文章编号:1000-5404(2012)17-1737-04

论著

肿瘤坏死因子-α单核苷酸多态性与口腔扁平苔藓的相关性研究

柏景坪[1],王红健[1],付 洁[1],陈方淳[2] (100050 北京,首都医科大学附属北京口腔医院牙周黏膜科[1];400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院牙周黏膜科,重庆市口腔疾病与生物医学研究中心[2])

[摘要] **目的** 研究肿瘤坏死因子-α(TNF-α)与口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)的相关性。**方法** 应用限制性片段长度多态性-聚合酶链反应(PCR-RFLP)检测151例OLP患者(包括81例糜烂型扁平苔藓和70例非糜烂型扁平苔藓)和143例健康对照者的TNF-α-308位点单核苷酸多态性,分析其基因型和等位基因频率,并进行关联分析。**结果** TNF-α-308位点的基因型和等位基因频率分布在OLP组与对照组之间无显著性差异($P>0.05$),但在糜烂型OLP组与对照组之间比较均有显著性差异($P<0.05$);基因型频率的相对风险分析发现,TNF-α-308 TNF2基因型患糜烂型OLP的风险是TNF1的2.268倍($OR=2.268$, $P<0.05$)。**结论** TNF-α基因启动子区-308位点的多态性可能不是影响OLP的一个独立因素,但TNF-α-308 *A等位基因可能是扁平苔藓局部炎症反应加重的危险因子之一。

[关键词] 口腔扁平苔藓;基因多态性;单核苷酸多态性;TNF-α
[中图法分类号] R181.33; R394.1; R781.59 [文献标志码] A

Correlation of TNF-α polymorphism and oral lichen planus susceptibility: report of 151 cases

Bai Jingping[1], Wang Hongjian[1], Fu Jie[1], Chen Fangchun[2] ([1]Department of Periodontal Mucosa, Beijing Stomatology Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing, 100050; [2]Department of Peridontal Mucosa, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the possible relationship between the single nucleotide polymorphisms (SNP) of TNF-α and the susceptibility of oral lichen planus (OLP). **Methods** A total of 151 OPL patients (including 81 erosive OLP and 70 non-erosive OLP) who were identified in our department from April to November 2010 and 143 healthy controls who received physical examination in Tiantan Hospital, Beijing from July to October 2010 were enrolled in this study. The polymorphisms of TNF-α -308 were detected in the 151 OLP cases and 143 healthy controls by using the PCR-RFLP technique. The genotype and the allele frequencies were analyzed between the 2 groups. **Results** There was no significant difference in the genotypepe and allele frequency between the OLP group and the healthy control ($P>0.05$), but was found between the erosive OLP group and the health control. When compared with healthy control, the allele frequencies of TNF-α -308 *A was much higher in the erosive OLP group ($P<0.05$), and subjects carrying the TNF1 genotype had significantly increased risk of erosive OLP ($OR=2.268$, $P<0.05$). **Conclusion** The polymorphisms of TNF-α -308 may be not a single dependent factor associated with the susceptibility and development of OLP, but the TNF-α -308 *A allele might attribute to deteriorate OLP.

[**Key words**] oral lichen planus; polymorphisms; single nucleotide polymorphisms; TNF-α

Corresponding author: Chen Fangchun, Tel: 86-23-88860029, E-mail: fangchun_chen@sina.com

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是一种慢性黏膜角化异常性疾病,是最常见的口腔黏膜病之一,临床分为普通型和充血糜烂型。OLP被WHO列为癌前状态,长期糜烂的病损具有癌变潜能,其恶变率报道不一,有研究发现可高达6.51%[1-2]。OLP的病因不清,发病机制尚未阐明,目前研究普遍认为OLP是由T淋巴细胞介导的口腔黏膜角质形成细胞发生免疫性破坏的慢性过程,是一种自身免疫相关性疾病,具有一定

[通信作者] 陈方淳,电话:(023)88860029,E-mail:fangchun_chen@sina.com

的遗传背景[3-4]。已有研究证实肿瘤坏死因子-α(TNF-α)几乎参与了OLP免疫发病机制中的所有环节,包括诱导细胞毒性T淋巴细胞的活化,介导T淋巴细胞向上皮组织的浸润,诱导角质形成细胞凋亡,激活NF-κB上调IL-6、IL-8以及TNF-α本身的表达,造成OLP活动期与静止期、病损复发与愈合交替出现的慢性迁延过程[5-8]。为进一步阐明OLP发病的免疫遗传机制,本研究采用病例-对照的方法,对TNF-α-308位点单核苷酸多态性与口腔扁平苔藓的相关性做初步研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入2010年4-11月在北京口腔医院黏膜科确诊(参照卫生部规划教材《口腔黏膜病学》第2版)的OLP患者151例,包括糜烂型81例,非糜烂型70例,其中男性65例,女性86例,年龄18~75岁。排除标准:①合并其他口腔黏膜疾患者;②长期规律服药以控制病情的系统性疾病(如自身免疫性疾病、糖尿病、心血管疾病、精神病等);③有免疫系统疾病病史;④某些药物、金属冠修复体或银汞合金充填物可能引起苔藓样反应者;⑤妊娠期、哺乳期妇女。选择同期143例正常健康人作为对照,其中男性64例,女性79例,年龄16~72岁,血液标本来源于2010年7-10月在北京市天坛医院体检中心体检的健康人。病例组和对照组性别、年龄无统计学差异($P>0.05$)。受试者均签署知情同意书。

1.2 样本DNA的提取和浓度测定

每例抽取3 ml静脉血,置于加有ACD抗凝剂的抗凝管中,-30 ℃冰箱保存,用于提取纯化基因组DNA。避免反复冻融。采用OMEGA公司E.Z.N.A基因组DNA抽提试剂盒(Genomic Blood DNA Kits)提取受试者DNA,将抽提的DNA取5 μl置于一Eppendorf管中,加无菌蒸馏水至100 μl,用紫外分光光度计测$D(260)$和$D(280)$。DNA浓度=$D(260)$值×50×稀释倍数/1 000 μg/μl;以$D(260)/D(280)$值估计DNA浓度。

1.3 TNF-α-308位点基因多态性检测

取外周血提取DNA后,用PCR-RFLP方法检测TNF-α-308位点基因多态性。设计上游引物为5′-AGGCAATAGGTTTT-GAGGGCCAT-3′,下游引物为5′-ACACTCCCCATCCTCCCTGCT-3′。PCR扩增循环参数为预变性94 ℃ 10 min,94 ℃ 1 min,63 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,40个循环,最后延伸72 ℃ 10 min。反应总体积25 μl,内含DNA模板1 μl,*Taq*酶(1 U/μl)0.5 μl,$MgCl_2$(25 mmol/L)1.5 μl,10×Buffer 2.5 μl,dNTP(10 mmol/L)2.5 μl,上下游引物(100 μmol/L)各1 μl。扩增完成后取PCR产物10 μl经*Nco*Ⅰ酶切2~3 h,酶切产物5 μl用含Goldview显色剂1 μl的2%琼脂糖凝胶电泳1 h后,用Bio-Rad凝胶成像分析系统分析判断结果。

TNF-α-308位点PCR产物约116 bp,经*Nco*Ⅰ酶切后仅有96 bp 1个片段,判定为GG型;如产生116、96 bp 2个片段,则结果判定为GA型;如产物无变化,仍为116 bp,为AA型。

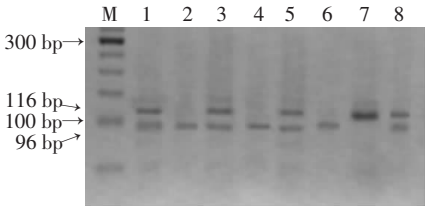
1.4 统计学分析

正常对照组及病例组均进行Hardy-Weinberg遗传平衡检验;计算各组各位点基因型频率及等位基因频率,用χ^2检验分析组间差异;计算等位基因的相对危险度估计值Odds Ratio(OR)及95%可信区间。均为双侧概率检验($\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 基因型电泳结果

TNF-α-308位点检出有3种基因型:GG型纯合子(96 bp),GA型杂合子(96、116 bp),AA型纯合子(116 bp),见图1。



M:DNA标准;1、3、5、8:GA基因型;2、4、6:GG基因型;7:AA基因型

图1 TNF-α-308位点分型电泳结果

2.2 Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验

TNF-α-308基因型频率测量值和期望值无显著性差异($P>0.05$),符合遗传平衡定律,说明病例组及对照组均为随机人群,具有群体代表性(表1)。

表1 各组对象基因型频率Hardy-Weinberg平衡分析

TNF-α-308基因型	糜烂型OLP		非糜烂型OLP		病例组总数		对照组	
	实际值	预测值	实际值	预测值	实际值	预测值	实际值	预测值
GG	63	62.2	62	62.2	125	124.3	127	127.4
GA	16	17.5	8	7.5	24	25.4	16	15.1
AA	2	1.2	0	0.2	2	1.3	0	0.4
P	0.618		0.257		0.461		0.502	

2.3 TNF-α-308位点基因多态性分析

2.3.1 2组基因型及等位基因频率的比较 TNF-α-308位点单核苷酸多态性在OLP组检测出3种基因型,以GG纯合子型最为多见(82.8%),GA杂合子型次之(15.9%),AA纯合子型最为罕见(1.3%);而对照组中只检测出2种基因型,GG纯合子型和GA杂合子型。各组等位基因频率分布均以G等位基因最为多见。根据OLP的临床表现,将其分为糜烂型(eOLP)与非糜烂型(neOLP),糜烂型扁平苔藓GG纯合子基因型频率显著低于对照组,而GA杂合子基因型显著高于对照组($\chi^2=7.371$,$P=0.025$),且仅有的2例AA纯合子基因型均为糜烂型扁平苔藓患者;等位基因频率分析结果也显示A等位基因在病例组中的频率显著高于对照组($\chi^2=6.104$,$P=0.013$)。其余各组基因型及等位基因频率组间两两比较均无显著性差异($P>0.05$)。见表2。

表2 各组TNF-α-308基因型及等位基因频率的分布[n(%)]

组别	n	基因型		等位基因		
		GG	GA	AA	G	A
OLP病例组	151	125(82.8)	24(15.9)	2(1.3)	274(90.7)	28(9.3)
eOLP	81	63(77.8)[a]	16(19.8)[a]	2(2.4)[a]	142(87.7)	20(12.3)[a]
neOLP	70	62(88.6)	8(11.4)	0	132(94.3)	8(5.7)
正常对照组	143	127(88.8)	16(11.2)	0	270(94.4)	16(5.6)

a:$P<0.05$, 与正常对照组比较

2.3.2 TNF-α基因型与OLP相对危险度分析 从基因型的相对风险分析发现,TNF-α-308位点TNF2(GA型+AA型)患糜烂型扁平苔藓的危险性是TNF1(GG型)的2.268倍(OR=2.268,95% CI:1.084~4.744,χ^2=4.716,P=0.030);等位基因风险分析也显示携带A等位基因的人群患糜烂型OLP的相对风险为正常人的2.377倍(OR=2.377,95% CI=1.194~4.729,χ^2=6.104,P=0.013)。

3 讨论

TNF-α是主要的致炎性细胞因子,其基因启动子区单核苷酸多态性在炎性疾病中的作用一直是近几年来研究的热点。研究表明TNF-α-308位点G/A单核苷酸多态性与免疫性疾病、感染性疾病、肿瘤以及移植后排异反应等有关,可以影响这些疾病病理过程的某些方面[9-13]。结合TNF-α对角质形成细胞、T细胞、LC细胞的生物学效应,提示TNF-α是OLP病损中的重要细胞因子,OLP中角质形成细胞既是浸润淋巴细胞攻击的靶细胞,同时也可能通过自身分泌TNF-α加强,增强炎性反应,并通过诱导T-淋巴细胞活化、抑制角质形成细胞生长、诱导朗格汉斯细胞CDla和HLA-D表达、促进化学诱导和朗格汉斯细胞分化迁移等作用,在OLP中的免疫反应中发挥重要的调节作用。对OLP中TNF-α的研究,将有助于进一步了解其发病机制,探索治疗方法。

TNF-α基因长约2 676 bp,包含4个外显子和3个内含子,位于6号染色体p21区域内,包含于HLA Ⅲ基因中。由于TNF-α不是预先储存在细胞内而是在受到刺激时合成的,因此,基因启动子区域中的SNP具有重要的意义。目前对于TNF-α基因启动子多态性的研究,大多数集中于-308位点。-308位点位于5′端,属于高突变区,存在多个对转录具有潜在调节作用的位点,如AP-1、AP-2、CAMP反应元件等。用人体内的单个细胞作为对象,通过比较-308G和-308A在TNF-α水平上的差异,研究-308G/A多态性的功能意义。研究表明TNF-α-308位点的多态性可能影响基因的表达,进而影响TNF-α的产量[14-16]。一般认为,A等位基因能够增强TNF-α的转录,并且与疾病的严重程度或患者的预后相关联,而G等位基因可能与低水平的TNF-α有关。在TNF-α表达水平上-308G/A和-308G/G的差异,似乎不可能是MHC连锁不平衡造成的。有研究报道,-308A纯合子和HLA-DR3处于连锁不平衡状态时,造成了TNF-α分泌的差异。但也有报道,无论HLA-DR3(+)组还是HLA-DR3(-)组,-308G/A杂合子个体TNF-α的分泌都是升高的,提示HLA-DR3本身不可能引起-308G/A杂合子TNF-α的高表达,而与HLA-DR3有关的TNF-α高表达,可能是由于和-308A纯合子连锁。

本研究将扁平苔藓患者根据其临床表现分为糜烂型组和非糜烂型组,代表了OLP局部炎症反应的不同严重程度。发现糜烂型组无论在基因型频率还是在等位基因频率分布上与对照组相比均有显著性差异($P<0.05$),GG纯合子基因型频率显著低于对照组,而GA杂合子基因型显著高于对照组,且仅有的2例AA纯合子基因型均为糜烂型扁平苔藓患者;从基因型频率的相对风险分析发现,TNF-α-308 TNF2基因型患eOLP的风险是TNF1的2.268倍,携带A等位基因的人群患糜烂型OLP的相对风险为正常人的2.377倍,但在非糜烂型OLP中,基因型频率和等位基因频率与对照组比较均无明显差异($P>0.05$)。提示TNF-α-308 *A等位基因可能是扁平苔藓局部炎症反应加重的危险因子之一。

然而,综合口腔扁平苔藓糜烂型组和非糜烂型组的实验数据,实验组TNF-α-308位点的基因型和等位基因频率分布与对照组相比均无明显差异($P>0.05$),提示TNF-α基因启动子区-308位点的多态性可能不是影响OLP的一个独立因素,分析可能的原因包括:①人群中TNF1常见,TNF2罕见。本实验测得-308位点G等位基因占90.7%,TNF1等位基因频率0.828;A等位基因占9.3%,TNF2等位基因频率0.172。在TNF1/1纯合子个体占人群大多数的情况下,检验OLP患者TNF-α-308位点SNP与正常人群分布的差异要有极大的样本量。②TNF-α基因启动子区SNP还包括-1031(T→G)、-863(C→A)、-851(C→T)、-419(G→C)、-376(G→A)、-238(G→A)、-162(G→A)及-49(G→A)等。这些位点SNP也有可能影响TNF-α的产量和功能。③在极其复杂的生物体内,一个基因多态性对细胞因子的影响很可能被其他的因素所掩盖。许多国家的研究者对此做了大量的工作,但结果不尽一致,有的甚至截然相反,这可能是与人种、病例数等有关。另外,由于TNF基因位于第6对染色体,具有高度多态性的主要组织相容性复合体基因族(MHC)区域(6p21.3),与HLA的某些单倍体有连锁不平衡,HLA的基因多态性可影响TNF的活性,因此TNF基因多态性在OLP的发生、发

展中是起主要作用,还是辅助作用,或者是与其他因素协同作用,或者只是其他主要因素的标志,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Bombeccari G P, Guzzi G, Tettamanti M, *et al*. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011, 112(3): 328-334.

[2] Cortes-Ramirez D A, Gainza-Cirauqui M L, Echebarria-Goikouria M A, *et al*. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: the controversies and the unknown[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2009, 14(3): E118-E122.

[3] Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part Ⅰ: facts and controversies[J]. Clin Dermatol, 2010, 28(1): 100-108.

[4] 雷蕾, 詹丽华, 谭为霞, 等. 口腔扁平苔藓局部浸润淋巴细胞颗粒酶B和穿孔素蛋白表达与上皮细胞凋亡的关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(18): 1943-1946.

[5] Asarch A, Gottlieb A B, Lee J, *et al*. Lichen planus-like eruptions: an emerging side effect of tumor necrosis factor-alpha antagonists[J]. J Am Acad Dermatol, 2009, 61(1): 104-111.

[6] Zhou G, Xia K, Du G F, *et al*. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with tumor necrosis factor-alpha in oral lichen planus: a clinicopathologic study in atrophic-erosive and reticular form[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(7): 559-564.

[7] Zhang Y, Lin M, Zhang S, *et al*. NF-kappaB-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population[J]. Cytokine, 2008, 41(2): 144-149.

[8] Sun A, Chia J S, Wang J T, *et al*. Levamisole can reduce the high serum tumour necrosis factor-alpha level to a normal level in patients with erosive oral lichen planus[J]. Clin Exp Dermatol, 2007, 32(3): 308-310.

[9] Lv N, Dang A, Zhu X, *et al*. The role of tumor necrosis factor-α promoter genetic variation in Takayasu arteritis susceptibility and medical treatment[J]. J Rheumatol, 2011, 38(12): 2602-2607.

[10] Ding B, Fu S, Wang M, *et al*. Tumor necrosis factor α -308 G>A polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis[J]. Int J Gynecol Cancer, 2012, 22(2): 213-219.

[11] Talaat R M, Esmail A A, Elwakil R, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected patients[J]. Chin J Cancer, 2012, 31(1): 29-35.

[12] Ardebili S M, Yeghaneh T, Gharesouran J, *et al*. Genetic association of TNF-α-308 G/A and -863 C/A polymorphisms with late onset Alzheimer's disease in Azeri Turk population of Iran[J]. J Res Med Sci, 2011, 16(8): 1006-1013.

[13] Sobti R C, Kler R, Sharma Y P, *et al*. Risk of obesity and type 2 diabetes with tumor necrosis factor-α 308G/A gene polymorphism in metabolic syndrome and coronary artery disease subjects[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 360(1/2): 1-7.

[14] Kroeger K M, Carcille K S, Abraham L J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription[J]. Mol Immunol, 1997, 34(5): 391-399.

[15] Louis E, Franchimont D, Piron A, *et al*. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 113(3): 401-406.

[16] Wilson A G, Symons J A, McDowell T L, *et al*. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(7): 3195-3199.

(**收稿**:2012-03-30;**修回**:2012-05-20)

(编辑 张 维)

(上接1732页)

2 讨论

国外文献报道,联体双胎畸形的患病率为1/50 000~1/200 000,多为死胎,男女比例为1∶3,联体多为单卵双生,受精卵分裂不完全形成的[1-2]。正常婴儿3月大EEG表现为3~4 Hz,50~100 μV的欠稳定的慢活动背景,婴儿期大半在睡眠中度过,3个月大时睡眠中应出现睡眠纺锤节律,频率12~15 Hz,多为13~14 Hz,波幅多为30~50 μV[3-4]。本例双头联体儿,左头脑电活动基本与月龄吻合,清醒及睡眠同正常儿脑电图,右头表现为低波幅懒波,呈现早产儿特征或发育延迟现象。懒波出现常提示脑功能低下,脑发育不成熟[5],或者脑干功能抑制、临近脑死亡者,若局灶性改变常与囊肿、脑软化灶及脑萎缩有关[6],此双头儿右头电活动微弱,可能与1套心、肺及复杂的先心病供血供氧不完全,畸形非优势脑发育延迟、功能低下等有关。临床亦提示右头面部表情呆滞,精神萎靡,反应迟钝。而左头面部表情活跃,反射正常。睡眠中刺激证实左头控制左侧肢体,而右头与右侧肢体有对应关系,但右侧刺激不及左侧灵敏。脑干及体感诱发电位也支持这一结果[7]。

参考文献:

[1] Kingston C A, McHugh K, Kumaradevan J, *et al*. Imaging in the preoperative assessment of conjoined twins[J]. Radiographics, 2001, 21(5): 1187-1208.

[2] 陈东, 方微. 3臂4腿双头胸腹联体双胎畸形的尸检研究[J]. 心肺血管病杂志, 2010, 29(5): 423-424.

[3] 刘晓燕. 小儿脑电图图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136-144.

[4] 刘晓燕. 临床脑电图学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 98-122.

[5] Ebersole J S, Pedley T A. 现代临床脑电图学[M]. 中国抗癫痫协会专家组, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 546-567.

[6] 杨梅华, 安宁, 何家全, 等. 86例癫痫痫灶定位与脑电图懒波[J]. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11(8): 459-462.

[7] 石先俊, 朱敏, 刘立红, 等. 双头连体婴儿四肢SLSEP、BAEP1例报告[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2012, 21(2): 122-124.

(**收稿**:2012-07-08;**修回**:2012-07-10)

(编辑 王 红)