

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.014

TGF- β 1 基因 rs200482214 位点多态性与黑龙江省汉族人群慢性牙周炎的相关性研究 *

乔聪聪 宁婉辰 何艳艳 石丽萍 贾树芳 王 丽[△]

(哈尔滨医科大学附属口腔医院牙周病科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨转移生长因子 β 1(transforming growth factor beta-1, TGF- β 1)位点 rs200482214 基因多态性与黑龙江省汉族人群慢性牙周炎的易感性的相关性。**方法:**选取 2012 年 3 月至 2013 年 7 月在哈尔滨医科大学附属口腔医院牙周科就诊的 135 例轻、中、重度慢性牙周炎汉族患者(牙周炎组)和 108 例汉族健康对照者(健康对照组)作为研究对象,基因组 DNA 来自口腔颊粘膜拭子,采用多重单碱基延伸 SNP 分型技术(Multiplex SNaPshot technique)对所有受试者 TGF- β 1 基因 rs200482214 位点进行检测,比较两组间此位点基因型分布和等位基因频率的差异。**结果:**(1)TGF- β 1 基因 rs200482214 位点各基因型(GG、GA、AA)分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 ($P>0.05$);(2)TGF- β 1 基因 rs200482214 位点 GG、GA、AA 在牙周炎组和健康对照组的分布频率分别为 61.5 %、30.4 %、8.1 %和 63.0 %、28.7 %、8.3 %,两组人群基因型分布频率差异无统计学意义($P>0.05$);等位基因 G、A 在牙周炎组和健康对照组分布频率分别为 76.7 %、23.3 %和 77.3 %、22.7 %, 两组人群的等位基因分布频率差异亦无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**TGF- β 1 位点 rs200482214 基因多态性与黑龙江省汉族人群慢性牙周炎的易感性不具有相关性。

关键词:慢性牙周炎;基因多态性;转移生长因子 β 1

中图分类号:R781.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5855-04

Association between TGF- β 1 rs200482214 Polymorphism and Susceptibility to Chronic Periodontitis in Chinese Han in Heilongjiang*

QIAO Cong-cong, NING Wan-chen, HE Yan-yan, SHI Li-ping, JIA Shu-fang, WANG Li[△]

(Department of Periodontology, the Affiliated Stomatological Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the association between TGF- β 1 rs200482214 polymorphism and susceptibility to Chronic periodontitis in Chinese Han in Heilongjiang. **Methods:** We performed a case-control study on 135 mild, moderate, severe chronic periodontitis patients and 108 healthy controls. Genomic DNA from oral mucosa of two groups was got. Polymorphism of TGF- β 1 gene was analyzed using the Multiplex SNaPshot technique, the differences of the genotype and allele frequencies were calculated and analyzed. **Results:** (1)All genotypes distribution of the TGF- β 1 rs200482214 polymorphism were in Hardy-Weinberg equilibrium in both the cases and the controls; (2)TGF- β 1 rs200482214 GG, GA, and AA genotype frequencies were 61.5 %, 30.4 % and 8.1 % in case samples, and 63.0 %, 28.7 % and 8.3 % in control samples, respectively, two groups genotype frequencies distribution were not significantly different ($P>0.05$); The allele G, A distribution frequencies were 76.7 %, 23.3 % in the periodontitis group and 77.3 %, 22.7 % in the control group, no significant difference was found in the distribution of allele frequencies between two groups ($P>0.05$). **Conclusion:** TGF- β 1 rs200482214 polymorphism may be not association with the susceptibility to Chronic Periodontitis in Chinese Han in Heilongjiang.

Key words: Chronic periodontitis; Polymorphism; TGF- β 1

Chinese Library Classification(CLC): R781.42 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5855-04

前言

牙周炎在世界范围内的患病率均较高,一直是成人失牙的主要原因之一。在我国,牙周炎的患病率更居于龋病之上,我国人口众多,而且随着社会的老龄化,牙周炎将成为更突出的保健问题之一^[1]。慢性牙周炎是牙周疾病中最常见的一种类型,是由牙菌斑中的微生物所引起的牙周支持组织的慢性感染性疾

病,其主要临床特征是牙龈炎症、牙周袋形成、附着丧失、牙槽骨吸收,最终导致牙齿松动、脱落,丧失咀嚼功能。牙周炎是一种多因素所致的疾病,菌斑微生物是牙周炎发生的始动因子,但并非是唯一条件,其发生还受到其他局部刺激因素和全身因素的影响。

近年来,随着遗传学、分子生物学的不断发展,人类基因组计划的不断深入研究,越来越多的学者们开始关注慢性牙周炎

* 基金项目:黑龙江省青年科学基金项目(QC2010008)

作者简介:乔聪聪(1985-),女,硕士研究生,研究方向:牙周疾病的基础研究,

E-mail:414678006@qq.com

[△]通讯作者:王丽,副主任医师,博士,E-mail:wli doctor@163.com

(收稿日期:2014-03-14 接受日期:2014-04-12)

的遗传学背景^[2]。与遗传有关的宿主易感性可通过改变宿主对微生物的反应性影响疾病的进展速度和严重程度^[1]。经典的遗传学实验证明:同卵孪生同胞之间对牙周炎的易感性较异卵孪生同胞大,表明遗传因素与牙周炎的发生有着密切联系。不同地域或民族人群的遗传背景不同,其对牙菌斑中微生物的反应性也可能不同。本研究旨在探讨 TGF β 1rs200482214 位点基因多态性与黑龙江省汉族人群中慢性牙周炎之间的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

受试者均选自 2012 年 3 月至 2013 年 7 月在哈尔滨医科大学附属口腔医院牙周科就诊的患者,分为慢性牙周炎组(轻度、中度、重度)和健康对照组。慢性牙周炎组 135 例,男 69 例,女 66 例,年龄 30-70 岁;健康对照组 108 例,男 59 例,女 49 例,年龄 30-70 岁。

纳入标准:年龄 30-70 岁;三代均为汉族,且三代以内未与其他民族通婚,受试者之间没有亲缘关系;无全身系统性疾病,妇女未处于妊娠期或哺乳期,无正畸治疗史;三个月内未服用抗生素;受试前未做过系统的牙周治疗,无其它口腔疾病;全口至少有 20 颗可以进行牙周评价的牙齿,至少有 4 颗磨牙;所有受试者检查 6 颗指数牙:11、16、26、31、36 和 46,如指数牙缺失则以临牙代替。

诊断标准^[3]:①重度 CP 组:PD>6 mm,平均牙周附着丧失(CAL)CAL $\geq$ 5 mm,口内至少有 3 个区域有一个或多个邻面位点 CAL $\geq$ 5 mm;②中度 CP 组:PD $\leq$ 6 mm,平均 CAL 为 1.6 mm-2.4 mm,口内至少有 3 个区域或至少 6 颗牙但不超过 8 个部位邻面位点 CAL $\geq$ 3 mm;③轻度 CP 组:PD $\leq$ 4 mm,平均 CAL 为 0.6 mm-1.5 mm,无邻面位点 CAL $\geq$ 3 mm;④健康对照组:牙周健康,PD $\leq$ 3 mm,平均 CAL $\leq$ 0.5 mm,无邻面位点 CAL $\geq$ 3 mm,BOP(-)。

1.2 研究方法

1.2.1 牙周检查 所有受试者均在知情同意的情况下对其进行检测。由同一位牙周专科医师对所有受试者进行牙周专科检查,测量每颗指数牙 6 个位点(远中颊侧、颊侧中央、近中颊侧、远中舌侧、舌侧中央、近中舌侧)的牙周状况,如 PD、CAL、BOP、GI、PLI。

1.2.2 标本采集和 DNA 提取 用无菌棉签取双侧颊粘膜拭

子,室温下自然干燥,剥取颊粘膜拭子表层放入 Ep 管中,用口腔拭子基因 DNA 快速提取试剂盒对标本进行 DNA 提取,得到的 DNA 样本,-20℃保存备用。

1.2.3 多重单碱基延伸 SNP 分型技术(Multiplex SNaPshot technique)^[4-6] ①合成 TGF- β 1rs200482214 引物:上游引物:5'-CGTGCTGCTCCACTTTTAAC-3',下游引物:5'-TTCAACA-CATCAGAGCTCCG-3'。②扩增体系:DNA 模板 1 μ L,dNTP0.5 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,正、反义引物各 0.5 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L,MgCl₂ 0.8 μ L,无菌去离子水补足总体积至 25 μ L。③扩增程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30s,循环 33 次,72℃延伸 5 min。④PCR 产物纯化,4℃保存备用。⑤SNaPshot 延伸反应:96℃10 s,51℃5 s,60℃30 s,循环 25 次,所得产物纯化,4℃保存备用。延伸产物经 ABI3730 测序,用 GeneMapper 软件基因分析。

1.3 统计学分析

使用 SPSS17.0 软件进行统计分析,基因型频率和等位基因频率采用直接计算法得出。各组基因型用 Hardy-Weinberg 平衡检测,并经 χ^2 检验($P>0.05$)确定是否达到遗传平衡。各组等位基因以及基因型的分布频率用优势比(odds ratio,OR)及 95% 可信区间(95% confidence interval,95% CI)表示相对风险度。

2 结果

基因型和等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),结果见表 1。经卡方检验,两组研究人群 TGF- β 1 的 rs200482214 位点基因型的分布差异无统计学意义($\chi^2=0.080$, $P=0.961$, $P>0.05$)(表 1),等位基因频率的分布比较差异也无统计学意义($\chi^2=0.028$, $P=0.866$, $P>0.05$)(表 1)。在牙周炎组,分别比较 TGF- β 1rs200482214 位点基因型及等位基因在轻、中、重度牙周炎组的分布差异,亦无统计学意义,结果见表 2、表 3。

3 讨论

流行病学调查发现,慢性牙周炎具有家族聚集性^[7]。Michalowicz 等^[8]通过对 117 对慢性牙周炎的双生子进行研究发现:同卵双生子的各项临床指标比异卵双生子的更加相似,疾病的严重程度和范围也具有统计学意义,表明遗传因素在牙周炎的发病机制中发挥着重要作用。1997 年,Kornman 等人^[9]第一次发现 IL-1 基因型与牙周病具有相关性,自此开启了基

表 1 TGF- β 1rs200482214 基因型分布及等位基因频率
Table1 Genotype and Allele frequencies distribution of TGF- β 1rs200482214

	Cases (n=135)	Controls (n=108)	χ^2	P	OR(95%CI)
Genotype	N(frequency)	N(frequency)			
G/G	83(61.5%)	68(63.0%)	0.080	0.961	1.00
G/A	41(30.4%)	31(28.7%)			1.084(0.615-1.908)
A/A	11(8.1%)	9(8.3%)			1.001(0.392-2.557)
Allele					
G	207(76.7%)	167(77.3%)	0.028	0.866	1.00
A	63(23.3%)	49(22.7%)			1.037(0.678-1.587)

表 2 轻中度牙周炎患者 TGF- β 1rs200482214 基因型分布及等位基因频率比较Table 2 Comparison of the genotype and Allele frequencies distribution of TGF- β 1rs200482214 between mild and moderate cases

	Mild cases (n=41)	Moderate cases (n=40)	X ²	P
Genotype	N(frequency)	N(frequency)		
G/G	25(61.0 %)	26(65.0 %)	0.174	0.917
G/A	13(31.7 %)	11(27.5 %)		
A/A	3(7.3 %)	3(7.5 %)		
Allele				
G	63(76.8 %)	63(78.75 %)	0.086	0.769
A	19(23.2 %)	17(21.25 %)		

表 3 中重度牙周炎患者 TGF- β 1rs200482214 基因型分布及等位基因频率比较Table3 Comparison of the genotype and Allele frequencies distribution of TGF- β 1rs200482214 between moderate and severe cases

	Moderate cases (n=40)	Severe cases (n=54)	X ²	P
Genotype	N(frequency)	N(frequency)		
G/G	26(65.0 %)	32(59.2 %)	0.329	0.848
G/A	11(27.5 %)	17(31.5 %)		
A/A	3(7.5 %)	5(9.3 %)		
Allele				
G	63(78.75 %)	81(75.0 %)	0.361	0.548
A	17(21.25 %)	27(25.0 %)		

因多态性与牙周炎相关性研究的先河。随着人类基因组计划的不断深入研究,寻找具有基因多态性的新位点与牙周炎的关系越来越受到各国研究学者的关注^[10,11]。

TGF- β 是一类具有复杂生物学效应的生长因子,在体内广泛存在,可以调节细胞的生长、分化,诱导胶原基因的表达,引起细胞外基质纤维化及修复组织损伤,并具有强大的免疫调节作用^[12,13]。它是由两个各含 112 个氨基酸,相对分子质量为 12500 的亚单位通过二硫键连接而成的同型二聚体。TGF- β 1 是 TGF- β 家族最常见且研究最广泛的亚型,人类 TGF- β 1 基因定位于染色体 19q13.1-q13.3, 含有 7 个外显子。TGF- β 1 rs200482214 位点因单个碱基的置换发生错义突变,可使氨基酸编码发生改变,由精氨酸变为半胱氨酸(Arg-Cys),这种氨基酸发生改变可能会影响某些疾病的易感性^[14-16]。而本研究的结果显示,TGF- β 1 基因 rs200482214 位点 GG、GA、AA 在牙周炎组和健康对照组的基因型分布频率差异无统计学意义;等位基因 G、A 在牙周炎组和健康对照组的分布频率差异亦无统计学意义;在牙周炎组,轻、中、重度三组的基因型及等位基因相比较,也无统计学意义;表明 TGF- β 1 位点 rs200482214 基因多态性与黑龙江省汉族人群慢性牙周炎的易感性不具有相关性。

国内外一些专家学者对 TGF- β 1 基因其它位点的多态性的意义也进行了探究。Holla 等^[17]通过应用特异性引物聚合酶链技术 (PCR-SSP) 测定 TGF- β 1-988C/A、-800G/A、-509C/T、-10T/C、-25G/C 等 5 个基因多态性位点,并对这 5 个位点的基因

多态性与成人牙周炎的关系进行了研究,在 108 例正常对照和 90 例牙周炎患者的对比研究中发现其等位基因序列或基因型分布没有显著的差别,对吸烟组与不吸烟组的对比也没有统计学意义,表明 TGF- β 1 的单核苷酸多态性与牙周炎的易感性无关。然而,Souza 等^[18]在探讨高加索人 TGF- β 1-509C/T 与慢性牙周炎易感性的关系时,发现 TGF- β 1-509C/T 的多态性对牙周炎的炎症反应具有调节作用。赵西珍等^[19]也从基因水平探讨了牙周炎发病的遗传学机制,通过测试 TGF- β 1-509C/T 在中国汉族人群中重度慢性牙周炎的发病相关性,认为 C 等位基因可能是重度慢性牙周炎的遗传易感基因。Babel^[14]和 Atilla^[15]等人采用聚合酶链反应技术 (PCR) 分别在德国人与土耳其人群中测试 TGF- β 1 密码子 25 与慢性牙周炎易感性的关系,发现 TGF- β 1 密码子 25 单核苷酸多态性与牙周炎易感性具有相关性。Heidari 等^[16]采用扩增阻滞突变系统聚合酶链技术(APMS-PCR)对牙周炎组和对照组人员的牙龈组织做定量分析,发现 TGF- β 1 29C/T 可能与慢性牙周炎的发病有关。因此,TGF- β 1 的生物特性广泛,其基因多态性在人群中的分布及在相关疾病中的作用可能具有人群特异性和疾病特异性^[20]。

TGF- β 1 在疾病过程中发挥的作用是很复杂的,其致病机理迄今尚不完全清楚,各国学者的实验结果不尽相同,可能与诸多方面有关,如种族不同、地理环境的差异、生活习惯的不同、试验人员纳入标准及实验方法的不同等,这些因素均可能影响研究结果。本实验结果虽显示 TGF- β 1 基因 rs200482214

位点的多态性与慢性牙周炎不具有显著相关性,但慢性牙周炎是一种复杂的多基因疾病,TGF- β 1 基因其它位点的多态性以及其它细胞因子的基因多态性都可能影响宿主对牙周炎的易感性。因此,探索不同基因的多态性与牙周炎的关系仍是十分必要的,可从基因方面揭示牙周炎的发病机制,为临床工作提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] 孟焕新.牙周病学[M].北京:人民卫生出版社,2008:32-82
Meng Huan-xin.Periodontology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008:32-82
- [2] Yosheie H, Kobayashi T, Tai H, et al. The role of genetic polymorphisms in periodontitis[J]. Periodontology, 2000, 2007, 43:102-132
- [3] Armitage GC, Wu Y, Wang HY, et al. Low prevalence of periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage[J]. J Periodontol, 2000, 71(2):164-171
- [4] Yan F, Gao YF, Lv F, et al. No association between IRF3 polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus infection in Chinese patients [J].World J Gastroenterol, 2012, 18(4): 388-392
- [5] Li N, Gao YF, Zhang TC, et al. Relationship between interleukin 18 polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B virus infection [J]. World J Hepatol, 2012, 4(3):105-109
- [6] Yan Yan-zhao, Feng Ju-zhang, Si Quan-zhu. The association of a single nucleotide polymorphism in the promoter region of the LAMA1 gene with susceptibility to Chinese high myopia[J]. Molecular Vision, 2011, 17:1003-1010
- [7] Petit MD, Van Steenberg TJ, Timmerman MF. Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitispatients[J]. J Clin Periodontol, 1994, 21(2):76-85
- [8] Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis [J].J Periodontol, 2000, 71(11):1699-1707
- [9] Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease [J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(1):72-77
- [10] EKimon Divaris, Keri L. Monda, Kari E. North, et al. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis:a genome-wide association study[J]. Human Molecular Genetics, 2013, 22(11):2312-2324
- [11] Lindroth AM, Park YJ. Epigenetic biomarkers:a step forward for understanding periodontitis [J]. J Periodontal Implant Sci, 2013, 43: 111-120
- [12] Akihiko Yoshimura, Yu Wakabayashi, Tomoaki Mori. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β [J]. J Biochem, 2010, 147(6):781-792
- [13] Lenka Kubickova, Lenka Sedlarikova, Roman Hajek. TGF- β -an excellent servant but a bad master[J]. Journal of Translational Medicine, 2012, 10:183
- [14] Nina Babel, Georgy Cherepnev, Daniel Babel, et al. Analysis of Necrosis Factor- α , Transforming growth factor- β , Interleukin-10, IL-6, and Interferon- γ Gene Polymorphisms in Patients With Chronic Periodontitis[J]. J Periodontol, 2006, 77: 1978-1983
- [15] Atilla G, Emingil G, Köse T, et al. TGF-beta1 gene polymorphisms in periodontal diseases[J]. Clin Biochem, 2006, 39(9): 929-934
- [16] Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Hashemi M, et al. Quantitative Analysis of Interdental Gingiva in Chronic Periodontitis Patients With Transforming Growth Factor- β 1 29C/T Gene Polymorphisms [J]. J Periodontol, 2013, 1-11
- [17] Holla LI, Fassmann A, Benes P, et al. 5 polymorphisms in the transforming growth factor- b1 gene (TGF- b 1) in adult periodontitis[J].J Clin Periodontol, 2002, 29: 336-341
- [18] De Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, et al. Analysis of the TGF-b1 promoter polymorphism (C509T) in patients with chronic periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 2003, 30: 519-523
- [19] 赵西珍, 管泽民, 张艳敏. 转化生长因子 β 1 基因 -509 位点多态性与重度慢性牙周炎易感性的关系[J]. 中华口腔医学杂志, 2010, 45 (10): 610-613
Zhao Xi-zhen, Guan Ze-min,Zhang Yan-min. Relationship between transforming growth factor beta-1gene-509C/T polymorphism and severe chronic periodontitis[J]. Chin J Stomatol, 2010,45(10):610-613
- [20] 季鑫. TGF β 1 基因单核苷酸多态性与疾病的关系. 现代免疫学[J]. 2009, 29(2): 165-168
Ji Xin. Relationship between TGF- β 1 gene polymorphism and the disease[J]. Courrent Immunology, 2009, 29(2): 165-168

(上接第 5823 页)

- [16] Saba TM, Jaffe E. Plasma fibronectin (opsonic glycoprotein): its synthesis by vascular endothelial cells and role in cardiopulmonary integrity after trauma as related to reticuloendothelial function[J]. Am J Med, 1980, 68(4): 577-594
- [17] Clark RA, Quinn JH, Winn HJ, et al. Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury [J]. J Exp Med, 1982, 156(2): 646-651
- [18] Larjava H, Koivisto L, Heino J, et al. Integrins in periodontal disease [J]. Exp Cell Res, 2014,325(2):104-110
- [19] Sakai T, Takako S, Yasuyoshi O, et al. The distribution of fibronectin and laminin in the murine periodontal membrane, indicating possible functional role in the apical migration of the junctional epithelium[J]. Archs oral Biol, 1996, 41(8/9): 885-891
- [20] Clark RA, An JQ, Greiling D, et al. Fibroblast migration on fibronectin requires three distinct functional domains [J]. J Invest Dermatol, 2003, 121(4): 695-705