

[文章编号 1000-1182(2004)02-0158-04]

Fc 受体 IIA 基因多态性与慢性牙周炎易感性的相关性研究

唐 燕¹, 章锦才², 张蕴惠¹, 庞若愚²

(1. 四川大学华西口腔医院 牙周病科, 四川 成都 610041; 2. 广东省口腔医院 牙周病科, 广东 广州 510280)

[摘要] 目的 探讨 Fc 受体 A 基因多态性和慢性牙周炎的易感性相关关系。方法 采用序列特异性引物多聚酶链反应(PCR-SSP), 对 63 例重度慢性牙周炎患者、103 例轻中度慢性牙周炎患者及 80 名健康对照者的 Fc 受体 A 基因多态性进行检测, 比较各组间基因型分布及等位基因频率的差异。结果 Fc R A-R/R131 基因型在重度慢性牙周炎与健康对照组之间的分布差异有显著性 ($P < 0.0125$), 而在轻中度慢性牙周炎组与健康对照组、重度慢性牙周炎组与轻中度慢性牙周炎组之间的分布差异无显著性 ($P > 0.0125$)。结论 Fc R A-R/R131 基因型与慢性牙周炎的严重程度相关, 提示其可能与汉族人群慢性牙周炎的易感性有关。

[关键词] Fc 受体 A; 慢性牙周炎; 基因多态性

[中图分类号] R 781.4 **[文献标识码]** A

The Association between Fc Receptor A Gene Polymorphism and Susceptibility to Chronic Periodontitis in Chinese Han Nationality TANG Yan¹, ZHANG Jin-cai², ZHANG Wen-hui¹, PANG Ruo-yu². (1. Dept. of Periodontology, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Periodontology, Stomatology Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510280, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association between Fc receptor A gene polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis in Chinese Han nationality. **Methods** DNA samples were collected with buccal swabs from 63 patients with severe chronic periodontitis (CP), 103 patients with mild to moderate CP and 80 healthy individuals as control. Polymorphism in Fc receptor A gene cluster was analyzed with PCR-SSP. The genotype distribution and allele frequency among different groups were compared. **Results** It was found that the frequency of Fc RIIA-R/R131 genotype was significantly higher in patients with severe CP (19.05%) compared to that of the healthy controls ($P < 0.0125$). **Conclusion** The Fc RIIA-R/R131 genotype may be one of the contributors for the increased susceptibility to severe CP in Chinese Han nationality.

[Key words] Fc receptor A; chronic periodontitis; gene polymorphism

慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)是牙周支持组织的慢性炎症性破坏性疾病,是成年人失牙的主要原因。流行病学研究表明,人群中存在牙周病的高危人群,不同个体对牙周炎的易感性不同,即使没有任何口腔卫生措施的群体中,尽管牙结石和/或菌斑很多,但发生重度牙周炎的也只是少数人群,牙周致病菌只有在敏感的宿主才引发病变¹。细菌菌斑并不能很好地解释牙周病发病的个体差异性²,而遗传因素在牙周病发病中的作用日益受到重视,牙周病变程度的差异很大一部分可用遗传易感性的不同来解释。Fc RIIA 是细胞免疫和体液免疫的中间桥梁,在 IgG 介导的中性粒细胞的吞噬作用中起着重要的作用。Fc RIIA 编码基因存在等位基因 H131/R131 多态

性³,且与多种疾病的发生或严重程度有关⁴。本实验通过病例对照研究探讨 Fc 受体 A 基因多态性与慢性牙周炎易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

5% Chelex-100、蛋白酶 K(华美生物工程公司), dNTP(1 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司),引物(上海生工生物工程公司合成,配制浓度均为 50 μmol/L),Hema480PCR 扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司),电泳仪(Pharmacia 公司,瑞典),DYY-型垂直电泳槽(北京市六一仪器厂),高速台式离心机(Eppendorf 公司,德国)。

1.2 病例收集

选取四川大学华西口腔医院门诊中牙周炎患者,要求三代均为汉族;无口腔正畸治疗史,无明显的错殆畸形以及局部刺激因素;无全身系统性疾病;不吸

[收稿日期 2003-07-21; 修回日期 2004-02-06]

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(39970793)

[作者简介]唐 燕(1969-),女,重庆人,讲师,博士

[通讯作者]章锦才, Tel: 020-84241308

烟或戒烟 5 年以上。另外从门诊患者中选择三代均为汉族的成人,牙周健康或仅有轻度龈炎,不吸烟,无系统性疾病者作为健康对照组。由同一位医生对所有受检者进行全口牙周检查,记录口腔中所有余留牙 6 个部位(近中颊面、颊面、远中颊面、近中舌面、舌面、远中舌面)的牙周袋深度(pocket depth, PD)及临床附着水平(clinical attachment level, CAL),根据检查结果参照 Armitage 推荐的诊断标准将研究对象分组为⁵: 健康对照组:平均 CAL 0.5 mm,无邻面位点 CAL 3 mm;缺失牙不超过两颗(拔除第三磨牙、正畸拔牙、外伤性失牙、大面积龋坏失牙及先天性缺失牙除外)。轻中度 CP 组:0.6 mm 平均 CAL 2.4 mm,不超过 8 个邻面位点 CAL 3 mm,分布于至少 3 个区或 6 颗牙齿;缺失牙不超过 5 颗(拔除第三磨牙、正畸拔牙、外伤性失牙、大面积龋坏失牙及先天性缺失牙除外)。重度 CP 组:平均 CAL 2.5 mm,至少有 3 个区有 1 个或多个邻面位点 CAL 5 mm;缺失牙不超过 14 颗(拔除第三磨牙、正畸拔牙、外伤性失牙、大面积龋坏失牙及先天性缺失牙除外)。

1.3 样本的采集和 DNA 的提取⁶

无菌棉签取双侧颊黏膜拭子,室温下自然干燥过夜。剥取拭子表层,加入 Chelex-100 150 μ l,使其浸没标本,再加蛋白酶 K (20 g/L) 10 μ l,漩涡混匀,55 水浴 3 h,煮沸 8 min,置于冰上 3 min,12 000 r/min 离心 2 min,取上清液,-20 保存。

1.4 Fc RIIA 基因型测定

使用序列特异引物 PCR (polymerase chain reaction with sequence-specific, PCR-SSP) 法⁷ 测定 Fc RIIA 基因型。引物(均在美国 GIBCO 公司合成,使用浓度 50 μ mol/L): 1 # 为 5'-ATCCCA GAAATCTCTCCCA-3', 2 # 为 5'-ATCCCA GAAATCTCTCCG-3', 3 # 为 5'-CAATT TTGCTATGGGC-3'。

内参引物(人生长激素 HGH 引物,50 μ mol/L): 4 # 为 5'-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTA-3', 5 # 为 5'-ATCCACTCACGGATTCTGTGTGTTT-3'。

PCR 反应体系:DNA 样品 3 μ l, dNTP (1 mmol/L) 2 μ l, 10 \times 缓冲液 2 μ l, BSA 2 μ l, 引物 1 # 或 2 # 0.2 μ l, 3 # 0.2 μ l, 4 # 和 5 # 各 0.1 μ l, Taq 酶 1.5 单位,用无菌去离子纯水补足体积至 20 μ l。

扩增程序:95 5 min, 10 \times (95 1 min, 57 2 min, 72 1 min), 22 \times (95 1 min, 54 2 min, 72 1 min), 72 5 min。

扩增在国产 Hema 480 型 PCR 仪上进行,产物经 6 %PAGE 垂直电泳,硝酸银法染色,直接读取基因型结果,产物内参为 439 bp, H/R 等位基因为 253 bp。

PCR 质量控制措施:所有 DNA 样本均在盲法下

测定其基因型;操作者不知道该样本的任何临床资料或分组情况;每次 PCR 扩增均设立阴性对照(以无菌去离子纯水代替模板 DNA),且反应体系中加入内参;随机抽取 10 %的样本(25 例),仍在盲法下(操作者不知道该样本的任何临床资料、分组情况及上次基因型检测结果)重复检测其基因型,以检测 PCR 结果的可靠性。

1.5 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件包进行病例组和对照组基因型分布的² 检验,并将杂合子和等位基因 H 纯合子的数据合并,再与等位基因 R 纯合子的数据进行四格表的 Fisher 精确检验和危险分析,计算机会比(odds ratio, OR)值和 95 %可信区间,以得出等位基因与疾病易感性的关系。

2 结果

2.1 样本资料

共收到 166 名病例,其中 63 名重度 CP 患者、103 名轻中度 CP 患者,男性 53 人,女性 113 人,年龄范围 27 ~ 60 岁,平均年龄 53 岁。健康对照组共 80 人,男 32 人,女 48 人,年龄范围 35 ~ 69 岁,平均年龄 53 岁。

2.2 PCR 质量控制结果

各位点随机抽取 10 % (25 例) 的样本,重复检测基因型结果与前一次测量结果完全一致,证明本实验结果是可靠的。

2.3 基因型测定电泳结果

Fc RIIA 有 3 种基因型,即 H/HI31 纯合子、H/RI31 杂合子及 R/RI31 纯合子,见图 1。

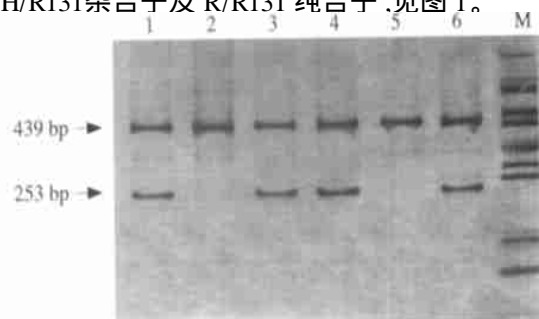


图 1 Fc RIIA 基因型 PCR 产物电泳结果

1, 2: H/HI31 纯合子; 3, 4: H/RI31 杂合子; 5, 6: R/RI31 纯合子

Fig 1 Representative polyacrylamide gel eletrophoresis illustrating genotyping of Fc RIIA

2.4 Fc RIIA 基因型在重度 CP 组、轻中度 CP 组及健康对照组中分布情况比较

3 组均以 Fc RIIA-H/RI31 杂合子基因型占优势,但 3 组间 H/HI31 纯合子和 R/RI31 纯合子基因型分布不完全相同(图 2)。重度 CP 组 Fc RIIA-R/RI31 纯合子基因型的检出率为 19.05 %,轻中度 CP 组为

11.65%, 健康对照组为 2.50%。重度 CP 组 R/R131 纯合子基因型检出率显著高于健康对照组 ($\chi^2 = 15.834, P = 0.000 < 0.0125$); H/R131 杂合子和 H/H131 纯合子数据合并后, 将 3 组间 R/R131 纯合子基因型和非 R/R131 纯合子基因型分布进行两两比较, 结果显示重度 CP 组与健康对照组间基因型分布差异有显著性 ($\chi^2 = 10.927, P = 0.001 < 0.0125$), R/R131 纯合子基因型的 OR 值为 9.176, 95% 可信区间为 1.971 ~ 42.719, 提示重度 CP 组暴露在危险因素 R/R131 纯合子基因型的总体比例与健康对照组相比较, 差异有显著性。

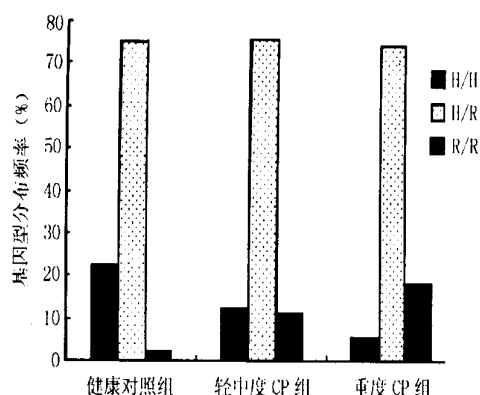


图 2 Fc RIIA 在不同病变类型和健康对照组中的基因型分布
Fig 2 Distribution of genotyping of Fc RIIA in the different disease groups

2.5 Fc RIIA 等位基因频率测定结果

3 组间等位基因 H 和 R 的基因频率见图 3, 由图可见, 各组基因频率分布各不相同, 重度 CP 组等位基因 R 的频率高于等位基因 H 的频率, 而健康组的情况正好相反, 等位基因 H 的频率高于等位基因 R 的频率; 轻中度 CP 组等位基因 H 和 R 的频率基本接近。各组两两比较结果显示, 重度 CP 组与健康组等位基因 H 和 R 的基因频率存在差异, 且具有统计学意义 ($\chi^2 = 7.560, P = 0.006 < 0.0125$), 等位基因 R 的 OR = 1.936, 95% 的可信区间为 1.206 ~ 3.108, 提示重度 CP 组等位基因 R 的基因频率显著高于健康组。以健康组推测, 人群中等位基因 H 的基因频率为 0.60, 等位基因 R 的基因频率为 0.40。

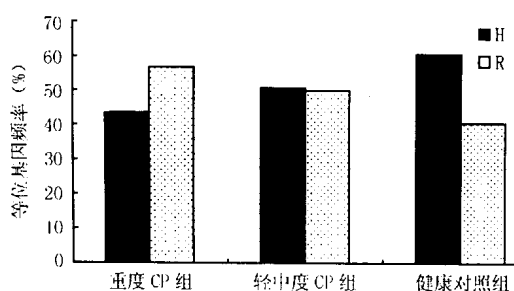


图 3 Fc R A 在不同组别中的等位基因频率
Fig 3 Distribution of allelic gene of Fc R A in the different disease groups

3 讨论

IgG₂ 是机体在有荚膜细菌感染中产生的对抗致病菌的主要抗体亚型, 通过其调理作用, 使中性粒细胞等发挥吞噬和杀伤细菌的功能。研究发现, 在人白细胞表面存在两种与人 IgG₂ 结合力不同的 Fc 受体, Fc γ A 的基因编码于 1 号染色体 q23 ~ 24 带上, 有 8 个外显子组成, 其中外显子 4 的第 494 位核苷酸发生了 G → A 的单碱基置换, 相应的, 在受体蛋白质的第二胞外功能区第 131 位的氨基酸由精氨酸变为组氨酸³。-131 位正是 IgG Fc 段识别结合的关键部位, 由此形成两种结合力相差很大的受体, 并分别命名为 R131 和 H131。在基因转染的成纤维细胞株中, H131 型受体显示出与 IgG₂ 高度的亲和力, 而 R131 型则亲和力很差甚至无亲和力⁸。Fc R 的基因多态性使不同个体 Fc R 介导的免疫反应出现差异, 进而影响一系列感染性和自身免疫性疾病的发生和发展, 目前研究⁴ 发现, 在爆发性脑膜炎双球菌败血症休克的儿童患者中, Fc RIIA-R/R131 纯合子的个体比率较高; Domingo 等⁹ 研究显示, Fc RIIA-R/R131 纯合子基因型和脑膜炎的严重程度存在相关关系。有研究¹⁰ 发现肝素诱发的血小板减少症患者中 Fc RIIA-R/R131 纯合子基因型表达频率明显高于健康对照组, 而且这类患者更容易并发血栓形成, 从而加重病情。许多学者^{11, 12} 也相继报道了系统性红斑狼疮的病变严重程度与 Fc RIIA-R/R131 纯合子基因型之间有相关关系。

本研究结果显示, 重度 CP 组 Fc RIIA-R/R131 纯合子基因型的检出率与健康对照组相比较 (分别为 19.05% 和 2.50%) 差异具有统计学意义; 而轻中度 CP 组 Fc RIIA-R/R131 纯合子基因型的检出率较健康对照组高 (分别为 11.65% 和 2.50%), 但两者比较差异无显著性; 提示 Fc RIIA-R/R131 纯合子基因型可能是汉族人群慢性牙周炎病变发展的一个危险因子。1997 年, Kobayashi 等¹³ 探讨了 Fc 受体基因多态性与慢性牙周炎发生的关系, 发现 Fc R γ b-NA1/NA2 基因型检出率较高, 在不考虑复发的情况下, 患者和健康组之间基因型分布频率比较, 差异无统计学意义, 但日本慢性牙周炎携带 Fc R γ b-NA2/NA2 基因型患者其复发率明显高于非携带 Fc R γ b-NA2/NA2 基因型患者, 提示 Fc R γ b-NA2/NA2 基因型是成人牙周炎复发的危险因子。Meisel 等¹⁴ 研究了 Fc RIIA、Fc R γ A 和 Fc R γ B 基因多态性与白种人慢性牙周炎的关系, 发现牙槽骨破坏程度与 Fc R γ -158V/V 基因型相关, 未发现与 Fc RIIA 基因型的相关关系。本研究结果与该结果有出入, 而其他自身免

疫性疾病的研究结果相一致,可能原因是:样本量不足,尤其是患者的选择,可能由于患者选择造成的偏倚,影响了统计结果;牙周病的发生和多种因素有关,涉及机体免疫的许多方面、免疫网络和细胞因子网络的相互作用和相互调控,以及在基因水平的复杂作用,遗传因子不是简单的一两个基因的问题,只有深入地进行相关研究,才有可能揭示遗传因子在牙周病发生中的作用;牙周病发生的个体异质性,使得不同危险因子在不同个体中的作用出现差异。对某些患者而言,中性粒细胞功能障碍是主要因素,而对另外患者而言,糖尿病是其主要危险因子,遗传因子的作用也同样有此现象。

由于炎症反应中各种细胞因子调节网络的复杂性,要揭示各基因位点和炎症表现型之间的相关关系还需要进一步实验研究,但可以明确一点,即 Fc R 家族基因多态性对牙周炎的发生、发展具有重要影响。本研究表明 Fc RIIA-R/R131 基因型与慢性牙周炎的严重程度相关,可能是中国汉族人牙周炎易感性的重要遗传标志。

[参考文献]

- 1] Le H, Anerud A, Boysen H, et al. Natural history of periodontal disease in man. Rapid moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age J. J Clin Periodontol, 1986, 13 (5): 431-40.
- 2] Offenbacher S. Periodontal disease: Pathogenesis J. Ann Periodontol, 1996, 1(11): 821-878.
- 3] Clark MR, Clarkson SB, Ory PA, et al. Molecular basis for a polymorphism involving Fc receptor on human monocytes J. J Immunol, 1989, 5(1): 1731-1734.
- 4] Platonov AE, Shipulin GA, Vershinina IV, et al. Association of human Fc RIIa (CD32) polymorphism with susceptibility to and severity of meningococcal disease J. Clin Infect Dis, 1998, 27(4): 746-750.
- 5] Armitage 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): 164-171.
- 6] 段海燕,章锦才,黄萍,等.四种方法 DNA 获取用于检测 IL-1 基因多态性的比较研究 J. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(1): 11-13.
- 7] Flesh BK, Bauer F, Neppert J. Rapid typing of the human Fc receptor IIA polymorphism by polymerase chain reaction amplification with allele specific primers J. Transfusion, 1998, 38(2): 174-176.
- 8] Clark MR, Stuart SG, Kimberly RP, et al. A single amino acid distinguishes the high-responder from the low-responder form of Fc receptor on human monocytes J. Eur J Immunol, 1991, 21(8): 1911-1916.
- 9] Domingo P, Muniz-Diaz E, Baralides MA, et al. Associations between Fc gamma receptor IIA polymorphisms and the risk and prognosis of meningococcal disease J. Am J Med, 2002, 112(1): 19-25.
- 10] Carlsson LE, Santos S, Bautichter G, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: New insights into the impact of the Fc gamma RIIa-R-H131 polymorphism J. Blood, 1998, 92 (5): 1526-1531.
- 11] Duits AJ, Bootsma H, Derksen RH, et al. Skewed distribution of IgG Fc receptor Ila (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systematic lupus erythematosus patients J. Arthritis Rheum, 1995, 38 (12): 1832-1836.
- 12] Manger K, Repp R, Spriewald BM, et al. Fc gamma receptor a polymorphism in Caucasian patients with systematic lupus erythematosus: Association with clinical symptoms J. Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1181-1189.
- 13] Kobayashi T, Westerdaal NA, Miyazaki A, et al. Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients J. Infect Immun, 1997, 65(9): 3556-3560.
- 14] Meisel P, Carlsson LE, Sawaf H, et al. Polymorphisms of Fc gamma receptors R a, R a, and R b in patients with adult periodontal diseases J. Genes Immun, 2001, 2(5): 258-262.

(本文编辑 汤亚玲)

第十期口腔种植牙外科与修复学习班通知

由四川大学华西口腔医学院口腔种植治疗中心承办的国家级继续教育项目“第十期口腔种植牙外科与修复学习班”将于 2004 年 9 月 13 日~17 日在四川大学华西口腔医学院举办。该学习班除使学员掌握基本的口腔种植牙的理论和操作技能外,还将着重介绍最新的临床技术和方法,包括口腔种植治疗的新进展,种植外科中的植骨技术,骨再生引导膜技术的应用,即刻种植牙技术,种植牙即刻负荷,种植牙修复的美学,上颌窦底提升技术,以及局部种植义齿及无牙颌种植义齿修复,演示种植体植入手术及各种上部结构修复制作过程,并介绍几种常用口腔种植系统的特点。联系人:欧国敏,电话:028-85503571

国家级继续医学教育项目“颌面部血管瘤生长分子机制及治疗研究进展学习班”通知

为提高口腔颌面部血管瘤临床治疗和基础研究水平,经全国继续教育委员会学科组第九次工作会议审定通过,兹定于 2004 年 7 月 19~24 日在福建省福州市举办国家级继续医学教育项目“颌面部血管瘤生长分子机制及治疗研究进展国家级继续教育学习班”(编号 2003-08-02-002)。此学习班由四川大学华西口腔医学院主办,福建医科大学协办,培训对象为口腔颌面外科和头颈外科各级医师及相关基础研究人员。结业授予国家级继续教育一类学分 12 分。联系人:四川省成都市人民南路三段 14 号四川大学华西口腔医院口腔颌面外科 华成舸 邮编:610041 电话:028-85501440,85501428 传真:028-85582167 Email:omrswcums@163.com