

# 口腔龈沟液生物标志物的检测分析现状及临床应用前景展望

胡竹林 赵诣 李茵

首都医科大学附属北京口腔医院修复科 北京 100050

**[摘要]** 龈沟液是存在于牙周龈沟或牙周袋内的组织渗透液,其含量和成分变化与牙周组织健康关系密切。目前研究热点主要集中在寻找比较可靠的高灵敏度和高特异性龈沟液生物标志物以及简单易于操作的临床椅旁检测技术,以期实现对牙周组织不良反应和感染炎症的早期发现、干预和治疗。龈沟液检测具有很大的临床应用潜力,将给临床诊断带来更加客观的量化证据。本文对近年来龈沟液主要生物标志物成分分析、检测技术以及临床应用前景作一综述。

**[关键词]** 牙周病; 龈沟液; 生物标志物; 检测技术; 临床应用

**[中图分类号]** R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2019042



开放科学(资源服务)  
标识码(OSID)

**Analysis status and clinical application prospect of biomarkers in oral gingival crevicular fluid** Hu Zhulin, Zhao Yi, Li Yin. (Dept. of Prosthodontics, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81171004), Beijing Natural Science Foundation (7123214), Beijing Science and Technology New Star Project (Z131107000413040) and Clinical Technical Innovation Project of Beijing Hospital Administration (XMLX201402).

**[Abstract]** Gingival crevicular fluid is a tissue transudate present in the periodontal gingival sulcus or a periodontal pocket, and its amount and composition are closely related to the state of periodontal tissues. Current research focuses on finding reliable, high-sensitivity and high-specificity gingival crevicular fluid biomarkers and convenient clinical chair-side detection technology to achieve the early detection, intervention and treatment of the adverse reactions and inflammation of periodontal tissues. Gingival crevicular fluid detection shows great potential for clinical application and likely provides objective quantitative evidence for clinical diagnosis. Thus, this review summarises the recent studies on the biomarker composition, detection technology and clinical application prospect of gingival crevicular fluid.

**[Key words]** periodontitis; gingival crevicular fluid; biomarker; detection technique; clinical application

口腔牙周病是一种慢性非特异性疾病,其发病率在我国高达70%~85%,是中老年人失牙的主要原因<sup>[1]</sup>。但目前对于牙周疾病的重视程度,诊疗水平等都存在缺陷。牙周病病程长,早期变化不明显,临床诊断主要依靠临床牙周检查指数和X线数字减影技术。但这种诊断具有一定的滞后性,

[收稿日期] 2018-08-10; [修回日期] 2019-01-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81171004);北京自然科学基金(7123214);北京市科技新星项目(Z131107000413040);北京市医院管理局临床技术创新项目(XMLX201402)

[作者简介] 胡竹林,医师,硕士,Email: hzl2016lf@163.com

[通信作者] 李茵,副教授,博士,Email: leeyin78@163.com

不能对牙周风险进行早期评估,也不能对牙周病活动性做出及时评价。随着分子生物学及生物检测技术的不断发展,很多学者开始重视对牙周炎活动期龈沟液内生物标志物的研究。龈沟液(gingival crevicular fluid)是唯一的、直接从体液渗出的液体<sup>[2]</sup>,其含量和成分的变化与牙周组织关系密切,可给牙周健康状况的评价提供重要的量化指标<sup>[3-4]</sup>,有助于提高临床诊断效率和准确率,改善因临床诊断和治疗的不及时造成的牙周不可逆损害。而且由于龈沟液可重复取样,取样具有无创性,能最大限度减少不适感,故龈沟液是目前很有前景的诊断信息来源。

本文旨在对近年来龈沟液主要生物标志物及常用检测技术作一总结，分析龈沟液检测的临床应用前景。

### 1 牙周疾病状态下龈沟液炎症成分的分析

健康牙周位点由于渗透梯度的改变也会出现

少量龈沟液，并且含有与血浆或组织间液相似的成分如蛋白分子、细胞因子等，但含量甚微<sup>[5-6]</sup>。当牙周发生炎症并伴随炎症的进展，龈沟液成分也发生相应的变化，龈沟液含量升高，大量炎症分子释放。这些炎症成分主要可分为3类：酶类、炎症介质、组织破坏产物。牙周炎症状态下龈沟液主要炎症成分汇总见表1。

表 1 牙周炎症状态下龈沟液主要成分的分析

Tab 1 Summary of the components of gingival crevicular fluid in periodontal inflammation

分类	标志物名称	含量变化	检测方法	参考文献
酶类	碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)	增加	酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) ; 荧光测定法	[7-8]
	天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)	增加	干化学法	[9]
	β-葡萄糖醛酸酶 (β-glucuronidase, β-G)	增加	分光光度法	[10]
	弹性蛋白酶 (elastase, EA)	增加	荧光测定法	[11]
	组织蛋白酶B (cathepsin B, CTSB)	增加	荧光测定法	[12]
	组织蛋白酶K (cathepsin K, CTSK)	增加	ELISA	[13]
	基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase, MMP-1)	增加	ELISA	[14]
	基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase, MMP-2)	增加	明胶酶谱法	[15]
	基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase, MMP-3)	增加	ELISA	[16-17]
	基质金属蛋白酶-8 (matrix metalloproteinase, MMP-8)	增加	ELISA	[15,18-20]
	基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase, MMP-9)	增加	ELISA ; 明胶酶谱法	[15,18,20]
	基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase, MMP-13)	增加	ELISA	[16]
	基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)	减少	ELISA	[14,17]
	髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)	增加	ELISA	[15,18]
炎症介质类	白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)	增加	ELISA ; 液相芯片	[21-23]
	白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)	增加	ELISA ; 液相芯片	[8,15,22,24]
	白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)	增加	ELISA ; 液相芯片	[22-23,25]
	肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)	增加	ELISA ; 液相芯片	[8,22-23]
	干扰素-γ (interferon-γ, IFN-γ)	增加	液相芯片	[26]
	前列腺素E2 (prostaglandin E2, PGE2)	增加	ELISA	[27]
	白三烯 B4 (leukotriene B4, LTB4)	增加	酶免疫法	[28]
	单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)	增加	ELISA	[29-30]
	调节活化正常T细胞表达与分泌的趋化因子 (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, RANTES)	增加	液相芯片	[31]
	C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)	增加	ELISA	[8]
	乳铁蛋白 (lactoferrin, LF)	增加	ELISA	[32]
	P物质 (substance-P, SP)	增加	放射免疫法	[33]
	免疫球蛋白-G (immunoglobulin G, IgG)	增加	ELISA	[34]
组织破坏产物	硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS)	增加	ELISA	[7]
	羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp)	增加	生物化学法	[35]
	骨钙素 (osteocalcin, OC)	增加	电化学发光法	[36]

续表1

分类	标志物名称	含量变化	检测方法	参考文献
	骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)	增加	酶免疫法	[37]
	骨结合蛋白	增加	斑点印迹法	[38]
	核因子-κB受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)	增加	ELISA	[39-40]
	骨保护素 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OPG)	减少	ELISA	[39-40]
	型胶原交联羧基端肽 (type I collagen cross-linked carboxyl terminal telopeptide, ICTP)	增加	放射免疫法; 酶免疫法	[41-42]
	钙卫蛋白	增加	ELISA	[43]

牙周炎发病机制的复杂性决定了龈沟液炎症介质的复杂性<sup>[44]</sup>。导致牙周出现不可逆损伤的一个重要因素是菌斑生物膜与宿主免疫炎症反应的失衡<sup>[45]</sup>，过大的炎症反应除了对抗细菌侵袭外还会造成自身组织的损伤，龈沟液内出现大量炎症介质和组织破坏产物。首先，炎症细胞释放如TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、PGE2、RANTES等与免疫炎症相关的细胞因子，它们介导牙周炎整个病理变化进程，与炎症程度关系密切，也是目前研究最多的龈沟液生物标志物；在细胞因子的作用下，中性粒细胞、成纤维细胞等会释放与组织水解有关的酶类如MMP、CTS等，它们不仅能造成结缔组织和骨组织的破坏，也可作为介质参与免疫炎症的调节<sup>[46]</sup>。其中，MMP-8、MMP-9作为一组重要的蛋白酶，常被作为研究牙周疾病的敏感标志物，在疾病位点的龈沟液内含量变化明显<sup>[15,47]</sup>。随着炎症的进一步扩大，牙周结缔组织甚至骨组织开始出现损伤破坏，如氨基多糖（尤其是4-CS）作为结缔组织主要组成成分，Hyp作为主要胶原蛋白成分，OPN作为骨基质成分，当牙周组织发生损伤破坏时释放到龈沟液中，可作为牙周炎症发生的证据。ICTP、RANKL为参与骨吸收破坏的介质，其含量的升高标志着牙周炎正处于活动期并发生着牙槽骨的吸收<sup>[40-41]</sup>，所以它们不仅可以作为诊断标志物，也可作为牙周炎症预测标志物。这三类炎症成分都在一定程度上标志着牙周疾病的发生和发展，他们之间的相互作用构成了复杂的牙周免疫炎症网络，其相对含量的变化更与炎症程度关系密切。

从目前的研究来看，炎症介质作为生物标志物受到更多学者的重视，不仅因为其出现于炎症早期并参与整个炎症过程，与炎症程度关系密切，大量有关商品化的试剂使研究者对于龈沟液

细胞因子等的研究能更加方便和深入；酶类与组织破坏关系密切，对于它们的早期检测，可预测牙周损伤风险；组织破坏产物作为牙周实质性破坏的指标，虽然不如炎症介质更具早期预测性，但是能更准确地提供牙周活动性的证据。有些研究很好地利用了这三类标志物的作用，利用混合标志物组来对相关疾病进行研究；而对于早期牙周炎龈沟液的分析，选择更多的还是炎症介质类标志物；对于重度牙周炎的研究，很多学者倾向于对骨组织和结缔组织破坏物的研究。当然，根据实验设计和实验方法的不同，研究者对炎症指标的选择也不尽相同。

有文献<sup>[4]</sup>总结，目前已发现超过90种以上龈沟液成分与牙周炎症相关，但是根据现有研究来看，龈沟液成分用于临床牙周疾病椅旁检测的明确指导性意见仍不统一。例如，还不能确定哪些指标对疾病诊断具有高度特异性和稳定性，研究较多的生物标志物也没有一个确定的能应用于临床的疾病阈值，部分生物标志物对牙周炎疾病程度及类型诊断的研究结果存在争议等<sup>[48]</sup>。可以说，牙周疾病的龈沟液诊断体系仍不完善，目前的研究多数还处于龈沟液成分与疾病相关性的验证性实验阶段，若要解决上述问题，尚需大量实验室及临床科学研究，最终实现对标志物的筛选和量化标准制定。

## 2 龈沟液的检测技术

龈沟液研究的流行也促使检测技术不断改进，用以诊断疾病的状态、活动性和治疗效果<sup>[49]</sup>。但不可否认，龈沟液检测仍存在一定的劣势，如单个位点样本含量少，对检测灵敏度要求高；不能反映全口牙周状况，若需多位点分析则工作量

巨大等。目前有研究<sup>[50]</sup>提倡，应用较龈沟液量大且更易获取的唾液作为诊断牙周疾病的标志物来源，此方法虽然能较全面地评估口腔卫生环境和疾病状态，但对全口牙周状况及特殊位点的评价不具备特异性。考虑到敏感性和特异性问题，龈沟液依然是最有前景的牙周诊断信息来源<sup>[51]</sup>。通

过改进开发针对小样本量的高灵敏度检测技术，实现单样本高通量分析，使单次龈沟液检测所需样本量降低而检测效率提高，是未来龈沟液标志物检测的突破方向。单位点检测效率的提高也使多位点甚至全口状况评估更加方便。目前，有关龈沟液研究常用检测方法与分析见表2。

表 2 龈沟液炎症标志物的常用检测方法

Tab 2 Commonly used methods for detecting gingival crevicular fluid inflammatory markers

检测方法	优势	劣势
分光光度法	操作简便快速，成本低，应用广泛	对样品纯度要求高；灵敏度和准确度不高
荧光测定法	特异性和灵敏度较高	应用具有局限性；操作复杂；耗时长，易受反应温度和时间等的影响
放射免疫法	特异性和灵敏度较高，简便易行，用样量少等	有时会出现交叉反应、假阳性反应，组织样品处理不够迅速，不能灭活降解酶和盐及pH有时会影响结果等；放射性物质对操作人员有危害，且实验后不易处理
免疫印迹法	分析容量大、敏感度高、特异性强等优点，是检测蛋白质特性、表达与分布的一种最常用的方法	不能准确定量，且检测数量有限
ELISA	简单，快速，灵敏度高，特异性强；所用设备简单，无污染，易于普及；试剂稳定，便于保存	每次只能检测一种目标分子
液相芯片技术	简便，快速，高通量，高效率，灵敏度高，特异性强，重复性好	成本较高

对龈沟液标志物检测力求寻找一种快速，简便，准确，高通量，高灵敏度，价格低廉，可用于临床的即时检测技术（point-of-care testing, POCT）。不过目前相关研究仍停留在实验室检测阶段，尚未实现临床转化。就实验室检测来说，每一种检测方法都有自身的优势和劣势，而且根据实验设计的不同，选择的检测技术也不尽相同。目前，常用检测技术如ELISA、免疫印迹，每次只能对一种或几种成分进行检测，效率低且需样本量大，对于含量较少的龈沟液的检测显示出了弊端。光谱和放射免疫等，由于其技术的复杂性或者检测对象的局限性等因素，使用也较少。随着免疫检测技术的不断发展，液相芯片技术显示出很大优势<sup>[52]</sup>。它是在ELISA原理基础上发展起来的可以用于多种成分同时检测的高通量检测技术，虽然单次检测成本较高，但对于多种成分的检测平均每种成分的成本较ELISA低，而且所需样本量大大减少，是近年来实验室分析研究常用的技术手段。技术的进步同时也带动了实验设计和方法的创新，使龈沟液成分的研究更加广泛和深入。但由于其在龈沟液检测领域刚刚起步，目前有关龈沟液的研究应用最多的检测方法

还是ELISA<sup>[51]</sup>，但是高通量免疫检测技术是未来发展趋势。

不过，对于实现龈沟液临床椅旁检测的转化，不管是ELISA还是芯片技术都存在着价格高昂的缺点。免疫胶体金技术是在放射、荧光和酶标免疫技术之后发展起来的一项新的固相标记免疫检测技术，其简单快速，不需特殊仪器，高特异性，成本低廉的特点，使其成为目前最快的免疫学检测技术之一，也是推动POCT技术逐渐发展成熟的重要手段<sup>[53]</sup>。目前，口腔领域已有应用免疫层析技术检测牙龈卟啉单胞菌的相关研究<sup>[54]</sup>。对于龈沟液临床椅旁检测技术的开发，免疫胶体金技术也许是优势选择。

### 3 龈沟液检测的临床应用前景

除用于牙周疾病诊断和指导治疗外，龈沟液检测也逐渐向着多学科辅助诊断方向发展，包括正畸、修复、种植以及全身疾病方面都在寻求应用龈沟液检测技术对临床问题进行早期诊断及干预治疗。表3是根据现有研究总结龈沟液检测的临床应用前景，为临床研究提供方向和思路。

表 3 龈沟液标志物检测的临床应用前景

Tab 3 Clinical application prospects of the gingival crevicular fluid markers detection

应用	目的
牙周炎诊断	1) 疾病风险评估, 早期诊断和严重程度诊断; 2) 指导临床用药; 3) 指导治疗计划制定; 4) 监测预后情况
种植体周围炎诊断	1) 监测种植效果; 2) 种植体周围炎早期诊断及与种植体黏膜炎鉴别
修复体基牙牙周状态评价	1) 确定修复时机; 2) 指导修复材料和修复方式的应用及效果评价; 3) 对修复体造成的牙周炎进行早期诊断
正畸矫治牙牙周状态评价	1) 指导正畸时机; 2) 评估治疗效果; 3) 对正畸过程中应力或局部刺激导致的牙周组织破坏进行早期诊断
系统性疾病与牙周关系评价	1) 辅助诊断系统性疾病或评价其预后; 2) 对由系统性疾病造成的牙周炎作出鉴别

目前, 龈沟液检测用于临床疾病分析研究较为成熟的还是在牙周病领域, 其在正畸、修复、种植以及全身疾病等领域的研究拓展也是建立在牙周炎症基础上。有实验<sup>[55-56]</sup>证实, 应力也可造成牙周组织微环境的改变, 甚至组织破坏, 导致龈沟液内炎症介质增加。故对龈沟液的检测也可提示口腔治疗方面异常生物力的使用, 反映牙齿处于非正常应力状态<sup>[57]</sup>。根据这一结论, 笔者认为龈沟液检测可以指导临床更合理使用应力进行口腔治疗及对治疗效果进行早期评价。另外, 正畸治疗造成的食物嵌塞, 冠修复造成的龈边缘刺激, 种植体龈边缘设计不合理等常见并发症也是导致牙周疾病的局部促进因素。对于因失牙而进行的修复治疗, 多数患者存在牙周风险, 而目前临床并没有客观的修复治疗标准。利用龈沟液检测对牙周状态进行量化评估, 可较客观地判断修复治疗时机。考虑到正畸修复及种植治疗的市场价格, 若能对治疗前后的牙周风险进行及时准确评估, 就能大幅降低治疗的失败率, 减轻患者再治疗的负担。

一些系统性疾病与牙周炎关系密切, 如糖尿病<sup>[58]</sup>、心血管疾病<sup>[59]</sup>、脑血管疾病<sup>[60]</sup>、肥胖<sup>[61]</sup>、类风湿关节炎<sup>[62]</sup>等。

研究发现, 系统性疾病可增加牙周炎龈沟液炎症因子水平, 促进牙周炎进展; 牙周炎也可作为风险因子导致或加重某些疾病的发生, 同时, 牙周治疗或口腔卫生环境的改善也有利于全身疾病的改善; 吸烟<sup>[63]</sup>及妊娠<sup>[64]</sup>等全身性因素会导致牙周风险指数的增高。不过, 目前对于牙周疾病与系统性疾病相互关系的认识尚不完善, 针对每一种系统性疾病仍需大量的科学研究, 而龈沟液成分分析可以帮助研究者更好地了解这些相互作用的机制<sup>[65]</sup>。研究制定用以评估牙周炎和系统性疾病关系更加准确和敏感的生物指标, 是未来研究的重点。

#### 4 展望

龈沟液检测能帮助研究者更好地了解牙周组织的病理变化, 在指导口腔多学科临床风险评估及多种系统性疾病分析方面具有很大的研究意义, 有望应用于临床成为新的牙周疾病诊断方法。基于临床应用前景的龈沟液体外诊断也给相关研究带来更加现实的意义。但是, 就目前研究情况来看, 无论是炎症标志物的选择还是检测技术的应用仍然没有形成较完备的研究成果, 多数研究还停留在实验室阶段, 尚无应用于临床的报道。开展寻找高度特异性的龈沟液标志物分析研究, 开展快速、简便、准确率高的临床椅旁龈沟液检测技术研究, 被认为是最具潜力的研究方向。对于炎症标志物的分析, 组织破坏产物较其他炎症标志物更具备诊断特异性, 若结合高通量检测技术将组织破坏产物和与牙周组织破坏高度相关的炎症介质如IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE2、MMP等综合分析, 那么结果用于牙周疾病早期诊断将更加具备可靠性。

#### 5 参考文献

- [1] 孟焕新. 牙周病学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 155.  
Meng HX. Periodontology[M]. 3rd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2008: 155.
- [2] Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid[J]. Periodontol 2000, 2003, 31: 32-42.
- [3] Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, et al. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases[J]. Periodontol 2000, 2003, 31: 167-180.

- [4] Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid[J]. *Periodontol* 2000, 2005, 39: 53-72.
- [5] Curtis MA, Griffiths GS, Price SJ, et al. The total protein concentration of gingival crevicular fluid. Variation with sampling time and gingival inflammation[J]. *J Clin Periodontol*, 1988, 15(10): 628-632.
- [6] Attström R, Egelbert J. Presence of leukocytes within the gingival crevices during developing gingivitis in dogs[J]. *J Periodont Res*, 1971, 6(2): 110-114.
- [7] Khongkhunthian S, Kongtawelert P, Ongchai S, et al. Comparisons between two biochemical markers in evaluating periodontal disease severity: a cross-sectional study[J]. *BMC Oral Health*, 2014, 14: 107.
- [8] Zhang Q, Chen B, Zhu DG, et al. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: a cross-sectional study[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 72: 92-98.
- [9] Sheth TS, Verma SJ. Analysis of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid: a study with initial therapy[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2011, 15(3): 235-239.
- [10] Sanara PP, Shereef M, Hegde S, et al. Comparative analysis of gingival crevicular fluid  $\beta$ -glucuronidase levels in health, chronic gingivitis and chronic periodontitis[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2015, 7(Suppl 2): S660-S665.
- [11] Gul SS, Douglas CW, Griffiths GS, et al. A pilot study of active enzyme levels in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontal disease[J]. *J Clin Periodontol*, 2016, 43(8): 629-636.
- [12] Kunimatsu K, Yamamoto K, Ichimaru E, et al. Cathepsins B, H and L activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients and experimental gingivitis subjects[J]. *J Periodont Res*, 1990, 25(2): 69-73.
- [13] Garg G, Pradeep AR, Thorat MK. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of Cathepsin K in periodontitis[J]. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(11): 1046-1051.
- [14] Ghodpage PS, Kolte RA, Kolte AP, et al. Influence of phase periodontal therapy on levels of matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1[J]. *Saudi Dent J*, 2014, 26(4): 171-175.
- [15] Baeza M, Garrido M, Hernández-Ríos P, et al. Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: an exploratory study[J]. *J Clin Periodontol*, 2016, 43(1): 34-45.
- [16] Pawar DD, Mehta DS. Effect of phase 1 periodontal therapy on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinases-3 and -13 in chronic periodontitis patients[J]. *J Investig Clin Dent*, 2015, 6(2): 118-124.
- [17] Kumar PM, Reddy NR, Deepa A, et al. Comparison of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels in gingival crevicular fluid in periodontal health, disease and after treatment: a clinico biochemical study[J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2013, 10(4): 434-439.
- [18] Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy [J]. *J Clin Periodontol*, 2010, 37(2): 180-190.
- [19] Romero AM, Mastromatteo-Alberga P, Escalona L, et al. MMP-3 and MMP-8 levels in patients with chronic periodontitis before and after nonsurgical periodontal therapy[J]. *Invest Clin*, 2013, 54(2): 138-148.
- [20] Victor DJ, Subramanian S, Gnana PP, et al. Assessment of matrix metalloproteinases-8 and -9 in gingival crevicular fluid of smokers and non-smokers with chronic periodontitis using ELISA[J]. *J Int Oral Health*, 2014, 6(6): 67-71.
- [21] Shimada Y, Tabeta K, Sugita N, et al. Profiling biomarkers in gingival crevicular fluid using multiplex bead immunoassay[J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58(6): 724-730.
- [22] Fujita Y, Ito H, Sekino S, et al. Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis [J]. *Odontology*, 2012, 100(2): 215-221.
- [23] Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, et al. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis [J]. *J Periodont Res*, 2013, 48(1): 44-51.

- [24] Keles ZP, Keles GC, Avci B, et al. Analysis of YKL-40 acute-phase protein and interleukin-6 levels in periodontal disease[J]. *J Periodontol*, 2014, 85(9): 1240-1246.
- [25] Lagdive SS, Marawar PP, Byakod G, et al. Evaluation and comparison of interleukin-8 (IL-8) level in gingival crevicular fluid in health and severity of periodontal disease: a clinico-biochemical study[J]. *Indian J Dent Res*, 2013, 24(2): 188-192.
- [26] Papathanasiou E, Teles F, Griffin T, et al. Gingival crevicular fluid levels of interferon- $\gamma$ , but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease[J]. *J Periodont Res*, 2014, 49(1): 55-61.
- [27] Kumar AK, Reddy NR, Babu M, et al. Estimation of prostaglandin  $E_2$  levels in gingival crevicular fluid in periodontal health, disease and after treatment[J]. *Contemp Clin Dent*, 2013, 4(3): 303-306.
- [28] Pradeep AR, Manjunath SG, Swati PP, et al. Gingival crevicular fluid levels of leukotriene B4 in periodontal health and disease[J]. *J Periodontol*, 2007, 78(12): 2325-2330.
- [29] Gunpinar S, Alptekin NO, Dundar N. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with aggressive periodontitis[J]. *Oral Dis*, 2017, 23(6): 763-769.
- [30] Anil S, Preethanath RS, Alasqah M, et al. Increased levels of serum and gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 in smokers with periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2013, 84(9): e23-e28.
- [31] Haytural O, Yaman D, Ural EC, et al. Impact of periodontitis on chemokines in smokers[J]. *Clin Oral Investig*, 2015, 19(5): 979-986.
- [32] Yadav N, Lamba AK, Thakur A, et al. Effect of periodontal therapy on lactoferrin levels in gingival crevicular fluid[J]. *Aust Dent J*, 2014, 59(3): 314-320.
- [33] Ozturk A, Bilgici B, Odyakmaz S, et al. The relationship of periodontal disease severity to serum and GCF substance P levels in diabetics[J]. *Quintessence Int*, 2012, 43(7): 587-596.
- [34] Komiyama Y, Kafkova LR, Barasch A, et al. Origin of galactose-deficient immunoglobulin g in gingival crevicular fluid in periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2014, 85(12): 1779-1785.
- [35] Akalin FA, Sengün D, Eratalay K, et al. Hydroxyproline and total protein levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with juvenile, rapidly progressive, and adult periodontitis[J]. *J Periodontol*, 1993, 64(5): 323-329.
- [36] Bullon P, Goberna B, Guerrero JM, et al. Serum, saliva, and gingival crevicular fluid osteocalcin: their relation to periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women[J]. *J Periodontol*, 2005, 76(4): 513-519.
- [37] Sharma CG, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease [J]. *J Periodontol*, 2006, 77(10): 1674-1680.
- [38] Bowers MR, Fisher LW, Termine JD, et al. Connective tissue-associated proteins in crevicular fluid: potential markers for periodontal diseases[J]. *J Periodontol*, 1989, 60(8): 448-451.
- [39] Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio[J]. *J Clin Periodontol*, 2007, 34(5): 370-376.
- [40] Baltacıoğlu E, Kehribar MA, Yuva P, et al. Total oxidant status and bone resorption biomarkers in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2014, 85(2): 317-326.
- [41] Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2010, 81(2): 251-259.
- [42] Hernández Ríos M, Sorsa T, Obregón F, et al. Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade[J]. *J Clin Periodontol*, 2009, 36(12): 1011-1017.
- [43] Zheng YF, Hou JX, Peng L, et al. The pro-apoptotic and pro-inflammatory effects of calprotectin on human periodontal ligament cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110421.
- [44] Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2013, 15: e7.
- [45] Ebersole JL, Dawson D 3rd, Emecen-Huja P, et al.

- The periodontal war: microbes and immunity[J]. *Periodontol* 2000, 2017, 75(1): 52-115.
- [46] Barros SP, Williams R, Offenbacher S, et al. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis[J]. *Periodontol* 2000, 2016, 70(1): 53-64.
- [47] Kinney JS, Morelli T, Oh M, et al. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression[J]. *J Clin Periodontol*, 2014, 41(2): 113-120.
- [48] Duarte PM, Bastos MF, Fermiano D, et al. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review[J]. *J Periodont Res*, 2015, 50(1): 18-27.
- [49] Ram VS, Parthiban, Sudhakar U, et al. Bone biomarkers in periodontal disease: a review article[J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(1): ZE07-ZE10.
- [50] Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases[J]. *Periodontol* 2000, 2016, 70(1): 164-183.
- [51] Nazar Majeed Z, Philip K, Alabsi AM, et al. Identification of gingival crevicular fluid sampling, analytical methods, and oral biomarkers for the diagnosis and monitoring of periodontal diseases: a systematic review[J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 1804727.
- [52] Wassall RR, Preshaw PM. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid[J]. *Periodontol* 2000, 2016, 70(1): 65-79.
- [53] 周蕾, 杨瑞馥. 从定性到定量的转变是POCT发展历程中的重要挑战[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(11): 801-803.
- Zhou L, Yang RF. Promotion from qualitative to quantitative test is one of challenges of point-of-care testing development[J]. *Chin J Lab Med*, 2014, 37(11): 801-803.
- [54] Imamura K, Takayama S, Saito A, et al. Evaluation of a novel immunochromatographic device for rapid and accurate clinical detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque[J]. *J Microbiol Methods*, 2015, 117: 4-10.
- [55] Liu J, Li Q, Liu SY, et al. Periodontal ligament stem cells in the periodontitis microenvironment are sensitive to static mechanical strain[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 1380851.
- [56] Spencer AY, Lallier TE. Mechanical tension alters semaphorin expression in the periodontium[J]. *J Periodontol*, 2009, 80(10): 1665-1673.
- [57] Yamaguchi M, Kasai K. Inflammation in periodontal tissues in response to mechanical forces[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005, 53(5): 388-398.
- [58] Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M, Bascones-Ilundain J. Diabetes and periodontitis: a bidirectional relationship[J]. *Med Clin*, 2015, 145(1): 31-35.
- [59] Kampits C, Montenegro MM, Ribeiro IW, et al. Periodontal disease and inflammatory blood cytokines in patients with stable coronary artery disease[J]. *J Appl Oral Sci*, 2016, 24(4): 352-358.
- [60] Palm F, Lahdentausta L, Sorsa T, et al. Biomarkers of periodontitis and inflammation in ischemic stroke: a case-control study[J]. *Innate Immun*, 2014, 20(5): 511-518.
- [61] Buduneli N, Bryikoğlu B, Ilgenli T, et al. Is obesity a possible modifier of periodontal disease as a chronic inflammatory process? A case-control study[J]. *J Periodont Res*, 2014, 49(4): 465-471.
- [62] Javed F, Ahmed HB, Mikami T, et al. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with chronic periodontitis[J]. *J Invest Clin Dent*, 2014, 5(1): 1-8.
- [63] Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38(3): 219-228.
- [64] Machado FC, Cesar DE, Apolônio AC, et al. Longitudinal study on clinical and microbial analysis of periodontal status in pregnancy[J]. *Braz Oral Res*, 2016, 30(1): e87.
- [65] Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1098: 216-229.

( 本文编辑 王姝 )