

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.11.008

· 基础研究 ·

IL-6 -572 基因多态性与侵袭性牙周炎易感性的相关性研究

李璟¹, 梁菁¹, 徐婷¹, 谭凤清¹, 刘娟², 曾雄群²

1. 广州市海珠区口腔医院, 广东 广州(510310); 2. 南方医科大学口腔医院, 广东 广州(510280)

【摘要】 目的 研究白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)-572位点基因多态性与侵袭性牙周炎易感性的关系。方法 采用病例对照试验设计,从广东汉族人群中选择83例侵袭性牙周炎(aggressive periodontitis, AgP)患者(AgP组)及79例牙周健康者(对照组),采用聚合酶链反应—限制性内切酶片段长度多态性分析方法对IL-6 -572位点基因多态性进行检测,分析组间基因型频率及等位基因分布的差异。结果 IL-6基因启动子区-572位点G/C基因型在AgP组、对照组中的分布频率差异有统计学意义($\chi^2 = 13.710, P = 0.001$)。AgP组与对照组相比,G、C等位基因频率分布差异有统计学意义($\chi^2 = 13.213, P < 0.001$),G等位基因相对于C等位基因:OR值为2.988,95%CI:1.634~5.465。结论 IL-6 -572 G/C位点的基因多态性同中国广东汉族人群侵袭性牙周炎患病易感性可能存在相关关系,IL-6 -572 G等位基因可能是广东汉族人群AgP遗传易感性的高风险因素。

【关键词】 白细胞介素-6; 慢性牙周炎; 侵袭性牙周炎; 单核苷酸多态性; 等位基因

【中图分类号】 R781.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)11-0718-05

【引用著录格式】 李璟,梁菁,徐婷,等. IL-6 -572基因多态性与侵袭性牙周炎易感性的相关性研究[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(11): 718-722.

Relationship between interleukin-6 -572 gene polymorphism and aggressive periodontitis in Chinese LI

Jing¹, LIANG Jing¹, XU Ting¹, TAN Fengqing¹, LIU Juan², ZENG Xiongqun². 1. Guangzhou Haizhuqu District Stomatological Hospital, Guangzhou 510310, China; 2. The Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: ZENG Xiongqun, Email: 2236876249@qq.com, Tel: 0086-20-84403983

【Abstract】 Objective To investigate the association between interleukin-6 -572 gene polymorphism and aggressive periodontitis. **Methods** A case-control study involved 83 patients with aggressive periodontitis (AgP) and 69 health controls was held, and the genotype and allele distributions of interleukin-6 -572 gene polymorphism were analyzed by PCR-RFLP. **Results** There was statistically significant differences in the genotype distribution by the chi-square test in the two groups ($\chi^2 = 13.710, P = 0.001$). The distribution of allele frequencies in AgP group was statistically different ($\chi^2 = 13.213, P < 0.001$) from the healthy control group, and the OR for the G allele is 2.988 (95%CI: 1.634-5.465) when compared with the C allele. **Conclusion** IL-6 -572 gene polymorphism is associated with the susceptibility to AgP in Chinese Han population of Guangdong, and the IL-6 -572 G allele might be a risk factor of the genetic susceptibility to AgP.

【Key words】 Interleukin-6; Chronic periodontitis; Aggressive periodontitis; Single nucleotide polymorphism; Allele

【收稿日期】 2017-09-10; **【修回日期】** 2017-10-10

【基金项目】 广州市海珠区科技计划项目(2017-43); 广东省自然科学基金(06022942)

【作者简介】 李璟,主治医师,硕士, Email: lijing19851208@126.com

【通信作者】 曾雄群,主任医师,硕士, Email: 2236876249@qq.com

侵袭性牙周炎 (aggressive periodontitis, AgP) 是不同于慢性牙周炎的一类疾病,其特点为发病较早、牙周组织破坏进展迅速,对人类的身心健康造成很大危害。该病的发病机制一直是各国学者研究的重点^[1]。研究认为,遗传因素可能影响侵袭性牙周炎的发生发展^[2,3],人类多种基因与牙周炎的易感性有关,包括编码各种炎症因子如白细胞介素-1^[4-6]、肿瘤坏死因子 α ^[7]、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)^[8]和白细胞介素-4等^[9]的基因。IL-6是一种多功能的细胞因子,参与牙周局部免疫炎症反应和骨代谢等方面的调节^[8]。已有研究表明,IL-6基因5'端启动子区域572位点存在G/C单核苷酸多态性,可能影响IL-6的基因转录与表达,进而影响不同人群对侵袭性牙周炎易感性的差异^[8]。本研究拟通过检测中国广东地区汉族人群IL-6启动子区域-572位点G/C基因多态性,探索IL-6-572位点G/C基因多态性与AgP的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取2015年3月—2016年3月152例来自于广州市海珠区口腔医院、广东省口腔医院门诊以及广州市社区卫生服务中心进行牙周治疗的广东汉族侵袭性牙周炎患者和前来就诊的牙周健康患者。

所有受试者均满足:汉族,三代居住广东;年龄为14~72岁;无全身系统性疾病;无牙周系统治疗史,近一年内未接受过“牙周洁治”,女性非妊娠期;6个月内未服用抗生素等抗炎药物。口内至少保留14颗恒牙(包含4颗磨牙),无口腔黏膜疾病;口内无不良修复体等局部刺激因素;无严重的错颌畸形,无正畸治疗史。

侵袭性牙周炎组(AgP组)共83例,其中女性43例,男性40例。平均年龄31岁。诊断标准^[10]:年龄 ≤ 34 岁,存在明显的固有牙槽骨破坏(邻面附着丧失 ≥ 4 mm),每位患者均需拍摄曲面断层片,记录初诊全口牙槽骨水平。

健康对照组(对照组)共69例,女性39例,男性30例,平均年龄44岁。纳入标准^[11]:年龄 ≥ 35 岁;全口牙周检查探诊深度 ≤ 3 mm,无邻面附着丧失,牙龈退缩 ≤ 1 mm,出血指数 ≥ 2 的位点 $\leq 10\%$ 且无出血指数 > 4 的位点。

1.2 主要设备和试剂

DYY-III 28A型夹心垂直电泳槽(北京六一仪

器厂),EPS-100型水平电泳仪(上海天能科技有限公司),蛋白酶K、DNA Marker DL2000、DNA Marker DL500、 $\Phi \times 174$ -Hae III digest DNA Marker(大连宝生物工程有限公司),Goldview染色液(北京鼎国生物技术有限公司),Chelex-100(Sigma,美国)。

1.3 实验方法

所有受试者都必须接受全口牙齿的牙周探查(每牙检查包括6个位点:颊侧近中、颊侧正中、颊侧远中、舌侧近中、舌侧正中、舌侧远中),并记录牙周袋探诊深度(probing depth, PD)、探诊出血(bleeding on probing, BOP)、牙周附着丧失(attachment loss, AL)等临床基线特征。记录发病年龄、性别、牙列缺损情况以及家族史等。口腔检查、诊断、取材均由同一位熟练的牙周专科医师操作。

1.3.1 样本采集 用无菌棉签取受试者双侧颊黏膜拭子,室温下自然干燥过夜,在无菌密闭容器中保存。

1.3.2 DNA提取 取颊黏膜拭子,剥取拭子表层,加入Chelex-100混悬液200 μ L,使其浸没标本,再加入蛋白酶K(20 mg/mL)5 μ L,震荡混匀,55 $^{\circ}$ C水浴3 h,煮沸8 min,冰浴3 min。12 000 r/min离心2 min,取上清液,-20 $^{\circ}$ C保存。

1.3.3 多态性位点基因型检测 IL-6启动子区域-572 G/C 3个SNP位点基因型检测均采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析方法。按常规方法进行聚合酶链反应,IL-6引物设计参照文献[12],上游:5'-GAGAC-GCCTTGAAGTAACTG-3';下游:5'-AACCAAAGAT-GTTCTGAACTGA-3'。

PCR反应体系:DNA模板3 μ L,GoTaq混合酶12.5 μ L,正、反义引物各0.25 μ L,无菌去离子水补足总体积至25 μ L。

PCR扩增程序:预变性反应94 $^{\circ}$ C \times 5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,58 $^{\circ}$ C复性30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C保持5 min,4 $^{\circ}$ C保存。

PCR扩增产物的限制性酶切:取扩增产物2.5 μ L,限制性内切酶BsrBI 2.5 μ L,10 \times NEB缓冲液1 μ L,用无菌去离子水补足总体积至10 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C水浴3 h。取4 μ L酶切产物加1 μ L载样缓冲液经PAGE垂直电泳,电压220 V,50 min。以 $\Phi \times 174$ -Hae III作分子量Marker,硝酸银染色后用Tanon 1600凝胶成像仪拍照并读取结果。

1.4 实验质量检测

PCR和酶切反应设置空白对照项,所有样本基因型测定均在盲法下完成,并随机取样10%进行重复性测试2次,验证实验结果的可靠性。

1.5 统计学分析

使用SPSS 20.0软件分析实验数据。组间IL-6 -572G/C位点基因型及等位基因频率以基因直接计数法计算,由Hardy-Weiberg遗传平衡定律检验。采用 χ^2 检验统计实验结果,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床检查结果比较

AgP组和对照组的临床检查结果见表1。AgP组和对照组PD($t = 40.96, P < 0.05$)、AL($t = 41.88, P < 0.05$)及年龄($t = -10.94, P < 0.05$)的组间差异有统计学意义;组间性别差异无统计学意义($\chi^2 = 4.19, P = 0.07$)。

表1 2组基线数据比较
Table1 Groups information

组别	n	男/女	年龄	PD(mm)	CAL(mm)
AgP组	83	40/43	31.37 ± 4.17	5.23 ± 0.52	6.24 ± 1.27
对照组	69	30/39	42.82 ± 8.63	2.74 ± 0.38	0.0

注 PD:牙周袋探诊深度;CAL:附着水平丧失;AgP:侵袭性牙周炎。

2.2 IL-6 -572G/C多态性检测酶切结果

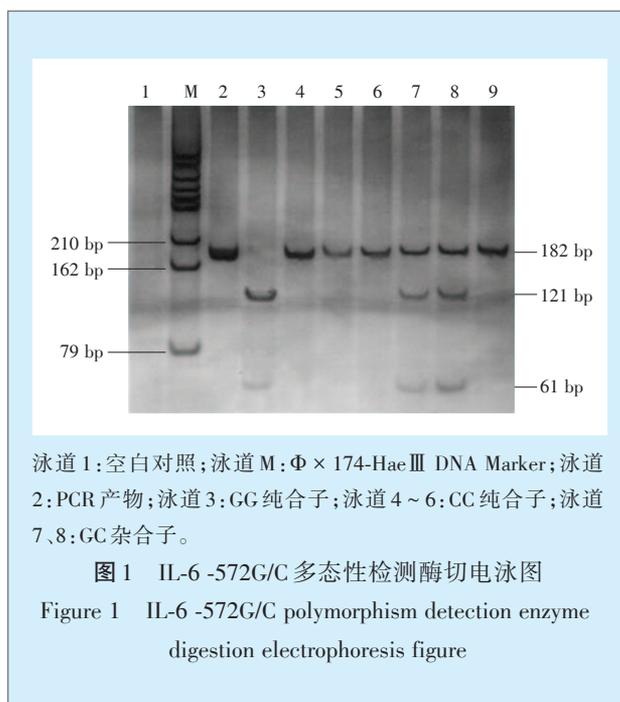
IL-6 -572G/C多态性检测酶切结果见图1。IL-6基因-572位点有3种基因型,如为CC纯合子,则1条DNA片段长度为182 bp,GG纯合子2条DNA片段长度为121 bp和61 bp,GC杂合子3条DNA片段长度分别为182 bp、121 bp、61 bp。

2.3 广东地区汉族人IL-6基因启动子区域-572G/C的基因型分布

样本IL-6 -572G/C基因型及等位基因在2组中的分布频率符合Hardy-Weiberg定律,IL-6 -572G/C基因型在AgP组、对照组中的分布频率经卡方检验有统计学差异($\chi^2 = 13.710, P = 0.001$)(表2)。AgP组与对照组相比,G、C等位基因频率分布差异有统计学意义($\chi^2 = 13.213, P < 0.001$),G等位基因相对于C等位基因:OR值2.988,95%CI为1.634~5.465。

2.4 可靠性检测结果

2次随机选择10%样本的重复试验结果与对应原始酶切反应结果相比较,二者符合率为100%。



泳道1:空白对照;泳道M:Φ × 174-Hae III DNA Marker;泳道2:PCR产物;泳道3:GG纯合子;泳道4~6:CC纯合子;泳道7、8:GC杂合子。

图1 IL-6 -572G/C多态性检测酶切电泳图
Figure 1 IL-6 -572G/C polymorphism detection enzyme digestion electrophoresis figure

表2 IL-6 -572位点基因型分布及等位基因频率比较
Table 2 IL-6 -572 genotype distribution and allele frequency comparison n (%)

组别	n	基因型分布			等位基因频率(%)	
		GC	GG	CC	G	C
AgP组	83	39(47.0)	13(15.7)	31(37.3)	66(39.8)	100(60.2)
对照组	69	25(36.2)	1(0.01)	43(62.3)	27(19.6)	111(80.4)
合计	152	64(42.1)	14(9.2)	74(48.7)	93(30.6)	211(69.4)

注 AgP:侵袭性牙周炎。

3 讨论

3.1 IL-6参与牙周炎的发生、发展

IL-6是炎症急性期蛋白质合成的重要调节因子,也是牙周疾病中被研究最多的炎症标志物之一,参与促中性粒细胞分化,活化破骨细胞,调节免疫应答等多项重要反应^[13-17]。研究发现^[14],在难治性牙周炎中,龈沟液中IL-6的分泌量增加,在活动期的牙周病损中,IL-6在龈沟液检出率较高,而经过牙周非手术治疗后IL-6水平显著降低^[15],提示在牙周病的异常免疫反应和组织破坏的过程中IL-6可能参与了免疫病理作用。Nibali等^[16]的一系列研究证明,IL-6的高水平集聚有利于Aa、Pg等牙周病原菌的繁殖,被炎性产物刺激的宿主细胞产生免疫效应,从而破坏牙周组织。

3.2 IL-6基因多态性对侵袭性牙周炎的影响

有研究报道,在牙周炎患者的牙周组织中,IL-6 mRNA呈现高表达状态,个体产生IL-6的能力越

强,在炎症介质的作用下组织遭受的破坏就越大。这种对环境刺激应答的模式被 Fishman 等人推断可能呈现遗传效应^[18]。人体等位基因的突变是由基础配对的变异或其他修饰改变所引起,最终通过改变基因活性和蛋白质表达使宿主容易罹患某种疾病。IL-6 基因与多种疾病均有关联,如急性冠脉综合征、终末端肾病、慢性肝炎等。上述疾病发生发展的个体差异性均可能由位于 7 号染色体短臂上的 IL-6 基因核苷酸变异引发^[19-23]。

侵袭性牙周炎最突出的特点就是患者口腔的菌斑牙石量和牙周组织破坏的速度和程度不成正比。所以众学者把研究重点放在了宿主的个体易感性上面。在炎症过程中发挥重要作用的细胞因子的基因变异就成为研究者的着入点。早期的研究指出,IL-6 基因的调控区存在单核苷酸变异,因此,众多学者反复验证了各自种族 IL-6 的基因多态性对牙周炎的潜在影响^[24-26]。2004 年, Holla 首次提出 IL-6 -572C 等位基因可能是捷克人慢性牙周炎的一个保护性因素^[27]。而 2008 年,英国科学家 Nibali 等^[17]采用病例对照研究,收集 224 例侵袭性牙周炎患者的试验组和 231 例健康对照组,选取包括 IL-6 的-572 位点在内的 5 个基因位点进行单核苷酸多态性(SNP)分析得出结论:IL-6 -572 位点的等位基因既不是侵袭性牙周炎的促进因素也非其保护因子,二者未检测出明显的相关关系。2012 年, Nibali 等^[16]选取了 12 例侵袭性牙周炎的患者,把 IL-6 启动子区-1363G 等位基因,-1480C 等位基因的纯合子定义为基因型阳性,其余即为基因型阴性。在牙周治疗后的 1、3、5、6、7、8、9 个月分别收集 2 组样本的龈缘菌斑及龈沟液测试伴放线放线杆菌数量及龈沟液中 IL-6 水平,并测试受试者全血中 IL-6 上述两位点的基因多态性,结果发现基因型阳性可能对患者产生过度炎性应答及牙周组织破坏具有推动作用。近年来,关于 IL-6 基因多态性与牙周炎关系的报道陆续发出^[28-30],认为在不同人群中 IL-6 -572 位点的基因型及等位基因频率存在一定差异,但关于 IL-6 基因多态性与侵袭性牙周炎的研究报道较少。

本研究首次检测了中国广东汉族人群 IL-6 -572 位点的基因多态性,位于染色体 7p21 上的 IL-6 基因 5' 端启动子区域 572 位点存在 C/G 替换单核苷酸多态性,可产生限制性内切酶 BsrBI 的酶切位点,内切酶 BsrBI 能识别的即为 G 等位基因,不能

识别的为 C 等位基因,因此,IL-6 -572 存在三种基因型:GG 纯合子、GC 杂合子、CC 纯合子。分析结果显示中国广东地区汉族人群 IL-6 基因启动子区域 IL-6 -572G、C 等位基因频率分布存在明显差异,G 等位基因相对于 C 等位基因 OR 为 2.988 95%CI 为 1.634 ~ 5.465。这说明,广东地区汉族人群 IL-6 基因启动子区域-572 位点基因多态性可能与广东汉族人侵袭性牙周炎的患病易感性存在相关关系,IL-6 -572G 等位基因可能是广东汉族人群侵袭性牙周炎遗传易感性的高风险因素。

尽管很多研究提示牙周炎的患病同 IL-6 基因的遗传变异有关,但其确切的影响仍然未有定论。本实验中仅仅验证了启动子区单个基因的 SNP,得出的结论较为片面,今后还需在基因的多个区域选取更多的位点来探讨 IL-6 基因多态性与侵袭性牙周炎患病易感性的相关性,并且还需扩大样本量进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 孟焕新. 牙周病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 135-137.
- [2] 路瑞芳, 孟焕新. 侵袭性牙周炎在非手术治疗后不同治疗反应位点的临床和可疑致病微生物特性[J]. 北京大学学报(医学版), 2015, 47(1): 23-24.
- [3] Hart TC, Kornman KS: Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis[J]. Periodontology, 2000, 1997, 14: 202-215.
- [4] Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, et al. The role of genetic polymorphisms in periodontitis[J]. Periodontol, 2000, 2007, 43(1): 102-132.
- [5] Yu N, Oortgiesen DA, Bronckers AL, et al. Enhanced periodontal tissue regeneration by periodontal cell implantation[J]. J Clin Periodontol, 2013, 40(7): 698-706.
- [6] 任秀云, 徐莉, 孟焕新, 等. 侵袭性牙周炎患者及其亲属白细胞介素-1 基因多态性的研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2008, 40(1): 82-88.
- [7] Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption[J]. Bone, 1995, 17(Suppl 2): S63-S67.
- [8] 肖立民, 谢成婕, 章锦才, 等. 白细胞介素-6-572 基因多态性与慢性牙周炎和 2 型糖尿病的相关性[J]. 广东医学, 2012, 33: 1749-1751.
- [9] 刘激, 肖立民, 章锦才, 等. 白细胞介素-4 基因多态性与慢性牙周炎的相关性研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2015, 29(5): 265-269.
- [10] 李启艳, 赵红珊, 孟焕新, 等. 白细胞介素-1 基因多态性与侵袭性牙周炎的关系[J]. 上海口腔医学, 2005, 14(4): 333-337.
- [11] Liu RK, Cao CF, Meng HX, et al. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive

- periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2001, 72(11): 1545-1553.
- [12] Seow A, Ng DP, Choo S, et al. Joint effect of asthma/atopy and an IL-6 gene polymorphism on lung cancer risk among lifetime non-smoking Chinese women[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(6): 1240-1244.
- [13] Keles ZP, Keles GC, Avci BA, et al. Analysis of YKL-40 Acute-Phase protein and interleukin-6 levels in periodontal disease[J]. *J Periodontol*, 2014, 85(9): 1240-1246.
- [14] Gulsoy Z, Sertoglu E. Chemerin and interleukin-6 levels in obese individuals following periodontal treatment[J]. *J Oral Dis*, 2016, 22(7): 673-802.
- [15] Balaji A, Chandrasekaran SC, Subramaniam D, et al. Salivary interleukin - 6 - A pioneering marker for correlating diabetes and chronic periodontitis: a comparative study[J]. *J Indian J Dent Res*, 2017, 28(2): 133-137.
- [16] Nibali L, Pelekos G, D'aiuto F, et al. Influence of IL-6 haplotypes on clinical and inflammatory response in aggressive periodontitis [J]. *Clin Oral Investig*, 2013, 17(4): 1235-1242.
- [17] Nibali L, Griffiths GS, Donos N, et al. Association between interleukin - 6 promoter haplotypes and aggressive periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2008, 35(3): 193-198.
- [18] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(7): 1369-1376.
- [19] Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis [J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 69(69): 89-94.
- [20] Loo WT, Fan CB, Bai LJ, et al. Gene polymorphism and protein of human pro- and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients[J]. *J Transl Med*, 2012, 10(Suppl 1): S8.
- [21] Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, et al. Interleukin-6 gene-174g > c and -572g > c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(9): 1458-1463.
- [22] Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, et al. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes[J]. *Diabet Med*, 2002, 19(12): 1000-1005.
- [23] Farhat SB, De Souza CM, Braosi AP, et al. Complete physical mapping of IL-6 reveals a new marker associated with chronic periodontitis[J]. *J Periodontol Res*, 2017, 52(2): 255-261.
- [24] Toker H, Gorgun EP, Korkmaz EM. Analysis of IL-6, IL-10 and nf-kappa b gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis[J]. *Cent Eur J Public Health*, 2017, 25(2): 157-162.
- [25] Gorgun EP, Toker H, Korkmaz EM. IL-6 and IL-10 gene polymorphisms in patients with aggressive periodontitis: effects on GCF, serum and clinic parameters[J]. *Braz Oral Res*, 2017, 31: 1590-1807.
- [26] Kavitha L, Vijayshree PJ, Sivapathasundharam B. Association among interleukin-6 gene polymorphisms, type 2 diabetes mellitus, and chronic periodontitis: a pilot study[J]. *J Investig Clin Dent*, 2017, 8(3): 1111-1121.
- [27] Holla LI, Fassmann A, Stejskalová A, et al. Analysis of the interleukin - 6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2004, 75(1): 30-36.
- [28] Zhang HY, Feng L, Wu H, et al. The association of IL-6 and IL-6R gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population[J]. *Oral Dis*, 2014, 20(1): 69-75.
- [29] Salman BN, Vahabi S, Biglari A, et al. Correlation of interleukin-6-174 GC and interleukin-6-572 GC gene polymorphisms with periodontal disease in an Iranian population[J]. *J Dent Res J(Isfahan)*, 2016, 13(4): 354-361.
- [30] Song GG, Choi SJ, Ji JD, et al. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G, -238 A/G, interleukin-6 -174 G/C and-572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(8): 5191-5203.

(编辑 张琳,徐琛蓉)