据病情严重程度分为轻度组 54 例, 中度组 51 例, 重度组 45 例。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测外周血 Notch1 mRNA 表达, 流式细胞仪测定外周血辅助性 T 细胞 17 (Th17) 水平, 双抗体夹心法酶联免疫吸附试验测定外周血白细胞介素-17 (IL-17) 水平。**结果** 观察组外周血 Notch1 mRNA 表达, Th17 细胞、IL-17 水平均高于对照组 ($P < 0.05$)。不同严重程度慢性牙周炎患者外周血 Notch1 mRNA 表达, Th17 细胞、IL-17 水平比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 中度组和重度组高于轻度组 ($P < 0.05$), 重度组高于中度组 ($P < 0.05$)。慢性牙周炎患者治疗后外周血 Notch1 mRNA 表达, Th17 细胞、IL-17 水平低于治疗前 ($P < 0.05$)。慢性牙周炎患者治疗前外周血 Notch1 mRNA 表达与 Th17 细胞、IL-17 水平呈正相关 ($r = 0.548$ 和 0.572 , $P < 0.05$)。**结论** Notch1 mRNA 可能通过促进 Th17 细胞分化参与慢性牙周炎的发病过程, Notch1 mRNA 表达水平可在一定程度上反映慢性牙周炎的病情严重程度。

关键词: 慢性牙周炎; 受体, Notch1; Th17 细胞; 白细胞介素-17

中图分类号: R781.42

文献标识码: A

Level of Notch1 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic periodontitis and its correlation with disease severity

Hai-biao Fu¹, Jun-Jie Yan²

(Graduate School, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310053, China; 2. Department of Stomatology, Lishui People's Hospital, Lishui, Zhejiang 323000, China)

Abstract: Objective To investigate the level of Notch1 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic periodontitis and its relationship with disease severity. **Methods** 150 patients with chronic periodontitis treated in the Department of Stomatology of Graduate School of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine and Lishui People's Hospital from January 2017 to December 2018 were selected as the observation group, and 150 healthy people who underwent physical examination during the same period were selected as the control group. According to the severity of the disease, the observation group patients were divided into mild group (54 cases), moderate group (51 cases), and severe group (45 cases). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to determine Notch1 mRNA levels in peripheral blood. Flow cytometry was used to determine T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood. Double-antibody sandwich ELISA was used to measure

收稿日期: 2020-03-25

[通信作者] 闫俊杰, Tel: 18957090797

interleukin-17 (IL-17) levels in peripheral blood. **Results** The levels of Notch1 mRNA, Th17 cells and IL-17 in the observation group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). There were significant differences in the levels of Notch1 mRNA, Th17 cells and IL-17 in peripheral blood of patients with different severity of chronic periodontitis ($P < 0.05$), where those in the moderate group and severe group were higher than those in the mild group ($P < 0.05$) and those in the severe group were higher than those in the moderate group ($P < 0.05$). The levels of Notch1 mRNA, Th17 cells and IL-17 in peripheral blood of patients with chronic periodontitis after treatment were lower than those before treatment ($P < 0.05$). The levels of Notch1 mRNA in peripheral blood of patients with chronic periodontitis before treatment were positively correlated with the levels of Th17 cells ($r = 0.548$) and IL-17 ($r = 0.572$) ($P < 0.05$). **Conclusions** Notch1 may participate in the pathogenesis of chronic periodontitis by promoting the differentiation of Th17 cells. The level of Notch1 mRNA can reflect the severity of chronic periodontitis to a certain extent.

Keywords: chronic periodontitis; Notch1; T helper 17 cell; interleukin-17

慢性牙周炎为常见的口腔疾病, 可导致牙槽骨、牙骨质、牙周膜和牙龈等牙周组织发炎, 为一种长期感染性疾病。细菌菌斑在牙周的定殖可引起牙周慢性炎症, 导致牙槽骨和结缔组织破坏, 最终造成牙齿脱落。牙龈卟啉单胞菌、厌氧链球菌、中间型小球藻等厌氧菌为常见致病菌。慢性牙周炎的典型表现为免疫炎症反应。慢性牙周炎患者牙菌斑中的厌氧菌等致病菌可引起宿主发生免疫反应和炎症反应, 造成牙周组织的破坏; 这些免疫炎症反应释放的炎症细胞因子进入外周血, 对全身各系统产生一定影响, 可导致糖尿病、冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)等疾病。辅助性 T 细胞 17(helper T cells 17, Th17)在慢性牙周炎的发病中发挥重要作用^[1]。Th17 在健康人群外周血中也存在, 主要参与维持机体内环境稳定, 产生免疫应答, 协助机体清除异物抗原, 且不损伤人体自身组织。在牙菌斑的作用下, Th17 等 T 细胞水平升高, 介导细胞免疫应答为主的多种致炎因子水平升高, 参与慢性牙周炎的发生^[2]。白细胞介素-17(Interleukin-17, IL-17)由 Th17 细胞产生, 具有非常强的致炎作用。在牙周炎时, 辅助性 T 细胞在牙周组织破坏阶段通过诱导 Th17 等细胞释放 IL-17 等致炎因子参与炎症反应过程^[3]。IL-17 作为一种强大的致炎因子, 参与牙周组织的炎症反应过程, 且随着炎症程度的加重, IL-17 水平升高, IL-17 水平在一定程度上可反映慢性牙周炎的严重程度^[4]。有研究发现慢性牙周炎患者龈沟液和血浆中辅助性 T 细胞及其细胞因子 IL-17 水平升高, 认为 Th17 在牙周炎的发病过程中可能发挥促炎作用^[5-6]。Th17 细胞的分化受多种信号通路调控, 其中 Notch 信号通路是调控细胞分化的重要通路^[7-8]。有研究发现 Notch 信号通路在 Th17 细

胞的分化中发挥重要作用^[9]。但 Notch 在慢性牙周炎患者外周血中的表达水平及其是否对 Th17 细胞分化具有调控作用尚不清楚。本文对慢性牙周炎患者外周血单核细胞 Notch1 mRNA 表达与 Th17 细胞和疾病严重程度的关系进行研究, 阐明其在慢性牙周炎中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2017 年 1 月—2018 年 12 月丽水市人民医院口腔科收治的慢性牙周炎患者 150 例作为观察组, 另取同期本院 150 例健康体检者作为对照组。观察组根据病情严重程度^[10]分为轻度组 54 例, 中度组 51 例, 重度组 45 例。观察组男性 77 例, 女性 73 例; 年龄 24 ~ 53 岁, 平均(43.25 ± 7.34)岁; 体重指数(2.42 ± 0.23) kg/m²。对照组男性 75 例, 女性 75 例; 年龄 25 ~ 54 岁, 平均(44.12 ± 7.18)岁; 体重指数(2.37 ± 0.21) kg/m²。两组年龄、性别、体重指数比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

纳入标准: 年龄 20 ~ 60 岁, 临床数据和资料完整, 签署知情同意书, 依从性好, 接受正规治疗。

排除标准: 吸烟; 妊娠期或哺乳期女性; 糖尿病、高血压、类风湿关节炎等其他疾病; 侵袭性牙周炎; 急慢性感染性疾病; 免疫系统疾病; 影响 Notch1 水平的其他口腔疾病; 接触放射线; 服用抗菌药物、激素类药物、免疫制剂。

1.2 方法

1.2.1 慢性牙周炎患者治疗方法 采用牙周基础治疗, 包括口腔卫生指导、口腔洁治、龈下刮治, 治疗后 6 周复查。

1.2.2 标本采集 采集慢性牙周炎患者治疗前后外周静脉血, 以及健康体检者体检当天外周静脉血。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 测定外周血 Notch1 mRNA 采用 Ficoll 密度分离法分离两组患者外周血单个核细胞, 参照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 进行 qRT-PCR。反应条件: 94℃ 预变性 60 s, 94℃ 变性 10 s, 56℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Notch1 mRNA。Notch1 正向引物: 5'-GTCAACGCCGTAGATGACC-3', 反向引物: 5'-TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG-3', 长度 101 bp。qRT-PCR 试剂购自日本 TaKaRa 公司。

1.2.4 外周血 Th17 细胞、IL-17 水平测定 采用流式细胞仪测定外周血 Th17 细胞水平, 采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定外周血 IL-17 水平。ELISA 试剂盒购自美国 Sigma 公司。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以

均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或配对 t 检验; 相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较

两组外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 观察组高于对照组 (见表 1)。Notch1 mRNA 扩增曲线和熔解曲线见图 1、2。两组外周血 Th17 细胞流式细胞图见图 3。

表 1 两组外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较 ($n = 150, \bar{x} \pm s$)

组别	Notch1 mRNA	Th17 细胞 /%	IL-17/ (pg/ml)
对照组	1.00 \pm 0.06	0.51 \pm 0.11	0.61 \pm 0.13
观察组	1.56 \pm 0.08	1.14 \pm 0.15	0.75 \pm 0.12
t 值	68.586	41.481	9.692
P 值	0.000	0.000	0.000

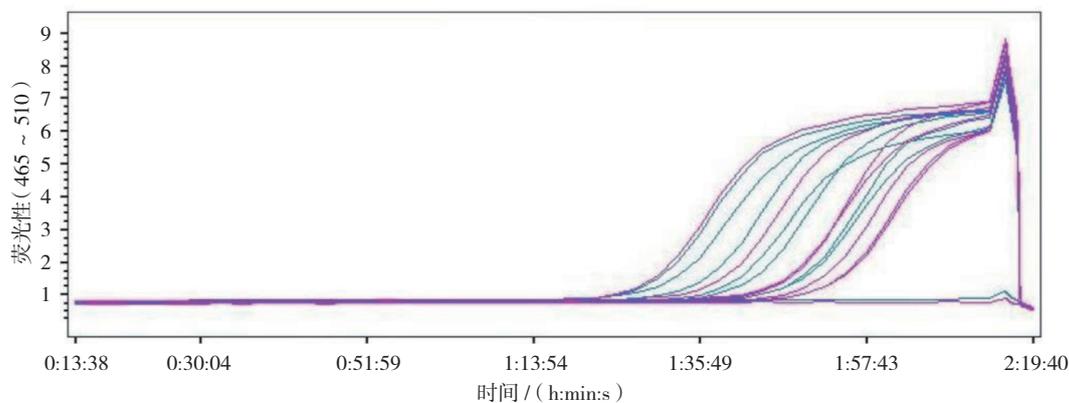


图 1 Notch1 mRNA 扩增曲线

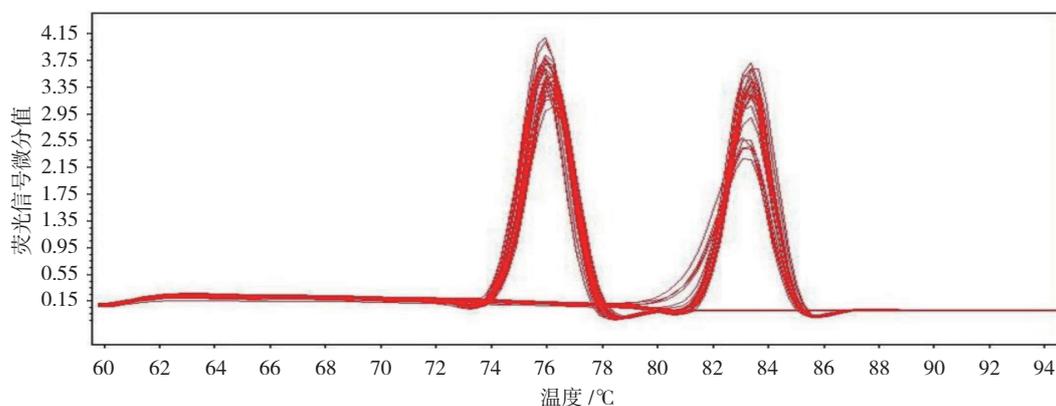


图 2 Notch1 mRNA 熔解曲线

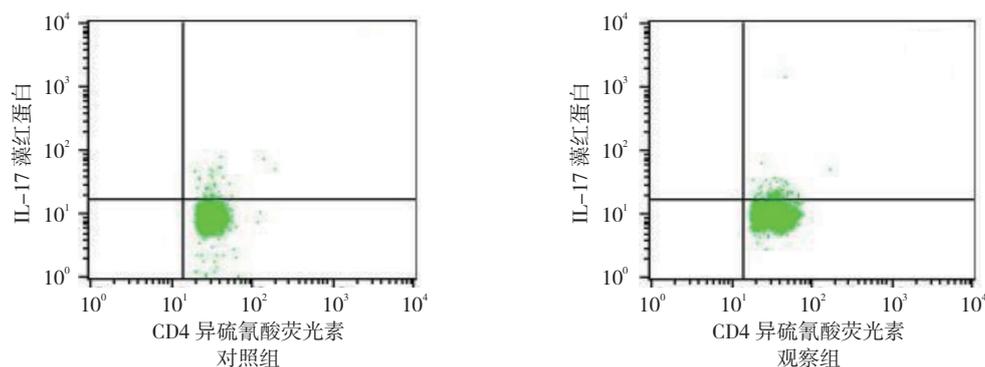


图 3 两组外周血 Th17 细胞的流式细胞图

2.2 不同严重程度慢性牙周炎患者外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较

不同严重程度慢性牙周炎患者外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 中度组和重度组高于轻度组 ($P < 0.05$), 重度组高于中度组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同严重程度慢性牙周炎患者外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Notch1 mRNA	Th17 细胞 /%	IL-17/ (pg/ml)
轻度组	54	1.27 ± 0.07	0.87 ± 0.14	0.68 ± 0.11
中度组	51	1.53 ± 0.08 ^①	1.11 ± 0.15 ^①	0.77 ± 0.12 ^①
重度组	45	1.72 ± 0.09 ^{①②}	1.24 ± 0.16 ^{①②}	0.87 ± 0.10 ^{①②}
F 值		398.394	78.944	36.174
P 值		0.000	0.000	0.000

注: ①与轻度组比较, $P < 0.05$; ②与中度组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 治疗前后外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较

慢性牙周炎患者治疗前后外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较, 经配对 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 治疗后低于治疗前。见表 3。

表 3 治疗前后外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平比较 ($n = 150, \bar{x} \pm s$)

时间	Notch1 mRNA	Th17 细胞 /%	IL-17/ (pg/ml)
治疗前	1.56 ± 0.08	1.14 ± 0.15	0.75 ± 0.12
治疗后	1.12 ± 0.09	0.63 ± 0.13	0.64 ± 0.11
t 值	58.876	93.081	67.361
P 值	0.000	0.000	0.000

2.4 慢性牙周炎患者治疗前外周血 Notch1 mRNA 表达与 Th17 细胞、IL-17 水平的相关性

慢性牙周炎患者治疗前外周血 Notch1 mRNA 表达与 Th17 细胞、IL-17 水平呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 慢性牙周炎患者治疗前外周血 Notch1 mRNA 表达与 Th17 细胞、IL-17 水平的相关性

指标	r 值	P 值
Th17 细胞	0.548	0.000
IL-17	0.572	0.000

3 讨论

慢性牙周炎是牙周组织破坏的主要原因, 为牙周软组织的炎症状态及对牙齿菌斑的直接免疫反应^[11]。慢性牙周炎为难治性疾病, 是导致成人牙齿缺失的主要原因。慢性牙周炎也增加冠心病、低出生体重儿等的发生风险, 对人类健康造成危害。随着免疫学的发展, 大量研究证实慢性牙周炎是一种由 T 细胞介导的、细胞免疫应答为主的、多种致炎因子共同参与的慢性炎症性疾病^[2]。

本研究结果表明, 慢性牙周炎患者外周血 Notch1 mRNA 表达及 Th17 细胞、IL-17 水平升高, 外周血 Notch1 mRNA 表达与 Th17 细胞、IL-17 水平呈正相关。Notch 家族为一种十分保守的跨膜蛋白, 在脊椎动物和无脊椎动物中广泛存在^[12], 在胚胎形成、免疫细胞分化及功能调节、细胞增殖和凋亡方面发挥重要作用^[13-14]。Notch 家族可通过 Notch1 在 Th17 细胞分化中发挥调节作用, 在类风湿关节炎、过敏性哮喘等常见自身免疫性疾病中发挥重要作用^[15-16], 如呼吸道合胞病毒通过激活 Notch1 促进气道微环境中 Th17 细胞的分化^[17]; Notch1 信号可促进银屑病患者外周血 Th17

细胞分化^[18]。张黎等^[19]通过动物实验发现, Notch1 信号通路在慢性牙周炎大鼠的免疫平衡调控中发挥重要作用。结合本研究结果及既往研究分析, Notch1 mRNA 可能通过促进 Th17 细胞分化诱导免疫炎症反应, 参与慢性牙周炎的发病过程。

本研究中随着慢性牙周炎严重程度增加, 外周血 Notch1 mRNA 表达升高, 治疗后随着牙周炎的控制, 外周血 Notch1 mRNA 表达降低, 表明其在一定程度上可反映慢性牙周炎的病情严重程度, 病情越严重, 免疫炎症反应越显著, Notch1 mRNA 表达越高, 通过调控 Th17 细胞分化, 导致 IL-17 等促炎细胞因子水平升高, 进一步加重病情发展。

Notch1 mRNA 可促进 Th17 细胞分化, 但其机制尚不清楚, 探讨 Notch1 mRNA 促进 Th17 细胞分化的机制将是下一步需要研究的内容。

参 考 文 献:

- [1] RAJENDRAN M, LOONEY S, SINGH N, et al. Systemic antibiotic therapy reduces circulating inflammatory dendritic cells and Treg-Th17 plasticity in periodontitis[J]. *J Immunol*, 2019, 202(9): 2690-2699.
- [2] ZHENG Y, DONG C, YANG J L, 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.
- [3] SAMUEL R O, ERVOLINO E, de AZEVEDO QUEIROZ Í O, et al. Th1/Th2/Th17/Treg balance in apical periodontitis of normoglycemic and diabetic rats[J]. *J Endod*, 2019, 45(8): 1009-1015.
- [4] 陈玮繁, 解飞, 张辰升, 等. 慢性牙周炎患者血浆和龈沟液中 Th 亚群细胞相关细胞因子浓度水平差异 [J]. *湖南师范大学学报 (医学版)*, 2016, 13(6): 134-135.
- [5] THORBERT-MROS S, LARSSON L, KALM J, et al. Interleukin-17-producing T cells and interleukin-17 mRNA expression in periodontitis and long-standing gingivitis lesions[J]. *J Periodontol*, 2019, 90(5): 516-521.
- [6] 马志祥, 吕广应, 刘乙臻, 等. Th17 细胞在牙周炎中的研究进展 [J]. *口腔医学*, 2019, 39(1): 77-80.
- [7] YANG L, DONG Y, LI Y J, et al. IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via JAK1/STAT1/NF-κB/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(4): 1099-1110.
- [8] ZHANG H S, ZHANG Z G, DU G Y, et al. Nrf2 promotes breast cancer cell migration via up-regulation of G6PD/HIF-1α/Notch1 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3451-3463.
- [9] 张珊, 刘宝山. Notch 信号通路调控 Treg/Th17 细胞机制的研究进展 [J]. *天津医药*, 2018, 46(5): 548-552.
- [10] 郑艳. 口腔内科学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 158.
- [11] DELI F, ROMANO F, GUALINI G, et al. Resident memory T cells: possible players in periodontal disease recurrence[J]. *J Periodontal Res*, 2020, 55(2): 324-330.
- [12] KIM H G, HWANG S Y, AARONSON S A, et al. Withdrawal: DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 17672-17681.
- [13] MILOUDI K, OUBAHA M, MÉNARD C, et al. NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(10): 4538-4547.
- [14] BABICHEVA A, YUAN J X. Endothelial notch1 in pulmonary hypertension[J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 176-179.
- [15] YIN X W, LIU B, WEI H X, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4⁺/CD8⁺, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 761-774.
- [16] ZENG Z Y, WANG L, MA W H, et al. Inhibiting the Notch signaling pathway suppresses Th17-associated airway hyperresponsiveness in obese asthmatic mice[J]. *Lab Invest*, 2019, 99(12): 1784-1794.
- [17] QIN L, QIU K Z, HU C P, et al. Respiratory syncytial virus promoted the differentiation of Th17 cells in airway microenvironment through activation of Notch-1/Delta3[J]. *J Med Microbiol*, 2019, 68(4): 649-656.
- [18] 马蕾, 薛海波, 高梅兰, 等. Notch1 信号对银屑病患者外周血 Th17 细胞分化和功能的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2018, 51(3): 189-193.
- [19] 张黎, 符起亚, 王宝梁. Notch 信号在慢性牙周炎实验大鼠模型的表达研究 [J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(6): 401-404.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 付海标, 闫俊杰. 慢性牙周炎患者外周血单核细胞 Notch1 mRNA 的表达及与疾病严重程度的相关性 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(16): 28-32.