

·临床研究·

GSTT1、GSTM1 基因多态性与重度慢性牙周炎 易感性关系的研究

张巨峰¹ 周立社² 彭志平³ 秦文斌² 睢天林²

(1 上海交通大学附属第一人民医院中心实验室 上海 200080 2 包头医学院生物化学教研室 内蒙古 包头 014010

3 包头市中心医院检验科 内蒙古 包头 014010)

摘要 目的: 研究 GSTT1+/0 和 GSTM1+/0 基因型及其联合基因型与重度慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)易感性的关系。方法: 用聚合酶链反应检测 50 例重度慢性牙周炎患者和 51 例正常对照者的 GSTT1+/0、GSTM1+/0 的基因型。结果: GSTM1(0/0)和 GSTT1(0/0)基因型及 GSTM1(0/0)与 GSTT1(0/0)联合基因型对重度慢性牙周炎相对危险度(OR)分别为 9.56(95%CI, 3.88—23.59), 8.68(95%CI, 3.50—21.51), 36.83(95%CI, 10.42—130.13)。结论: 在内蒙古汉族人群中, 基因型 GSTT1(0/0)和 GSTM1(0/0)增加了个体对重度慢性牙周炎易感性, 且上述两种基因型间存在协同作用。

关键词: 慢性牙周炎; 基因多态性; GSTT1 基因; GSTM1 基因; 易感性

中图分类号: 781.4 文献标识码: A

Study on Relationship between Polymorphisms of GSTT1 and GSTM1 genes and susceptibility to severe chronic periodontitis

ZHANG Ju-feng¹, ZHOU Li-she², PENG Zhi-ping³, et al

(1 Experimental Center, Affiliated 1st People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080;

2 Department of Biochemistry, Baotou Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia;

3 Clinical Laboratory, Baotou Central Hospital, Baotou 014010, Inner Mongolia, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the polymorphisms of GSTT1 and GSTM1 genes as well as their separate and combined effects on susceptibility to severe chronic periodontitis. **Methods:** In the 50 patients with chronic severe periodontitis and 51 healthy controls, the genotypes of GSTT1+/0 and GSTM1+/0 polymorphisms were detected by PCR. **Results:** Individuals with genotype(0/0) of GSTM1, genotype(0/0) of GSTT1, combined genotypes GSTM1(0/0) and GSTT1(0/0) had more relative risks than those with the corresponding common genotypes, whose ratios were 9.56(95%CI, 3.88—23.59), 8.68(95%CI, 3.50—21.51), 36.83(95%CI, 10.42—130.13). **Conclusion:** There is a synergy of susceptible genotypes GSTM1(0/0) and GSTT1(0/0) to enhance the individual susceptibility to chronic severe periodontitis.

key words: Gene polymorphisms; GSTT1 gene; GSTM1 gene; Susceptibility; Chronic periodontitis

牙周炎(chronic periodontitis, CP)是一个复杂的、多因素的慢性炎症性疾病, 遗传因素与环境因素^[1](如吸烟、细菌)在 CP 的发病机制中起着重要的作用。谷胱甘肽 S 转移酶家族(glutathione s-transferase, GSTs)为二聚蛋白酶, 是人体重要的 II 相代谢酶系, 催化谷胱甘肽与外源有毒物结合, 从而促进有毒物排泄。GSTs 基因家族定位于人类染色体 1p13 上, 在 GSTs 基因家族中, GSTT1、GSTM1 基因表现出缺失多态性。GSTM1 的缺失纯合子称 GSTM1 null(0/0)型, 可造成 GSTs 酶类失活。GSTM1 主要对一些有毒物如多环芳烃(PAH)、乙烯环氧化物、苯乙烯等进行代谢。GSTT1 为 GSTM1 的同工酶, 与 GSTM1 一样, 其等位基因 GSTT1 的缺失纯合子称 GSTT1 null(0/0)型。由于其代谢底物主要为甲基卤化物和乙烯环氧化物, GSTT1

(0/0)基因型对吸烟和饮酒所致疾病有易感性。这些外源物代谢酶的遗传多态性由相关的基因多态性决定, 并对个体的环境易感性起了关键作用^[2]。

是否由于 GSTT1 酶和 GSTM1 酶功能的失活与 CP 易感性存在着相关性呢? 我们通过检测比较汉族人群中重度 CP 患者和牙周健康对照者 GSTM1、GSTT1 的基因型分布和等位基因频率的差异, 探讨 GSTM1、GSTT1 基因多态性与重度 CP 易感性的关系, 为慢性牙周炎的易感基因的筛选提供一些相关的资料。

1 材料与方法

1.1 研究对象

50 例经门诊确诊的汉族 CP 患者, 年龄 26—65 岁, 平均年龄 43 岁, 其中男 28 例, 女 22 例, 入选的患者均符合: 全身无系统性疾病, 一年内未做过牙周系统治疗, 妇女未妊娠。CP 的诊断标准: 全口平均牙周探诊深度(probing depth, PD) > 4mm, 附

作者简介: 张巨峰, (1973—), 男, 博士研究生, 讲师

专业: 生物化学与分子生物学

通讯作者: 周立社, 教授, 硕士生导师, E-mail: jzhang111@163.com

(收稿日期: 2006—04—21 接受日期: 2006—05—18)

着丧失(Attachment loss AL)> 5mm 超过 7 颗牙(不包括第二磨牙)。对照为 51 例汉族牙周健康的成人,无遗传病家族史,无肿瘤? 风湿病及神经系统疾病等,其中男 23 例,女 28 例。

1.2 主要试剂

TaqDNA polymerase, dNTP, DNA Maker 和引物购自上海生物工程公司。裂解液 A 和裂解液 B 由包头医学院基因诊断研究所秦文斌教授惠赠。

1.3 抽提 DNA

取混匀的全血 200ul 置于 1.5ml EP 管,向 EP 管中加入裂解液 A200ul,上下颠倒震荡使红细胞破裂。离心 12000 转 30s,吸弃上层红色液体,保留管底沉淀,再向沉淀中加入裂解液 A400ul,充分震荡混匀。再次离心 12000 转 30s,吸弃上层红色液体,向留有白色沉淀的 EP 管中加入裂解液 B 50ul,剧烈震荡使沉淀均匀分布于裂解液。沸水浴 10 分钟后离心 10000 转 3 分钟,上清液中即含有 DNA 模板。

1.4 基因型测定

依据参考文献^[2],设计引物,GSTM1 基因间 exon6、exon7 扩增片段长度为 215bp。GSTT1 基因扩增片段长度为 480bp。管家基因β-actin 作为内对照,扩增片段长度是 268bp。引物序列分别为:GSTM1 上游 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3',GSTM1 下游 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'。GSTT1 上游 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3',GSTT1 下游 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'-3'。β-actin 上游 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3',β-actin 下游 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'。PCR 反应体系为 20 ul,其中 DNA 模板 0.1ug,10× Buffer 2ul,Mgd2 2.0mmol/L, dNTP 0.2mmol/L,上下游引物终浓度各 0.4umol/L,Taq Polymerase 0.5U, ddH2o 13.84ul。PCR 反应条件:预变性 94℃ 3min,变性 94℃ 30s,退火 53℃ 1min,延伸 72℃ 1min,35 个循环,最后 72℃延伸 5min。

1.5 统计学处理

用统计分析软件包 SPSS 10.0 进行数据处理,并计算机会比(odds ratio, OR),判断等位基因型与牙周炎易感性的关系。

2 结果

2.1 成功的提取了样品中的 DNA 和进行了 PCR 扩增。基因型测定的典型电泳结果见图 1。

2.2 GSTM1 各基因型在病例组 和对照组中的频率分布(见表一)。

若以 GSTM1+ (+/+, +/0) 基因型个体的 OR 值为 1,GSTM1 基因纯合缺失个体的 OR 值为 9.56(95%CI, 3.88-23.59)。本结果显示,GSTM1 基因缺失纯合子显著增加了患重度慢性牙周炎的相对危险度。

2.3 GSTT1 各基因型在病例组 和对照组中的频率分布(见表二)。

若以 GSTT1+ (+/+, +/0) 基因型个体的 OR 值为 1,GSTT1 基因纯合缺失个体的 OR 值为 8.68(95%CI, 3.50-21.51)。本结果显示,GSTT1 基因缺失纯合子显著增加了患慢性重度牙周炎的相对危险度。

2.4 GSTM1 基因和 GSTT1 基因联合基因型对慢性重度牙周炎易感性的影响。(见表-3)。

若以 GSTT1+ (+/+, +/0) 和 GSTM1+ (+/+, +/0) 联合基因型个体的 OR 值为 1,联合基因型 GSTT1 和 GSTM1 纯合缺失个体的 OR 值为 8.68(95%CI, 3.50-21.51)。结果显示联合基因型 GSTT1 和 GSTM11 纯合缺失个体对重度慢性牙周炎易感性存在着协同作用。

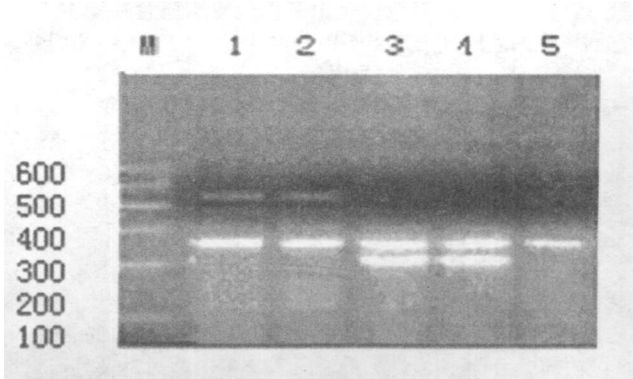


图 1 GSTM1 基因和 GSTT1 基因 PCR 扩增产物在 2.0%的琼脂糖凝胶中电泳

Figure 1:GSTM1 gene and GSTT1 gene PCR products analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis.

M:DNA Marker(100—600bp fragments); Lanes1—5: amplified PCR Products;

Lane1, 2: GSTT1+/+ or GSTT1+/0 genotypes; Lane3, 4: GSTM1+/+ or GSTM1+/0 genotypes; Lane5: GSTM10/0 or GSTT10/0 genotypes.

表 1 GSTM1+/0 遗传多态性与慢性重度牙周炎的相对危险度

Table 1 GSTM1+/0 gene polymorphisms and relative risk of CP			
Groups	n	GSTM1	GSTM1
(组别)	(例数)	(+/+, +/0)	(0/0)
Patients(病例组)	50	18	32
Controls(对照组)	51	43	8
OR(95% CI)		1.00	9.56(3.88—23.59)
Pvalue(P 值)			<0.05

表 2 GSTT1+/0 遗传多态性与慢性重度牙周炎的相对危险度

Table 2 GSTT1+/0 gene polymorphisms and relative risk of CP			
Groups	n	GSTT1	GSTT1
(组别)	(例数)	(+/+, +/0)	(0/0)
Patients(病例组)	50	21	29
Controls(对照组)	51	44	7
OR(95% CI)		1.00	8.68(3.50—21.51)
Pvalue(P 值)			<0.05

表3 GSTT1 和 GSTM1 联合基因型与慢性重度牙周炎的相对危险度
Table 3 The combined effects of GSTT1 and GSTM1 genes and relative risk of CP

组别	例数	(GSTT1)+/+ , +/0		(GSTT1) 0/0	
		(GSTM1)+	0	(GSTM1)+	0
Patients(病例组)	50	6	15	12	17
Controls(对照组)	51	39	5	4	3
OR(95% CI)	1.00	19.5	19.5	36.83	(10.42—130.13)
			(5.96—63.79)	(5.57—68.30)	
P Value(P 值)			< 0.05	< 0.05	< 0.05

3 讨论

慢性牙周炎(CP)发病是由多种因素决定的,如宿主、环境等。有证据表明,在同样的局部刺激因素下,不同个体牙周组织破坏程度差异很大。最近很多研究(尤其是对双胞胎的研究)证明,牙周炎的易感性是由基因位点多态性决定的^[3-7]。然而确切的牙周炎的标志基因并未确定。在有关白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)基因型与牙周炎关系的研究中, Kornman^[3]等发现,非吸烟人群中慢性牙周炎的严重程度与 IL-1A(-889 位点)等位基因 2 和 IL-1B(+3953 位点)等位基因 II 的同时存在高度相关,带有这两个等位基因的个体在 40 岁后发生重度牙周炎的可能性高出阴性者 18.9 倍。但也有不同结论,如: Ammitage GC^[8]等对 300 名中国人进行了牙周炎与 IL-1 基因型关系的研究,并没有发现 IL-1A 和 IL-1B 复合基因型多态性与牙周炎易感性的联系。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)与牙周炎的关系也有报道,在 Galbraith^[9]等研究中观察到晚期慢性牙周炎患者与 TNF 基因型及其产量增加有关,提示 TNF 基因型是慢性牙周炎的一个危险因素。在 Holla Li^[10]等的研究中也发现 TNF 基因型与慢性牙周炎的易感性有关。还有一些学者^[11-18]对 IgG Fc 段受体 FcR 基因型、HLA 基因型、维生素 D 受体(VDR)基因型、甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸受体基因型、糖化末端产物受体基因型与慢性牙周炎的关系研究表明这些基因型与慢性牙周炎的发病有一定关系。

吸烟在慢性牙周炎的发病中,也受到很大关注,最近研究表明吸烟者发展为牙周炎的几率比不吸烟者高 2.5—6.0 倍^[19],而且吸烟在一定程度上增加了牙周炎的严重度。由于外来化合物在体内进行生物转化是经多酶体系催化的连续过程,因此近年来生物转化酶基因多态性的联合作用与疾病的易感性研究显得尤为重要。由吸烟所致的肿瘤,如:肺癌、口腔癌,与生物转化酶类基因多态性研究较多,但生物转化酶类基因多态性与牙周炎易感性关系的研究还未见报道。

本文研究了 GSTM1 基因型(+ / +, + / 0)、(0 / 0)和 GSTT1 基因型(+ / +, + / 0)、(0 / 0)与重度慢性牙周炎易感性的关系,结果显示,基因型 GSTM1(0 / 0)和 GSTT1(0 / 0)都显著增加了患慢性重度牙周炎危险度,而且两种基因型存在协同效应。这为牙周病的遗传机理提供了新的依据,基因型 GSTM1(0 / 0)和 GSTT1(0 / 0)可作为重度慢性牙周炎易感性标志基因。当然这一结论得出仅在一个小样本和一个地区单一民族中,为了更好的反映 GSTT1、GSTM1 基因型多态性与重度慢性牙周炎的关系,还需扩大样本量,并在不同民族、不同地区人群中进行比较分析。

参考文献

[1] Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis[J]. Journal of Clinical Periodontology, 2000, 71: 1699—1707
[2] Stacy AG, Andrew RO. GSTM1, GSTT1 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. AM J Epidemiol, 2001, 154: 95—105

[3] 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: 72—77
[4] Gore EA, Sander JJ, Pandey JP, et al. interleukin-1 beta+3953 allele 2: Association with disease status in adult periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25: 781—785
[5] Kobayashi T, Westerdaal NA, Migazaki A, et al. Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients[J]. Infect Immun, 1997, 65: 3556—3560
[6] Takashiba S, Noji S, Nishimura F, et al. Unique intronic variations of HLA-DQ beta gene in early-onset periodontitis[J]. J Periodontol, 1994, 65: 379—386
[7] Bonfil JJ, Dillier FL, Mereier P, et al. A case controls study on the role of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. Identification of types and subtypes using molecular biology(PCR-SSO)[J]. J Clin Periodontol, 1999, 26: 77—84
[8] Ammitage GC, Wu Y, Wang HY, et al. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage[J]. J Periodontol, 2000, 71(2): 164—71
[9] Galbraith GM, Sreed RB, Sanders JJ, et al. tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotypes[J]. J Periodontol, 1998, 69: 428—433
[10] Holla LI, Fassmann A, Vasku A, et al. Interactive of lymphotoxin alpha(TNF-beta), aniotensin-converting enzyme(ACE) and endothelin-1 (ET-1) gene polymorphisms in adult periodontitis[J]. J Periodontol, 2001, 72: 85—89
[11] Kobayashi T, Yamamoto K, Sugita N, et al. The FcR receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients[J]. J Periodontol, 2001, 72: 1324—1331
[12] Yamamoto K, Kobayashi T, Grossi S, et al. Association of Fc gamma receptor IIa genotype with chronic periodontitis in Caucasians[J]. J Periodontol, 2004, 75(4): 517—22
[13] 伏雅莉,曹采方,王申五. FcR 基因型与早发性牙周炎易感性的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1999, 34: 361—366
[14] 伏雅莉,曹采方,王申五,等. FcR 基因在成人牙周炎中的分布[J]. 现代口腔医学杂志, 1999, 13: 257—260
[15] Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF, et al. No association with HLA-DQB1 in European Caucasians with early-onset periodontitis. Tissue[J]. Antigens, 1999, 54: 205—207
[16] Soga Y, Nishimura F, Ohya H, 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(6): 524—31
[17] Hennig BJ, Parkhill JM, Chapple IL, et al. Association of a vitamin D receptor gene Polymorphism with localized early-onset periodontal disease[J]. J Periodontol, 1999, 70: 1032—1038
[18] Gwinn MR, Shama A, Nardin ED. Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis[J]. J Periodontol, 1999, 70: 1194—1201
[19] Natto S, Baljon M, Bergstrom J. Tobacco smoking and periodontal health in a Saudi Arabian population[J]. J Periodontol, 2005, 76(11): 1919—26