

龈沟液中细胞外游离DNA与牙周临床指标及环磷酸鸟苷—磷酸腺苷合成酶—干扰素基因刺激因子信号通路相关分子的关联性分析

陈兰¹ 朱轩智¹ 周婕妤¹ 李继遥² 赵蕾¹

1. 口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心
四川大学华西口腔医院牙周病科, 成都 610041;
2. 口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心
四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科, 成都 610041

[摘要] 目的 探究龈沟液(GCF)中细胞外游离DNA(cfDNA)与牙周临床指标、牙龈组织及牙龈成纤维细胞(HGFs)表达DNA感受通路环磷酸鸟苷—磷酸腺苷合成酶(cGAS)—干扰素基因刺激因子(STING)的可能关联。方法 收集健康者和牙周炎患者的GCF及牙龈组织,记录受试者全口牙周临床指标,包括菌斑指数(PLI)、出血指数(BI)、探诊深度(PD)、临床附着水平(CAL),定量龈沟液cfDNA浓度,分析其与牙周临床指标的相关性;采用免疫荧光、定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)分别检测牙龈组织中cGAS、STING、p-STING的分布,以及cGAS-STING信号通路关键分子cGAS、STING、抑制因子激酶(IKK)、核因子 κ B p65(NF- κ B p65)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA的表达。应用健康组及牙周炎组GCF来源的cfDNA刺激HGFs,通过Western blot及RT-qPCR检测细胞cGAS-STING信号通路关键分子的表达。结果 牙周炎组GCF中cfDNA水平显著高于健康组,且cfDNA水平与牙周临床指标呈强正相关性。与健康组相比,牙周炎组牙龈组织中cGAS、STING、p-STING与HGFs标志物FSP-1的荧光共定位百分比显著增加,牙周炎组牙龈组织中cGAS、STING、IKK、NF- κ B p65、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的mRNA表达水平高于对照组;与对照组相比,健康组或牙周炎组GCF来源cfDNA体外刺激HGFs后,cGAS和p-STING的蛋白表达水平呈升高趋势,cGAS、STING、IKK、NF- κ B p65、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的mRNA表达水平均显著增高。相关性分析显示:牙龈组织取样位点cfDNA浓度与cGAS、STING、NF- κ B p65、IL-6的mRNA表达呈正相关性。结论 牙周炎患者GCF中cfDNA水平显著升高,且可能通过激活HGFs的cGAS-STING信号通路在牙周炎进展中发挥重要作用。

[关键词] 牙周炎; 细胞外游离DNA; 环磷酸鸟苷—磷酸腺苷合成酶—干扰素基因刺激因子信号通路; 人牙龈成纤维细胞

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2024391



本文链接 开放科学标识码

Correlation analysis of cell-free DNA in gingival crevicular fluid with periodontal clinical indicators and cyclic guanosine phosphate-adenosine phosphate synthase-stimulator of interferon genes signaling pathway

Chen Lan¹, Zhu Xuanzhi¹, Zhou Jieyu¹, Li Jiyao², Zhao Lei¹

1. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Cariology

[收稿日期] 2024-10-23; **[修回日期]** 2025-09-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81970944, 81991501, 81991502); 四川省自然科学基金(2023NSFSC0553)

[第一作者] 陈兰, 医师, 博士, E-mail: 2444713576@qq.com

[通信作者] 赵蕾, 教授, 博士, E-mail: zhaolei@scu.edu.cn

and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81970944, 81991501, 81991502); Natural Science Foundation of Sichuan Province (2023NSFSC0553)

Correspondence: Zhao Lei, E-mail: zhaolei@scu.edu.cn

[Abstract] Objective This study aims to explore the potential relationships of cell-free DNA (cfDNA) in gingival crevicular fluid (GCF) with periodontal clinical indicators and the expression of DNA receptor pathway cyclic guanosine phosphate-adenosine phosphate synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) in gingival tissues and human gingival fibroblasts (HGFs). **Methods** GCF and gingival tissue samples were collected from periodontally healthy individuals and patients diagnosed with periodontitis. Periodontal clinical indicators were recorded, including plaque index (PLI), bleeding index (BI), probing depth (PD), and clinical attachment level (CAL). The concentration of cfDNA in GCF was quantified, and the correlation between GCF and periodontal clinical indicators was analyzed. Immunofluorescence and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were used to assess the distribution of cGAS, STING, and p-STING in gingival tissues. Additionally, the mRNA expression levels of the key components of the cGAS-STING signaling pathway, namely, cGAS, STING, inhibitory of kappa-B kinase (IKK), nuclear factor kappa-B p65 (NF- κ B p65), interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), were measured. Furthermore, cfDNA extracted from GCF was employed to stimulate HGFs in the healthy control and periodontitis groups, and the mRNA expression levels of the key molecules of cGAS-STING signaling pathway were detected through Western blot and RT-qPCR. **Results** The concentration of cfDNA in GCF was found to be significantly elevated in the periodontitis group compared with the control group. Moreover, cfDNA concentration demonstrated a strong positive correlation with the periodontal clinical indicators. Immunofluorescence analysis revealed considerably increased percentage of fluorescence co-localization of cGAS, STING, and p-STING with the gingival fibroblast FSP-1 marker in the gingival tissues of the periodontitis group. The mRNA expression levels of cGAS, STING, IKK, NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6, and TNF- α were significantly higher in the periodontitis group. *In vitro* stimulation of HGFs with GCF-derived cfDNA resulted in increased protein expression of cGAS and p-STING and considerably upregulated the mRNA expression levels of cGAS, STING, IKK, NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the healthy and periodontitis groups compared with the blank group. Correlation analysis showed that the concentration of cfDNA at the sampling site was positively correlated with the mRNA expression levels of cGAS, STING, NF- κ B p65, and IL-6 in gingival tissues. **Conclusion** cfDNA concentrations in the GCF of patients with periodontitis are considerably elevated, and are associated with the activation of the cGAS-STING signaling pathway in HGFs. These findings suggest that cfDNA contributes to the progression of periodontitis.

[Key words] periodontitis; cell-free DNA; cyclic guanosine phosphate-adenosine phosphate synthase-stimulator of interferon genes signaling pathway; human gingival fibroblasts

牙周炎是一种导致牙周支持组织破坏的慢性感染性疾病, 先天免疫反应在牙周炎的发生发展中发挥重要作用^[1]。先天免疫反应的启动依赖模式识别受体与病原相关分子模式或损伤相关分子模式相互识别。当模式识别受体被分子模式激活后, 能将信号转导至胞内进一步活化相关转录因子, 使其入核激活下游基因转录, 从而释放细胞因子等, 发挥炎症级联放大的效应^[2-3]。

细胞外游离DNA (cell-free DNA, cfDNA) 是指存在于体液中的游离DNA, 可作为细胞外分子模式, 激活包括环磷酸鸟苷—磷酸腺苷合成酶 (cyclic guanosine phosphate-adenosine phosphate synthase, cGAS)、黑素瘤缺乏因子2 (absent in mela-

noma 2, AIM2)、Toll样受体9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 等在内的多种核酸感受模式识别受体, 与糖尿病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、冠心病等慢性免疫炎症性疾病具有直接关联^[4]。牙周炎症微环境中存在cfDNA, 包括微生物基因组DNA (bdDNA) 和宿主细胞死亡裂解释放的DNA [细胞核DNA、线粒体DNA (mtDNA)、中性粒细胞胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 等]^[5-7]。课题组前期研究^[8]发现: 丝线结扎诱导的牙周炎小鼠模型中唾液和血清cfDNA水平显著升高, 且出现明显的炎症性牙槽骨吸收; 而牙周组织局部应用cfDNA清除剂G3@SeHANs能够明显抑制牙周组织的免疫炎症反应, 减轻小鼠牙槽骨吸

收。提示：cfDNA作为一种核酸分子模式可能通过激活核酸感受模式识别受体，在牙周炎发生发展中扮演重要角色。

cGAS是一种胞质DNA传感器，其与干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon genes, STING）结合，激活核因子 κ B p65（nuclear factor kappa-B p65, NF- κ B p65），诱导促炎因子白细胞介素（interleukin, IL）-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）的产生^[9]。cGAS-STING信号通路最初是由于感知外源DNA并产生先天免疫反应被发现^[10]。Tumburu等^[11]发现镰状细胞病患者的cf-mtDNA升高，且患者血浆中高水平cf-mtDNA触发了NETs的形成，通过抑制TANK结合激酶1（The TANK-binding kinase 1, TBK1）可显著减少NETs，证明了cGAS-STING信号通路的参与。另有学者^[12]在干眼症研究中发现：应激状态可导致角膜上皮细胞的mtDNA通过线粒体通透性转换孔释放到细胞质中，激活cGAS-STING信号通路从而加重炎症反应和眼表损伤；而敲除或阻断STING基因、抑制mtDNA释放均可显著减少炎症反应及眼表损伤。在口腔医学领域，研究^[13]显示：不可复性牙髓炎患牙牙髓组织中cGAS和STING的mRNA表达增加，而在人牙髓细胞中使用cGAS或STING抑制剂，可减轻由细菌DNA感染引起的干扰素 β （interferon- β , IFN- β ）、TNF、IL-6分泌。综上研究均提示：牙周炎患者龈下微环境中的cfDNA可能激活cGAS-STING信号通路，影响牙周组织局部免疫稳态平衡。然而，目前相关机制尚未被充分探讨。

本研究拟收集牙周健康者和牙周炎患者的龈沟液（gingival crevicular fluid, GCF）和牙龈组织，检测GCF中cfDNA浓度、牙龈组织中cGAS-STING信号通路的表达，并分析其与牙周临床指标等的相关性，使用牙周健康者和牙周炎患者GCF来源cfDNA刺激人牙龈成纤维细胞（human gingival fibroblasts, HGFs），检测HGFs细胞中cGAS-STING信号通路关键分子的表达，以期丰富牙周炎先天免疫调节机制提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

血清/血浆游离DNA提取试剂盒 [天根生化科技（北京）有限公司]，Quant-iT™ PicoGreen™ ds-DNA定量试剂盒、兔源一抗cGAS、兔源一抗

STING、兔源一抗p-STING、鼠源一抗成纤维细胞特异性蛋白1（fibroblast specific protein 1, FSP-1）、鼠源一抗CK14、羊抗兔荧光二抗AF488、羊抗鼠荧光二抗AF594、lipo3000（赛默飞公司，美国），DAPI、抗体稀释液、抗荧光衰减封片液、DMEM培养基、青霉素—链霉素溶液（北京索莱宝科技有限公司），SYBR Green qPCR Master Mix试剂盒（APEX-BIO公司，美国），胎牛血清（Bio-sharp公司，加拿大），十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE）凝胶电泳、无蛋白快速转膜液（上海雅酶生物医药科技有限公司），牙周探针UNC-15 [豪孚迪医疗器械（上海）有限公司]，Whatman®3MM色谱滤纸（Whatman公司，美国）。

1.2 研究对象

根据2018年牙周病学新分类^[14]诊断标准筛选受试者。牙周健康者的诊断标准：无临床附着丧失，探诊出血（bleeding on probing, BOP）<10%且探诊深度（probing depth, PD） \leq 3 mm。Ⅲ~Ⅳ期牙周炎患者的诊断标准：1) PD \geq 6 mm，邻面临床附着丧失最重位点 \geq 5 mm，垂直骨吸收 \geq 3 mm，Ⅱ~Ⅲ度根分叉病变；2) 影像学骨丧失至根中1/3或根尖1/3；3) 因牙周炎失牙。

共纳入牙周健康者和Ⅲ~Ⅳ期牙周炎患者各10名。受试者的纳入标准：年龄18~40岁，口内至少有20颗恒牙和 \geq 4颗磨牙。排除标准：1) 吸烟史、酗酒史；2) 不良咬合习惯；3) 孕妇、哺乳期妇女；4) 系统疾病；5) 近6个月内接受过牙周治疗；6) 近3个月服用过抗生素；7) 正在接受正畸治疗。本研究经四川大学华西口腔医院伦理委员会批准（批件号：WCHSIRB-D-2019-057），所有患者均知情并签署知情同意书。

1.3 临床资料及样本的采集

受试者知情同意后，由同一名校准后的牙周专科医生记录受试者身高、体重，并使用UNC-15探针检查记录牙周临床指标^[15]，包括菌斑指数（plaque index, PLI）、出血指数（bleeding index, BI）、PD和临床附着水平（clinical attachment level, CAL）。

牙周临床指标记录后，另行预约采集受试者GCF或牙龈组织。1) GCF：健康组取自4个象限第一磨牙近中颊侧无炎症、PD \leq 3 mm的位点，如第一磨牙缺失或有炎症，取第二磨牙或第一前磨牙近中颊侧位点；牙周炎患者取自4个象限PD最

重的位点各1个。2) 牙龈组织: 健康组取自需行前牙美学牙冠延长术部位的牙龈组织, 取样部位牙龈无炎症、BOP (-)、PD \leq 3 mm; 牙周炎患者取自因牙周炎需要拔除患牙的部位。取样位点排除标准: 1) 龋齿; 2) 牙周脓肿; 3) 牙周一牙髓联合病变; 4) 有邻面充填体、嵌体或冠修复。

在牙龈组织获取牙位的颊侧近中位点采集GCF, 并记录临床指标 (PLI、BI、PD、CAL), 取样方法同前。GCF样品使用Whatman®3MM色谱滤纸采集, 所有滤纸用无菌组织剪修剪成每条2 mm \times 10 mm大小, 称重并计量, 备用。棉卷隔湿目标牙, 三用喷枪吹干牙面, 将一条滤纸条缓慢插入牙周袋或龈沟内1~2 mm, 静置30 s取出^[6]。将4个象限取出的滤纸条转移至同一1.5 mL离心管中。血液或唾液污染样本不被纳入。离心管中加入0.01 mol/L PBS 300 μ L (pH值7.4) 室温摇床洗脱1 h, 4 $^{\circ}$ C离心5 500 r/min 20 min, 提取200 μ L上清液, -80 $^{\circ}$ C保存。GCF用于提取和检测cfDNA。GCF采集后, 局麻下切除2 mm²牙龈组织, 使用生理盐水对牙龈样本进行冲洗, 去除血污后置于4%多聚甲醛中固定或液氮冻存, 备用。

1.4 GCF cfDNA的提取与定量检测

采用血清/血浆游离DNA提取试剂盒和Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA定量试剂盒进行cfDNA的提取和定量。cfDNA定量检测方法如下。使用TE缓冲液稀释样本, 按照说明书设定标准曲线, 将50 μ L PicoGreen和50 μ L cfDNA洗脱液添加至黑色不透明96微孔板中, 室温避光孵育2~5 min。使用酶标仪测量荧光强度 (激发波长490 nm, 发射波长520 nm), 计算cfDNA浓度。GCF cfDNA浓度数据以mg/mL per 30-s sample为单位报告^[6]。

1.5 GCF cfDNA体外刺激HGFs

为进一步评估cfDNA对免疫反应的影响, 分别从健康组或牙周炎组的混合GCF中提取cfDNA, 参考Lipofectamine™3000试剂盒说明书, 将第3~6代对数生长期的HGFs制备成单细胞悬液, 按照密度为 5×10^5 个/mL接种6孔板中, 待细胞铺满瓶底70%~90%, 健康组、牙周炎患者GCF来源cfDNA (200 ng/mL)^[7]刺激HGFs 48 h, 设置空白对照组。采用Trizol试剂提取细胞总RNA, 备用。

1.6 免疫荧光染色

牙龈组织石蜡切片常规脱蜡水化, PBS洗3次, 每次5 min; 改进型柠檬酸钠抗原修复液 ($\times 50$) 微波炉修复20 min, PBS洗3次, 每次5 min; 阻断内源性过氧化物酶37 $^{\circ}$ C下孵育25 min, PBS

洗3次, 每次5 min; 使用新鲜配制的5%山羊血清37 $^{\circ}$ C下孵育30 min, 倾去, 不洗; 加一抗cGAS (1:100)、STING (1:100)、p-STING (1:100)、牙龈上皮细胞标志物CK14 (1:100)、HGFs标志物FSP-1 (1:100), 4 $^{\circ}$ C湿盒中孵育过夜。次日取出湿盒复温, PBS洗3次, 每次5 min; 在避光条件下同时滴加荧光二抗AF488 (1:200) 和荧光二抗AF594 (1:200), 37 $^{\circ}$ C下孵育50 min, PBS洗3次, 每次5 min; 加入DAPI (细胞核染色) 室温下孵育10 min, PBS洗3次, 每次5 min; 抗荧光衰减封片液封片, 4 $^{\circ}$ C避光保存。荧光显微镜下观察切片, 使用Image J/Fiji软件对图片进行分析, GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析并绘图。

1.7 Western blot法

检测HGFs的cGAS、STING、p-STING蛋白表达, 刺激方法同1.5。全程冰上操作, 使用PBS清洗细胞后加入RIPA裂解液, 待细胞充分裂解后收集细胞, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心15 min, 收集上清液, BCA法测定蛋白浓度, 100 $^{\circ}$ C加热10 min使蛋白变性, -80 $^{\circ}$ C保存备用。SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜, 无蛋白快速封闭液封闭10 min, 加入一抗 (GAPDH 1:10 000, cGAS 1:2 000, STING 1:2 000, p-STING 1:2 000) 4 $^{\circ}$ C过夜, 洗膜后进行二抗孵育1 h, 曝光显影。

1.8 定量逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

液氮碾碎-80 $^{\circ}$ C冷冻保存的牙龈组织, Trizol试剂提取组织/HGFs总RNA, 紫外分光光度仪检测样品RNA浓度 ($A_{260}/A_{280}>1.8$), 配比20 μ L反转录体系 (1 000 ng RNA, 4 μ L反转录预混液、dd-H₂O配平), 反转录cDNA。所用cGAS、STING、核转录因子 κ B抑制蛋白激酶 (inhibitor of kappa B kinase, IKK)、NF- κ B p65、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计并合成 (表1)。采用设计好的正反向特异性引物进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增, 95 $^{\circ}$ C预变性2 min; 变性95 $^{\circ}$ C 15 s, 延伸1 min, 共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参, 检测各组mRNA相对表达量。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算牙龈组织、HGFs中目的基因的mRNA表达量。

1.9 统计学分析

每个实验重复3次。采用GraphPad Prism 9.0

软件对结果数据进行统计学分析并绘制统计图。GCF cfDNA 浓度与各牙周临床指标或 cGAS-STING 信号通路核心分子的相关性分析采用斯皮尔曼相关性分析。组间比较采用 *t* 检验，多组组间比较采用单因素方差分析，*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 RT-qPCR 引物序列及产物大小

Tab 1 RT-qPCR primer sequence and product size

基因	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
cGAS	F: GCTGCTCCACGAAGCCAAGAC	194
	R: GTCCACAACCCCTTTCACCATCC	
STING	F: AGGAGAGCCACCAGAGCACAC	231
	R: ACCGCATTTGGGAGGGAGTAGTAG	
IKK	F: GCGGTCCGACGTATGTGGTAAC	119
	R: TGTGCTGCTGCTGCGATGC	
NF-κB p65	F: CGCATCCAGACCAACAACAACC	80
	R: TGGAAAGCAGAGCCGCACAG	
IL-6	F: GCCTTCGGTCCAGTTGCCTTC	133
	R: GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC	
TNF-α	F: TGGCGTGGAGCTGAGAGATAACC	149
	R: TCTGGTAGGAGACGGCGATGC	
IL-1β	F: GGACAGGATATGGAGCAACAAGTGG	123
	R: CAACACGCAGGACAGGTACAGATTC	
GAPDH	F: CACCCACTCCTCCACCTTTGAC	112
	R: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	

2 结果

2.1 GCF cfDNA 浓度与牙周临床指标的相关性分析

受试者一般资料见表 2。其中，健康组年龄 (24.00±1.48) 岁，BMI (21.06±1.72) kg/m²；

牙周炎组年龄 (30.20±3.87) 岁，BMI (21.53±2.19) kg/m²，2 组年龄间差异有统计学意义 (*P*<0.001)，但 BMI 值间差异无统计学意义。牙周炎组 GCF cfDNA 浓度 [(13.45±2.06) mg/mL] 高于健康组 [(1.76±1.09) mg/mL] (*P*<0.000 1)。

表 2 受试者的牙周临床指标和 GCF cfDNA 浓度

Tab 2 Periodontal clinical indicators and GCF cfDNA concentration of subjects

临床指标		健康组 (n=10)	牙周炎组 (n=10)
性别	男	5	4
	女	5	6
年龄/岁		24.00±1.48	30.20±3.87***
BMI/ (kg/m ²)		21.06±1.72	21.53±2.19
PLI	全口	0.16±0.08	0.74±0.29****
	取样位点	0.18±0.25	0.93±0.43***
BI	全口	0.06±0.03	2.32±0.61****
	取样位点	0.13±0.17	3.55±0.48****
PD/mm	全口	1.90±0.19	4.40±0.85****
	取样位点	2.35±0.25	9.35±0.98****
CAL/mm	全口	0	4.31±1.57****
	取样位点	0	8.95±1.81****
GCF cfDNA/ (mg/mL)		1.76±1.09	13.45±2.06****

注：与健康组相比，****P*<0.001，*****P*<0.000 1。

GCF cfDNA 浓度与牙周临床指标的相关性分析见表 3。相关性分析表明：GCF cfDNA 浓度与研究对象的年龄、全口 PLI、取样位点 PLI、全口 BI、取样位点 BI、全口 PD、取样位点 PD、全口 CAL、取样位点 CAL 呈强正相关性 (*P*<0.01)。以上结果提示：GCF cfDNA 浓度与牙周临床指标具有关联性，GCF cfDNA 浓度可能随牙周临床指标的恶化而升高。

表 3 GCF cfDNA 浓度与牙周临床指标的相关性分析

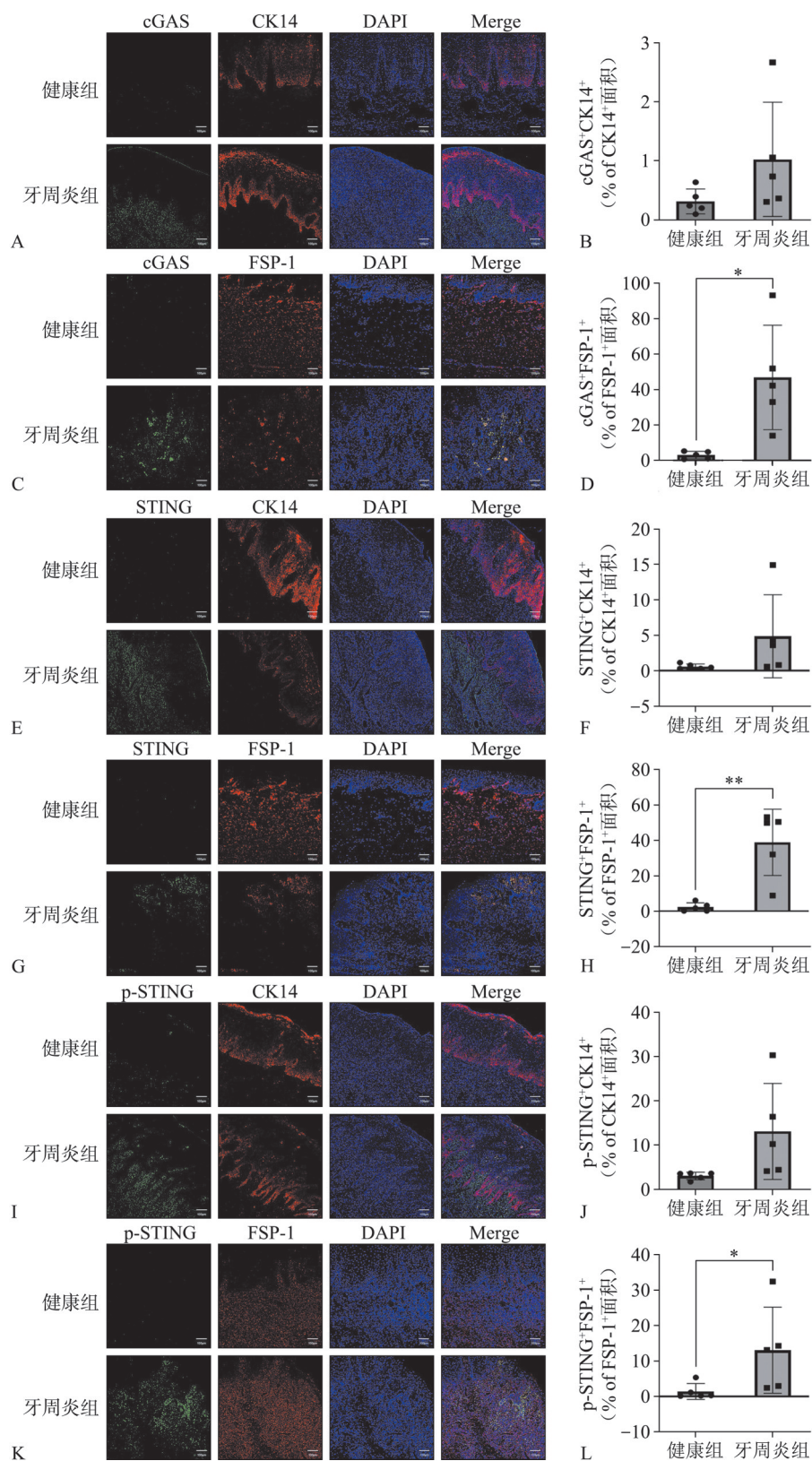
Tab 3 Correlation analysis between GCF cfDNA concentration and periodontal clinical indicators

项目	年龄	BMI	PLI		BI		PD		CAL	
			全口	取样位点	全口	取样位点	全口	取样位点	全口	取样位点
<i>F</i> 值	15.750	0.258 0	16.140	12.440	80.000	97.990	88.810	133.100	115.100	173.000
<i>r</i> 值	0.467	0.014 2	0.473	0.409	0.817	0.845	0.832	0.881	0.865	0.906
<i>P</i> 值	0.000 9	0.617 4	0.000 8	0.002 4	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

2.2 牙龈组织中 cGAS、STING、p-STING 的免疫荧光染色结果

与健康组相比，牙周炎组牙龈组织中 cGAS⁺、STING⁺、p-STING⁺ 的绿色荧光信号增强 (图 1)。牙周炎组 cGAS⁺/FSP-1⁺、STING⁺/FSP-1⁺、p-STING⁺/FSP-1⁺ 荧光共定位面积占 FSP-1⁺ 的百分比高于健康

组 (*P*<0.05)；而牙周炎组 cGAS⁺/CK14⁺、STING⁺/CK14⁺、p-STING⁺/CK14⁺ 荧光共定位面积占 CK14⁺ 的百分比与健康组相比，差异无统计学意义 (*P*>0.05)。提示：牙周炎组牙龈组织中 cGAS⁺、STING⁺、p-STING⁺ 增强的绿色荧光信号主要由 HGFs 表达。



A、E、I: cGAS、STING、p-STING (绿色) 与牙龈上皮细胞标志物CK14 (红色) 的免疫荧光双染色; C、G、K: cGAS、STING、p-STING (绿色) 与HGFs标志物FSP-1 (红色) 的免疫荧光双染色; B、D、F、H、J、L: 应用Image J软件计算cGAS⁺CK14⁺、cGAS⁺FSP-1⁺、STING⁺CK14⁺、STING⁺FSP-1⁺、p-STING⁺CK14⁺、p-STING⁺FSP-1⁺面积占CK14⁺或FSP-1⁺面积的百分比。比例尺: 100 μm; 与健康组比较, *P<0.05, **P<0.01。

图1 牙龈组织切片中cGAS、STING、p-STING的免疫荧光染色结果

Fig 1 Immunofluorescence staining results of cGAS, STING and p-STING in gingival tissue sections

2.3 牙龈组织中 cGAS-STING 通路关键分子的 mRNA 表达结果

与健康组相比，牙周炎组牙龈组织中 cGAS、STING、IKK、NF-κB p65 的 mRNA 表达升高，差

异具有统计学意义 ($P<0.05$)。其下游炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达量在牙周炎组也较健康组升高，差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (表 4)。

表 4 牙龈组织中 cGAS-STING 通路关键分子的 mRNA 表达

Tab 4 mRNA expression results of key molecules of cGAS-STING signaling pathway in gingival tissue

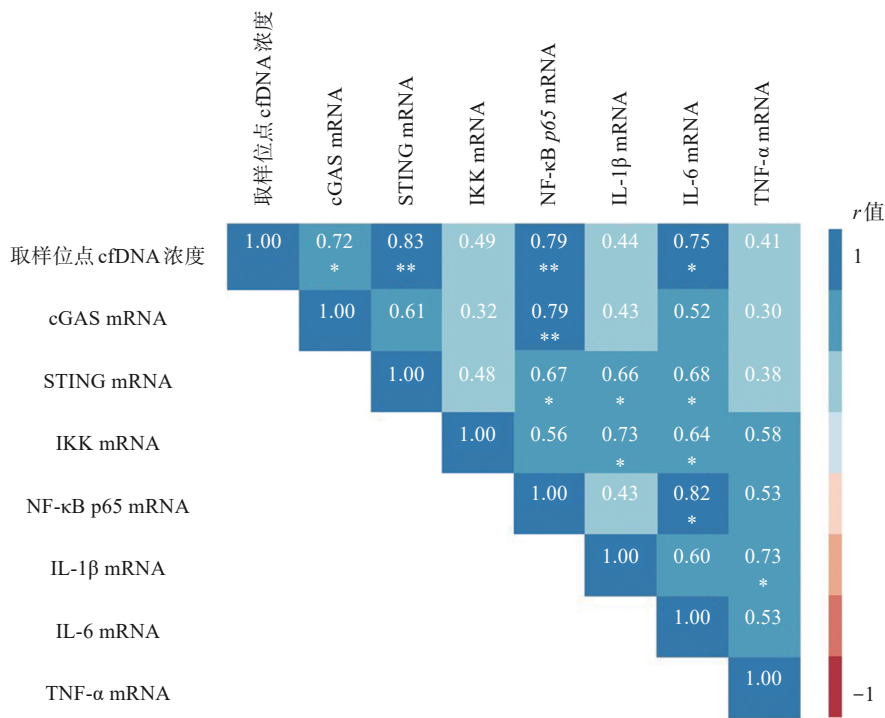
组别	cGAS	STING	IKK	NF-κB p65	IL-1β	IL-6	TNF-α
健康组	1.06±0.40	0.77±0.24	1.69±1.48	0.88±0.15	1.21±0.71	1.15±0.77	0.79±0.33
牙周炎组	2.63±0.81**	2.17±0.57**	11.49±8.30*	1.84±0.47**	2.47±0.77*	16.75±8.82**	2.36±1.21**

注：与健康组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

2.4 牙龈组织取样位点 GCF cfDNA 浓度与 cGAS-STING 信号通路核心分子的相关性分析

牙龈组织取样位点 GCF cfDNA 浓度分析结果显示：牙周炎组牙龈组织取样位点的 GCF cfDNA 浓度 (15.90±6.32) mg/mL 高于健康组 (1.17±0.80) mg/mL ($P<0.0001$)。将牙龈组织取样位点 GCF cfDNA 浓度与 cGAS-STING 信号通路核心分

子 (cGAS、STING、IKK、NF-κB p65、IL-1β、IL-6、TNF-α) 的 mRNA 表达水平进行相关性分析，结果显示：cfDNA 浓度与 cGAS ($r=0.72$, $P<0.05$)、STING ($r=0.83$, $P<0.001$)、NF-κB p65 ($r=0.79$, $P<0.001$)、IL-6 ($r=0.75$, $P<0.05$) 的 mRNA 表达呈正相关性 (图 2)。



* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。r=1 完全正相关；r=-1 完全负相关。

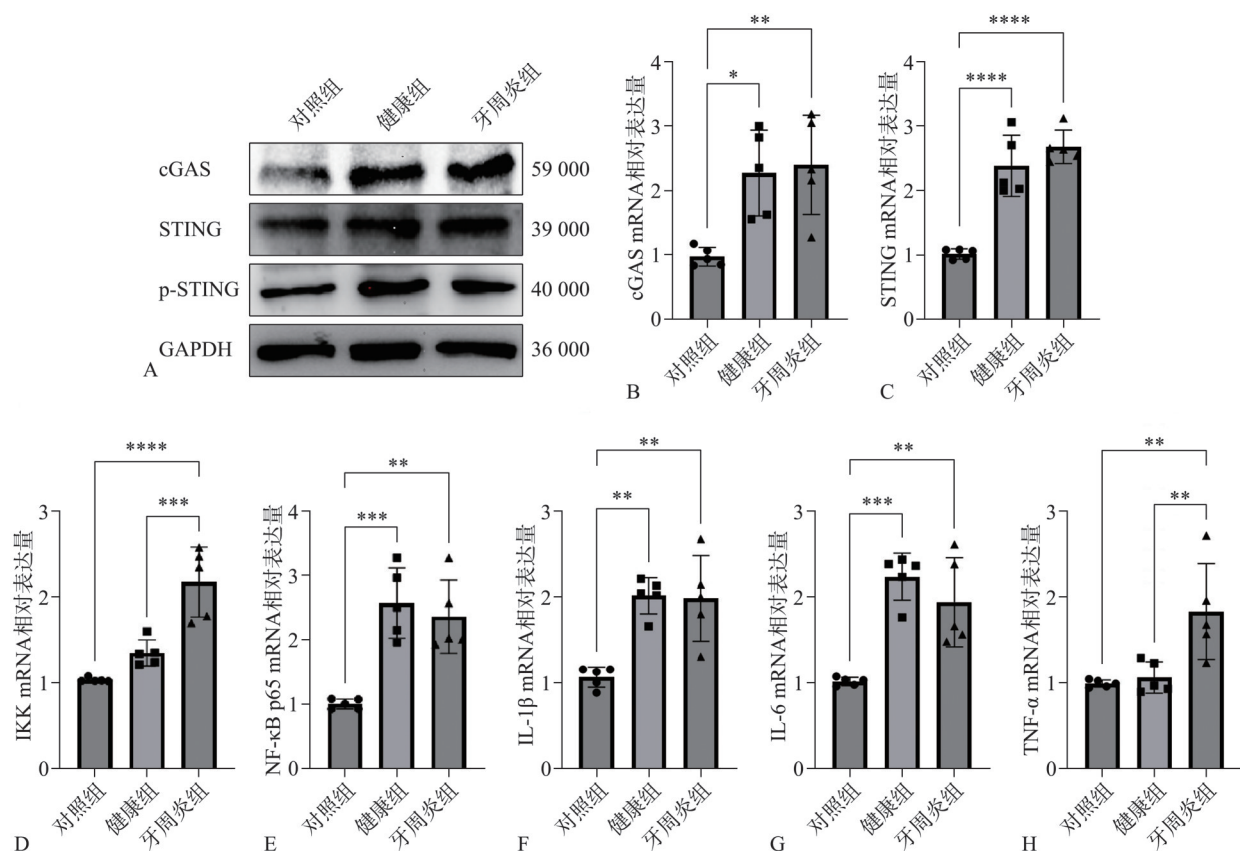
图 2 牙龈组织取样位点 GCF cfDNA 浓度与 cGAS-STING 信号通路核心分子 mRNA 表达水平的相关性分析

Fig 2 Correlation analysis between GCF cfDNA concentration at sampling sites and mRNA expression levels of core molecules of cGAS-STING signaling pathway in gingival tissue

2.5 GCF cfDNA 对 HGFs 表达 cGAS-STING 信号通路核心分子的影响

与对照组相比，健康组、牙周炎组 GCF 来源 cfDNA 刺激 HGFs 细胞 48 h，cGAS 和 p-STING 的蛋白表达水平升高，STING 的蛋白水平无明显

变化 (图 3A)，同时可显著上调 cGAS、STING、IKK、NF-κB p65 及促炎细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达 ($P<0.05$)，其中牙周炎组 IKK、TNF-α 的 mRNA 表达高于健康组 ($P<0.05$) (图 3B~H)。



A: cGAS、STING、p-STING的蛋白表达; B-H: 分别为cGAS、STING、IKK、NF-κB p65及下游细胞因子IL-1β、IL-6、TNF-α的mRNA相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图3 GCF来源cfDNA对HGFs表达cGAS-STING信号通路核心分子的影响

Fig 3 Influence of GCF-derived cfDNA on the core molecules of cGAS-STING signaling pathway expressed by HGFs

3 讨论

先天免疫系统是宿主抵抗病原微生物的第一道防线,需要模式识别受体与分子模式的相互识别来启动^[18]。既往研究^[4,19-21]表明:体液中微生物及宿主细胞来源的cfDNA可识别多种核酸感受器(如cGAS、AIM2、TLR9)激活先天免疫,从而在机体抵抗微生物、自身免疫性疾病、肿瘤免疫等多种生理及病理过程中发挥作用。有研究^[22]发现:类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者的滑膜液及血清样本中cfDNA水平与关节炎反应、RA疾病活动性之间存在强正相关性。随后通过建立胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)小鼠模型发现: CIA小鼠滑膜液中的cfDNA水平和促炎细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF)水平均较健康小鼠高;与未经处理的CIA小鼠相比,经bDNA模拟物低甲基化胞嘧啶磷酸鸟苷刺激的小鼠关节表面骨吸收更多,骨密度更低;而使用cfDNA清除剂可显著抑制关节炎,并有

效保护关节软骨和骨。课题组前期研究^[8,23]也证实:牙周炎微环境中的cfDNA具有促进牙槽骨炎症性骨吸收的作用,使用cfDNA清除剂G3[®]SeHANs可显著抑制牙周炎症和牙槽骨破坏。研究^[24]表明,随着年龄增长,机体的慢性炎症反应加剧,会导致cfDNA水平升高。本研究结果发现:牙周炎组的年龄显著高于健康组,且年龄与cfDNA浓度呈正相关性,这可能是2组cfDNA水平差异的一个因素。另有研究^[25]表明, BMI较高的人群的慢性炎症会增加细胞凋亡和坏死,从而释放更多的cfDNA。本研究结果发现:健康组及牙周炎组的BMI差异无统计学意义,说明2组纳入者的健康营养状况基本相同。牙周炎患者GCF中的cfDNA浓度显著高于对照组,且与全口平均PLI、BI、PD、CAL和取样位点平均PLI、BI、PD、CAL之间均呈强正相关性。牙周炎龈下微环境中bDNA显著升高,且炎症导致宿主细胞死亡,造成胞质DNA、mtDNA、NETs等释放,牙周局部微环境中的cfDNA随着疾病的进程异常积累^[5-7],可能放大先天免疫反应,与牙周炎的发病机制密切相关。有学

者^[26]发现慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 患者的中性粒细胞在香烟烟雾刺激下具有更强的释放 NETs 的能力, 且含有更高比例的 mtDNA 和高水平的氧化损伤 DNA (NETs-DNA), NETs-DNA 促进了人气道上皮细胞增殖、NF- κ B 相关细胞因子和 IFNs 的表达及分泌, 并促进人树突状细胞成熟。这些效应在沉默或抑制 DNA 传感器 cGAS 或 TLR9 后缓解或逆转。随后使用 cGAS^{-/-}、TLR9^{-/-} 基因敲除小鼠在体内阻断 NETs-DNA 的感应、使用 mitoTEMPO 抑制 NETs 生成、使用 DNase I 降解 NETs, 均可降低经香烟烟雾诱导的 COPD 小鼠模型中 NETs 的浸润、NF- κ B 相关炎症因子的表达, 缓解其气道炎症、气流受限和肺气肿程度。综上, cfDNA 可能是牙周炎免疫炎症反应的重要刺激物, cfDNA 及其相关信号通路可作为拮抗靶点, 用于开发疾病治疗的新手段。

cGAS 是一种细胞质 DNA 感受器, 可识别来自病原体等外来入侵者及宿主自身 DNA, 催化合成其第二信使 2'3'-环鸟苷酸-腺苷酸 (cyclic GMP-AMP dinucleotide, 2'3'-cGAMP), 后者可以直接激活内质网膜上的 STING, 使其发生构象变化。活化的 STING 可以诱发多样化的下游通路, 包括 TBK1-IRF3 信号轴活化、激活 NF- κ B、诱导自噬及细胞死亡等, 在免疫炎症反应中扮演重要角色^[27]。Ma 等^[28]研究发现, 卡波西肉瘤相关疱疹病毒中的病毒干扰素调节因子 1 可以直接结合 cGAS, 阻止 STING 与 TBK1 相互作用, 从而抑制 STING 磷酸化和伴随的 IFN- β 产生, 继而抑制 DNA 感应途径。STING 在动脉粥样硬化中也发挥重要作用。有学者^[29]发现与野生型小鼠相比, 西方饮食喂养的载脂蛋白 E 缺陷 (ApoE^{-/-}) 小鼠中 STING 表达和 DNA 损伤标志物, 如 γ -H2AX、p53 和单链 DNA 均显著增加; 与对照组相比, ApoE^{-/-} 小鼠中 STING 缺失减少了主动脉弓的动脉粥样硬化病变程度、斑块中脂质和巨噬细胞的积聚、主动脉炎症分子的表达, 使用特异性抑制剂 C-176 阻断 STING 可改善 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的形成。目前 cGAS-STING 信号通路在牙周炎炎症调节机制中的作用仍未被充分探究。免疫组化法检测牙龈组织中 STING 的结果显示: 与健康者相比, 牙周炎患者牙龈结缔组织层存在强烈的 STING 积累^[30], 然而样本量过少 (每组 1 例), 且未对 cGAS 进行分析。最近研究^[26]表明: 使用牙龈卟啉单胞菌处理 HGFs 细胞后, cGAS、STING 的蛋白相对

表达量显著升高, 且 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- β 的 mRNA 表达显著升高, 此外与野生型小鼠相比, 使用 STING 抑制剂的牙周炎小鼠的炎症细胞因子和破骨细胞形成显著降低。有学者^[31]将牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡 (Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles, Pg-OMVs) 与血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 共培养后发现, Pg-OMVs 通过激活 cGAS-STING-TBK1 通路抑制 ECs 的迁移和成骨分化。另有学者^[5,32]发现脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可以通过激活 cGAS-STING 信号通路从而诱导 M1 巨噬细胞发生极化, 而胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor-2, IGF2) 可以下调 cGAS、STING、p65 的磷酸化, 从而抑制 M1 巨噬细胞极化, 促进小鼠牙周炎模型的成骨。本研究发现 GCF cfDNA 水平在牙周健康者和牙周炎患者中存在差异, 升高的 cfDNA 是否可触发牙周组织 HGFs cGAS-STING 信号通路, 引起细胞炎症反应并进一步破坏牙周稳态, 该问题值得深入研究。本研究结果显示: 牙周炎组牙龈组织取样位点的 cfDNA 浓度显著高于对照组, 同时, 牙周炎组牙龈组织中 cGAS、STING 及其下游 IKK、NF- κ B p65、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的基因表达水平显著升高, 且免疫荧光结果显示牙周炎组牙龈组织 cGAS、STING、p-STING 与 HGFs 标志物 FSP-1 的荧光共定位面积百分比显著高于健康组, 提示: 牙周炎症状态下 GCF cfDNA 异常积累, 并可能通过激活 HGFs 中的 cGAS-STING 信号通路进一步促进牙周组织炎症反应。

HGFs 是牙龈结缔组织中的主体细胞, 在牙周组织修复中起着重要作用^[31]。近年的单细胞测序研究^[33]提示: HGFs 通过表达多种趋化因子配体和模式识别受体, 与免疫细胞之间发生大量的交互影响, 与进行性、破坏性牙周免疫反应有关, 在牙周免疫稳态的调控中扮演重要作用。为研究 GCF 中升高的 cfDNA 是否激活 HGFs 的 cGAS-STING 信号通路, 本实验将健康组和牙周炎组来源的 cfDNA 经 lipo3000 刺激至 HGFs, 结果显示: 与对照组相比, 健康组或牙周炎组 GCF 来源 cfDNA 刺激 HGFs 细胞后, 细胞 cGAS、p-STING 的蛋白表达呈上升趋势。且健康组或牙周炎组 GCF 来源的 cfDNA 刺激 HGFs 细胞可显著上调 cGAS、STING、IKK、NF- κ B p65 及促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达, 其中 IKK、TNF- α 的 mRNA 表达在牙周炎组高于健康组。提示: GCF 中 cfDNA 可能通过激活 cGAS-STING 信号通路,

诱导HGFs细胞放大牙周组织局部炎症反应。GCF cfDNA在牙周微环境中调控免疫炎症反应的具体机制值得未来进一步探索。

综上所述, 本研究表明牙周炎患者GCF中的cfDNA水平与牙周临床指标呈强正相关, 牙周炎患者牙龈组织中cGAS-STING信号通路相关分子表达上调, GCF cfDNA通过激活cGAS-STING信号通路诱导HGFs细胞发生炎症反应。然而cfDNA激活的cGAS-STING信号通路在牙周疾病过程中的具体作用机制仍需要通过体外和体内实验进一步研究, 这将为牙周病的防治提供新的思路和策略。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 30-44.
- [2] Olive C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2012, 11(2): 237-256.
- [3] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [4] Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(5): 795-799.
- [5] Nakamura A, Zeng F, Nakamura S, et al. Macrophage migration inhibitory factor drives pathology in a mouse model of spondyloarthritis and is associated with human disease[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(620): eabn0903.
- [6] Govindarajan S, Veeraraghavan VP, Dillibabu T, et al. Oral cavity—A resilient source for DNA sampling[J]. *J Contemp Dent Pract*, 2022, 23(1): 1-2.
- [7] Silva LM, Doyle AD, Greenwell-Wild T, et al. Fibrin is a critical regulator of neutrophil effector function at the oral mucosal barrier[J]. *Science*, 2021, 374(6575): eabl5450.
- [8] Huang H, Pan W, Wang Y, et al. Nanoparticulate cell-free DNA scavenger for treating inflammatory bone loss in periodontitis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5925.
- [9] Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 657-674.
- [10] Cai X, Chiu YH, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(2): 289-296.
- [11] Tumburu L, Ghosh-Choudhary S, Seifuddin FT, et al. Circulating mitochondrial DNA is a proinflammatory DAMP in sickle cell disease[J]. *Blood*, 2021, 137(22): 3116-3126.
- [12] Ouyang W, Wang S, Yan D, et al. The cGAS-STING pathway-dependent sensing of mitochondrial DNA mediates ocular surface inflammation[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 371.
- [13] Tian X, Liu C, Wang Z. The induction of inflammation by the cGAS-STING pathway in human dental pulp cells: a laboratory investigation[J]. *Int Endod J*, 2022, 55(1): 54-63.
- [14] 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 Clin Periodontol*, 2018, 45 Suppl 20: S1-S8.
- [15] 孟焕新, 牙周病学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2020.
- [16] Meng HX. Periodontology[M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020.
- [17] Wassall RR, Preshaw PM. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid[J]. *Periodontol 2000*, 2016, 70(1): 65-79.
- [18] Deng J, Pan W, Ji N, et al. Cell-Free DNA promotes inflammation in patients with oral lichen planus via the STING pathway[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 838109.
- [19] Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition[J]. *Cell*, 1997, 91(3): 295-298.
- [20] He X, Wedn A, Wang J, et al. IUPHAR ECR review: the cGAS-STING pathway: novel functions beyond innate immune and emerging therapeutic opportunities[J]. *Pharmacol Res*, 2024, 201: 107063.
- [21] Chen C, Xu P. Cellular functions of cGAS-STING signaling[J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(8): 630-648.
- [22] Kumar V. The trinity of cGAS, TLR9, and ALRs guardians of the cellular galaxy against host-derived self-DNA [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 624597.
- [23] Wang Z, Zhang C, Meng J, et al. A targeted exosome therapeutic confers both CfDNA scavenging and macrophage polarization for ameliorating rheumatoid arthritis

- [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(48): e2302503.
- [23] Chen X, Huang H, Guo C, et al. Controlling alveolar bone loss by hydrogel-based mitigation of oral dysbiosis and bacteria-triggered proinflammatory immune response[J]. *Adv Funct Mater*, 2024, 35(3): 2409121.
- [24] Li X, Li C, Zhang W, et al. Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 239.
- [25] Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance[J]. *Sci Adv*, 2016, 2(3): e1501332.
- [26] Bi R, Yang Y, Liao H, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces an inflammatory response via the cGAS-STING signaling pathway in a periodontitis mouse model[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1183415.
- [27] Zhang Z, Zhou H, Ouyang X, et al. Multifaceted functions of STING in human health and disease: from molecular mechanism to targeted strategy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 394.
- [28] Ma Z, Jacobs SR, West JA, et al. Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(31): E4306-E4315.
- [29] Pham PT, Fukuda D, Nishimoto S, et al. STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases[J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(42): 4336-4348.
- [30] Elmanfi S, Yilmaz M, Ong WWS, et al. Bacterial cyclic dinucleotides and the cGAS-cGAMP-STING pathway: a role in periodontitis[J]. *Pathogens*, 2021, 10(6): 675.
- [31] Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva[J]. *Periodontol 2000*, 2000, 24: 28-55.
- [32] Aral K, Berdeli E, Cooper PR, et al. Differential expression of inflammasome regulatory transcripts in periodontal disease[J]. *J Periodontol*, 2020, 91(5): 606-616.
- [33] Williams DW, Greenwell-Wild T, Brenchley L, et al. Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity[J]. *Cell*, 2021, 184(15): 4090-4104.e15.

(本文编辑 李彩)

《美学区贴面修复中的定深与控厚》出版发行

书籍名称：美学区贴面修复中的定深与控厚

主编：于海洋

出版社：人民卫生出版社

内容简介：瓷贴面临床操作的难点为如何控制深度使之足够且能位于牙釉质内。本书基于目标修复体空间理论，首次提出了数字引导的瓷贴面定深与控厚方式，介绍了瓷贴面预备深度与瓷贴面厚度的精准设计与控制，从而实现瓷贴面的精准微创修复。本书从术前分析设计到术中临床实施，系统且详细地讲解了瓷贴面修复定深与控厚的相关理论与关键技术。根据瓷贴面修复的临床流程，内容分为瓷贴面修复的术前分析设计、牙体预备的深度控制与牙釉质保存、牙体预备后深度实测、瓷贴面修复体控厚等部分，每个部分都包括了关键技术的理论讲解与实例讲解。例如牙体预备阶段，结合临床病例，图文并茂地讲解了不同引导方式下牙体预备的深度控制与牙釉质保存；从引导方式、预备体、车针切磨系统、量具等多个要素系统讲解了瓷贴面牙体预备深度控制关键要素的相互影响、共同作用。

