

【临床研究】

本文引用:黄萍,张雨慧,林静,等.转化生长因子- β_1 29C/T 基因多态性与墨玉县维吾尔族成人慢性牙周炎的相关性[J].新乡医学院学报,2017,34(12):1114-1117. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.12.018.

转化生长因子- β_1 29C/T 基因多态性与墨玉县维吾尔族成人慢性牙周炎的相关性

黄萍,张雨慧,林静,赵今

(新疆医科大学第一附属医院牙体牙髓科,新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 探讨转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 29C/T(10号密码子)基因多态性与墨玉县维吾尔族成人慢性牙周炎的相关性。方法 随机选择该地区建立的慢性牙周炎生物样本库中的300个样本并分为对照组(牙周健康者)、轻度慢性牙周炎组和中重度慢性牙周炎组,每组100个样本。采用四引物扩增受阻突变聚合酶链反应(T-ARMS-PCR)方法检测受试者TGF- β_1 29C/T(10号密码子)基因型和等位基因的分布,并采用 χ^2 检验、有序多分类logistic回归等方法分析TGF- β_1 29C/T基因多态性与慢性牙周炎的相关性。结果 3组受试者性别构成、年龄、附着丧失及探诊深度比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),基因型分布符合Hardy-Weinberg遗传平衡($P > 0.05$)。基因型及等位基因频率在对照组、轻度慢性牙周炎组、中重度慢性牙周炎组的分布比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 12.161, 8.418, P < 0.05$)。经Bonferroni校正,对照组与中重度牙周炎组基因型、等位基因频率分布比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 11.306, 8.415, P < 0.0167$),对照组与轻度慢性牙周炎组、轻度慢性牙周炎组与中重度慢性牙周炎组比较差异均无统计学意义($P > 0.0167$)。Logistic回归分析显示,年龄55~65岁的人群患慢性牙周炎的风险是年龄<35岁人群的85.29倍(95%可信区间:下限为34.81,上限为209.14),携带TT基因型的人群患慢性牙周炎的风险是CC基因型人群的2.36倍。结论 初步证实了TGF- β_1 29C/T(10号密码子)基因多态性与新疆墨玉县维吾尔族人群慢性牙周炎易感性有关,年龄及携带TT基因型可能是墨玉县维吾尔族人群患慢性牙周炎的危险因素。

关键词: 转化生长因子;慢性牙周炎;基因多态性

中图分类号: R781.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)12-1114-04

Correlation of transforming growth factor- β_1 29C/T gene polymorphisms with adult chronic periodontitis in Uygur population of Moyu county

HUANG Ping, ZHANG Yu-hui, LIN Jing, ZHAO Jin

(Department of Operative Dentistry and Endodontics, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) 29C/T (codon 10) gene polymorphisms and adult chronic periodontitis in Moyu Uygur population. **Methods** Three hundred samples from the region's biological sample library of chronic periodontitis were selected randomly and divided into control group periodontal healthy subjects, mild chronic periodontitis group, moderate and severe chronic periodontitis group, with 100 samples in each group. The distribution of genotype and allele of TGF- β_1 29C/T (codon 10) in the subjects was detected by tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (T-ARMS-PCR) method. The association between TGF- β_1 29C/T gene polymorphism and chronic periodontitis was analyzed by Chi-squared test, ordinal classification logistic regression analysis and other methods. **Results** There was significant differences in sex composition, age, attachment loss and probing depth among the three groups ($P < 0.05$), and the genotype distribution was in accordance with the Hardy-Weinberg genetic balance ($P > 0.05$). There was statistic difference in the distribution of genotype and allele frequencies among control group, mild chronic periodontitis group, moderate and severe chronic periodontitis group ($\chi^2 = 12.161, 8.418; P < 0.05$). After Bonferroni correction, there was significant difference in the distribution of genotype and allele frequencies between the control group and the moderate and severe chronic periodontitis group ($\chi^2 = 11.306, 8.415; P < 0.0167$); there was no significant difference in the distribution of genotype and allele frequencies between the control group and mild chronic periodontitis group, mild chronic periodontitis group and moderate and severe chronic periodontitis group ($P > 0.0167$). Logistic regression analysis showed that the risk of chronic periodontitis in people aged 55-65 years was 85.29 times (95% CI: 34.81-209.14) higher than those aged less than 35 years old, and the risk of chronic periodontitis in people with TT genotype was 2.36 times higher than

DOI: 10.7683/xyxyxb.2017.12.018

收稿日期: 2017-02-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(编号: 2016B03049-1)。

作者简介: 黄萍(1989-),女,甘肃兰州人,硕士研究生在读,研究方向:牙周病病因及防治。

通信作者: 赵今(1967-),女,云南大理人,博士,教授,主任医师,研究方向:牙体牙髓病的病因、发病机制及防治; E-mail: merryjin@ sina.com。

those with CC genotype. **Conclusion** This study indicate that TGF- β_1 29C/T (codon 10) gene polymorphism may contribute to the susceptibility of chronic periodontitis in Moyu county of Xinjiang Uygur population, and the age and TT genotype may be risk factors for chronic periodontitis in this population.

Key words: transforming growth factor; chronic periodontitis; gene polymorphisms

慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)是以牙菌斑为始动因子的感染性疾病,已成为我国成年人失牙的主要原因。CP的病因复杂,宿主的易感性是影响牙周病的重要因素,目前认为,CP是由牙菌斑与宿主的免疫反应相互作用引起^[1]。致炎细胞因子在微生物诱导的破坏性炎症中起着至关重要的作用,这些致炎因子相关的基因多态性研究为CP易感性提供了有价值的工具。国内外对CP细胞因子基因的单核苷酸多态性研究涉及白细胞介素-10、维生素D受体基因等^[2-3]。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)是一种多功能细胞因子,在机体内有多重作用。由于地域、环境、民族等不同,TGF- β_1 基因多态性与牙周疾病发生和发展的关系尚未达成一致结论。本研究旨在探讨TGF- β_1 29C/T(10号密码子)基因多态性与墨玉县维吾尔族成人CP的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象 实验样本来自新疆墨玉县CP流行病学组前期在该地区建立的CP生物样本库(颊黏膜拭子),所有受试者均签署知情同意书。流行病学组对CP的分度标准,轻度CP:附着水平(attachment loss, AL) = 1 ~ 2 mm;中度CP: AL = 3 ~ 5 mm;重度CP: AL > 5 mm。样本库中颊黏膜拭子共1 604个,其中轻度899个,中度230个,重度85个,正常390个。

1.2 纳入、排除标准 轻度CP组、中重度CP组纳入标准:年龄18~65岁;3代均为维吾尔族;口内存留牙不少于10颗,包括4颗磨牙(不含第3磨牙);无明显错颌畸形和不良修复体。对照组纳入标准:年龄18~65岁;3代均为维吾尔族;牙周健康,缺失牙不超过3颗。排除标准:患有与CP相关的系统性疾病,如糖尿病、心血管疾病、肾衰竭等;妇女处于妊娠期或哺乳期;3个月内使用过抗生素或者免疫抑制剂者;0.5 a内进行过牙周专业治疗者。

1.3 样本量的确定及抽样方法 本试验分为对照组、轻度CP组、中重度CP组,为3组平行对照计数资料,根据预试验结果做效能检验得出实验样本量:每组100个样本,共300个样本。采用单纯随机抽样,电脑随机化方法在轻度、中重度CP及健康对照者样本库中各抽取100个,其中中重度组按样本比例抽取,中度73个,重度27个。

1.4 TGF- β_1 29C/T(10号密码子)基因型检测

样本库中抽取的颊黏膜拭子,采用口腔拭子基因组DNA提取试剂盒(北京天根生物有限公司)提取

DNA, -20 °C保存。采用四引物扩增受阻突变聚合酶链反应(tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction, T-ARMS-PCR)法检测受试者TGF- β_1 29C/T(10号密码子)基因型和等位基因的分布。根据文献^[4]设计TGF- β_1 29C/T引物:上游外引物:5'-TTTCCCTCGAGGCCCTCCTACCTT-3',下游外引物:5'-CTTACCAGCTCCATGTGCGATAG-3';上游内引物:5'-CTCCGGGCTGCGGCTGCTTCT-3';下游内引物:5'-CCACAGCAGCGGTAGCAGCATCG-3'。PCR体系包括模板DNA 1 μ L;引物各0.5 μ L;2 \times PCR MIX 12.5 μ L;用无菌去离子水补足总体积至25 μ L。循环参数为95 °C预变性5 min,95 °C变性30 s,65 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,30个循环,72 °C延伸10 min。PCR产物经体积分数2%琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像仪上观察,确定基因分型。

1.5 PCR的质量控制 所有的样本均在盲法下进行测量;实验中使用同一型号的仪器并定期校验;使用同一品牌的DNA提取试剂盒及相关试剂;检测方法统一,并由同一人检测;随机抽取10%样本进行DNA测序,以检验所测基因型的重复性和可靠性。

1.6 统计学处理 应用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。TGF- β_1 29位点(10号密码子)基因型频率经Hardy-Weinberg遗传平衡定律检查样本具有群体代表性。基因频率采用直接计数法统计,各基因型和等位基因频率的差异比较采用 χ^2 检验,组间Bonferroni校正。为控制可能的混杂因素,年龄、性别作为独立变量在有序多分类logistic回归中进行校正。检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$,校正后检验水准为 $\alpha = 0.0167$ 。

2 结果

2.1 3组受试者基本资料及临床数据比较 结果见表1。3组受试者性别构成、年龄、AL及探诊深度比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组受试者基本资料及临床数据

Tab.1 Demographic characteristics and clinical parameters of subjects in each group

组别	n	性别		年龄/岁	AL/mm	探诊深度/mm
		男/例	女/例			
对照组	100	34	66	34.61 ± 11.02	0.00 ± 0.00	1.26 ± 0.38
轻度CP组	100	50	50	40.33 ± 11.32	1.76 ± 0.55	2.09 ± 0.50
中重度CP组	100	60	40	53.02 ± 10.03	4.51 ± 1.44	2.47 ± 0.64
F		5.325		143.273	12.093	4.402
P		<0.05		<0.05	<0.05	<0.05

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 TGF- β_1

29C/T(10号密码子)多态性分为 TT(123 bp)、CC(180 bp)和 CT(123、180 bp)3种基因型,255 bp为2条外引物控制带。PCR产物电泳结果见图1。PCR电泳结果与PCR测序结果一致(图2)。本次试验对3个研究组 TGF-β₁ 29位点(10号密码子)基因型分布进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,发现基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($P >$

0.05),可认为该人群有较好的群体代表性。

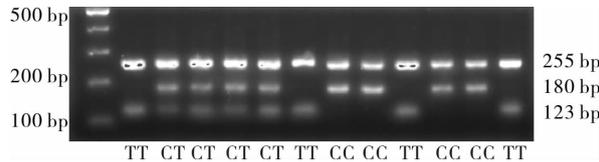


图1 PCR产物电泳结果

Fig.1 PCR products detected by electrophoresis

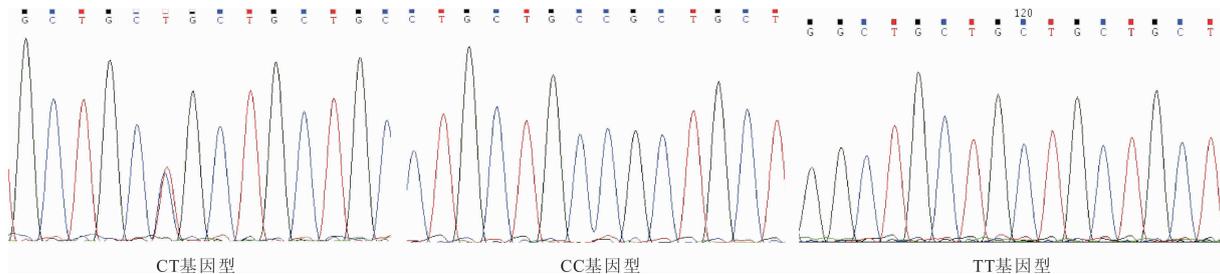


图2 DNA测序结果

Fig.2 Results of DNA sequencing

2.3 TGF-β₁ 29C/T(10号密码子)基因型及等位基因频率的分布 结果见表2。基因型及等位基因频率在对照组、轻度 CP 组、中重度 CP 组受试者的分布比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 12.161、8.418, P < 0.05$)。经 Bonferroni 校正后发现,基因型、等位基因频率的分布在对照组与中重度牙周炎组间差异均有统计学意义($\chi^2 = 11.306、8.415, P < 0.0167$),对照组与轻度 CP 组($\chi^2 = 5.369、2.270, P > 0.0167$)、轻度 CP 组与中重度 CP 组($\chi^2 = 3.281、1.965, P > 0.0167$)之间比较差异均无统计学意义。中重度 CP 组 TT 基因型及 T 等位基因频率高于对照组,CC 基因型及 C 等位基因频率低于正常组($\chi^2 = 11.306、8.415, P < 0.0167$)。

表2 3组受试者 TGF-β₁ 29C/T 基因型及等位基因频率的分布

Tab.2 Distribution of genotype and allele frequency of TGF-β₁ 29C/T gene in the three groups

组别	基因型			等位基因/样本(%)	
	CC	TT	CT	C	T
对照组	27	10	63	117(58.5)	83(41.5)
轻度 CP 组	24	22	54	102(51.0)	98(49.0)
中重度 CP 组	14	26	60	88(44.0)	112(56.0)
χ^2	12.161			8.418	
P	<0.05			<0.05	

2.4 CP 易感因素分析 结果见表3。由于 CP 的发病机制是多因素的,用有序多分类 logistic 回归分析来评估基因型与 CP 易感性的关系,通过调整患者的年龄、性别,以控制可能的混杂影响,结果发现,性别、等位基因分布与 CP 的易感性无关($P > 0.05$)。年龄与 CP 显著相关,年龄 55~65 岁的人群的患牙周炎风险是年龄 <35 岁人群的 85.29 倍($OR = 85.29, 95\%$ 可信区间:下限为 34.81,上限为 209.14, $P < 0.05$),说明年龄是患 CP 的危险因素,年龄越大越容易患 CP。携带 TT 基因型的人群患 CP 风险是 CC 基因型人群的 2.36 倍($OR = 2.36, 95\%$ 可信区间:下限为

1.09,上限为 5.12, $P < 0.05$),说明 TT 基因型是该人群患 CP 的危险因素。

表3 CP 易感因素的 logistic 回归分析

Tab.3 Results of logistic regression analysis for susceptibility to chronic periodontitis

因素	OR	95% 可信区间		P
		下限	上限	
性别				
男	1.00	-	-	-
女	0.78	0.48	1.27	>0.05
年龄/岁				
<35	1.00	-	-	-
35~44	5.66	3.04	10.51	<0.05
45~54	34.49	16.19	73.26	<0.05
55~65	85.29	34.81	209.14	<0.05
基因型				
CC	1.00	-	-	-
TT	2.36	1.09	5.12	<0.05
CT	1.34	0.74	2.45	>0.05
等位基因				
C	1.00	-	-	-
T	1.38	0.99	1.94	>0.05

3 讨论

TGF-β₁ 是一种多功能蛋白,有助于维持骨吸收和骨形成的动态平衡^[5],对牙周组织的形成和发展也具有重要的调控作用^[6-8]。遗传多态性在种群遗传学研究中非常有用,已有大量关于基因多态性与疾病相关性的研究^[9-10]。TGF-β₁ 29C/T(10号密码子)的基因多态性与绝经后骨质疏松症、急性冠状动脉综合征、糖尿病等多种疾病密切相关,与 CP 的相关性尚存争议^[11-12]。墨玉县是典型的封闭的维吾尔族人群聚集区,该地区人群有代表性,本研究团队前期流行病学调查结果显示,该地区维吾尔族成人 CP 的患病率高达 65.2%,同时证实雌激素受体及维生素 D 受体基因多态性与墨玉县维吾尔族成人 CP 有一定相关性,并且发现该地区维吾尔族人群的研究结果与国内外学者关于其他民族的结果有一定的差异^[13-14]。故本

研究旨在探讨 TGF- β_1 29C/T 位点基因多态性与维吾尔族 CP 易感性的相关性,为该地区维吾尔族成人 CP 危险性的预测和防治提供理论依据。

本研究发现,TGF- β_1 29C/T(10 号密码子)基因型及等位基因频率的分布在对照组、轻度 CP 组、中重度 CP 组患者中,组间比较差异均有统计学意义,说明 TGF- β_1 29C/T 基因多态性可能与新疆墨玉县维吾尔族人群 CP 的易感性有关。这与 HEIDARI 等^[4]、ATANASOVSKA-STOJANOVSKA 等^[15]的研究结果相似,与 BABEL 等^[16]研究结果不同。BABEL 等^[16]在对德国人群的研究中并未发现 TGF- β_1 29C/T(10 号密码子)基因多态性与 CP 的相关性。经 Bonferroni 校正后证实,基因型、等位基因频率的分布在正常组与中重度 CP 组间比较差异有统计学意义,对照组与轻度 CP 组、轻度 CP 组与中重度 CP 组间比较差异均无统计学意义。TT 基因型、T 等位基因在中重度 CP 组的分布明显高于对照组,TT 基因型、T 等位基因可能是维吾尔族成人患有中重度 CP 的危险因素。但 3 个实验组的年龄、性别构成组间比较差异有统计学意义,用有序多分类 logistic 回归分析来调整患者的年龄、性别,以控制可能的混杂影响,评估基因型与慢性牙周炎易感性的关系。有序多分类 logistic 回归分析结果发现,年龄与 CP 的患病显著相关,年龄 55~65 岁的人群患 CP 风险是年龄 <35 岁人群的 85.29 倍(95% 可信区间:下限为 34.81,上限为 209.14),说明年龄是患 CP 的危险因素,年龄越大越容易患 CP。携带 TT 基因型的人群患 CP 风险是 CC 基因型人群的 2.36 倍(95% 可信区间:下限为 1.09,上限为 5.12),说明 TT 基因型是患牙周炎的危险因素。这与 HEIDARI 等^[4]的研究结果有所不同,其认为 CT、TT 基因型可提高伊朗人群患 CP 的易感性,T 等位基因是 CP 的危险因素。与 ATANASOVSKA-STOJANOVSKA 等^[15]的研究结果不同,其认为 CC 基因型与 C 等位基因是马其顿人群患 CP 的危险因素,TT 基因型与 T 等位基因是保护因素。

同以往国外研究结果冲突的其中一个重要原因考虑为遗传异质性。而且不同于前期研究,仅仅分为对照组与 CP 组,本次研究将其分为对照组、轻度 CP 组和中重度 CP 组,同时采用有序多分类 logistic 回归方法校正了年龄及性别,控制基因多态性易感因素分析中的混杂因素。

本研究初步证实了 TGF- β_1 29C/T(10 号密码子)基因多态性与新疆墨玉县维吾尔族人群 CP 易感性有关,年龄及携带 TT 基因型是墨玉县维吾尔族人群患 CP 的危险因素。但本次研究设计尚存不足,在今后的研究中,还要尽可能扩大样本量;将实验组分为轻度、中度、重度牙周炎组,以探讨基因多态性与 CP 不同分度易感性的关系;同时,可将当地汉族人群纳入研究,以探讨不同民族间基因多态性与 CP 易感性的关系。

参考文献:

- [1] CHANDRA A, YADAV O P, NARULA S, et al. Epidemiology of periodontal diseases in Indian population since last decade[J]. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2016, 6(2):91-96.
- [2] SILVEIRA V R, PIGOSSI S C, SCAREL-CAMINAGA R M, et al. Analysis of polymorphisms in interleukin 10, NOS2A, and ESR2 genes in chronic and aggressive periodontitis[J]. *Braz Oral Res*, 2016, 30(1):105.
- [3] CHANTARANGSU S, SURA T, MONGKORNKARN S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and smoking in the risk of chronic periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2016, 87(11):1343-1351.
- [4] HEIDARI Z, MAHMOUDZADEH-SAGHEB H, RIGI-LADIZ M A, et al. Association of TGF- β_1 -509 C/T, 29C/T and 788 C/T gene polymorphisms with chronic periodontitis; a case-control study[J]. *Gene*, 2013, 518(2):330-334.
- [5] JANSSENS K, TEN DIJKE P, JANSSENS S, et al. Transforming growth factor-beta1 to the bone[J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(6):743-774.
- [6] LI S, GE S, YANG P. Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor, transforming growth factor-beta1 and phosphorylated-smad2/3 in the developing periodontium of rats[J]. *J Periodontol Res*, 2014, 49(5):624-633.
- [7] RIPAMONTI U. Redefining the induction of periodontal tissue regeneration in primates by the osteogenic proteins of the transforming growth factor- β supergene family[J]. *J Periodontol Res*, 2016, 51(6):699-715.
- [8] MIZE T W, SUNDARARAJ K P, LEITE R S, et al. Increased and correlated expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor beta 1 in surgically removed periodontal tissues with chronic periodontitis[J]. *J Periodontol Res*, 2015, 50(3):315-319.
- [9] 靳彩玲, 高建辉, 张敏, 等. 肿瘤坏死因子- α 基因多态性与恶性肿瘤糖代谢异常的关系[J]. *新乡医学院学报*, 2016, 33(8):680-683.
- [10] 黄蓉, 邓宇傲, 王玲, 等. CYP17 基因多态性与子宫内膜异位症的相关性[J]. *新乡医学院学报*, 2017, 34(2):129-131.
- [11] SUN J, ZHANG C, XU L, et al. The transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) gene polymorphisms (TGF- β_1 T869C and TGF- β_1 T29C) and susceptibility to postmenopausal osteoporosis: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(4):461.
- [12] MAO S, ZHANG J, ZHAO M, et al. Association of transforming growth factor- β_1 polymorphisms with the risk of diabetes mellitus[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11):21886-21892.
- [13] 王东麟, 吴龙, 林静, 等. 新疆墨玉地区维吾尔族成人中、重度慢性牙周炎与雌激素受体基因多态性的相关性研究[J]. *医学研究生学报*, 2015, 28(3):280-285.
- [14] 吴龙, 林静, 王东麟, 等. 新疆墨玉县维吾尔族成人慢性牙周炎与维生素 D 受体基因多态性的相关性研究[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(10):995-999.
- [15] ATANASOVSKA-STOJANOVSKA A, TRAJKOV D, POPOVSKA M, et al. Analysis of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms in Macedonian patients with chronic periodontitis[J]. *Macedon J Med Sci*, 2009, 15(2):30-35.
- [16] BABEL N, CHEREPNEV G, BABEL D, et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2006, 77(12):1978-1983.