

基础治疗对重度牙周炎患者龈沟液内中性粒细胞胞外诱捕网形成的影响研究

付岚清 郝新宇 钱文博 孙颖

南京医科大学附属口腔医院牙周病科 口腔疾病研究与防治国家级重点实验室培育建设点
江苏省口腔转化医学工程研究中心, 南京 210029

[摘要] **目的** 探讨基础治疗对重度牙周炎患者龈沟液(GCF)内中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)水平的影响,并分析影响NETs形成的因素。**方法** 纳入Ⅲ~Ⅳ期牙周炎患者31例,初诊及基础治疗后6~8周,记录牙周临床指标菌斑指数(PLI)、牙龈指数(GI)、探诊深度(PD)和临床附着丧失(CAL),采用免疫荧光技术检测GCF内NETs水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测龈下非附着菌斑中总菌、牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)、伴放线菌团聚杆菌(*A. actinomycetemcomitans*)和中间普雷沃菌(*P. intermedia*)数量,酶联免疫吸附试验检测GCF中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-8(IL-8)水平,并分析NETs水平与上述指标的关联性。**结果** 基础治疗后,GCF内NETs水平,PLI、GI、PD、CAL等牙周临床指标,总菌、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*及*P. intermedia*数量,IL-8及TNF- α 水平均显著下降($P<0.05$)。GCF内NETs水平与PLI、GI、PD、CAL、TNF- α 、IL-8水平,总菌和*P. gingivalis*数量存在高度正相关性($P<0.05$)。**结论** 基础治疗能降低重度牙周炎患者GCF中的NETs水平,后者的形成可能与*P. gingivalis*数量和GCF中TNF- α 、IL-8水平相关。

[关键词] 牙周炎; 基础治疗; 龈沟液; 中性粒细胞胞外诱捕网

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2024162



本文链接 开放科学标识码

Effects of initial periodontal therapy on the formation of neutrophil extracellular traps in gingival crevicular fluid in patients with severe periodontitis

Fu Lanqing, Hao Xinyu, Qian Wenbo, Sun Ying

Dept. of Periodontology, The Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University & State Key Laboratory Cultivation Base of Research, Prevention and Treatment for Oral Diseases & Jiangsu Province Engineering Research Center of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029, China

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20231268); Jiangsu Province Capability Improvement Project through Science, Technology and Education, Jiangsu Provincial Research Hospital Cultivation Unit (YJX-YYJSDW4); Jiangsu Provincial Medical Innovation Center (CXZX202227)

Correspondence: Sun Ying, E-mail: ebolasun@njmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** This study aimed to observe the effects of initial periodontal therapy on the level of neutrophil extracellular traps (NETs) in gingival crevicular fluid (GCF) of patients with severe periodontitis and to analyze the factors related to the formation of NETs. **Methods** Thirty-one patients with stage III–IV periodontitis were recruited. Clinical periodontal parameters, including plaque index (PLI), gingival index (GI), probing depth (PD), and clinical attachment loss (CAL), were recorded before and 6–8 weeks after initial periodontal therapy. Levels of NETs in GCF were detected by immunofluorescence staining. Quantities of total bacteria, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingi-*

[收稿日期] 2024-04-24; **[修回日期]** 2024-08-06

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20231268); 江苏省科教能力提升工程——江苏省研究型医院(YJXYYJSDW4); 江苏省医学创新中心(CXZX202227)

[第一作者] 付岚清, 住院医师, 硕士, E-mail: 2577334820@qq.com

[通信作者] 孙颖, 教授, 博士, E-mail: ebolasun@njmu.edu.cn

cal periodontal parameters, including plaque index (PLI), gingival index (GI), probing depth (PD), and clinical attachment loss (CAL), were recorded before and 6–8 weeks after initial periodontal therapy. Levels of NETs in GCF were detected by immunofluorescence staining. Quantities of total bacteria, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingi-*

valis), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) and *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) in unattached subgingival plaque were determined by real-time quantitative PCR, and levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8) in GCF were explored by enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, the correlations between the level of NETs and the above indicators were analyzed. **Results** After initial periodontal therapy, the level of NETs in GCF, PLI, GI, PD, and CAL; quantities of total bacteria, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, and *P. intermedia*; and levels of IL-8 and TNF- α significantly decreased ($P < 0.05$). We observed strong positive correlations between the level of NETs and PLI, GI, PD, CAL, the amount of total bacteria, *P. gingivalis*, TNF- α , and IL-8 ($P < 0.05$). **Conclusion** Initial periodontal therapy might decrease the level of NETs in GCF from patients with severe periodontitis, which might be positively correlated with the quantities of *P. gingivalis* and the levels of TNF- α and IL-8 in GCF.

[Key words] periodontitis; initial periodontal therapy; gingival crevicular fluid; neutrophil extracellular trap

牙周炎是一种微生物相关, 宿主介导并导致牙周附着丧失的炎症^[1]。牙周支持组织破坏是包括牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)、伴放线菌团聚杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomitans*) 和中间普雷沃菌 (*Prevotella intermedia*, *P. intermedia*) 在内的牙周致病菌的直接破坏和宿主的免疫损伤共同作用的结果。中性粒细胞是抵御牙周致病菌入侵的重要防线, 其过度活化在牙周免疫破坏中发挥了重要作用^[2]。

2004年, Brinkmann等^[3]发现了一种新的杀菌方式, 即中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs), 它是一种以DNA为骨架, 镶嵌弹性蛋白酶、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、组织蛋白酶G等多种抗菌颗粒蛋白的胞外纤维网状结构, 可捕获并杀死入侵致病微生物。NETs参与了牙周炎的发生发展过程。Jiang等^[4]在龈上菌斑生物膜中检测到了NETs, Vitkov等^[5]通过扫描电镜观察证实牙周炎患者的龈沟液 (gingival crevicular fluid, GCF) 中存在NETs。Magán-Fernández等^[6]在牙周炎患者和龈炎患者的牙龈组织中均检测到了NETs, 并发现龈炎患者的NETs数量更多, 可能与炎症急性期有关。龈沟/牙周袋是中性粒细胞抵御牙周致病菌入侵的前沿, 其内的NETs可直接捕获, 并清除入侵致病微生物, 控制牙周感染, 与牙周免疫炎症反应的关系更为密切^[7]。目前, 关于牙周炎患者GCF中NETs水平的研究仍不充分。

本研究拟观察牙周基础治疗前后, III~IV期牙周炎患者GCF中NETs水平的变化, 并评估后者与牙周临床指标、龈下菌斑中*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*等牙周致病菌数量, 以及GCF肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-

8) 水平的相关性, 以明确基础治疗对GCF中NETs形成的影响以及与NETs水平相关的临床与微生物学因素。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

标准菌株*P. gingivalis* ATCC 33277、*A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523和*P. intermedia* ATCC 25611由口腔疾病研究与防治国家级重点实验室培育建设点保种并提供。脑心浸液 (brain heart infusion, BHI) 培养基 (Gibco Life Sciences公司, 美国), DNA提取试剂盒及PCR反应相关试剂 (Takara Biotechnology公司, 日本), TaqMan探针及PCR引物 (南京骥骜生物技术有限公司), IL-8、TNF- α 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海爱必信生物科技有限公司), 抗MPO抗体 (Abcam Plc公司, 美国), ACLAR (Honeywell International公司, 美国)。

1.2 样本纳入

本研究经南京医科大学附属口腔医院伦理委员会批准 (批准号: PJ 2022-176-001), 并取得所有纳入者知情同意。纳入2022年5月—2023年12月于南京医科大学附属口腔医院牙周病科就诊的III~IV期牙周炎患者31例。牙周炎诊断标准依据2018年牙周病和植体周病国际新分类, 具体如下: 1) 口内留存牙 ≥ 20 颗; 2) 6个月内未行牙周治疗; 3) 3个月内未服用非甾体类抗炎药或抗生素; 4) 没有与牙周炎相关的系统性疾病, 如糖尿病、高血压、类风湿性关节炎等; 5) 不在正畸治疗期间; 6) 无吸烟史; 7) 非妊娠或哺乳期妇女。采样牙纳入标准为: 1) PD ≥ 5 mm; 2) 无龋齿或牙颈部非龋性缺损; 3) 无冠修复体或充填体; 4) 邻

牙及采样牙无扭转、错位。

1.3 临床检查

初诊时,记录性别、年龄等一般信息,拍摄全口曲面体层片。初诊及基础治疗后6~8周,进行全口牙周检查,记录牙周临床指标,包括菌斑指数(plaque index, PLI)、牙龈指数(gingival index, GI)、探诊深度(probing depth, PD)和临床附着丧失(clinical attachment loss, CAL)。所有受试者接受牙周基础治疗,包括口腔卫生指导、龈上洁治、龈下刮治及根面平整。PLI根据牙面菌斑的厚度记分而不根据菌斑覆盖面积记分:0=龈缘区无菌斑;1=龈缘区的牙面有薄的菌斑,但视诊不可见,若用探针尖的侧面可刮出菌斑;2=在龈缘或邻面可见中等量菌斑;3=龈沟内或龈缘区及邻面有大量菌斑。GI:0=牙龈健康;1=牙龈轻度炎症:牙龈的色有轻度改变并轻度水肿,探诊不出血;2=牙龈中等炎症:牙龈色红,水肿光亮,探诊出血;3=牙龈严重炎症:牙龈明显红肿或有溃疡,并有自动出血倾向。

1.4 样本收集

初诊及基础治疗后6~8周,采集龈沟内NETs,方法^[8]如下:将预涂聚d-赖氨酸的ACLAR膜裁剪为1.5 mm×15 mm。选取牙周袋宽而深的2个位点采集NETs。采样前,棉卷隔湿采样区域,去除大块龈上牙石,将ACLAR条带插入牙周袋底,直至感觉轻微阻力,放置30 s取出,置于4%多聚甲醛中,4℃保存备用。在全口余留位点中,纸捻法采集PD≥5 mm的18个位点的龈下非附着菌斑及GCF, -80℃保存备用。

1.5 GCF中NETs的免疫荧光检测

将ACLAR膜用4%多聚甲醛固定20 min, 0.5% TritonX-100透化20 min; 2%BSA封闭30 min; 加入抗人MPO抗体(1:300), 4℃孵育过夜,加入Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔荧光二抗(1:100), 室温避光孵育2~3 h,加入DAPI染色液,避光孵育2 min,加入抗荧光猝灭剂后,荧光显微镜下观察NETs结构,随机挑选5个视野,计算每个视野中形成NETs的细胞占视野内总细胞数的百分比。

1.6 总菌、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*和*P. intermedia*数量的检测

将对数生长期的*P. gingivalis* ATCC 33277、*A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523和*P. intermedia* ATCC 25611接种至BHI液体培养基中增菌24~72 h,收集(1.0~5.0)×10⁹ CFU细菌,提取16S

rDNA,用于实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)标准曲线制备。从龈下非附着菌斑样本中提取16S rDNA,采用TaqMan探针法定量总菌、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*和*P. intermedia*数量。qPCR反应过程如下:95℃、30 s预变性;95℃、5 s;60℃、30 s;50℃冷却30 s,共40个循环。所用探针和引物序列见表1。

1.7 TNF-α与IL-8的测定

GCF样本复温后,根据ELISA试剂盒检测说明书,加入300 μL样本稀释液,12 000 r/min 4℃离心15 min,取上清液,检测450 nm波长下OD值,计算样本中TNF-α和IL-8水平。

1.8 统计学分析

采用SPSS 24.0软件进行统计分析。qPCR结果对数转换后进行统计,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用配对*t*检验比较治疗前后各指标的差异。采用Spearman相关性分析,分析GCF中的NETs水平和牙周临床指标、牙周致病菌数量以及TNF-α、IL-8水平的相关性。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基础治疗前后牙周临床指标的变化

本研究共纳入31例Ⅲ~Ⅳ期牙周炎患者,平均年龄38.9岁,其中男性18例,女性13例。牙周基础治疗后,采样牙牙周临床指标PLI、GI、PD和CAL均比治疗前显著下降(*P*<0.05,表2)。

2.2 GCF内NETs水平的变化

免疫荧光染色可见胞外DNA纤维网状结构(蓝色),MPO阳性染色蛋白镶嵌其中(绿色),表明NETs形成(图1A)。治疗前形成的NETs数量更多,NETs形成细胞百分比由治疗前的54.10%降为治疗后的17.51%(*P*<0.01,图1B)。

2.3 龈下非附着菌斑中的总菌、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*和*P. intermedia*的定量检测

从龈下非附着菌斑中提取16S rDNA, qPCR检测发现,牙周基础治疗后,患者龈下非附着菌斑中总菌、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*和*P. intermedia*数量均显著低于治疗前(*P*<0.05,图2)。

2.4 GCF中TNF-α及IL-8水平的变化

ELISA检测显示,治疗前,TNF-α水平为(48.16±13.54) pg/mL,IL-8水平为(2 634.94±

856.95) pg/mL; 治疗后, TNF- α 水平为 (35.01 \pm 7.68) pg/mL, IL-8水平为 (543.56 \pm 253.85) pg/mL, 两种细胞因子水平均显著下降 ($P<0.05$, 图3)。

表 1 PCR 探针及引物序列

Tab 1 Sequences of probes and primers for PCR

项目	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
总菌	FJ: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 495
	RJ: ACGGCTACCTGTTCAGACTT	
	F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT	
	R: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
	P: FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-MGB	
<i>P. gingivalis</i>	FJ: CAGCTTGCCATACTGCG	404
	RJ: ACTGTTAGCAACTACCGATGT	
	F: TACCCATCGTCGCTTGGT	
	R: CGGACTAAAACCGCATACACTTG	
	P: FAM-ATTATAGCTGTAAGATAGGC-MGB	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	FJ: ATGCCAACTTGACGTTAAAT	102
	RJ: AAACCCATCTCTGAGTCTTCTTC	
	F: TTGATCGTGCGAGAATGCTT	
	R: ATCGCCGTTATAACCAAATTTCTT	
	P: FAM-AGGAATACTCGAAACGC-MGB	
<i>P. intermedia</i>	FJ: TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG	65
	RJ: TCAACATCTCTGTATCCTGCGT	
	F: TCCACCGATGAATCTTTGGTC	
	R: ATCCAACCTTCCCTCCACTC	
	P: FAM-CGTCAGATGCCATATGTGGACAACATCG-MGB	
		103

注: FJ、RJ用于鉴定 16s rDNA, F、R用于qPCR, P为探针。

表 2 治疗前后牙周临床指标的变化

Tab 2 Changes in clinical periodontal parameters before and after initial periodontal therapy $\bar{x}\pm s$

时间	PLI	GI	PD/mm	CAL/mm
治疗前	2.46 \pm 0.25	2.53 \pm 0.26	7.33 \pm 0.18	5.67 \pm 0.22
治疗后	1.17 \pm 0.21*	1.18 \pm 0.24*	5.02 \pm 0.19*	3.15 \pm 0.17*

注: * $P<0.05$ 。

2.5 相关性分析

Spearman 相关性分析发现, 治疗前 GCF 内 NETs 水平与采样牙周临床指标 PLI、GI、PD、CAL, GCF 中 TNF- α 、IL-8 水平、总菌和 *P. gingivalis* 数量存在高度正相关性 ($1>r>0.6, P<0.05$), 与 *A. actinomycetemcomitans* 数量 ($0.6<r<1, P>0.05$)、*P. intermedia* ($0<r<0.2, P>0.05$) 数量无相关性。Spearman 相关性分析结果见表3。

3 讨论

NETs 作为中性粒细胞的主要杀菌机制之一, 在牙周炎的发生发展中发挥了重要作用。本研究揭示了 III~IV 期牙周炎患者基础治疗后 GCF 中 NETs 水平的变化, 并发现后者可能与采样牙 PD、CAL、

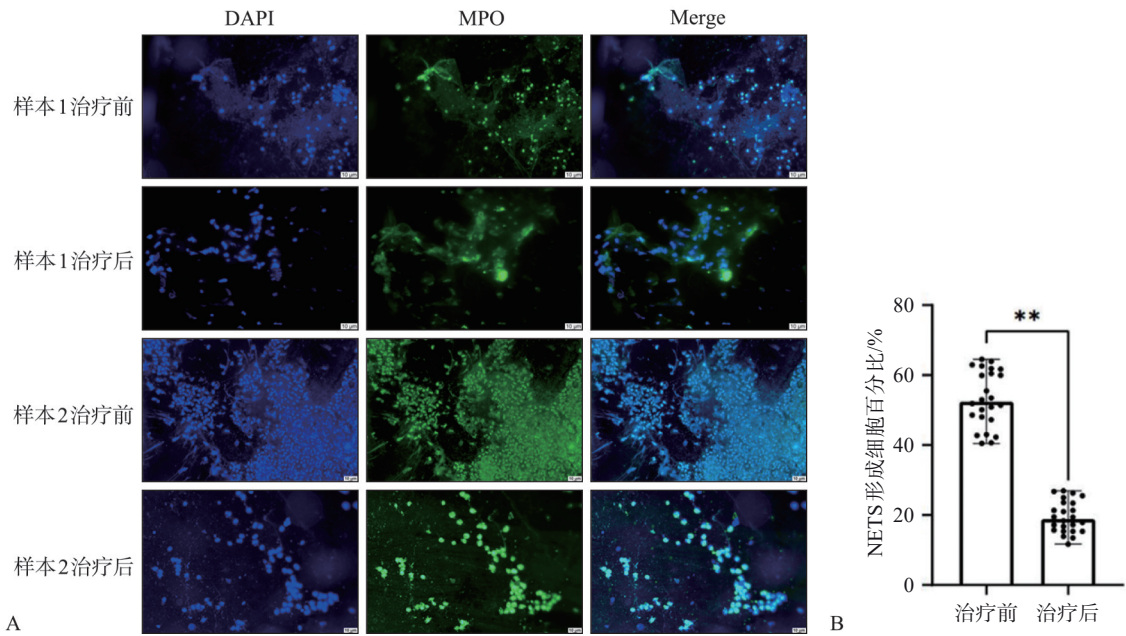
PLI、GI 等牙周临床指标, GCF 中 IL-8、TNF- α 水平及 *P. gingivalis* 数量相关。

NETs 的检测方法主要包括: 1) 免疫细胞组织学检测, 共定位胞外 DNA、MPO、瓜氨酸化组蛋白等; 2) qPCR 检测外周血、唾液中的无细胞 DNA、DNA-MPO 复合物等; 3) 流式细胞学检测 NETs 组件, 如 MPO 和瓜氨酸化组蛋白等^[9]。免疫细胞学检测是最经典的方法^[5]。有学者^[10]收集了牙周炎患者和牙龈炎患者的牙龈组织, 并对牙龈中瓜氨酸化组蛋白或 MPO 进行免疫组化染色, 共定位 NETs, 但牙龈收集有一定创伤, 染色特异性尚待进一步研究。血清或组织液中的无细胞 DNA 并非 NETs 所独有^[11], 而 MPO-DNA 复合物滴度与 NETs 形成速率相关, 可能影响 ELISA 检测准确度^[12]。流式细胞术仅能检测 MPO-瓜氨酸化组蛋白共定位的 NETs, 不同刺激物诱导的 NETs 组分存在差异, MPO 或瓜氨酸化组蛋白含量较低的 NETs 可能难于检测^[13]。因此, 上述检测均存在一定局限性。

NETs 非常脆弱, 纸捻法收集 GCF 或化脓性龈沟渗出物时, NETs 可能附着于纸捻纤维素, 因而无法完整转移到多聚赖氨酸覆盖的表面^[14]。本研

究采用的 ACLAR 膜可检测牙周袋内的 NETs，后者与外周血/唾液中的 NETs 相比能更好地反应牙周组织免疫炎症反应的变化。ACLAR 膜是一种共聚物薄膜，自身不产生荧光，且能耐受化学和高温损伤，涂布多聚赖氨酸后能用于采集，并使用免疫荧光技术检测 GCF 中的 NETs^[8]。但使用 ACLAR

膜进行采样时，对牙周袋宽度和深度有一定要求，因此纳入患者均为 III~IV 期牙周炎，以获得宽而深的牙周袋，便于插入 ACLAR 膜。如何采集浅袋或窄袋内的 NETs，还需进一步摸索采样方法，或改良 ACLAR 膜的物理性能。



A: 代表性的 NETs 免疫荧光检测，标尺为 10 μm；B: 治疗前后 NETs 形成细胞百分比的比较。**P<0.01。

图 1 GCF 内 NETs 水平的免疫荧光检测

Fig 1 NETs in GCF detected by immunofluorescence assay

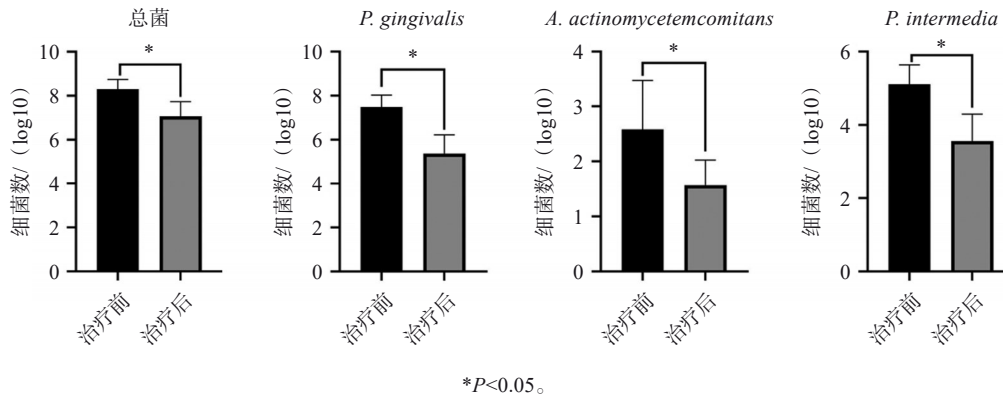


图 2 基础治疗前后总菌、P. gingivalis、A. actinomycetemcomitans 和 P. intermedia 数量的比较

Fig 2 Changes in the quantities of total bacteria, P. gingivalis, A. actinomycetemcomitans and P. intermedia before and after initial periodontal therapy

P. gingivalis 与 NETs 形成密切相关，除了激活经典的 NADPH 氧化酶，还可分泌包括牙龈素在内的半胱氨酸蛋白酶，诱导 NETs 形成^[15]。*A. actinomycetemcomitans* 的毒力因子 LTX 能溶解白细胞，并诱导中性粒细胞迁移、脱颗粒和形成 NETs^[16]。*P. intermedia* 同样可通过激活 NADPH 氧化酶，诱导 NETs 形成^[17]。但本研究仅发现，NETs 水平与 *P. gingivalis* 数量存在较强相关性，而与 *A. actinomy-*

cetemcomitans 和 *P. intermedia* 数量的相关性不明显。Gonçalves 等^[18]认为，*A. actinomycetemcomitans* 检出率与取样位点的炎症程度无明显相关性。研究^[19]报道，中国牙周炎患者的 *A. actinomycetemcomitans* 检出率为 48.3%，与牙周健康者没有显著差异，且含 LTX 的 *A. actinomycetemcomitans* 高毒株携带率较低^[20]。Liu 等^[21]比较了基础治疗前后汉族牙周炎患者的龈下菌斑组成，结果发现 *A. acti-*

nomycetemcomitans 分布及相对丰度均维持在较低水平。以上证据提示, 中国人群龈下菌斑中的 *A. actinomycetemcomitans* 数量可能并不能很好地反映牙周局部炎症, 这也许是 *A. actinomycetemcomitans* 数量与 NETs 相关性不明显的原因。 *P. intermedia* 不是红色复合体成员, 而后者与牙周炎的关系更为紧密, 这也可能与本研究未发现 *P. intermedia* 与 NETs 水平的相关性有关。还需要纳入更多样本和更长时间观察, 以进一步验证本研究的结论。

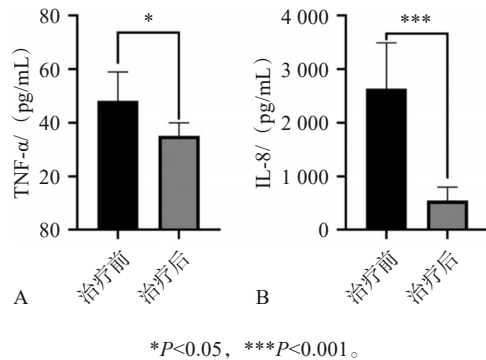


图 3 牙周基础治疗前后 GCF 中 TNF- α 和 IL-8 水平的变化

Fig 3 Changes in the levels of TNF- α and IL-8 in GCF before and after initial periodontal therapy

表 3 NETs 水平与牙周临床指标, TNF- α 、IL-8 水平、总菌、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia* 数量的相关性分析

Tab 3 Correlation analysis between NET levels and periodontal parameters, levels of TNF- α , IL-8 and quantities of total bacteria, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. intermedia*

指标	r	P 值
PLI	0.608	0.012*
GI	0.822	0.023*
PD	0.886	0.019*
CAL	0.893	0.007**
TNF- α	0.833	0.01*
IL-8	0.800	0.009**
总菌	0.748	0.005**
<i>P. gingivalis</i>	0.718	0.006**
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.619	0.102
<i>P. intermedia</i>	0.143	0.76

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

目前, NETs 相关的牙周临床研究多聚焦于牙周炎患者外周血和唾液中的 NETs。Kovalčiková 等^[22]揭示, 牙周炎患者的唾液中, NETs 含量高于健康人, 且与 PD 正相关。Moonen 等^[23]发现, 基础治疗后, 牙周炎患者的血浆降解 NETs 的能力增强, 可能导致患者外周血的 NETs 水平下降。但

White 等^[24]认为, 在相同刺激下, 牙周炎患者和健康人的外周血中性粒细胞释放 NETs 的能力没有差异, 推测外周血 NETs 与牙周炎的关系可能并不密切。龈沟/牙周袋是口腔中性粒细胞 (oral polymorphonuclear neutrophil, oPMN) 的主要聚集地之一, oPMN 的生物学功能可更好地反映牙周炎症状况。相同条件下, oPMN 产生的 NETs 是外周血中性粒细胞的 13 倍^[25]。本研究探讨了基础治疗对 GCF 中 NETs 水平的影响, 后者较全血或唾液中的 NETs 能更好反映牙周炎症水平和局部 oPMN 功能。

TNF- α 是一种重要的促炎因子和骨吸收因子, 可以诱导破骨细胞分化, 促进基质金属蛋白酶、胶原酶等产生。Czerwińska 等^[26]的研究表明, TNF- α /IL-17/IL-23 信号轴的激活能诱导产生 NETs。IL-8 是一种经典的趋化因子, 能诱导中性粒细胞向炎症部位或致病菌入侵部位趋化。Shu 等^[27]发现, IL-8 还能通过 MAPKs 和 NADPH 信号通路, 诱导 NET-s 形成。上述发现与本研究中 NETs 水平可能和 TNF- α 、IL-8 含量相关的结论一致。

综上所述, 牙周基础治疗可通过降低牙周致病菌水平, 减少局部 TNF- α 、IL-8 等细胞因子产生, 降低 GCF 中 NETs 水平, 进而控制牙周免疫炎症反应, 减轻局部组织破坏。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] 孟焕新. 2018 年牙周病和植体周病国际新分类简介[J]. 中华口腔医学杂志, 2019, 54(2): 73-78.
Meng HX. 2018 world new classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions[J]. Chin J Stomatol, 2019, 54(2): 73-78.
- [2] Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities[J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(7): 426-440.
- [3] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663): 1532-1535.
- [4] Jiang QS, Zhao YX, Shui YS, et al. Interactions between neutrophils and periodontal pathogens in late-onset periodontitis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 627328.
- [5] Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, et al. Neutrophil fate in gingival crevicular fluid[J]. Ultrastruct Pathol, 2010, 34(1): 25-30.

- [6] Magán-Fernández A, O'Valle F, Abadía-Molina F, et al. Characterization and comparison of neutrophil extracellular traps in gingival samples of periodontitis and gingivitis: a pilot study[J]. J Periodontol Res, 2019, 54(3): 218-224.
- [7] Wigerblad G, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases [J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(5): 274-288.
- [8] Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, et al. Extracellular neutrophil traps in periodontitis[J]. J Periodontol Res, 2009, 44(5): 664-672.
- [9] Masuda S, Nakazawa D, Shida H, et al. NETosis markers: quest for specific, objective, and quantitative markers[J]. Clin Chim Acta, 2016, 459: 89-93.
- [10] Al-Bakri SMR, Magan-Fernandez A, Galindo-Moreno P, et al. Detection and comparison of neutrophil extracellular traps in tissue samples of peri-implantitis, periodontitis, and healthy patients: a pilot study[J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2024, 26(3): 631-641.
- [11] Goggs R, Jeffery U, LeVine DN, et al. Neutrophil-extracellular traps, cell-free DNA, and immunothrombosis in companion animals: a review[J]. Vet Pathol, 2020, 57(1): 6-23.
- [12] Peng Y, Wu X, Zhang S, et al. The potential roles of type I interferon activated neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome[J]. Arthritis Res Ther, 2022, 24(1): 170.
- [13] Arends EJ, Dam LSV, Kraaij T, et al. A high-throughput assay to assess and quantify neutrophil extracellular trap formation[J]. J Vis Exp, 2019, 143. doi: 10.3791/59150.
- [14] Ghazizadeh M, Sasaki Y, Oguro T, et al. A novel technique for observing the internal ultrastructure of human chromosomes with known karyotype[J]. Microsc Microanal, 2008, 14(4): 357-361.
- [15] Bryzek D, Ciaston I, Dobosz E, et al. Triggering NETosis via protease-activated receptor (PAR)-2 signaling as a mechanism of hijacking neutrophils function for pathogen benefits[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(5): e1007773.
- [16] Hirschfeld J, Roberts HM, Chapple IL, et al. Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin on neutrophil migration and extracellular trap formation[J]. J Oral Microbiol, 2016, 8: 33070.
- [17] Baz AA, Hao HF, Lan SM, et al. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections and evasion strategies[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1357967.
- [18] Gonçalves PF, Klepac-Ceraj V, Huang H, et al. Correlation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* detection with clinical/immunoinflammatory profile of localized aggressive periodontitis using a 16S rRNA microarray method: a cross-sectional study[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e85066.
- [19] He JY, Huang WJ, Pan ZW, et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis[J]. Clin Oral Investig, 2012, 16(6): 1579-1588.
- [20] Tan KS, Woo CH, Ong G, et al. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population[J]. J Clin Periodontol, 2001, 28(9): 886-890.
- [21] Liu GJ, Luan QX, Chen F, et al. Shift in the subgingival microbiome following scaling and root planing in generalized aggressive periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 2018, 45(4): 440-452.
- [22] Kovalčíková AG, Novák B, Roshko O, et al. Extracellular DNA and markers of neutrophil extracellular traps in saliva from patients with periodontitis-a case-control study[J]. J Clin Med, 2024, 13(2): 468.
- [23] Moonen CG, Buurma KG, Faruque MR, et al. Periodontal therapy increases neutrophil extracellular trap degradation[J]. Innate Immun, 2020, 26(5): 331-340.
- [24] White P, Sakellari D, Roberts H, et al. Peripheral blood neutrophil extracellular trap production and degradation in chronic periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 2016, 43(12): 1041-1049.
- [25] Moonen CGJ, Hirschfeld J, Cheng LL, et al. Oral neutrophils characterized: chemotactic, phagocytic, and neutrophil extracellular trap (NET) formation properties[J]. Front Immunol, 2019, 10: 635.
- [26] Czerwińska J, Kasprowicz-Furmańczyk M, Placek W, et al. Changes in tumor necrosis factor α (TNF α) and peptidyl arginine deiminase 4 (PAD-4) levels in serum of general treated psoriatic patients[J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(14): 8723.
- [27] Shu QX, Zhang N, Liu YY, et al. IL-8 triggers neutrophil extracellular trap formation through an nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase- and mitogen-activated protein kinase pathway-dependent mechanism in uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(13): 19.