

正畸模型大鼠磨牙龈沟液 IL-6 水平与其正畸后复发的相关性研究

何党恩¹, 田东源¹, 金红²

(1. 杨凌示范区医院口腔科, 陕西 咸阳 712100; 2. 陕西省核工业二一五医院口腔科, 陕西 咸阳 712000)

【摘要】目的: 探讨正畸模型大鼠磨牙龈沟液白细胞介素-6(IL-6)水平对其正畸后复发的影响。**方法:** 健康雄性6~8周龄Wistar大鼠27只,随机平均分为三组(每组n=9)。空白组(不作任何处理)、正畸1组(正畸力值20g)与正畸2组(正畸力值60g)。根据大鼠牙龈边缘附近菌斑的厚度和量进行菌斑指数(PLI)评分;观察大鼠牙龈炎症、色泽稍变等情况进行牙龈指数(GI)评分;取大鼠磨牙龈沟液,酶联免疫吸附测定法(ELISA)定量检测大鼠龈沟液中IL-6及天冬氨酸氨基转移酶(AST)和碱性磷酸酶(ALP)的水平,Spearmean分析IL-6水平与正畸后复发的相关性。**结果:** 正畸2组与正畸1组大鼠上颌第一磨牙均发生不同程度的近中移动,已成功建立了机械力诱导的大鼠正畸模型,并随着时间的延长移动距离增加。正畸1组与正畸2组实验1d、3d、7d的龈沟液质量、龈沟液IL-6、AST and ALT含量高于空白组,且正畸2组高于正畸1组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。正畸1组与正畸2组实验1d、3d、7d的PLT与GI值、龈沟液AST与ALP含量低于空白组,且正畸2组高于正畸1组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);正畸后大鼠磨牙龈沟液IL-6水平与PLT和GI呈显著负相关($P < 0.05$),与AST和ALP呈显著正相关($P < 0.05$)。**结论:** 大鼠正畸后伴随有磨牙龈沟液IL-6表达水平升高,可能加速其牙周炎的发病,引起牙周组织损伤,形成恶性循环。

【关键词】 大鼠磨牙;龈沟液;正畸;复发;白细胞介素-6

【中图分类号】 R332 **【文献标志码】** A

Correlation between IL-6 levels of gingival crevicular fluid and orthodontic recurrence in orthodontic model

HE Dang-en¹, TIAN Dong-yuan¹, JIN Hong²

(Department of Stomatology, 1. Yangling Demonstration Zone Hospital, Xianyang 712100; 2. NO. 215 Hospital of Shaanxi Nuclear Industry, Xianyang 712000, Shaanxi, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of interleukin-6 (IL-6) level of molar gingival crevicular fluid in orthodontic model rats on its recurrence after orthodontics. **Methods:** 27 healthy male Wistar rats 6~8 weeks old were randomly divided into three groups: blank group (normal rats, without any treatment), orthodontic group 1 (orthodontic model rats, orthodontic force value 20g) and orthodontics 2 groups (orthodontic model rats, orthodontic force value 60g), 9 rats in each group. The plaque index (PLI) score was calculated according to the thickness and amount of plaque near the gingival margin of rats, and the rat gum inflammation and slight color change were observed, and the Gums index (GI) score was evaluated. Rat molar gingival crevicular fluid was obtained, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to quantitatively detect the levels of IL-6 and aspartate aminotransferase (AST) and Alkaline phosphatase (ALP), and Spearmean analysis of the correlation between IL-6 levels and recurrence after orthodontics. **Results:** The first molars of the rats in orthodontic group 1 and orthodontic group 2 had different degrees of near-middle movement, the orthodontic model induced by mechanical force were successfully established, and the moving distance were increased with time. The quality of gingival crevicular fluid, IL-6, AST and ALT content of gingival crevicular fluid in the orthodontic group 1 and orthodontic group 2 at 1d, 3d, 7d were higher than those in the blank group, and the orthodontic group 2 were also higher than the orthodontic group ($P < 0.05$). The PLT and GI, AST and ALT content of gingival crevicular fluid of orthodontic group 1 and the orthodontic group 2 at 1d, 3d, 7d were lower than those of the blank group, and the orthodontic group 2 were also lower than the orthodontic group 1 ($P < 0.05$). After orthodontics, IL-6 levels in rat molar gingival crevicular fluid were significantly negatively correlated with PLT and GI ($P < 0.05$), and significantly positively correlated with AST and ALP ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of IL-6 in gingival crevicular fluid is increased after orthodontic treatment in rats, which may accelerate the pathogenesis of rat periodontitis and cause periodontal tissue damage, thus

forming a vicious circle.

【Key words】 Rat molars; Gingival crevicular fluid; Orthodontics; Recurrence; IL-6

正畸治疗能显著改善患者的外观与口腔功能,但是目前正畸后复发仍是临床上较为棘手的问题,对患者的身心状况有一定的负面影响,同时会对牙周组织产生一定程度的损害^[1]。大鼠正畸后复发的机制比较复杂,过敏和哮喘是影响正畸牙根吸收的危险因素,其中成熟的白介素-17(IL-17)细胞可以分泌并产生 IL-6、IL-17A、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎症因子,通过动员、激活以及募集中性粒细胞等途径有效地介导炎症反应^[1-3]。其中 IL-6 能够单独诱导单核细胞直接向破骨细胞(OC)分化,参与牙周炎导致的骨破坏过程^[4-5]。相关研究^[6]表明:菌斑指数(PLI)、牙龈指数(GI)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和碱性磷酸酶(ALP)均是牙周相关疾病治疗效果及治疗后复发评估的常用指标。因此,本研究通过建立大鼠正畸模型,观察并分析大鼠磨牙龈沟液中 IL-6 的水平,验证大鼠磨牙龈沟液 IL-6 水平对大鼠正畸后复发的影响,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

研究时间为 2018 年 2 月至 2019 年 8 月,健康雄性 6~8 周龄 Wistar 大鼠 27 只,体质量(220±10)g,由西北农林科技大学食品分子营养与健康实验室提供。在 12 h/12 h 光/暗节律的实验环境中习惯性喂养,定饮消毒清水,实验室温度控制在 18~20℃,湿度控制在 50%~60%,室内噪音控制在 <60 dB,所有大鼠均适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 大鼠分组与模型建立

将所有大鼠随机分为三组:空白组、正畸 1 组与正畸 2 组,每组 9 只。正畸 1 组与正畸 2 组均建立正畸模型,空白组不做处理。

建立大鼠正畸模型:大鼠腹腔注射 2% 水合氯醛进行麻醉,麻药的最大用量为 3 mg/kg。麻醉后,将大鼠仰卧放置在手术台上,固定其四肢及头部,防止唾液污染,用开口器尽量打开大鼠口腔,干棉球隔湿。加力装置包括 NiTi 螺旋拉簧(直径 0.12 cm),正畸结扎丝从上颌左侧第一、二磨牙接触点下穿过,并结扎于第一磨牙近中,将 NiTi 螺旋拉簧通过结扎丝固定在预留的小圈上,施加力时使弹簧发生拉伸即可。正畸 1 组与正畸 2 组力值分别为 20 g、60 g,在力的作用下,右侧上颌第一磨牙向近中移动,左侧未经处理,定期适当调磨下切牙长度,减少装置滑脱的风险。

1.3 观察指标

三组大鼠分别于实验 1 d、3 d、7 d 各处死大鼠 3 只,然后进行下列指标的检测。(1)记录牙龈边缘附近菌斑的厚度和量,进行 PLI 四等级评分;观察牙龈炎症、色泽变化等情况,进行 GI 三等级评分。(2)检测大鼠磨牙龈沟液质量变化情况:用酒精棉球轻轻擦拭干净采样部位,分离磨牙近中牙龈沟,将 1 根吸潮纸尖紧沿牙面插入停留 30 s,然后放入 EP 管,间隔 1 min 后再次取样,共 8 次;龈沟液样本自然解冻后加入 100 μ L PBS 液,室温下振荡 1 h 后 4℃,1 000 rpm 离心 10 min。ELISA 定量检测大鼠龈沟液中 IL-6、AST 和 ALP 的水平。

1.4 统计学分析

利用 SPSS 22.00 进行数据处理。计量资料($\bar{x} \pm s$)的两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料[*n*(%)] 的比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 龈沟液质量变化情况对比

正畸 1 组与正畸 2 组实验 1 d、3 d、7 d 的龈沟液质量高于空白组,正畸 2 组也高于正畸 1 组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 三组实验不同时间点的龈沟液质量变化情况对比 ($\bar{x} \pm s$, mg)

组别	1 d	3 d	7 d
正畸 2 组(<i>n</i> = 3)	0.36 ± 0.03 **	0.60 ± 0.03 **	0.61 ± 0.07 **
正畸 1 组(<i>n</i> = 3)	0.22 ± 0.02 *	0.36 ± 0.09 *	0.41 ± 0.03 *
空白组(<i>n</i> = 3)	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.02
<i>F</i> 值	59.455	54.626	91.935
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

* *P* < 0.05, 与空白组比较; # *P* < 0.05, 与正畸 1 组比较。

2.2 龈沟液 IL-6 变化对比

正畸 1 组与正畸 2 组实验 1 d、3 d、7 d 龈沟液 IL-6 含量高于空白组,正畸 2 组也高于正畸 1 组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 三组实验不同时间点的龈沟液 IL-6 变化情况对比 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	1 d	3 d	7 d
正畸 2 组(<i>n</i> = 3)	16.55 ± 0.32 **	20.79 ± 0.62 **	28.52 ± 1.60 **
正畸 1 组(<i>n</i> = 3)	11.03 ± 0.12 *	15.09 ± 0.14 *	22.87 ± 2.16 *
空白组(<i>n</i> = 3)	6.13 ± 0.14	6.14 ± 0.08	6.15 ± 0.10
<i>F</i> 值	1 998.245	1 195.961	168.313
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

* *P* < 0.05, 与空白组比较; # *P* < 0.05, 与正畸 1 组比较。

2.3 PLI 与 GI 变化对比

正畸 1 组与正畸 2 组实验 1 d、3 d、7 d 的 PLT 与 GI 值低于空白组,正畸 2 组也低于正畸 1 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 龈沟液 AST 与 ALP 变化对比

正畸 1 组与正畸 2 组实验 1 d、3 d、7 d 的龈沟液 AST 与 ALP 含量高于空白组,正畸 2 组也高于正畸 1 组,对比差异都有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 三组实验不同时间点的 PLT 与 GI 变化对比($\bar{x} \pm s$)

组别	PLI			GI		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
正畸 2 组($n=3$)	1.24 ± 0.12 ^{*#}	1.03 ± 0.03 ^{*#}	0.89 ± 0.11 ^{*#}	0.45 ± 0.04 ^{*#}	0.17 ± 0.04 ^{*#}	0.31 ± 0.02 ^{*#}
正畸 1 组($n=3$)	1.54 ± 0.09 [*]	1.43 ± 0.08 [*]	1.22 ± 0.12 [*]	0.65 ± 0.05 [*]	0.45 ± 0.13 [*]	0.40 ± 0.04 [*]
空白组($n=3$)	1.72 ± 0.03	1.73 ± 0.18	1.72 ± 0.09	0.87 ± 0.12	0.86 ± 0.06	0.87 ± 0.07
F 值	22.615	27.960	45.425	21.470	49.075	117.957
P 值	0.002	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与空白组比较;# $P < 0.05$,与正畸 1 组比较。

表 4 三组实验不同时间点的龈沟液 AST 与 ALP 变化情况对比(IU/30 s, $\bar{x} \pm s$)

组别	AST			ALP		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
正畸 2 组($n=3$)	482.95 ± 34.10 ^{*#}	493.98 ± 25.94 ^{*#}	560.29 ± 40.32 ^{*#}	110.78 ± 15.97 ^{*#}	120.87 ± 15.84 ^{*#}	146.44 ± 19.52 ^{*#}
正畸 1 组($n=3$)	378.96 ± 21.48 [*]	400.76 ± 45.82 [*]	456.76 ± 50.66 [*]	76.98 ± 15.50 [*]	87.88 ± 10.59 [*]	100.76 ± 17.10 [*]
空白组($n=3$)	261.98 ± 10.84	259.42 ± 60.01	360.87 ± 37.01	50.18 ± 7.12	59.02 ± 11.34	65.89 ± 14.59
F 值	63.150	19.695	16.069	14.901	17.533	16.570
P 值	<0.001	0.002	0.004	0.005	0.003	0.004

* $P < 0.05$,与空白组比较;# $P < 0.05$,与正畸 1 组比较。

2.5 IL-6 水平与正畸后复发的相关性

相关性分析结果显示:正畸后大鼠磨牙龈沟液 IL-6 水平与 PLT 和 GI 呈显著负相关($r < 0$, $P < 0.05$),与 AST 和 ALP 呈显著正相关($r > 0$, $P < 0.05$)。见表 5。

表 5 IL-6 水平与正畸后 7 d 复发的相关性

指标	PLT	GI	AST	ALP
r 值	-0.533	-0.665	0.634	0.563
P 值	0.040	0.011	0.017	0.028

3 讨论

牙龈沟液是一种通过牙龈结缔组织渗透到龈沟的液体,龈沟液的液体成分主要来自血清、邻近牙周组织以及细菌^[7]。当正畸牙周周围发生炎症时,修复体周围龈沟液分泌量增加。特别是正畸牙齿移动的早期是一个急性炎症发生的过程,其特点是牙周血管扩张、毛细血管内白细胞发生迁移,不同的机械力量作用于牙周靶细胞,使其产生一系列的细胞因子,导致产生酸性产物,促进牙槽骨的吸收和沉积,从而导致龈沟液的流量和成分的改变^[8]。本研究在正畸模型的基础上,运用不同的正畸力建立动物模型,选择 20 g 和 60 g 力值来建立大鼠正畸的牙龈吸收变

化大鼠模型。正畸 2 组与正畸 1 组大鼠上颌第一磨牙均发生不同程度的近中移动,成功建立了机械力诱导的大鼠正畸模型,并随着时间的延长移动距离增加。本研究显示正畸 1 组与正畸 2 组实验 1 d、3 d、7 d 的龈沟液质量高于空白组,正畸 2 组也高于正畸 1 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),证实正畸力对龈沟液流量确有促进作用。相关研究^[9-10]显示大鼠正畸复发可诱发末梢神经释放神经肽,引起细胞形态、细胞膜通透性和离子通道活性发生改变,导致白细胞渗出到牙周膜血管外,导致血管活性增加,从而导致龈沟液质量的增加。

相关研究^[11-12]认为:ALP 和 AST 是反映牙周组织早期受损程度敏感而客观的指标。AST 是一种可溶性细胞胞浆酶,正常条件下存在于细胞浆中,当组织或细胞坏死时,细胞外环境中即会出现大量 AST。ALP 属于一种非特异性水解酶,在正常情况下,牙周膜细胞中含有大量的 ALP,当患者发生牙周炎时,牙周组织被破坏,ALP 从牙周膜释放,造成牙龈沟液 ALP 水平增加。相关研究^[13]显示:牙周炎患者牙龈沟液 AST 水平高于健康人群,并且与牙周临床指数高度呈显著正相关。另外,在正畸治疗中,正畸后复发的发生与口腔病原菌及菌斑存在密切相关,控制牙周菌斑是预防复发的重要措施^[14]。特别是酶在牙周组织改建中的作用早已受

到学者们的重视,而且龈沟液中的酶具有一定的稳定性,但与牙周组织的活动性明显相关^[15]。本研究显示正畸 1 组与正畸 2 组实验 1 d、3 d、7 d 的 PLT 与 GI 值低于空白组,正畸 2 组也低于正畸 1 组;而龈沟液 AST 与 ALP 含量高于空白组,正畸 2 组也高于正畸 1 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明正畸力的作用能导致龈沟液 AST、ALP 含量增加与 PLT、GI 值降低。当前也有研究^[16]显示正畸后复发机理十分复杂,AST 与 ALP 被认为是破骨活动中最主要、表达水平最高的蛋白分解酶,可通过多种途径刺激炎性介质的表达,进而参与正畸牙齿移动过程和牙根吸收的发生和发展,导致正畸术后复发,存在一定危害。

成纤维细胞、单核巨噬细胞、上皮细胞、成骨细胞等细胞合成并分泌 IL-6,在机体防御、造血反应、免疫反应等过程中均起到重要作用。其可以促进炎症细胞因子释放,调节急性期蛋白的产生,并促进炎症细胞的聚集,从而加重炎症症状^[17]。并且正畸装置本身就作为一种刺激物的存在,食物残渣刺激牙周组织,导致大鼠口腔的自洁作用降低,致使 IL-6 的分泌水平增加。已有研究^[18]发现大鼠压力侧龈沟液中 IL-6 阳性表达量和牙根吸收相对面积也有相关关系,IL-6 质量浓度与正畸作用力大小相关。本研究显示正畸 1 组与正畸 2 组实验 1 d、3 d、7 d 的龈沟液 IL-6 含量高于空白组,正畸 2 组也高于正畸 1 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。表明正畸装置去除后,磨牙牙周组织炎症程度加重,IL-6 表达明显增加,这是导致牙周组织损伤破坏加重,促使形成正畸后复发的可能原因。本研究也存在一定的不足,只从龈沟液水平探讨了正畸治疗后复发对 IL-6 水平的影响,且大鼠数量较少,其具体机制还有待深入分析,将在下一步研究中进行探讨。

总之,大鼠正畸后伴随有磨牙龈沟液 IL-6 表达水平升高,可能加速其牙周炎的发病,引起牙周组织损伤,形成恶性循环。

参考文献

[1] Jayaprakash PK, Basavanna JM, Grewal H, *et al.* Elevated levels of Interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , epidermal growth factor, and β 2-microglobulin levels in gingival crevicular fluid during human Orthodontic tooth movement (OTM) [J]. *J Family Med Prim Care*, 2019, 8(5): 1602 - 1606.

[2] Neves SO, Magalhães LMD, Corrêa JD, *et al.* Composite-derived monomers affect cell viability and cytokine expression in human leukocytes stimulated with *Porphyromonas gingivalis* [J]. *J Appl Oral Sci*. 2019, 3(27): 529 - 534.

[3] BinShabaib M, ALHarthi SS, Akram Z, *et al.* Clinical periodontal status and gingival crevicular fluid cytokine profile among cigarette-smokers, electronic - cigarette users and never-smokers [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 6(102): 212 - 217.

[4] Nassar EA, Fouda AM, Hassan KS. Influence of low-level laser (LLL) on interleukin 6 (IL-6) levels in gingival crevicular fluid (GCF) during orthodontic tooth movement of periodontally affected rabbits [J]. *Int Orthod*, 2019, 17(2): 227 - 234.

[5] Zekeridou A, Mombelli A, Cancela J, *et al.* Systemic inflammatory burden and local inflammation in periodontitis: What is the link between inflammatory biomarkers in serum and gingival crevicular fluid? [J]. *Clin Exp Dent Res*, 2019, 5(2): 128 - 135.

[6] 潘爽. 固定矫治器对错(牙合)畸形患者牙周状况及主要牙周致病菌的影响 [D]. 济南: 山东大学, 2018.

[7] 曾辉, 赵许兵, 李子夏, 等. 骨碎补总黄酮对牙周炎大鼠龈沟液骨钙素及牙槽骨骨密度的影响 [J]. *贵州医药*, 2016, 40(5): 460 - 462.

[8] Gregorczyk-Maga I, Kaszuba M, Olszewska M, *et al.* Biomarkers of inflammatory external root resorption as a result of traumatic dental injury to permanent teeth in children [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 3(99): 82 - 91.

[9] 赵雅静, 王盼盼, 王兴羽, 等. 实验性牙周炎大鼠牙周组织、龈沟液及外周血中 IL-22 的检测 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2016, 26(6): 353 - 357, 363.

[10] 黄林, 方威苏, 曹君. IL-1 β 、MMP-2 在大鼠牙根吸收组织中的表达及意义 [J]. *口腔医学研究*, 2019, 35(6): 604 - 607.

[11] 王亚玲, 曹直, 占时霞. 钴铬合金和金合金烤瓷全冠修复对龈沟液中 AST、ALP、TNF- α 和 IL-8、GP-x、MDA 水平的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(17): 2069 - 2072.

[12] 袁晓莉, 尤再春, 文利, 等. 米诺环素联合布洛芬对牙周炎患者龈沟液中炎症因子、ALP 及 NO 水平的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(10): 1055 - 1058.

[13] Suparwitri S, Rosyida NF, Alhasyimi AA. Wheat seeds can delay orthodontic tooth movement by blocking osteoclastogenesis in rats [J]. *Clin Cosmet Investig Dent*, 2019, 9(11): 243 - 249.

[14] Ali Alhasyimi A, Fathmah Rosyida N. Cocoa administration may accelerate orthodontic tooth movement by inducing osteoclastogenesis in rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22(2): 206 - 210.

[15] Petrovi XMS, Kannosh IY, Mila XJM, *et al.* Clinical, microbiological and cytomorphometric evaluation of low-level laser therapy as an adjunct to periodontal therapy in patients with chronic periodontitis [J]. *Int J Dent Hyg*, 2018, 16(2): e120 - e127.

[16] Zemouri C, Jakubovics NS, Crielaard W, *et al.* Resistance and resilience to experimental gingivitis: a systematic scoping review [J]. *BMC Oral Health*, 2019, 19(1): 212 - 217.

[17] Han YK, Jin Y, Miao YB, *et al.* Improved RANKL production by memory B cells: A way for B cells promote alveolar bone destruction during periodontitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 11(64): 232 - 237.

[18] Gao X, Shen Z, Guan M, *et al.* Immunomodulatory Role of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth on Periodontal Regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(17-18): 1341 - 1353.

(收稿日期: 2019 - 11 - 25)

学术编辑: 刘英)