

转化生长因子-β1和白细胞介素-10单核苷酸多态性与复发性口腔溃疡易感性的研究

张敬¹ 沙晶晶² 龚娟¹

1.宁夏医科大学总医院口腔医院牙体牙髓病科; 2.宁夏医科大学研究生院, 银川 750004

[摘要] 目的 研究转化生长因子-β1 (TGF-β1) -509T/C位点与白细胞介素-10 (IL-10) -1082A/G位点的单核苷酸多态性与复发性口腔溃疡 (RAU) 易感性的相关性。方法 采用限制性片段长度多态性-聚合酶链式反应 (RFLP-PCR) 法和序列特异性引物-聚合酶链式反应 (SSP-PCR) 法对138例RAU患者和124例健康对照者进行TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点的单核苷酸多态性的检测分析, 用比值比 (OR) 和95%可信区间 (95%CI) 估计相对危险度。结果 TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点在基因型频率与等位基因频率的分布上, 病例组与正常对照组之间均存在明显差异 ($P<0.05$)。TGF-β1-509位点基因型CT (OR=1.231, 95%CI=0.702~2.160) 与TT (OR=2.482, 95%CI=1.250~4.927) 为高风险基因型, T等位基因为高风险等位基因 (OR=1.465, 95%CI=1.036~2.074)。IL-10-1082位点基因型AG (OR=1.391, 95%CI=0.808~2.396) 与GG (OR=4.165, 95%CI=1.944~8.924) 为高风险基因型, G等位基因为高风险等位基因 (OR=2.134, 95%CI=1.474~3.089)。结论 TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点是RAU患者的易感基因位点。TGF-β1-509位点携带T等位基因患RAU的风险性是携带C等位基因者的1.465倍。IL-10-1082位点携带G等位基因患RAU的风险性是携带A等位基因者的2.134倍。

[关键词] 转化生长因子-β1; 白细胞介素-10; 单核苷酸多态性; 复发性口腔溃疡

[中图分类号] R 781.5 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2016.01.006

Relationship between transforming growth factor-β1 and interleukin-10 single nucleotide polymorphism and susceptibility of recurrent aphthous ulcer Zhang Jing¹, Sha Jingjing², Gong Juan¹. (1. Dept. of Endodontic Disease, Stomatological Hospital of Ningxia Medical University General Hospital, Yinchuan 750004, China; 2. Graduate School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Supported by: National Natural Science Foundation of Ningxia (NZ201322). Correspondence: Zhang Jing, E-mail: zhj20045@163.com.

[Abstract] **Objective** To explore the possible relationship between recurrent aphthous ulcer (RAU) and single nucleotide polymorphism (SNP) of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) -509T/C and interleukin-10 (IL-10) -1082A/G sites. **Methods** A total of 138 RAU patients were recruited for this study. The control group consisted of 124 subjects. TGF-β1-509T/C and IL-10-1082A/G sites were detected by restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (RFLP-PCR) and sequence specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR). Relative risk ratios were estimated by odds ratios (OR) and 95% confidence interval (95%CI). **Results** Significant differences were found in the genotype frequencies or allele frequencies of TGF-β1-509T/C and IL-10-1082A/G sites between the RAU patients and controls ($P<0.05$). CT genotype (OR=1.231, 95%CI=0.702~2.160), TT genotype (OR=2.482, 95%CI=1.250~4.927), and T allele (OR=1.465, 95%CI=1.036~2.074) at the TGF-β1-509 site exhibited high risks. AG genotype (OR=1.391, 95%CI=0.808~2.396), GG genotype (OR=4.165, 95%CI=1.944~8.924), and G allele (OR=2.134, 95%CI=1.474~3.089) at the IL-10-1082A/G site also showed high risks. **Conclusion** TGF-β1-509T/C and IL-10-1082A/G sites are associated with the risk of RAU. The TGF-β1 gene-509T allele

and IL-10 gene-1082G allele may serve as genetic determinants for RAU.

[Key words] transforming growth factor-β1; interleukin-10; single nucleotide polymorphism; recurrent aphthous ulcer

[收稿日期] 2015-04-26; **[修回日期]** 2015-11-10

[基金项目] 宁夏自然科学基金 (NZ201322)

[作者简介] 张敬, 主任医师, 硕士, E-mail: zhj20045@163.com

[通信作者] 张敬, 主任医师, 硕士, E-mail: zhj20045@163.com

复发性口腔溃疡 (recurrent aphthous ulcer, RAU) 是常见的口腔黏膜疾病, 患病率可高达20%。目前国内外学者普遍认为RAU发病是遗传、环境及免疫综合作用, 即遗传背景加上适当的环境引发异常的免疫反应而出现RAU特征性病损。研究^[1]已表明: RAU患者出现T淋巴细胞介导的细胞免疫反应的下降, 其中以CD4、CD4/CD8的水平均出现不同程度的降低。转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 是由调节性T细胞产生, 可以抑制多种细胞因子的合成, 对T细胞免疫有着负性调节的作用。有研究表明, TGF-β1和IL-10的单核苷酸多态性与多种自身免疫性疾病密切相关, 位于启动子区的TGF-β1-509位点^[2]与IL-10-1082位点^[3]的基因多态性与这2个因子的转录水平和循环浓度有关。前期研究^[4]发现RAU患者外周血中TGF-β1和IL-10处于高表达水平, 提示TGF-β1和IL-10可能与RAU发病有一定的关系。本研究通过对RAU患者与健康对照组TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点的单核苷酸多态性进行检测, 旨在探讨这2个位点与RAU易感性的关系, 为RAU发病机制提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取2012年6月—2014年12月在宁夏医科大学总医院口腔医院口腔黏膜病科就诊的138例RAU患者, 其中男72例, 女66例, 年龄 (43.45±31.34) 岁, 其诊断标准均符合第4版的《口腔黏膜病学》。同时选取124例健康者为正常对照组, 其中男60例, 女64例, 年龄 (44.01±28.50) 岁。2组年龄、性别、民族均衡可比 ($P_{\text{性别}} > 0.540$; $P_{\text{年龄}} > 0.781$; $P_{\text{民族}} > 0.415$), 且组间汉族与其他民族2个位点各个基因型构成比较均无统计学差异 ($P > 0.05$)。病例组及正常对

照组均排除: 各种全身系统性疾病; 24 h内使用过镇痛药, 1个月内使用过抗生素, 3个月内全身使用过免疫抑制剂、皮质类固醇激素类药物等。

1.2 方法

1.2.1 全血基因组DNA提取 采集所有病例组与正常对照组人员的外周静脉血2 mL, 使用DNA提取试剂盒 (北京天根有限公司) 提取DNA, 具体操作按照试剂盒说明。

1.2.2 单核苷酸多态性的检测 通过限制性片段长度多态性-聚合酶链式反应 (restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction, RFLP-PCR) 法及序列特异性引物-聚合酶链式反应 (sequence specific primer-polymerase chain reaction, SSP-PCR) 法检测TGF-β1-509T/C位点与IL-10-1082A/G位点的单核苷酸多态性, 利用特异性的引物扩增目的基因片段。将一个样本配制25 μL聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 反应体系, 其配比为: 12.5 μL的2×Reaction Mix、0.5 U的Taq聚合酶、300 ng的待测样本模板DNA。TGF-β1-509位点再加入1 μL上游引物、1 μL下游引物 (表1), 剩余用ddH₂O补足体系。IL-10-1082位点再加入1 μL内参照正向引物、1 μL内参照反向引物、1 μL通用反向引物、1 μL特异正向引物 (A管中加入引物A, G管中加入引物G) (表1), 剩余用ddH₂O补足体系。反应条件: 94 °C预变性3 min, 30个循环 (94 °C变性30 s, 退火30 s, 72 °C延伸45 s), 72 °C终末延伸5 min。然后对TGF-β1-509位点的PCR产物进行酶切, 25 μL酶切体系 (5 μL PCR扩增产物、5 U限制性内切酶Bsu36 I, 2.5 μL 10×Buffer, 剩余用ddH₂O补足体系) 在37 °C下孵育1 h, 然后对TGF-β1-509位点的酶切PCR产物及IL-10-1082位点的直接扩增PCR产物在3%的琼脂糖凝胶进行120 V、20 min的电泳, 在多色荧光成像系统下拍摄照片。

表 1 各基因位点引物序列及退火温度

Tab 1 Each sequence primers of gene site and annealing temperature

基因位点	引物名称	引物序列	退火温度/°C
TGF-β1-509位点	上游引物	5'-CAGACTCTAGAGACTGTCAG-3'	58
	下游引物	5'-GTCACCAGAGAAAGAGGAC-3'	
IL-10-1082位点	内参照正向引物	5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3'	60
	内参照反向引物	5'-TCACGGATTCTGTGTGTTTC-3'	
	特异正向引物A	5'-AACACTACTAAGGCTTCTTTGGGTA-3'	
	特异正向引物G	5'-AACACTACTAAGGCTTCTTTGGGTG-3'	
	通用反向引物	5'-GTAAGCTTCTGTGGCTGGAGTC-3'	

1.3 统计学处理

采用Hardy-Weinberg平衡检验群体代表性。采

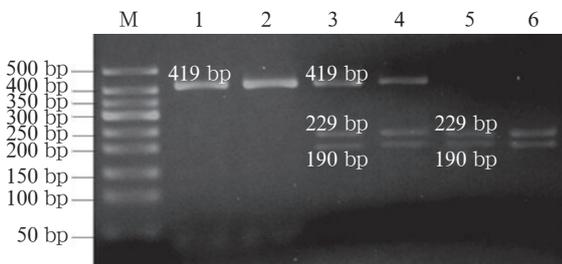
用SPSS 17.0软件对实验数据进行分析, 运用 χ^2 检验计算各位点的基因型频率和等位基因频率, 以 $P < 0.05$

为差异具有统计学意义，用比值比 (odds ratio, OR) 和95%可信区间 (95% confidence interval, 95%CI) 估计相对危险度。

2 结果

2.1 TGF-β1-509T/C位点与IL-10-1082A/G位点的基因型检测分析

TGF-β1-509T/C位点基因型电泳结果见图1。由图1可见，TGF-β1-509位点的目的基因为419 bp的一条带，经Bsu36 I 限制性内切酶消化，可将等位基因C酶切，因此TT基因型为419 bp的条带，CT基因型为419、229、190 bp的条带，CC基因型为229、190 bp的条带。



M: DNA Marker; 1, 2: TT基因型的样本; 3, 4: CT基因型的样本; 5, 6: CC基因型的样本。

图 1 TGF-β1-509T/C位点基因型电泳图

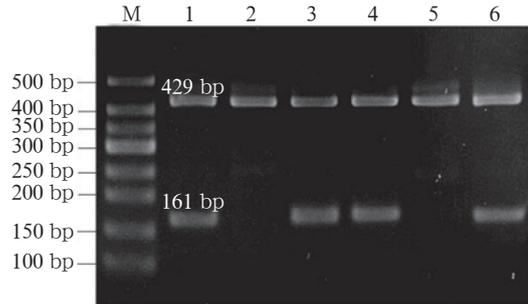
Fig 1 The genotype electrophoregram of TGF-β1-509T/C site

IL-10-1082位点的目的基因为161 bp的一条带，人生长激素内参基因为429 bp的一条带。将一个样本分为A管与G管，所有的样本中均含人生长激素内参基因。AA基因型：A管中有161 bp的条带，G管中没有161 bp的条带；GG基因型结果与之相反；AG基因型：A、G两管中均有161 bp的条带，具体见图2。

2.2 Hardy-Weinberg平衡检验

对正常对照组124人进行了Hardy-Weinberg平衡检验群体代表性，结果显示：TGF-β1-509位点的 $\chi^2=0.0573$, $P>0.05$ ；IL-10-1082位点的 $\chi^2=1.328$, $P>$

0.05，符合Hardy-Weinberg平衡，具有群体代表性。



M: DNA Marker; 1, 2为AA基因型的样本, 1为A管、2为G管; 3, 4为AG基因型的样本, 3为A管、4为G管; 5, 6为GG基因型的样本, 5为A管、6为G管。

图 2 IL-10-1082A/G位点基因型电泳图

Fig 2 The genotype electrophoregram of IL-10-1082A/G site

2.3 TGF-β1-509T/C位点与IL-10-1082A/G位点的基因检测结果分析

TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点的各等位基因及基因型统计结果见表2、3。本研究共完成138例RAU患者及124例健康对照者的TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点的检测，结果表明：病例组与正常对照组在基因型频率与等位基因频率的分布上，均存在明显差异 ($P<0.05$)。2组TGF-β1-509位点的CC、CT、TT基因型频率相比较， $\chi^2=7.273$, $P=0.026$ ；C、T的等位基因频率相比较， $\chi^2=4.671$, $P=0.031$ 。与基因型CC相比较，基因型CT的OR=1.231 (95%CI=0.702~2.160)，基因型TT的OR=2.482 (95%CI=1.250~4.927)。以C等位基因作为标准，T等位基因OR=1.465 (95%CI=1.036~2.074)。2组IL-10-1082位点的AA、AG、GG的基因型频率相比较， $\chi^2=14.569$, $P=0.001$ ；A、G的等位基因频率： $\chi^2=16.387$, $P=0.000$ 。与基因型AA相比较，基因型AG的OR=1.391 (95%CI=0.808~2.396)，基因型GG的OR=4.165 (95%CI=1.944~8.924)。以A等位基因作为标准，G等位基因OR=2.134 (95%CI=1.474~3.089)。

表 2 TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点的基因型统计分析表

Tab 2 Genotype statistical analysis tables of TGF-β1-509 site and IL-10-1082 site

基因型	RAU患者n/%	健康者n/%	χ^2 值	P值	OR值	95%CI
TGF-β1-509位点	CC	38/27.54	7.273	0.026	1	-
	CT	59/42.75			1.231	0.702~2.160
	TT	41/29.71			2.482	1.250~4.927
IL-10-1082位点	AA	55/39.86	14.569	0.001	1	-
	AG	47/34.06			1.391	0.808~2.396
	GG	36/26.09			4.165	1.944~8.924

表 3 TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点的等位基因统计分析表

Tab 3 Allele statistical analysis tables of TGF-β1-509 site and IL-10-1082 site

等位基因		RAU患者n/%	健康者n/%	χ^2 值	P值	OR值	95%CI
TGF-β1-509位点	C	135/48.91	150/60.48	4.671	0.031	1	-
	T	141/51.09	98/39.52			1.465	1.036~2.074
IL-10-1082位点	A	157/56.88	183/73.79	16.387	0.000	1	-
	G	119/43.12	65/26.21			2.134	1.474~3.089

3 讨论

TGF-β1是体内主要的负性调节因子，能抑制T细胞的增殖与分化，引起免疫抑制。它的基因定位于染色体19q13.1~q13.3，含有7个外显子，该基因5'端序列包含5个明显的调控区：1个类增强子活性区，2个负调控区和2个启动子区。研究^[2]发现TGF-β1基因的转录水平和循环浓度与-509T/C位点、-869C/T位点和-915C/G位点的多态性相关，-509T/C位点的T等位基因与TGF-β1高表达相关。TGF-β1-509T/C位点的单核苷酸多态性与多种疾病的易感性相关，其中包括：IgA肾病^[5]、慢性牙周炎^[6]等。本课题组前期对RAU患者及正常对照组进行TGF-β1的血清酶联免疫吸附实验，发现RAU患者血清中TGF-β1的含量较正常对照组高^[4]。本研究通过对RAU患者与正常对照组TGF-β1-509位点与IL-10-1082位点的单核苷酸多态性进行检测，结果显示，病例组与正常对照组TGF-β1-509T/C位点的基因型频率和等位基因频率之间均存在着明显的差异（ $P < 0.05$ ）。T等位基因导致个体患RAU的风险是C等位基因的1.465倍，提示T等位基因为易感基因，可能与RAU的发病有一定的联系。

Babyatsky等^[7]报道溃疡性结肠炎的结肠黏膜中发现TGF-β1及TGF-β1 mRNA表达增高，且主要在靠近腔面的固有层炎细胞中表达，提示TGF-β1可能在抑制上皮细胞增殖与促进溃疡愈合均发挥重要作用。口腔黏膜与结肠黏膜同属消化道黏膜，口腔溃疡患者的TGF-β1水平升高可能会与口腔黏膜损伤及修复有关。口腔黏膜中上皮层次的稳定性取决于基底细胞层增殖分化的速度与角化细胞层脱落的速度相等，当前者变慢和/或后者变快时都会导致口腔黏膜上皮变薄，抵抗力降低，易于发生溃疡^[8]。TGF-β1的高表达能够趋化炎症细胞及组织修复细胞向溃疡面聚集，可靠直接作用成纤维细胞促进胶原合成、肉芽组织生长及修复期的组织改建。TGF-β1-509T/C位点的T等位基因可能与相应的核蛋白转录因子的结合谱改变相关^[9]，从而使血清中的TGF-β1循环水

平增加，这与本研究发现的CT与TT为高风险基因型及T为高风险等位基因的结果相一致。

IL-10是一种Th2细胞产生的免疫调节性细胞因子，作为主要的抗炎因子、细胞因子网络的中心环节，它具有较强的免疫抑制作用和抗炎作用，在许多自身免疫性疾病起到至关重要的作用^[10]。IL-10基因定位于第1号染色体q31~32，包括5个外显子和4个内含子，它的基因多态性在启动子区的转录起始部位上游-1082（A/G）、-819（C/T）和-592（C/A）处有3个单核苷酸多态性位点^[11]。这3处位点的基因多态性与IL-10表达水平有密切联系，-1082G相对于-1082A为高表达等位基因，以-1082A/G的多态性对表达水平的影响最显著。本课题组前期对RAU患者及正常对照组进行IL-10的血清酶联免疫吸附实验，发现RAU患者血清中IL-10的含量较正常对照组高^[4]。本研究对IL-10-1082A/G位点的基因多态性进行检测，结果显示：2组IL-10-1082A/G位点的基因型频率和等位基因频率均存在着明显的差异（ $P < 0.001$ ）。G等位基因导致个体患RAU的风险是A等位基因的2.134倍，GG、AG基因型的发病机率明显高于基因型AA，提示G等位基因可能与RAU的易感性相关。

向晓明等^[12]指出，RAU患者存在长期的细胞免疫功能低下（发病期及间隙期均低下），某些因素启动并加重口腔黏膜局部的免疫损伤，形成溃疡，并使RAU反复发作。IL-10-1082位点的G等位基因的表达使血清IL-10水平升高，可能造成口腔黏膜局部细胞免疫反应的产生，破坏口腔黏膜部分上皮的完整性，从而形成溃疡。这说明IL-10-1082位点单核苷酸多态性所致的表达水平的改变，很有可能导致RAU的发生与发展。

总之，本研究证明TGF-β1-509T/C位点与IL-10-1082A/G位点是RAU患病的易感基因位点，携带T等位基因与G等位基因者分别患RAU的风险比正常对照组高出1.465倍与2.134倍。RAU是多种病因共同导致的疾病，尤其是免疫方面的病因复杂，涉及多种细胞因子的协同作用，单个细胞因子的作用也仅能体现单方面病因。RAU的单核苷酸多态性研究

还处于起步阶段,要想深刻阐述RAU遗传与免疫的关系,还需要对多种细胞因子的多个单核苷酸多态性位点进行更深入研究。

[参考文献]

- [1] 聂玉洁,蔡扬,丰秋婧.复发性阿弗他溃疡患者外周血T-bet、GATA-3和Foxp3的表达及意义[J].国际口腔医学杂志,2013,40(5):568-571.
Nie YJ, Cai Y, Feng QJ. Expression of T-bet, GATA-3, and Foxp3 in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcer[J]. Int J Stomatol, 2013, 40(5):568-571.
- [2] 季鑫,高春芳.TGF-β1基因单核苷酸多态性与疾病的关系[J].现代免疫学,2009,29(2):165-168.
Ji X, Gao CF. The relationship of TGF-β1 gene single nucleotide polymorphisms and disease[J]. Current Immunology, 2009, 29(2):165-168.
- [3] Hyun MH, Lee CH, Kang MH, et al. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis[J]. PLoS ONE, 2013, 8(1):e53758.
- [4] 张敬,王婷婷,漆明.复发性阿弗他溃疡患者外周血中TGF-β1和IL-10的水平变化及其临床意义[J].实用口腔医学杂志,2014,30(1):82-84.
Zhang J, Wang TT, Qi M. Expression of transforming growth factor-β1 and interleukin-10 in patients with recurrent aphthous ulcer[J]. J Pract Stomatol, 2014, 30(1):82-84.
- [5] Carturan S, Roccatello D, Menegatti E, et al. Association between transforming growth factor beta1 gene polymorphisms and IgA nephropathy[J]. J Nephrol, 2004, 17(6):786-793.
- [6] 郑敏,沈艳芳.TGF-β1基因-509C/T位点多态性与牙周炎相关性的Meta分析[J].武警医学,2014,25(4):340-343.
Zheng M, Shen YF. Association between TGF-β1 gene-509 C/T polymorphism and periodontitis: a meta-analysis[J]. Med J Chin People's Armed Police Forces, 2014, 25(4):340-343.
- [7] Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 1996, 110(4):975-984.
- [8] 顾杨,张纲,林梅.复发性阿弗他溃疡患者唾液中表皮生长因子和病损区表皮生长因子受体的定量研究[J].华西口腔医学杂志,2008,26(1):36-39.
Gu Y, Zhang G, Lin M. Quantity research on epidermal growth factor in saliva and epidermal growth factor receptor in biopsy samples of recurrent aphthous ulcer patients [J]. West China J Stomatol, 2008, 26(1):36-39.
- [9] 高春芳.TGF-β1基因变异与疾病相关性研究展望[J].世界华人消化杂志,2007,15(28):2959-2965.
Gao CF. Progress of research on the correlation between transforming growth factor β1 gene mutation and disease[J]. World Chin J Digestology, 2007, 15(28):2959-2965.
- [10] Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease[J]. Crit Rev Immunol, 2012, 32(1):23-63.
- [11] da Silva NM, Germano FN, Vidales-Braz BM, et al. Polymorphisms of IL-10 gene in patients infected with HCV under antiviral treatment in southern Brazil[J]. Cytokine, 2015, 73(2):253-257.
- [12] 向晓明,刘建军,李辉,等.巨细胞病毒与复发性阿弗他溃疡T细胞亚群关系的研究[J].中华口腔医学杂志,2000,35(3):212-214.
Xiang XM, Liu JJ, Li H, et al. Cytomegalovirus infection and the changes of T-lymphocyte subsets in RAU patients [J]. Chin J Stomatol, 2000, 35(3):212-214.

(本文编辑 杜冰)

敬告作者

文章作者的署名是一件严肃的事,它是文责自负和拥有著作权的标志;然而,我们发现一些作者在发回的校样上随意添加新的作者署名,有的还加两三位。我们不赞成这种做法。为了杜绝署名的不正之风,再次郑重敬告作者:务必不要在校样上添加新的作者署名!无论何人执意添加,本刊一概不予承认。

《华西口腔医学杂志》编辑部