

汉族成人牙周炎患者白细胞介素-1 基因多态性分析

梁焕友, 吴 坚, 刘国萍

(中山医科大学附属第三医院口腔科, 广东 广州 510630)

摘 要: 【目的】分析汉族成人牙周炎患者的白细胞介素-1(IL-1)基因家族多态性特征。【方法】将 109 名汉族成人牙周炎患者分为轻、中、重度三组,用 PCR 和限制性酶切方法,对其与 20 名正常人的 IL-1A-889 基因位点, IL-1B+3953 基因位点、IL-1RN 内含子 2 进行多态性分析。【结果】重度成人牙周炎患者的 IL-1B 等位基因 2 携带率(35.9%)较正常人(15.0%)和轻(6.8%)、中度(18.8%)牙周炎患者的高,其同时携带 IL-1A 等位基因 2、IL-1B 等位基因 2 的发生率亦比其他各组患者的高($P < 0.05$)。而 IL-1A、IL-1RN 的多态性分布在各组中无明显差异。【结论】汉族重度成人牙周炎患者与轻度、中度患者的 IL-1B(+3953)基因多态性差异可能是他们临床表现差异的内在原因,这有助于提高对成人牙周炎疾病本质的认识。

关键词: 白细胞介素 1; 多态性现象(遗传学); 等位基因; 牙周疾病/遗传学

中图分类号: R781.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0468-05

Analysis of the IL-1 Gene Polymorphism in Han Nationalities with Adult Periodontitis

LIANG Huan-you, WU Jian, LIU Guo-ping

(Department of Stomatology, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the characteristic of the IL-1 gene polymorphism in Han nationality with adult periodontitis. 【Methods】109 Han adults with periodontitis (include mild, moderate, severe group) and 20 periodontally healthy controls were enrolled. PCR and restriction enzymes were used to identify specific polymorphisms, and the frequency of polymorphisms in the IL-1A gene at position -889, IL-1B gene at position +3953 and IL-1RN intron 2 were investigated. 【Results】The IL-1B allele 2 carriage rate (35.9%) in severe periodontitis was higher than that in healthy (15.0%), mild (6.8%) and moderate (18.8%) groups, the composite genotype (IL-1A allele 2 plus IL-1B allele 2) occurrence rate in severe patients was also higher than that in the other groups ($P < 0.05$). The frequency of IL-1A(-889) and IL-1RN(intron 2) polymorphisms was not statistically significant among groups. 【Conclusion】The difference in IL-1B gene polymorphism between the severe patients and the other groups may be the most important intrinsic factor attribute to the differences in clinical manifestation. It may provide useful informations for recognizing the essence of periodontitis.

Key words: interleukin-1; polymorphism (genetics); alleles; periodontal diseases/genetics

牙周病致病菌作为局部因素,是牙周炎发生发展的必要条件,但从细菌作用方面尚不能完全解释牙周炎患者在牙周破坏程度、病程变化发展、对治疗反应中存在的个体差异性。随着基因工程技术的发展,对人类基因多态性的不断研究,人们逐渐认识到基因多态性可能是牙周炎个体差异的物

质基础^[1]。

白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)家族是一族炎前细胞因子,对牙槽骨吸收、牙周结缔组织破坏起着重要的作用。近期研究发现 IL-1 基因家族存在着等位基因多态性,故为了探讨 IL-1 基因多态性在汉族成人牙周炎患者中的表现情况,本研究用

PCR和限制性酶切方法对汉族成人牙周炎患者的IL-1 基因多态性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 观察对象

观察对象为1999年1月~9月来我科牙周病专科就医的患者,共129名。按牙周组织状况、牙槽骨吸收程度分为4组^[1]:(1)健康对照组,牙周组织健康,探诊深度<3 mm,无附着丧失,无松动,无牙槽骨吸收, $n=20$,其中男性9人,女性11人,年龄(44±5)岁;(2)成人牙周炎轻度组,探诊深度<3 mm,牙槽骨吸收≤15%, $n=22$,其中男性11人,女性11人,年龄(44±6)岁;(3)中度组,15%<牙槽骨吸收≤35%, $n=48$,其中男性25人,女性23人,年龄(46±6)岁;(4)重度组,牙槽骨吸收>35%, $n=39$,其中男性18人,女性21人,年龄(47±6)岁。所有观察对象均符合:35岁≤年龄<60岁;3个月内没有进行过任何抗炎治疗,包括抗生素或免疫制剂的治疗;没有系统性疾病,非肝炎病毒携带者;无怀孕,非哺乳期,非月经期;无嗜烟史(5年内);三代内均为汉族;6个月内没有进行过有关的牙周治疗;无明显咬伤创伤;全口至少有18颗牙,每个象限内至少有三颗功能牙。

1.2 基因组DNA的提取

取新鲜静脉血1.6 mL(3.2%枸橼酸钠抗凝),低渗溶血法^[2]提取基因组DNA。

1.3 PCR扩增条件

模板DNA 100 ng, TaqDNA聚合酶2 U(上海生工), dNTP 0.2 mmol/L, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L(pH 8.8), KCl 50 mmol/L, 引物0.5 mmol/L,总反应体系40 μL。

1.4 IL-1A(-889)基因多态性分析

IL-1A在-889位点上有二种等位基因。引物^[3]:5'-AAG CTT GTT CTA CCA CCT GAA CTA GGC-3';5'-TTA CTA ATG AGC CTT CCA TG-3'。96℃预变性5 min后进入循环,93℃变性45 s,56℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环后,72℃延伸7 min,冷却至4℃。5 U的NcoI(MBI, Fermentas)限制性内切酶酶切10 μL PCR产物,37℃4 h,8.5 mL/L PAGE凝胶150 V,2 h电泳酶切产物,银染观察结果。

1.5 IL-1B(+3953)基因多态性分析

IL-1B在+3953位点上有二种等位基因。引

物^[1]:5'-CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A-3';5'-GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG-3'。96℃预变性5 min后进入循环,93℃变性45 s,67.5℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环,72℃延伸7 min,冷却至4℃。5 U TaqI(MBI, Fermentas)酶切10 μL PCR产物,65℃3 h,8.5 mL/L PAGE凝胶150 V,2.5 h电泳酶切产物,银染观察结果。

1.6 IL-1RN(内含子2)基因多态性分析

IL-1RN在编码区内含子2的多态性表现为有5种等位基因以-86 bp为单位的,数目可变的串联重复序列(variable number of tandem repeat, VN-TR)。引物^[4]:5'-CTC AGC AAC ACT CCT AT-3';5'-TCC TGG TCT GCA GGT AA-3'。96℃预变性5 min后进入循环,93℃45 s,52℃45 s,72℃1 min,35个循环,72℃延伸7 min,冷却至4℃,2 g/L琼脂糖凝胶60 V电泳1.5 h,EB染色,紫外灯下观察PCR产物的电泳位置及条带数目。

1.7 数据分析

等位基因携带率采用直接计数法,用 χ^2 检验比较各组之间等位基因2携带率的差异。

2 结果

2.1 IL-1A(-889)基因多态分析

等位基因1:83 bp+16 bp,等位基因2:99 bp,根据酶切片断情况,判断患者IL-1A(-889)基因型是(A1-1)、(A2-2)纯合子或(A1-2)杂合子(图1)。

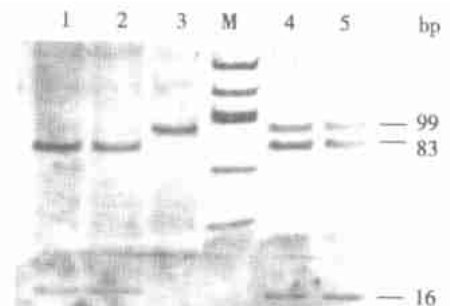


图1 IL-1A(-889)PCR产物的酶切片段PAGE电泳结果

Fig. 1 Restricted fragments of IL-1A(-889) PCR product by PAGE electrophoresis

M: pUC19DNA/ Msp I (Hpa II); lane 1: genotype(A1-1); lane 2: genotype(A1-1); lane 3: genotype(A2-2); lane 4: genotype(A1-2); lane 5: genotype(A1-2)

2.2 IL-1B(+3953)基因多态分析

等位基因 1: 12 bp+85 bp+97 bp, 等位基因 2: 12 bp+182 bp, 根据酶切片断, 判断该血样本 IL-1B(+3953)基因型是(B1-1)、(B2-2)纯合子或(B1-2)杂合子(图 2)。

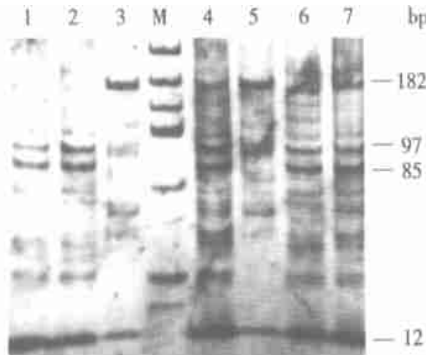


图 2 IL-1B(+3953) PCR 产物的酶切片断 PAGE 胶电泳结果

Fig. 2 Restricted fragments of IL-1B(+3953) PCR product by PAGE electrophoresis

M: pUC19DNA/ *Msp* I (*Hpa* II); lane 1: genotype(B1-1); lane 2: genotype(B1-1); lane 3: genotype(B2-2); lane 4: genotype(B1-2); lane 5: genotype(B2-2); lane 6: genotype(B1-1); lane 7: genotype(B1-2)

2.3 IL-1RN 基因多态分析

等位基因 1(4 repeats, 410 bp), 等位基因 2(2 repeats, 240 bp), 等位基因 3(3 repeats, 325 bp), 等位基因 4(5 repeats, 500 bp), 等位基因 5(6 repeats, 595 bp)。根据电泳结果, 判断该血样本是哪个等位基因的纯合子或哪两个等位基因的杂合子。

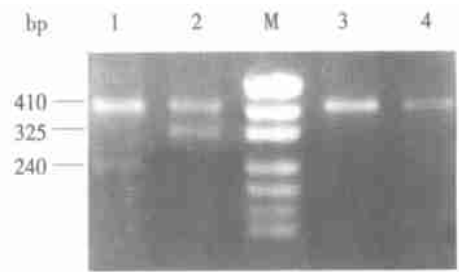


图 3 IL-1RN(intron 2) PCR 产物琼脂糖电泳结果

Fig. 3 Fragments of IL-1RN(intron 2) PCR product

M: pUC19DNA/ *Msp* I (*Hpa* II); lane 1: genotype(RN1-2); lane 2: genotype(RN1-3); lane 3: genotype(RN1-1); lane 4: genotype(RN1-1)

2.4 等位基因携带率分析

通过检测 IL-1A、IL-1B、IL-1RN 基因多态性情况, 发现不论是正常组或成人牙周炎组, 均是等位基因 1 的携带率高于等位基因 2 的携带率(表 1)。而重度组成人牙周炎患者的 IL-1B 等位基因 2(B2)携带率比其他组的高, χ^2 检验有统计学意义($P < 0.05$)。重度组成人牙周炎的 IL-1A 等位基因 2(A2)、IL-1RN 等位基因 2(RN2)携带率在数值上虽高于中、轻组及正常组, 但没有统计学意义(表 1)。IL-1RN 的等位基因 5(RN5)在我们所观察的个体中未有出现。进一步分析基因型组合, 重度成人牙周炎患者同时携带 A2、B2 等位基因(A2B2)的出现率是 38.5%, 高于其他三组的出现率(分别为 10.0%, 9.1%, 14.6%), $\chi^2 = 11.64$, $P < 0.05$ 。

表 1 IL-1 各等位基因在正常组与成人牙周炎各组中的携带率

Table 1 The frequency of IL-1 allele in each group

(%)

Gene	Allele	Health (n = 20)	Adult Periodontitis			χ^2	P
			Mild (n = 22)	Moderate (n = 48)	Severe (n = 39)		
IL-1A (-889)	1	82.5	84.1	79.2	73.1	2.59	> 0.05
	2	17.5	15.9	20.8	26.9		
IL-1B (+3953)	1	85.0	93.2	81.3	64.1	14.17	< 0.01
	2	15.0	6.8	18.8	35.9		
IL-1RN (intron 2)	1	80.0	79.5	76.1	70.4	1.49	> 0.05
	2	17.5	18.2	20.8	25.6		
	3	0.0	2.3	1.0	4.0		
	4	2.5	0.0	2.1	0.0		

3 讨论

临床中牙周炎患者的牙周组织破坏程度、病程

的变化发展以及对治疗的反应都存在着较大的个体差异性, 仅分析外部因素——细菌的量、细菌的类型方面都尚未能得到完全的解释, 因此, 宿主因素日益受到重视。白细胞介素 1 家族, 包括 IL-1 α 、

IL-1 β 、白细胞介素-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra),主要来源于单核细胞及巨噬细胞等,是一类生物活性非常广泛的细胞因子,在牙周病炎症反应和免疫应答中起着重要的调节作用。动物实验和临床研究均证实IL-1可活化破骨细胞,刺激骨吸收;也可通过诱导前列腺素E₂、金属蛋白酶等非炎症细胞为介质,刺激破骨样细胞形成以及结缔组织溶解、破坏;对牙槽骨吸收、牙周结缔组织破坏、牙周附着丧失起着十分重要的作用^[5,6]。

3.1 IL-1基因多态性与IL-1的关系

IL-1基因家族包括IL-1A、IL-1B、IL-1RN,分别编码合成IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra。它们均位于人类第2号染色体长臂2q13,存在等位基因多态性表现,并与某些慢性炎症—免疫性疾病的临床表现有密切关系,如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、慢性肠炎等^[7,8]。Pociot等^[9]学者研究发现携带IL-1B等位基因2患者的外周血IL-1 β 水平是等位基因1患者的2倍,而当IL-1B是(B2-2)纯合子时,IL-1 β 水平是(B1-1)纯合子的4倍。在牙周炎研究中也发现携带IL-1A等位基因2患者的龈沟液IL-1 α 水平是阴性患者的2~4倍^[10],提示由于IL-1的等位基因多态性影响了外周血及龈沟液中的IL-1 α 、IL-1 β 合成,进而表现出临床病情变化发展、治疗效果的个体差异。

3.2 汉族成人牙周炎患者的IL-1基因多态性特征

在本实验中发现不论是正常人或成人牙周炎患者,均是等位基因1(A1、B1、RN1)的携带率高于等位基因2(A2、B2、RN2),说明等位基因1是常见基因,而等位基因2是非常见基因。而且A2、B2、RN2等位基因的携带率在各个组中各有不同,尤其是重度成人牙周炎患者的B2携带率(35.9%)、A2B2基因型组合的出现率(38.5%)均高于中、轻度牙周炎患者和正常人。Komman等^[1]学者调查了白种人成人牙周炎患者的IL-1基因型后,发现重度患者的A2B2基因型组合出现率高达78%,但B2等位基因的携带率与中、轻度患者无明显差异。本文分析这可能与两个因素有关:①可能与种族不同有关,②可能与所研究对象的年龄有关。本研究对象年龄在35~60岁,Komman的研究对象在40~60岁,年龄本身也是成人牙周炎的危险因素之一,随着年龄增大,牙周疾病加重,这在一定程度上

掩盖了IL-1B的基因因素的影响。

重度牙周炎患者的A2、RN2携带率(26.9%, 25.6%)虽在数值上高于中、轻度牙周炎患者和正常人,但差别没有统计学意义($P>0.05$)。与(汉族)系统性红斑狼疮(SLE)和白塞综合征病人的IL-1RN等位基因2携带率相比(68%, 46%)^[11],重度牙周炎患者的RN2携带率较低。有关研究显示携带IL-1RN等位基因2的SLE患者在炎症反应情况下,循环中IL-1ra水平较低,不能够有效地拮抗IL-1的作用,使该类患者的病情更严重^[8],这也提示了成人牙周炎的免疫损伤机理与SLE和白塞综合征有差异。与白种人重度牙周炎患者A2携带率相比(55.8%)^[11],汉族人重度牙周炎患者A2携带率较低,其临床意义有待两人种间进一步的流行病学研究。

本研究首次观察了IL-1基因家族多态性在汉族成人牙周炎患者中的情况,发现(汉族)重度成人牙周炎患者的IL-1基因多态性特征与中、轻度病人和正常人有明显区别,表现在B2携带率、A2B2发生率的增高。基因是个体临床表型的内在基础,故推测重度牙周炎患者与中、轻度病人的IL-1基因多态性特征的差异可能是他们病情变化发展差异的内在原因之一。为了进一步阐明这种可能性,我们将在IL-1等位基因多态性与患者牙周临床表现间是否存在相关关系等方面做进一步的探讨。

参考文献:

- [1] Kornman K S, Crane A, Wang H Y, *et al*. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease[J]. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(1): 72.
- [2] 伍新尧, 罗超权, 杨英洁. 基因诊断原理与临床[M]. 广州: 中山大学出版社, 1995. 13.
- [3] McDowell T L, Symons J A, Ploski R, *et al*. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism[J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38(2): 221.
- [4] Tarlow J K, Blakemore A I F, Lennard A, *et al*. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat[J]. *Hum Genet*, 1993, 91(4): 403.
- [5] Charney A D. Biologic basis for interleukin-1 in disease[J]. *Blood* 1996, 87(6): 2095.
- [6] 唐倩, 梁焕友, 刁惠波. IL-1 β 对培养的人牙龈成纤维细胞间Sicam-1表达的影响. 中山医科大学学报

- [J] . 1999, 20 增刊: 21.
- [7] Cantagrel A, Navaux F, Loubet L P, *et al.* Interleukin-1beta interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis [J] . *Arthritis Rheum*, 1999, 42(6): 1093.
- [8] Blakemore A I F, Tarlow J K, Cork M, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a severity factor in systemic lupus erythematosus [J] . *Arthritis Rheum*, 1994, 37(9): 1380.
- [9] Pociot F, Molvig J, Wogensen L, *et al.* A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 Beta (IL-1 β) gene correlates with secretion in vitro [J] . *Eur J Clin Invest*, 1992, 22(6): 396.
- [10] Shirodaria S, Smith J, McKay I J, *et al.* Polymorphism in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease [J] . *J Dent Res*, 2000, 79(11): 1864.
- [11] 张军民, 刘贞嵩, 许丹华. 白介素-1 受体拮抗物多态性与白塞病. *中国皮肤性病学杂志* [J] . 1997, 11(4): 197.

(编辑 刘清海)

(上接第 467 页)

患者于治疗后主观感觉精神状态、睡眠和食欲均有明显改善。吸附-透析组中有 2 例患者出现低血压, 1 例于治疗 10 min 后出现全身瘙痒, 用激素静脉推注后缓解。单纯透析组有 1 例出现低血压。

3 讨论

中分子物质被认为是参与尿毒症发病的重要因素之一, 尿毒症的治疗效果与中分子物质的清除率有密切关系。文献报道, 血液透析对中分子的清除效率与透析病人的死亡率有关, 即中分子物质清除越差, 死亡率越高^[1]。血液透析是目前尿毒症最常用的替代治疗方法, 虽然对中分子物质有清除作用, 但不如清除小分子物质效果好。我们采用血液吸附的方法清除中分子物质, 所用的吸附剂为苯乙烯/二乙烯苯聚合而成的大孔高分子聚合物, 属中性大孔树脂, 主要吸附相对分子质量为 300~5 000 的中分子物质。这种树脂比表面积大, 吸附容量大, 清除效果好。用火棉胶包被后, 有较好的生物相容性。本结果显示, 吸附-透析组对中分子物质的清除能力明显优于血液透析组。但吸附-透析组和血液透析组对尿素氮和肌酐的清除无显著差异, 提示吸附联合透析治疗并不增加对小分子物质的清除。因此, 本研究采用了吸附与透析串联同时进行, 既保证了中小分子的清除效果, 又不增加病人的透析次数和时间; 由于考虑到易操作性并兼顾吸附时间(一般认为是 2~2.5 h/次)和透析时间(一般为 4 h/次), 吸附-透析设定为 3 h, 这可能对吸附

的最佳效果有一定影响。本结果还显示 1 次吸附对患者治疗后血压无显著影响, 是否长期吸附治疗能通过对中分子物质的清除改善顽固性高血压尚待进一步观察。

所采用的吸附器未降低血浆蛋白质、血细胞及血小板, 说明苯乙烯/二乙烯苯聚合物有较好的生物相容性。吸附-透析及血液透析组病人治疗后血细胞、血小板及血浆蛋白均明显升高, 但两组间差异不显著, 可能与吸附器无关, 原因可能为治疗过程中给患者超滤(脱水)后血液浓缩所致。1 次治疗后, 吸附-透析组中 10% 的患者于治疗后精神状态、睡眠和食欲均有明显改善, 这与 Mamoun 等^[2] 研究结果相似。目前认为对中分子物质清除较好的方法尚有血液滤过及腹膜透析, 它们与本实验所采用吸附的方法何者更好, 有待进一步比较研究。但由于吸附治疗不需要置换液或透析液, 操作会更简便些。

参考文献:

- [1] Leypoldt J K, Cheung A K, Carroll C E, *et al.* Effect of dialysis membranes and middle molecule removal on chronic hemodialysis patient survival [J] . *Am J Kidney Dis*, 1999, 33(2): 349.
- [2] Mamoun A H, Sodersten P, Anderstam B, *et al.* Evidence of splanchnic-brain signaling in inhibition of ingestive behavior by middle molecules [J] . *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(2): 309.

(编辑 黄小延)