

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00541

## TNF-A-863 和 CGRP 基因多态性与中国汉族人重度慢性牙周炎易感性的关系

李灵敏,曹志中\*

第二军医大学长海医院口腔科,上海 200433

**[摘要]** **目的:**探讨 TNF-A-863 与 CGRP979 基因多态性与重度慢性牙周炎易感性的关系。**方法:**收集 100 例重度慢性牙周炎患者和 118 例健康对照组的颊黏膜拭子并抽提 DNA,应用 PCR-LDR 方法检测 TNF-A-863 与 CGRP979 基因型,用计算机软件统计分析患者和对照组间基因型分布的差异。**结果:**TNF-A-863 在重度慢性牙周炎组中 TNF-A-863“A/C”杂合子占优势,在健康对照组中 TNF-A-863“C/C”纯合子基因型为主,TNF-A-863 基因型分布在两组间的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。CGRP979 在重度慢性牙周炎患者中“A/G”基因型明显占多数,两组间基因型分布有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论:**TNF-A-863 基因多态性与重度慢性牙周炎有相关性;CGRP979 等位基因“A/G”杂合子基因型可能是重度牙周炎的易感因素。

**[关键词]** 重度慢性牙周炎;肿瘤坏死因子 A-863;降钙素基因相关肽;基因多态性

**[中图分类号]** R 781.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0541-04

### Association of TNF-A-863 and CGRP979 gene polymorphisms with susceptibility to severe chronic periodontitis in Chinese Han nationality

LI Ling-min, CAO Zhi-zhong\*

Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the relationship of TNF-A-863 and CGRP979 gene polymorphisms with the susceptibility to severe chronic periodontitis in Chinese. **Methods:** Buccal swabs were collected from 100 adult patients with severe chronic periodontitis and 118 healthy adult controls. DNA was extracted from each subjects of the two groups. PCR-LDR technique was used to identify the genotypes of TNF-A-863 and CGRP979. The difference in the genotypes between the two groups was analyzed by statistics software. **Results:** The genotype of TNF-A-863 was mainly TNF-A-863 A/C in patients with severe chronic periodontitis and TNF-A-863 C/C in healthy controls. There were significant differences in TNF-A-863 distribution between the two groups( $P<0.05$ ). We also found that there were significant differences in genotype distribution of CGRP979 between the two groups ( $P<0.05$ ), with A/G predominating in patients with severe chronic periodontitis. **Conclusion:** TNF-A-863 polymorphism is associated with severe chronic periodontitis; A/G of the CGRP979 loci might be a factor for severe chronic periodontitis.

**[KEY WORDS]** severe chronic periodontitis; tumour necrosis factor A-863; calcitonin gene-related peptide; gene polymorphisms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5):541-544]

牙周炎是发生于牙周支持组织的慢性炎症性疾病,其发病机制尚不完全清楚。近年来,宿主易感性在牙周炎发生发展中的作用越来越受到重视。遗传因素可增加宿主对牙周病的易感性<sup>[1]</sup>,是侵袭性牙周炎和重度慢性牙周炎的主要决定因素之一,能影响和改变宿主对微生物的反应,并决定疾病是否进展及其严重程度<sup>[2]</sup>。

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )作为一个多效性的细胞因子,能够调节炎症

及免疫反应,在牙周病的发生发展中起重要的作用。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)也是重要的炎症介质,在牙周组织生理、病理过程中具有重要的作用<sup>[3-4]</sup>。

我们前期已经建立了一个基于连接酶检测反应(ligase detection reaction, LDR)的基因多态性并行检测系统,并检测了 IL-1、CGRP 基因多态性,发现 IL-1A-889、CGRP1210 和 CGRP+5247 阳性基因型可能是重度慢性牙周炎易感性的遗传标志,同时提

**[收稿日期]** 2008-03-16 **[接受日期]** 2008-08-12

**[基金项目]** 上海市自然科学基金(06ZR14123),全军“十一五”面上项目(06ZR14123)。Supported by Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government(06ZR14123) and Project of the “11th Five-Year Plan” for Tackling Scientific Program of PLA(06ZR14123)。

**[作者简介]** 李灵敏,硕士生。E-mail: drsongwei@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873830, E-mail: caozhizh@263.net

示 IL-1、CGRP 基因型在不同地域、不同人种中的分布可能是不相同的<sup>[5]</sup>。本研究以颊黏膜拭子作为提取 DNA 的来源,分别对中国汉族重度慢性牙周炎患者和健康者的 TNF-A-863 与 CGRP979 位点基因型进行了测定,旨在进一步论证 TNF- $\alpha$  和 CGRP 与重度慢性牙周炎的关系。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 100 例重度慢性牙周炎患者与 118 例牙周健康对照者均选自长海医院口腔科门诊患者。纳入标准:(1)三代均为汉族,口内至少有 14 颗牙,其中包括 4 颗磨牙(不含第 3 磨牙);(2)无明显的错 畸形及不良修复体等局部刺激因素;(3)无糖尿病、心血管病等系统性疾病。

1.2 牙周检查及分组 所有受检者均接受全口余留牙的牙周检查,以测定其全口牙周探诊深度(PD)和临床附着丧失量(CAL)。所有检查均由同一位牙周专业医师进行,每颗牙检查 6 个位点。根据受检者病情程度,参照 Armitage<sup>[6]</sup>推荐标准,分为以下 2 组:(1)健康对照组:全口余留牙平均牙周附着丧失 $\leq 0.5$  mm,无牙周附着丧失 $\geq 3$  mm;无 2 颗以上牙缺失,不包括第 3 磨牙拔除或因正畸需要拔除牙、外伤脱落牙、大面积龋失牙及先天缺牙等。共 118 例,男 60 例,女 58 例,年龄 35~70 岁,平均(58 $\pm$ 9)岁。(2)重度慢性牙周炎组:全口牙平均牙周附着丧失 $\geq 2.5$  mm,至少 3 个象限内有 1 个或多个牙牙周附着丧失 $\geq 5$  mm,至少 3 个象限内有 1 个或多个牙牙周袋深度 $> 6$  mm。本组共 100 例,男 58 例,女 42 例,年龄 25~65 岁,平均(55 $\pm$ 7)岁。

1.3 主要试剂和仪器 DNA 抽提用蛋白酶 K 和 Tris 饱和酚(大连普肽生物科技有限公司);PCR 所用的 Hotstar Taq 酶体系、dNTP(德国 Qiagen 公司);PCR 引物和 LDR 探针(上海生工生物工程技术有限公司);TaqDNA ligase 酶体系(英国 NEB 公司);9600 PCR 仪和 3100 DNA 测序仪(爱普拜斯应用生物系统上海有限公司);JY600+型电泳仪(北

京君意东方电泳设备有限公司);FR-200A 全自动紫外与可见分析装置和生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 样本采集与 DNA 提取 用无菌棉签取双侧颊黏膜拭子,室温下自然干燥过夜,在无菌密封容器中保存。剥取拭子表层,加入 Chelex-100 150  $\mu$ l,蛋白酶 K(20 mg/ml)10  $\mu$ l,漩涡混匀;40 $^{\circ}$ C 水浴消化过夜;煮沸 10 min,置于冰上 3 min,14 000 r/min(离心半径 9 cm)离心 2 min,吸取上清液,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.2 PCR 反应 两位点分别进行 PCR,PCR 引物共 2 对,由上海生工生物工程技术有限公司合成。(1)TNF-A -863 基因多态性目的基因引物:上游 5'-GGA GCT CCT GGG AGA TAT GG-3',下游 5'-TCC TGG AGG CTC TT TCA CTC-3';(2)CGRP979 基因多态性目的基因引物:上游 5'-AGG GTA GGA AGG GGG AGG T-3',下游 5'-ATG ACC TGC TGG GCC TGA-3'。PCR 反应体系:1  $\mu$ l 模板,2  $\mu$ l 缓冲液,0.6  $\mu$ l Mg<sup>2+</sup>,2  $\mu$ l dNTP,0.2  $\mu$ l TaqDNA 聚合酶,4  $\mu$ l Q-Solution,0.6  $\mu$ l 引物混合液,加水补足 20  $\mu$ l。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;(94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 7 min) $\times$ 35 个循环;3%的琼脂糖凝胶电泳检测,观察 PCR 产物的效果,确定其作为模板在 LDR 反应中加入的量。

1.4.3 LDR 方法进行基因型测定 根据 LDR 探针设计原则<sup>[7]</sup>设计 LDR 的上下游探针。上游探针 5'端用磷酸化修饰(表 1)。LDR 反应体系:1  $\mu$ l 缓冲液,1  $\mu$ l 探针混合液,0.05  $\mu$ l 连接酶, $\geq 1$   $\mu$ l PCR 产物,PCR 专用水补齐 20  $\mu$ l。LDR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 2 min,进行 30 个循环,然后取 1  $\mu$ l ABIGS-500 ROX 荧光标记分子量标准,1  $\mu$ l LDR 连接产物和 1  $\mu$ l 去离子甲酰胺上样液混合,95 $^{\circ}$ C 加热变性 2 min,冰中骤冷,于 5%聚丙烯酰胺和 5 mol/L 尿素中 3 000 V 电泳 2.5 h,应用 GENES-CAN<sup>TM</sup> 672 软件进行数据收集,最后应用 Genemapper 软件进行数据分析和基因分型。

表 1 LDR 反应探针序列

Tab 1 Primer of LDR

Gene	Primer
CGRP979A/G	5'-P-GGA AGC CTC CAT CCA GAC CTC TGG ATT TTT TTT TTT TTT TT-3'
CGRP979A/G_A	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TGG GGT GAG TTG CAA GGT ACA GAT GT-3'
CGRP979A/G_G	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT GGG GTG AGT TGC AAG GTA CAG ATG C-3'
TNF-A-863A/C	5'-P-GGG GGT CCC CAT ACT CGA CTT CCA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'
TNF-A-863A/C_A	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TCT ACA TGG CCC TGT CTT CGT TAA GT-3'
TNF-A-863A/C_C	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA CAT GGC CCT GTC TTC GTT AAG-3'

## 2 结果

2.1 PCR 结果 两位点分别进行 PCR, 结果如图 1 所示, CGRP979 的 PCR 产物长度为 86 bp, TNF-A-863 的 PCR 产物长度为 185 bp。

### 2.2 基因分型结果和数据分析

2.2.1 CGRP979 的基因分型结果与基因型分析 CGRP979 基因分型结果如图 2, 可得到杂合子 A/G、纯合子 A/A 和纯合子 G/G 3 种基因型。本组中有 24% (52/218) 受检者携带 CGRP979 等位基因 G, 为杂合子 A/G 型和纯合子 G/G 型(表 2), 其等位基因频率经  $\chi^2$  检验得:  $\chi^2 = 19.743473, P = 0.211279$ , 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。重度慢性牙周炎组杂合子 A/G 基因型比健康对照组高 ( $P < 0.05$ ), 两组间等位基因 G 的携带频率有统计学差异 (20% vs 5.9%,  $P < 0.05$ )。

2.2.2 TNF-A-863 的基因分型结果与基因型分析 TNF-A-863 基因分型结果如图 3, 可得 A/A 纯合子、A/C 杂合子、纯合子 C/C 3 种基因型, 其等位基因频率经  $\chi^2$  检验得:  $\chi^2 = 0.284293, P = 0.593924$ , 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。统计分析(表 2)表明: TNF-A-863 杂合子 A/C 在重度慢性牙周炎组中占优势 ( $P < 0.05$ ), 两组间等位基因 A 的携带频率有显著差异 (25.5% vs 11.0%,  $P < 0.05$ )。

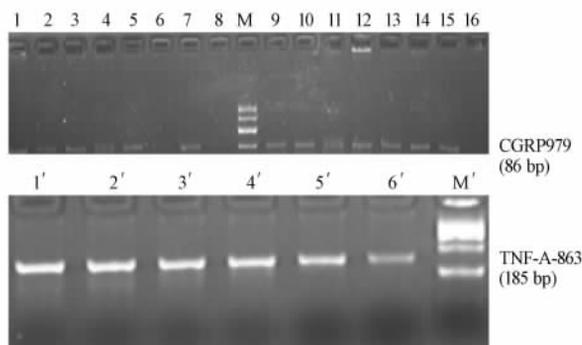


图 1 CGRP979 和 TNF-A-863 PCR 电泳图

Fig 1 PCR results of CGRP979 and TNF-A-863

M, M': Marker; 1-16: CGRP979 products; 1'-6': TNF-A-863 products

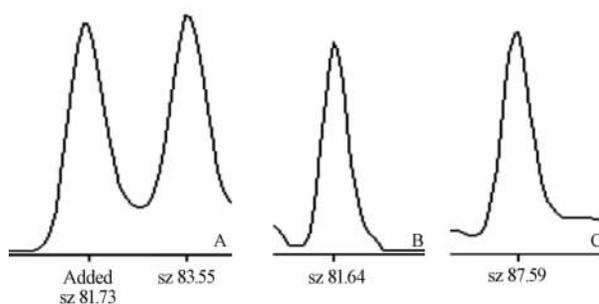


图 2 CGRP979 基因分型结果

Fig 2 Genotyping of CGRP979

A: A/G genotype; B: G/G genotype C: A/A genotype. Added sz 81.73, sz 83.55, sz 81.64, sz 87.59: LDR length

表 2 CGRP979 和 TNF-A-863 基因型分布

Tab 2 Distribution of CGRP979 and TNF-A-863 genotypes

Group	N	CGRP979			TNF-A-863			[n(%)]
		A/A	A/G	G/G	A/A	A/C	C/C	
Severe chronic periodontitis	100	62(62.0)	36(36.0)	2(2.0)	3(3.0)	45(45.0)	52(52.0)	
Control	118	104(88.1)	14(11.9)	0(0)	2(1.7)	22(18.6)	94(79.7)	

There were significant differences in the genotype distribution ( $P < 0.05$ )

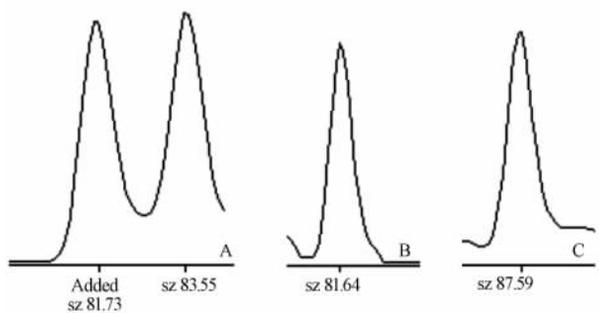


图 3 TNF-A-863 基因分型结果

Fig 3 Genotype of TNF-A-863

A: A/C genotype; B: A/A genotype; C: C/C genotype. Added sz 93.40, Added sz 95.31, sz 93.36, sz 95.37: LDR length

## 3 讨论

牙周炎是侵犯牙龈和牙周支持组织的慢性炎症性的破坏性疾病,它是引起牙齿缺失的两大主要原因之一。牙周炎所致牙周组织的破坏主要通过牙周致病菌及其产物的直接破坏和过度的宿主反应所造成的间接破坏两种途径,宿主的基因易感性对牙周炎的发生发展具有重要影响。TNF-A 是一种促炎症反应的免疫调节剂,能促进炎症细胞侵入感染部位,导致金属蛋白酶的释放,降解细胞外基质蛋白,促进牙槽骨吸收和胶原纤维的破坏,还能调节牙龈与牙周膜成纤维细胞的增殖<sup>[8]</sup>。南晓红等<sup>[9]</sup>研究中

国新疆伊犁地区哈萨克族和 Craandijk 等<sup>[10]</sup>研究高加索人牙周炎患者 TNF-A-308 位点基因多态性与健康对照组比较,结果均表明 TNF-A-308 基因多态性不能成为牙周炎易感性和严重程度的标志,但也有研究结果发现 TNF-A-308 阳性基因型与中、重度慢性牙周炎易感性有关<sup>[11]</sup>,提示 TNF-A 某些多态性位点在不同种族或者不同样本量的研究结果有差别。Soga 等<sup>[12]</sup>研究日本人中 64 例重度牙周炎患者及 64 例健康者的 TNF-A 单核苷酸多态性(SNP),用 25 pg/ml 脂多糖(LPS)刺激外周血,发现重度牙周炎组 TNF-A-863 携带 SNPs 频率高于健康对照组,有统计学差异,他们认为 TNF-A-863 位点 SNPs 与日本人的重度牙周炎有关。本研究对 TNF-A-863 的研究与 Soga 等<sup>[12]</sup>的研究相比增加了样本量,针对中国汉族人群选用了 100 例重度慢性牙周炎患者与 118 例健康对照组,并且使用了特异性高、通用性好的新的基因分型技术——LDR,结果表明重度牙周炎组等位基因 A 的携带率与健康组比较明显增高,这与 Soga 等<sup>[12]</sup>在日本人群中的研究结果一致。

CGRP 阳性神经纤维广泛存在于牙周组织中,尤其是牙周炎的起始部位。Toriya 等<sup>[13]</sup>发现: CGRP-IR 神经纤维与巨噬细胞关系密切, CGRP-IR 神经纤维可能参与了实验性牙周炎的组织修复。Fristad 等<sup>[14]</sup>2003 年发现在大鼠牙齿和牙周组织中有 CGRP-1 受体存在,认为在受到外界刺激后 CGRP 等神经肽从感觉神经轴突释放,调节口腔组织中骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞、上皮细胞及血管的功能。我们前期工作<sup>[15]</sup>也发现一定浓度的 CGRP 可促进体外培养人牙周膜细胞的增殖,推测 CGRP 可能和牙周炎的发生与发展关系密切;在此研究基础上应用传统基因测序方法在 CGRP+5247 位点发现等位基因杂合子多态性现象的存在<sup>[16]</sup>。本实验发现 CGRP979 等位基因 G 在重度慢性牙周炎组与健康对照组有显著性差异,该多态性位点可能与重度牙周炎有相关性。

以上研究表明, TNF-A-863 和 CGRP979 等位基因阳性基因型与重度慢性牙周炎的易感性有关。该研究为流行病学筛查中、重度慢性牙周炎患者易感基因和临床预测牙周炎患者的预后提供了初步的理论依据,值得深入研究。

## [参考文献]

[1] Michalowicz B S, Aepli D P, Virag J G, Klump D G, Hinrichs J E, Segal N L, et al. Periodontal findings in adult twins[J]. *J Periodontol*, 1991, 62: 293-299.

- [2] 朱丽红, 栾庆先. 肿瘤坏死因子基因多态性与牙周炎[J]. *国外医学: 口腔医学分册*, 2005, 32: 99-101.
- [3] Abd El-Aleem S A, Morales-Aza B M, Donaldson L F. Sensory neuropeptide mRNA up-regulation is bilateral in periodontitis in the rat: a possible neurogenic component to symmetrical periodontal disease[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19: 650-658.
- [4] Hargreaves K M, Bowles W R, Jackson D L. Intrinsic regulation of CGRP release by dental pulp sympathetic fibers[J]. *Dent Res*, 2003, 82: 398-401.
- [5] 李灵敏, 曹志中, 沈霖德. 基于连接酶检测反应的 CGRP 和 IL-1A 基因多态与重度慢性牙周炎的相关性研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2008, 18: 241-246.
- [6] Armitage G C, Wu Y, Wang H Y, Sorrell J, di Giovine F S, Duff G W. Low prevalence of a periodontitis associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage[J]. *J Periodontol*, 2000, 71: 164-171.
- [7] Luo J, Bergstrom D E, Barany F. Improving the fidelity of thermophilus DNA ligase[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 3071-3078.
- [8] Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis[J]. *J Periodontol Res*, 2001, 36: 183-186.
- [9] 南晓红, 钟良军, 阿达来提. 肿瘤坏死因子 A-308 基因型与新疆伊犁地区哈萨克族重度慢性牙周炎的关系[J]. *实用口腔医学杂志*, 2004, 20: 636-638.
- [10] Craandijk J, van Krugten M V, Verweij C L, van der Velden U, Loos B G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2002, 29: 28-34.
- [11] 林莉, 潘亚萍, 尹丽媛. IL- $\beta$  和 TNF- $\alpha$  基因多态性与慢性牙周炎的相关性分析[J]. *上海口腔医学*, 2003, 12: 456-459.
- [12] Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha)-1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese[J]. *J Clin Periodontol*, 2003, 30: 524-531.
- [13] Toriya Y, Hashiguchi I, Maeda K. Immunohistochemical examination of the distribution of macrophages and CGRP-immunoreactive nerve fibers in induced rat periapical lesions[J]. *Endod Dent Traumatol*, 1997, 13: 6-12.
- [14] Fristad I, Vandevska-Radunovic V, Fjeld K, Wimalawansa S J, Hals Kvinnsland I. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2003, 311: 383-391.
- [15] 韩姐丽, 曹志中, 周中华. 牙周炎患者龈沟液中 P 物质和降钙素基因相关肽的变化[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2003, 13: 689-692.
- [16] 寇君, 曹志中, 张宝, 马文丽, 郑文岭. 降钙素基因相关肽基因多态性与成人重度牙周炎关系的初步研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2005, 15: 197-201.

[本文编辑] 孙岩