

# 种植体周围黏膜炎在药物干预前后龈沟液的代谢组学分析

张雨诗<sup>1,2</sup> 邵艳琳<sup>3</sup> 芦帅<sup>2</sup> 钟科<sup>1,2\*</sup>

(1. 西南医科大学口腔医学院 四川 泸州 646000; 2. 成都军区机关医院 四川 成都 610041;  
3. 南充市中心医院口腔科 四川 南充 637000)

**[摘要]** 目的:探讨种植体周围黏膜炎在药物(盐酸米诺环素)干预前后龈沟液(GCF)的代谢组学特征及代谢产物差异,寻找种植体周围黏膜炎可能的生物标记物。方法:30例接受种植牙患者,健康种植体组(A组)、种植体周围黏膜炎组(B组)、药物干预后组(C组)GCF, A组15例, B组与C组15例, 每组随机选取5例样本, 分别采集GCF应用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用(UHPLC/Q-TOF-MS)仪进行检测分析后, 在线数据库 Metlin library、人类代谢物数据库(HMDB)进行精确的比对检索。结果:A与B组、B与C组、A与C组间分别有10个、5个、4个差异性代谢产物有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:黄嘌呤、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺可能是种植体周围黏膜炎潜在的标志物。

**[关键词]** 种植体周围黏膜炎 超高效液相色谱 四级杆飞行时间质谱 代谢组学

**[中图分类号]** R782.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2017)12-1306-04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.12.017

**Metabonomics Study on Peri-implant Mucositis before and after Drug Intervention.** ZHANG Yu-shi<sup>1,2</sup>, SHAO Yan-lin<sup>3</sup>, LU Shuai<sup>2</sup>, ZHONG Ke<sup>1,2\*</sup>. 1. School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Authority Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu 610041, China; 3. Nanchong Central Hospital of Stomatology, Nanchong 637000, China.

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the gingival sulcus fluid (GCF) metabolomics characteristics and metabolic product difference in peri-implant mucositis before and after drug (minocycline hydrochloride) intervention, and to find the implant mucositis potential biomarkers. **Methods:** Thirty patients receiving dental implant were recruited and divided into group A (health implant), group B (peri-implant mucositis), and group C (drug intervention), with 15 cases in group A, 15 cases in group B and group C. Five cases were randomly selected from each group. GCF was collected and analyzed with UHPLC/Q-TOF-MS instrument. The results were compared accurately with online database Metlin Library and human metabolites database (HMDB). **Results:** There were 10, 5, and 4 different metabolites between A and B, B and C, and A and C ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Hemolytic phosphatidyl choline and haemolytic phosphatidyl ethanolamine might be potential marker for the peri-implant mucositis.

**[Key words]** Peri-implant mucositis Ultra high performance liquid chromatography Quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry Metabonomics

种植体周围疾病分为:种植体周围黏膜炎(peri-implant mucositis)和种植体周围炎(peri-implantitis)。种植体周围黏膜炎是指炎症性病变发生在种植体周黏膜,未累积周围骨组织;而种植体周围炎是即有黏膜炎症又有牙槽骨的吸收<sup>[1,2]</sup>。本实验意在探讨种植体周围黏膜炎在药物(盐酸米诺环素)干预前后龈沟液(GCF)的代谢组学特征及代谢产物

差异,寻找种植体周围黏膜炎可能的生物标记物,为临床上早期预防、诊断及治疗种植体周围黏膜炎提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2016年4~11月期间在本科行种植牙全瓷冠修复(单冠后牙)正常行使咀嚼功能半年的病例,共30例。健康种植体15例(男7例,女8例,年龄26~64岁,平均年龄46.13岁),种植体周围黏膜炎和药物治疗后的种植体15例(男7例,女8例,年龄21~71岁,平均年龄47.00岁)。纳入标准:1)患者均非牙周易感者,余留天然牙牙周

**基金项目** 成都军区机关医院院管课题(编号:YG201405)

**作者简介** 张雨诗(1991~),女,硕士在读,医师,主要从事口腔种植修复学研究工作。

\* 通讯作者 钟科, E-mail:37435387@qq.com

情况良好;2)种植体周牙龈充血水肿,探诊出血,无溢脓,种植体无松动,牙周探诊深度 ≤5 mm,X线片显示种植体周围无明显骨破坏;3)3个月内未接受牙周治疗,未口服抗生素或免疫抑制剂,1个月内未用抑制菌斑的药物漱口;4)健康状况良好,无系统性疾病。所有患者均告知相关实验内容,签署知情同意书并通过医院伦理委员会批准同意。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料 Whatman 3号定性滤纸(Whatman公司,英国);1.8 mL冻存管(江苏大唐医疗器械有限公司);液氮(成都侨源气体有限公司);离心机(美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司);超高效液相色谱仪(Agilent公司,美国);质谱仪(Agilent公司,美国)。

1.2.2 GCF采集 首先患者用0.12%洗必泰含漱1 min。取样前先将装有滤纸条的冻存管称重记录。去除龈上菌斑,严格隔湿后,于颊(唇)侧和舌(腭)侧近远中位点将滤纸条沿牙面方向放入龈沟内至有轻微阻力,30 s后取出(如有血迹则丢弃)。即刻称重计算出GCF重量。将冻存管放入液氮罐,再集中转移至-80℃冰箱保存。

1.2.3 UHPLC/Q-TOF-MS分析、数据分析及代谢物鉴定 健康种植体组和种植体周围炎黏膜组各随机选取5例,对应药物干预组也就选取出来。室温下解冻,提取离心GCF后UHPLC/Q-TOF-MS检测分析,使用Agilent Masshunter Qualitative Analysis B.04.00软件对原始数据进行预处理和归一化处理。使用SIMCA-P13.0软件对经上述处理后的数据集依次进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二

乘法判别分析(OPLS-DA)。代谢物鉴定根据OPLS-DA模型的得分图(scores plot)筛选出变量重要性投影(VIP)值>1.0的离子,结合SPSS 17.0统计软件进行独立样本t检验(P<0.05)并在线数据库Metlin library、人类代谢物数据库(HMDB)中进行精确的比对。

2 结果

2.1 GCF典型总离子流色谱图,见图1a~1c、图1d~1f 正负离子模式下,谱图差异分别在6~10 min和9~11 min处。

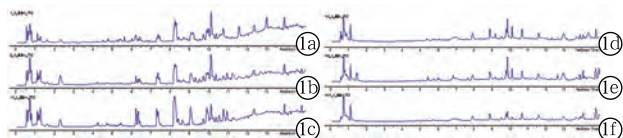


图 1a~1c GCF 样品的典型总离子流色谱图(正) 图 1d~1f GCF 样品的典型总离子流色谱图(负)  
Fig. 1a-1c TIC of GCF (positive) Fig. 1d-1f TIC of GCF (negative)

2.2 PCA、PLS-DA、OPLS-DA结果 由图2a可见,在正(X)负(Y)离子模式下,各组间均不能得到很好的区分。采用PLS-DA及OPLS-DA进行分析。由图2b、2c可见,各组间均能够在得分图上有明显的分离。

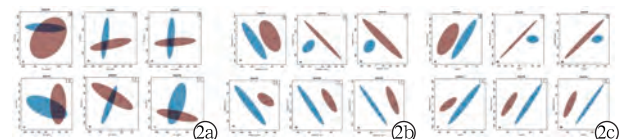


图 2a PCA 得分图 Fig. 2a Score plots of PCR  
图 2b PLS-DA 得分图 Fig. 2b Score plots of PLS-DA  
图 2c OPLS-DA 得分图 Fig. 2c Score plots of OPLS-DA

2.3 差异代谢产物鉴定结果

表 1 健康种植体组(A组)与种植体周围黏膜炎组(B组)的差异代谢物

Table 1 Difference metabolites between healthy implant group (group A) and peri-implant mucositis group (group B)

No.	m/z	RT /min	Metabolites	FOMULA	<sup>a</sup> FC (B/A)	<sup>b</sup> Trend (B/A)	<sup>c</sup> VIP	<sup>d</sup> P-VALUE
1	88.0328	0.70	Alanine	C3H7NO2	2.009120957	↑	1.48	0.0052
2	198.0568	0.71	3-Indoleacetic Acid	C10H9NO2	2.187934045	↑	1.38	0.0213
3	151.0261	1.19	Xanthine	C5H4N4O2	2.736274683	↑	2.30	0.0267
4	245.1145	2.12	Aspartyl-Isoleucine	C10H18N2O5	2.084216118	↑	1.16	0.0241
5	220.1213	3.32	Pantothenic Acid	C9H17NO5	3.837952855	↑	2.27	0.0114
6	259.1299	4.35	Prolyl-Valine	C10H18N2O3	2.328984595	↑	1.22	0.0365
7	542.3205	10.34	1-Linoleoylglycerophosphocholine	C26H50NO7P	3.999099773	↑	1.74	0.0407
8	524.3358	11.32	LysoPC(P-16:0)	C24H50NO6P	3.575776225	↑	1.20	0.0426
9*	245.1731	11.78	1,11-Undecanedicarboxylic acid	C13H24O4	0.877260148	↓	2.01	0.0050
10*	726.5470	14.78	LysoPE(18:1(11Z)/P-18:1(9Z))	C41H78NO7P	2.098576494	↑	1.89	0.0021

表 2 种植体周围黏膜炎组(B组)与药物干预后组(C组)的差异代谢物

Table 2 Difference metabolites between peri-implant mucositis group (group B) and drug intervention group (group C)

No.	m/z	RT /min	Metabolites	FOMULA	<sup>a</sup> FC (C/B)	<sup>b</sup> Trend (C/B)	<sup>c</sup> VIP	<sup>d</sup> P-VALUE
1*	192.1085	6.02	4-Hydroxydebrisoquine	C10H13N3O	0.396808077	↓	2.36	0.0108
2	350.2943	7.43	N,N-Dimethylsphingosine	C20H41NO2	0.463205188	↓	1.34	0.0314
3	272.2595	9.19	2-aminohexadecanoic acid	C16H33NO2	0.710814578	↓	1.62	0.0225
4	427.0685	9.86	Urolithin A-3-O-glucuronide	C19H16O10	0.681183193	↓	3.85	0.0098
5*	726.5470	14.78	LysoPE(18:1(11Z)/P-18:1(9Z))	C41H78NO7P	0.54559236	↓	1.98	0.0110

表 3 健康种植体组(A组)与药物干预后组(C组)的差异代谢物

Table 3 Difference metabolites between healthy implant group (group A) and drug intervention group (group C)

No.	m/z	RT /min	Metabolites	FOMULA	<sup>a</sup> FC (C/A)	<sup>b</sup> Trend (C/A)	<sup>c</sup> VIP	<sup>d</sup> P-VALUE
1	460.0185	0.72	Thiamine pyrophosphate	C12H19N4 O7P2S2	1.95415004	↑	1.35	0.0395
2*	192.1085	6.02	4-Hydroxydebrisoquine	C10H13N3O	0.350227718	↓	2.38	0.0027
3*	316.2892	9.29	Dehydrophytosphingosine	C18H37NO3	0.378067246	↓	1.77	0.0127
4	344.3175	10.18	Dihydroceramide C2	C20H41NO3	0.437491399	↓	1.18	0.0042
5	314.3412	10.90	2-amino-14,16-dimethyl-17-octadecan-3-ol	C20H43NO	0.439571634	↓	2.44	0.0063
6*	245.1731	11.78	1,11-Undecanedicarboxylic acid	C13H24O4	0.8331272	↓	1.83	0.0015
7	329.2092	12.96	16β-Hydroxynorgestrel	C21H28O3	0.401788217	↓	1.36	0.0007
8	790.5801	13.11	LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/P-18:1(9Z))	C46H80NO7P	1.309699848	↑	1.98	0.0357

注:带\*号的为其他组也鉴定到的差异代谢物。<sup>a</sup> FC:平均值的比值;<sup>b</sup> Trend:两组比较,上调(↑)和下调(↓)趋势;<sup>c</sup> VIP:来自 OPLS-DA 模型的 VIP 值;<sup>d</sup> P-VALUE:来自 *t* 检验的 *P* 值

### 3 讨论

3.1 与健康种植体组相比,种植体周围黏膜炎组呈上调趋势的差异代谢产物有:丙氨酸、3-吡啶乙酸、黄嘌呤、天冬氨酸-异亮氨酸、泛酸、脯氨酰缬氨酸、L-甘油磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺。GCF 成分和血清类似,而丙氨酸是血液中转运氨的主要形式之一,其含量的上调间接说明种植体周围黏膜炎组 GCF 比健康种植体组分泌增多。Bevilacqua L 等研究得出健康牙周和健康种植体周的 GCF 量显著低于炎症状态下<sup>[3]</sup>。异亮氨酸和缬氨酸均参与三羧酸循环;泛酸参与糖代谢、柠檬酸循环、脂肪酸和胆固醇的分析<sup>[4]</sup>。以上呈上调的代谢产物提示种植体周围黏膜炎存在氨基酸代谢、脂代谢、糖代谢及柠檬酸循环异常。此外,黄嘌呤明显上调,可能是由于炎症状态下嘌呤氧化不全的产物黄嘌呤增加,而嘌呤代谢过程在细胞中进行,种植体周围黏膜炎时细胞组织坏死崩解,释放黄嘌呤这也提示嘌呤降解途径和黄嘌呤氧化酶可能与种植体周围黏膜炎相关。黄嘌呤氧化酶已被证明参与各种疾病发病,如炎症性疾病、血液疾病、高血压等<sup>[5,6]</sup>。L-甘油磷脂酰胆碱是甘油磷脂的一种,溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺是甘油磷脂的水解代谢产

物<sup>[7]</sup>。甘油磷脂分解代谢异常会导致中性粒细胞活化,可产生蛋白水解酶和活性氧<sup>[8]</sup>,释放的蛋白水解酶和活性氧可引发骨组织破坏。溶血磷脂酰胆碱具有病理活动所产生的生物活性促炎作用<sup>[9,10]</sup>,能诱导促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达<sup>[11]</sup>,能使细胞膜破坏导致细胞坏死。

3.2 与种植体周围黏膜炎组相比,药物干预后组呈下调趋势的差异代谢产物有:4-羟基异喹啉、二甲基鞘氨醇(DMS)、2-棕榈酸、尿石素 A-3-O-葡萄糖醛酸、溶血磷脂酰乙醇胺。DMS 作为鞘氨醇激酶-1 (SPHK1) 的竞争性抑制剂,通过特异性抑制 SPHK1 和调节细胞的神经酰胺的水平活动,能诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。药物干预后 DMS 呈下调趋势,说明炎症情况下死亡细胞更多,而药物治疗后种植体周围黏膜的炎症状态逐渐恢复。

3.3 与健康种植体组相比,药物干预后组呈上调趋势的差异代谢产物有:焦磷酸硫胺素、溶血磷脂酰胆碱;呈下调趋势的差异代谢产物主要有:脱氢鞘氨醇、C2 二氢神经酰胺。焦磷酸硫胺素可以催化葡萄糖代谢,影响  $\alpha$ -酮酸的氧化脱羧反应和转酮醇酶<sup>[4]</sup>。脱氢鞘氨醇和 C2 二氢神经酰胺都属于鞘脂类<sup>[13]</sup>,是细胞膜的组成部分,参与了多种生理过程,

包括细胞增殖、分化、衰老和凋亡等<sup>[14]</sup>。药物干预后组的焦磷酸硫酸素和溶血磷脂酰胆碱上调,脱氢鞘氨醇和 C2 二氢神经酰胺下调,说明治疗两周后,虽然黏膜的临床指标恢复正常,但是仍然存在糖代谢、磷脂代谢和鞘脂代谢异常。这可能是由于组织从炎症状态到完全恢复正常代谢需要更长的时间。

由实验分析结果来看,黄嘌呤、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺可能是种植体周围黏膜炎潜在的标志物。本研究的局限性在于未对不同牙周状况个体的 GCF 进行对比分析,这将在后续实验中进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Lindhe J, Meyle J, et al. Peri-implant diseases; Consensus report of the Sixth European Workshop on Periodontology [J]. J Clin Periodontol, 2008, 35(2) : 282-285
- [2] 李维婷,朴牧子,李慧,等.种植体周围疾病发病率及危险因素的研究[J/OL]. 口腔医学研究, 2017, 33(7) : 758-761
- [3] Bevilacqua L, Biasi MD, Lorenzon MG, et al. Volumetric Analysis of Gingival Crevicular Fluid and Peri-Implant Sulcus Fluid in Healthy and Diseased Sites; A Cross-Sectional Split-Mouth Pilot Study [J]. Open Dent J, 2016, 10(2) : 131-138
- [4] Gao S, Yang R, Peng Z, et al. Metabolomics analysis for hydroxyL-proline-induced calcium oxalate nephrolithiasis in rats based on ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Sci Rep, 2016, 6 : 30142
- [5] Cecerska-Heryc E, Jesionowska A, Klaudyna S, et al. Xanthine oxidoreductase reference values in platelet-poor plasma and platelets in healthy volunteers [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015 : 341926
- [6] Shirakura T, Nomura J, Matsui C, et al. Febuxostat, a novel xanthine oxidoreductase inhibitor, improves hypertension

and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2016, 389(8) : 831-838

- [7] Liu R, Huang Q, Shan J, et al. Metabolomics of the Antipyretic Effects of Bubali Cornu (Water Buffalo Horn) in Rats [J]. PLoS One, 2016, 11(7) : e0158478
  - [8] Mayer K, Fegbeutel C, Hattar K, et al. Omega-3 vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients; impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation [J]. Intensive Care Med, 2003, 29(9) : 1472-1481
  - [9] Li Y, Song X, Zhao X, et al. Serum metabolic profiling study of lung cancer using ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 966(1) : 147-153
  - [10] Bao J, Liu F, Zhang C, et al. Anti-melanoma activity of Forsythiae Fructus aqueous extract in mice involves regulation of glycerophospholipid metabolisms by UPLC/Q-TOF MS-based metabolomics study [J]. Sci Rep, 2016, 6 : 39415
  - [11] Jeong H, Kim YH, Lee Y, et al. TRPM2 contributes to LPC-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> influx and microglial activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, pii: S0006-291X(17)30378-30379
  - [12] Zhang Z, Yan Z, Yuan Z, et al. SPHK1 inhibitor suppresses cell proliferation and invasion associated with the inhibition of NF-κB pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Tumour Biol, 2015, 36(3) : 1503-1509
  - [13] Reali F, Morine MJ, Priami C, et al. Mechanistic interplay between ceramide and insulin resistance [J]. Sci Rep, 2017, 7 : 41231
  - [14] 李芳芳,张丹,鲍秀琦,等.二氢神经酰胺研究进展[J].药学报, 2016, 51(9) : 1388-1393
- [收稿日期:2017-07-24] (本文编辑 李四群)

## 关于《口腔医学研究》启用在线投稿系统的启事

《口腔医学研究》杂志网址为 [www.kqxyj.com](http://www.kqxyj.com), 网站主要包括投稿与查询系统、编辑加工系统、专家远程审稿系统 3 部分。作者可以通过网站投稿并查询稿件处理情况, 审稿专家可实现网上审稿。

作者投稿的步骤: 登录《口腔医学研究》网站→点击左侧“作者投稿系统”→注册→填写个人资料→登陆“作者投稿系统”即可。初次注册可能需要花费一定时间, 但注册成功后投稿和查询便可节约大量时间和精力, 今后投稿无需再次注册。

此外, 编辑部的有关公告和通知也将通过网站发布, 编辑部联系电话: 027-87686117, E-mail: [kqxyj@163.com](mailto:kqxyj@163.com)。