

本文引用:朱 萱,李 涛,冯云枝.铁调素在慢性牙周炎性牙槽骨吸收中的作用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(8):905-909.

## 铁调素在慢性牙周炎性牙槽骨吸收中的作用

朱 萱<sup>1</sup>,李 涛<sup>2</sup>,冯云枝<sup>3\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.长沙市口腔医院,湖南 长沙 410000;  
3.中南大学湘雅二医院,湖南 长沙 410011)

**[摘要]** **目的** 探讨铁调素(Hepcidin)在慢性牙周炎性牙槽骨吸收过程中的作用,阐明铁离子及其相关调节蛋白在牙槽骨吸收中的重要生物学意义,以期探索出有效地防治牙槽骨吸收的方法提供理论基础。**方法** 检测慢性牙周炎患者龈沟液(GCF)中铁离子、核因子KB受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)的表达水平,分析铁离子的含量与RANKL和OPG表达的相关性以及铁离子的含量与牙周炎性牙槽骨吸收的关系。**结果** 20例慢性牙周炎组受检牙GCF中铁离子、Hepcidin和RANKL的浓度高于健康对照组( $P<0.05$ ),OPG的浓度低于健康对照组( $P<0.01$ )。慢性牙周炎组GCF中RANKL和OPG的浓度与该受检牙4项临床指标:牙周探诊深度(PD)、附着丧失(AL)、菌斑指数(PLI)、龈沟出血指数(SBI)无相关( $P>0.05$ ),铁离子浓度与Hepcidin浓度呈正相关( $P<0.01$ ),与RANKL浓度呈正相关( $P<0.05$ ),与OPG浓度无相关( $P>0.05$ )。**结论** 慢性牙周炎导致的牙槽骨吸收与局部Hepcidin升高和发生铁过载有关。

**[关键词]** 慢性牙周炎;铁调素;二价铁离子;骨质吸收

**[中图分类号]**R781.4

**[文献标志码]**B

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.08.022

### Impact of Hepcidin in Alveolar Bone Absorption of Chronic Periodontitis

ZHU Xuan<sup>1</sup>, LI Tao<sup>2</sup>, FENG Yunzhi<sup>3\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Changsha Stomatological Hospital, Changsha, Hunan 410000, China; 3. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the role of hepcidin in the process of alveolar bone absorption in chronic periodontitis, and the important biological significance of iron ion and related regulatory proteins in alveolar bone absorption, in order to build theoretical basis of effective prevention of alveolar bone absorption. **Methods** The expression of iron ions, RANKL and OPG in gingival crevicular fluid (GCF) of chronic periodontitis patients was detected. The correlation between iron ion and RANKL/OPG, and the relationship between iron ion and alveolar bone absorption were correlated. **Results** The concentration of Iron ion, hepcidin, RANKL levels in GCF of 20 chronic periodontitis patients was higher than that in healthy control group ( $P<0.01$ ). RANKL and OPG level in GCF of chronic periodontitis patients were not correlated to four clinical indicators: probing depth (PD), attachment loss (AL), plaque index (PLI) and sulcus bleeding index (SBI) ( $P>0.05$ ). Iron ion level was positive correlated with hepcidin ( $P<0.01$ ) and RANKL level ( $P<0.05$ ), but not correlated with OPG level ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Alveolar bone absorption caused by chronic periodontitis may be related with upregulation of hepcidin and overload iron.

**[Keywords]** periodontitis; hepcidin; ferrous iron; bone absorption

慢性牙周炎(chronic periodontitis,CP)是口腔科的常见病之一。铁是人体重要的微量元素,它参与

人体红细胞合成、氧化应激反应、免疫调节等重要生理过程。最新的研究发现当体内铁离子过多时

**[收稿日期]**2016-12-13

**[基金项目]**湖南省教育厅科学研究项目(14C0848)。

**[作者简介]**朱 萱,女,硕士,研究方向:口腔医学。

**[通讯作者]**\* 冯云枝,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:724986095@qq.com。

(铁过载)反而会引起体内一系列病理变化,其中骨骼系统是铁过载损伤的重要靶点<sup>[1]</sup>。高浓度的铁离子能抑制成骨细胞增殖、分化以及钙盐的沉积,促进破骨细胞的分化成熟,增强骨吸收,在遗传性血色病、海洋性贫血(反复输血)、镰刀细胞性贫血、非洲铁沉积症等铁过载引起的疾病中,骨质疏松症的发病率也很高<sup>[2]</sup>。铁调素(Hepcidin)是一种具有抗菌活性的25氨基酸肽,对人体铁的吸收和分配起到重要的调节作用,其表达受机体信号因子以及炎症、低氧等疾病状态的影响。口腔内长期存在大量微生物,当伴发牙周炎、种植体周围炎及咬合创伤时,多种复杂的因素可能直接或间接的影响局部微环境中铁调素和铁离子的水平。目前关于铁离子水平及其调节蛋白在口腔疾病中的作用及机制尚未见报道。中西医结合辨证论治治疗慢性疾病的方法取得了明显的进展,在改善消除局部病损的同时,又调节全身状况,成为慢性疾病新的治疗方案<sup>[3]</sup>。因此本研究拟从铁代谢与牙槽骨吸收的关系入手,旨在阐明铁离子及其相关调节蛋白在牙槽骨吸收中的重要生物学意义,以期探索出有效防治牙槽骨吸收的方法提供理论基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验对象

选取2014年4月至2014年11月期间在中南大学湘雅二医院口腔科就诊的20例慢性牙周炎患者,其中男11人,女9人,年龄35~60岁,平均(43.2±1.2)岁。对照组选取20例年龄、性别基本匹配无牙周炎的正常人群,其中男8人,女12人,年龄30~60岁,平均(42.9±1.3)岁。两组的年龄、性别差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。此研究经中南大学湘雅二医院伦理委员会同意,所有患者签署了知情同意书。

纳入标准:从20例患者口腔中选取受试牙,满足炎症累及牙周深层组织、牙周袋 $\geq 3$  mm,X线示牙槽骨吸收,但无牙髓及根尖周病变(根据临床症状、检查及X线诊断)、无咬合创伤(根据功能性咬合动度和牙周膜宽度诊断)等局部刺激因素等标准。对照组选取受试牙满足龈沟出血指数(SBI) $\leq 1$ ,

牙周探诊深度(PD) $< 3$  mm,无附着丧失(AL),无松动,无牙槽骨的吸收,所选牙齿社区牙周治疗需要量指数(CPITN)=0等标准。

排除标准:患者合并其它系统性疾病;实验前3个月内服用过抗生素;半年内进行过牙周治疗;孕妇。

### 1.2 试剂与仪器

人核因子KB受体活化因子配体(RANKL) ELISA试剂盒(上海丽臣生物科技有限公司);人骨保护素(OPG) ELISA试剂盒(上海丽臣生物科技有限公司);人铁调素 ELISA试剂盒(上海丽臣生物科技有限公司);Fe检测试剂盒(上海丰汇医学科技有限公司);PBS缓冲液(0.01 mmol/L,pH 7.2);ELx800吸光度全自动定量绘图酶标仪(美国BioTek公司);Milli-Q超纯水机(美国Millipore公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 受检牙临床资料的收集 所有受检牙均进行视诊、探诊和拍摄牙片,并分别记录:(1)牙周探诊深度(probing depth,PD)是指龈缘至牙周袋底或者龈沟底的距离,以mm为单位记录。(2)附着丧失(attachment loss,AL)是指袋(沟)底至釉牙骨质界的距离,以mm为单位记录。(3)菌斑指数(plaque index,PLI)用探针轻划牙面,根据菌斑的量和厚度记分。(4)龈沟出血指数(sulcular bleeding index,SBI)使用钝头牙周探针轻探龈沟,观察出血情况并计分。

1.3.2 龈沟液标本的采集 采用吸潮纸尖法。对照组受试牙均在该牙唇(颊)侧近中龈沟处收集龈沟液(gingival crevicular fluid,GCF)标本。慢性牙周炎组受试牙均在牙周探诊最深位点处收集龈沟液标本。取完称质量后放入加入了PBS缓冲液的离心管中,-80℃冷冻保存。

1.3.3 龈沟液中铁离子含量的测定 采用亚铁嗉微板法,按Fe检测试剂盒说明书,选用经稀盐酸处理及去离子水清洁的96孔板,将待测龈沟液和配置好的标准铁溶液加入到96孔板中,再加入显色液混匀,室温静置,酶标仪562 nm处检测,以空白孔调零,再依次读取各孔吸光度。利用测得的标准铁试剂的吸光度,绘制标准曲线,计算出待测龈沟液中铁的浓度。

1.3.4 龈沟液中 Heparin、RANKL、OPG 的表达采用酶联免疫吸附法,所有操作均按照铁调素、RANKL、OPG ELISA 试剂盒的说明书操作。

1.3.5 数据统计方法 采用统计软件 SPSS 23.0 进行统计学分析,均值间差异比较采用  $t$  检验,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。Spearman 法分析相关性。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组受检牙临床指标的比较

分别测量 CP 组和对照组受检牙的临床指标,发现 20 例 CP 组受检牙和 20 例健康对照组受检牙在 PD、AL、PLI 和 SBI 四个指标中均有明显差异( $P<0.01$ )。CP 组的受检牙符合牙周病的诊断。见表 1。

表 1 两组受检牙临床检测指标的比较

项目	对照组	CP 组	Z	P
PD/mm	1.50	5.25**	5.439	0.000
AL/mm	0.00	2.00**	5.875	0.000
PLI	0.00	2.00**	5.988	0.000
SBI	0.00	2.00**	5.888	0.000

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ 。

### 2.2 两组 GCF 中铁离子( $Fe^{2+}$ )和 Heparin 浓度的比较

20 例 CP 组受检牙和 20 例健康对照组受检牙 GCF 中  $Fe^{2+}$  和 Heparin 浓度有差别,慢性牙周炎患者 GCF 中  $Fe^{2+}$  和 Heparin 浓度高于健康对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 两组 GCF 中  $Fe^{2+}$  和 Heparin 浓度的比较 ( $n=20, \bar{x}\pm s$ )

项目	$Fe^{2+}/\mu mol\cdot L^{-1}$	Heparin/ $ng\cdot mL^{-1}$
对照组	18.71 $\pm$ 10.35	12.28 $\pm$ 5.50
CP 组	34.47 $\pm$ 17.88*	18.51 $\pm$ 8.38*
Z	2.192	2.272
P	0.028	0.023

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ 。

### 2.3 两组 GCF 中 RANKL 和 OPG 的浓度及其比值的比较

20 例 CP 组受检牙和 20 例健康对照组受检牙 GCF 中 RANKL 和 OPG 的表达浓度有差别,慢性牙周炎患者 GCF 中 RANKL 浓度高于健康对照组,OPG 浓度低于健康对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见表 3。

表 3 两组 GCF 中 RANKL 和 OPG 的浓度及其比值的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

项目	RANKL/ $pg\cdot \mu L^{-1}$	OPG/ $pg\cdot \mu L^{-1}$	RANKL/OPG
对照组	27.20 $\pm$ 11.47	110.08 $\pm$ 47.37	0.32 $\pm$ 0.26
CP 组	54.53 $\pm$ 14.43**	49.86 $\pm$ 24.98**	1.49 $\pm$ 1.06**
$t/z$	4.599	5.030	4.734
P	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ 。

### 2.4 慢性牙周炎组受试牙 GCF 中 RANKL 和 OPG 的浓度及 RANKL/OPG 的比值与牙周临床指标的相关性分析

分析 20 例 CP 组受检牙 GCF 中 RANKL 和 OPG 的浓度与该受检牙临床指标 PD、AL、PLI、SBI 的相关性可知,各组之间均无相关,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 4。

表 4 CP 组受试牙 GCF 中 RANKL 和 OPG 的浓度及 RANKL/OPG 的比值与牙周临床指标的相关性分析

项目	PD	AL	PLI	SBI
RANKL	-0.211	0.193	0.036	0.043
OPG	0.281	-0.406	-0.279	-0.087
RANKL/OPG	-0.402	0.382	0.109	0.065

注:表中各相关系数差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 2.5 慢性牙周炎患者 GCF 中铁离子的浓度与 Heparin、RANKL 和 OPG 浓度的相关性分析

分析 20 例 CP 组受检牙 GCF 中铁离子的浓度与 Heparin、RANKL 和 OPG 浓度的相关性,发现铁离子浓度与铁调素浓度呈正相关  $r=0.586, P=0.007$ ,有统计学意义( $P<0.01$ );铁离子浓度与 RANKL 浓度呈正相关  $r=0.403, P=0.04$ ,有统计学意义( $P<0.05$ );铁离子浓度与 OPG 浓度无相关性( $P>0.05$ ),见表 5。

表 5 CP 患者 GCF 中  $Fe^{2+}$  的浓度与 Heparin、RANKL 和 OPG 浓度的相关性分析

项目	Heparin	RANKL	OPG
Fe	0.586**	0.403*	-0.035

注:Fe 与 Heparin 相关系数 \*\* $P<0.01$ , Fe 与 RANKL 相关系数 \* $P<0.05$ 。

## 3 讨论

牙周病,中医学称之为牙宣、齿衄,主要表现为牙龈的炎症、牙周袋的形成、牙槽骨的吸收和牙齿的

松动移位,慢性牙周炎性牙槽骨吸收是导致牙丧失的主要原因。中医认为肾主骨,齿为骨之余,足阳明胃经经鼻外入上齿龈,手阳明大肠经经颈部至面颊入下齿龈;牙齿与骨一样由肾气充养,牙龈则与胃、脾、肾、大肠等脏腑关系密切。过食辛辣炙博、酗酒过度或房劳太过等可致胃火上蒸,消齿灼龈;或肾阴亏虚,虚火上炎,灼伤牙龈而发为牙宣;或久病致气血不足,则齿失濡养,齿失润泽而见牙齿松动、牙龈萎缩等症。

铁调素是近些年来新发现的一种调节细胞铁代谢的活性物质,在机体铁代谢平衡的调节中起关键作用。最早在2000年由 Krause 和 Park 等<sup>[4-5]</sup>分别从人血清和尿中提纯得到铁调素。当机体铁过载时,铁调素基因表达增强,使肝脏合成分泌铁调素增多,从而加速小肠上皮细胞表面膜铁转运蛋白1(FPN1)的降解,关闭铁向血液中转运的源头,进而减少小肠上皮细胞和巨噬细胞向血液中输送铁,当机体铁缺乏时,以上过程发生相反的改变,从而维持铁的稳态<sup>[6-8]</sup>。

人体在生理状态下缺少排泄铁的机制,因此在遗传和各种环境因素异常的条件下,机体的局部和整体很容易发生铁过载,从而导致一系列病理变化,这其中也包括对成骨细胞和破骨细胞的影响。有研究证实,高浓度的铁离子能在体外抑制成骨细胞增殖、分化以及钙盐沉积,同时促进破骨细胞的分化成熟,增强骨吸收<sup>[9-12]</sup>。绝经期妇女发生的骨质疏松也可能与体内存在铁过载有关<sup>[12]</sup>。本实验对不同程度的牙周病患者 GCF 中铁离子浓度进行了检测,结果发现随着 CP 严重程度的加深,龈沟液中铁离子和 Heparin 的浓度增加,铁离子和 Heparin 有着明显的相关关系,这些都提示局部铁过载的发生与 CP 的发生和发展有着密切的联系,局部 Heparin 的异常引起的铁代谢异常可能是 CP 发生的重要机制。

在正常的生理条件下,成年人的骨骼中破骨细胞的骨吸收与成骨细胞的骨形成处于一个动态平衡的过程,使骨组织不断更新,以维持骨骼的硬度与弹性。破骨细胞的分化成熟受多种信号途径调控,RANKL/RANK/OPG 系统是破骨细胞分化成熟的主要信号途径,它们不但在牙周骨吸收中起重要

作用,而且在类风湿关节炎和骨质疏松等其它病理性骨吸收中也发挥着重要作用。成骨细胞及骨髓基质细胞表达 RANKL,与破骨细胞前体细胞或破骨细胞表面上的核因子 KB 受体活化因子(RANK) 结合后,可促进破骨细胞的分化及骨吸收活性。成骨细胞及骨髓基质细胞分泌表达 OPG 与 RANKL 竞争性结合,可阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合。RANKL/OPG 的比值决定着破骨细胞的分化与功能<sup>[13-14]</sup>。口腔局部铁代谢失衡与牙槽骨吸收有密切的关系。作为牙周病主要致病菌的卟啉单胞菌可通过特异性外膜受体结合含铁蛋白中的铁/亚铁血红素,并将其转运至细胞内,引起感染局部铁离子水平上升<sup>[15]</sup>。有研究表明在牙周炎、种植体周围炎者 GCF 中存在大量如 IL-6、IL-1、TNF、PGE2 等炎症因子及 TGF- $\beta$ 、BMP、HIF 等细胞因子,以及牙周袋内相对缺氧的环境及咀嚼压力的刺激均可能对局部 Heparin 的表达水平产生影响,导致龈沟液中铁离子浓度的升高,最终导致牙槽骨的吸收<sup>[16]</sup>。在本实验中发现,慢性牙周炎患者 GCF 中 RANKL 的表达较正常对照组升高,而 OPG 的表达较正常对照组降低,而且 Heparin 和铁离子的表达与 RANKL 明显相关,提示铁离子和 Heparin 浓度的升高通过影响增加 RANKL 的表达,抑制 OPG 的表达,最终导致破骨细胞活性升高,引起牙槽骨的吸收。

通过本次实验结果可以认为慢性牙周炎导致的牙槽骨吸收与局部 GCF 中发生铁过载有关。局部 Heparin 水平的升高与铁离子浓度明显相关,是导致局部铁过载的重要机制。铁离子浓度的升高通过促进 RANKL 表达和抑制 OPG 的表达,引起牙槽骨的吸收。中医治疗牙周病主张辨证施治<sup>[17]</sup>,采用疏风清热、清胃泻火、补益气血、滋阴补肾等方法,注重扶正与祛邪并用,强调宏观调节顾护人体正气。利用铁离子浓度的改变来调节气血,顾护人体正气,提高免疫力,对防止慢性牙周炎中牙槽骨吸收,维持牙根的稳固有重要的意义。本实验在理论上初步揭示 Heparin 异常导致的铁过载与牙槽骨吸收的作用及机制,有助于进一步加深对慢性牙周炎、种植体周围炎发病机制的认识,开拓中西医结合辨证论

治治疗牙周炎的新方法,在改善消除局部病损的同时,又调节全身状况、标本兼治,为今后防治牙周炎、种植体周围炎引起的骨吸收提供一定的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 苏弘薇.铁过载对骨代谢的影响[D].桂林:广西医科大学,2015.
- [2] Li GF, Pan YZ, Sirois P, et al. Iron homeostasis in osteoporosis and its clinical implications[J]. *Osteoporos Int*, 2012,23(10):2403–2408.
- [3] 张 静,刘 畅.中西医结合治疗晚期结肠癌的临床疗效[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(5):548–551.
- [4] Krause A, Neitz S, Mägert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity [J]. *FEBS Lett*, 2000, 480(2–3):147–150.
- [5] Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver [J]. *J Biol Chem*, 2001,276(11):7806–7810.
- [6] Boumaiza M, Jaouen M, Deschemin JC, et al. Expression and purification of a new recombinant camel hepcidin able to promote the degradation of the iron exporter ferroportin1[J]. *Protein Expr Purif*, 2015,115:11–18.
- [7] Xu Z, Sun W, Li Y, et al. The regulation of iron metabolism by hepcidin contributes to unloading-induced bone loss[J]. *Bone*, 2017, 94:152–161.
- [8] Bergamaschi G, Di Sabatino A, Pasini A, et al. Intestinal expression of genes implicated in iron absorption and their regulation by hepcidin [J/OL]. *Clinical Nutrition* [2016–09–29]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2016.09.021>.
- [9] Dereka XE, Markopoulou CE, Fanourakis G, et al. RANKL and OPG mRNA level after non-surgical periodontal treatment [J]. *Inflammation*, 2010, 33(3):200–206.
- [10] Ta HM, Nguyen GT, Jin HM, et al. Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010,107(47): 20281–20286.
- [11] Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 53(4): 1333–1341.
- [12] Xu YJ, Xi H. Decreasing iron over load: a new approach for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research*, 2012,5(1):1–6.
- [13] 李鸿泓.基于破骨细胞分化调节通路 OPG/RANKL 探讨补肾健脾方治疗骨质疏松症的作用机理[D].北京:中国中医科学院,2013.
- [14] 金 健. 利塞膦酸钠抑制骨髓间充质干细胞成脂分化并通过逆转 RANKL/OPG 的表达抑制破骨细胞分化[D].广州:南方医科大学,2012.
- [15] Wójtowicz H, Wojaczyński J, Olczak M, et al. Heme environment in HmuY, the heme-binding [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,383(2):178–182.
- [16] Talbot NP, Smith TG, Lakhal-Littleton S, et al. Suppression of plasma hepcidin by venesection during steady-state hypoxia [J]. *Blood*, 2016, 127(9):1206–1207.
- [17] 刘希恒,李寒梅.中药结合西医基础疗法治疗牙周病的疗效观察 [J].*中国中医药咨讯*,2011,3(20):462.

(本文编辑 李 杰)