口腔研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000115

对氧磷酶 1 Leu55Met 基因多态性与牙周炎伴糖尿病的相关性研究

李永凯，李丛华，杨　霞，叶　国，侯海娟
（重庆医科大学附属口腔医院牙周科　口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室，重庆　401147）

【摘　要】**目的**：研究对氧磷酶（paraoxonase，PON）1 Leu55Met 的基因多态性与单纯牙周炎及牙周炎伴糖尿病（diabetes mellitus，DM）（本文特指 2 型糖尿病）的易感性是否相关。**方法**：收集慢性牙周炎（chronic periodontitis，CP）伴 DM 患者、单纯 CP 患者、单纯 DM 患者及正常人各 50 例口腔颊黏膜拭子，采用口腔/咽拭子基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA，然后应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性检测 PON1 Leu55Met 的基因型分布。**结果**：DM 伴 CP 组（CP+DM）、单纯 CP 组（CP）、单纯 DM 患组（DM）、正常组（H）在 PON1 Leu55Met 基因型分布有统计学差异（χ^2=12.444，P=0.006）。**结论**：CP 与 DM 的易感性可能与 PON1 Leu55Met 基因多态性有关。

【关键词】慢性牙周炎；糖尿病；基因多态性；对氧磷酶 1
【中图分类号】Q786　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2013-12-09

Correlation between paraoxonase1 Leu55Met gene polymorphism and chronic periodontitis with diabetes mellitus

Li Yongkai, Li Conghua, Yang Xia, Ye Guo, Hou Haijuan
(*Department of Periodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University; Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences*)

【Abstract】***Objective***: To study the relationship between paraoxonase 1(PON1) Leu55Met gene polymorphisms and the risk of chronic periodontitis(CP) with diabetes. ***Methods***: Buccal swab of 50 patients with CP and diabetes, 50 patients with CP, 50 patients with diabetes and 50 healthy controls were collected. DNA was isolated from buccal swabs of patients with CP and diabetes, CP, diabetes and health controls and were extracted by Chelex-100. PON1 Leu55Met gene polymorphisms were assessed by PCR amplification and digestion with restriction enzyme respectively. ***Results***: There were statistically significant differences in the distribution of PON1 Leu55Met genotype among CP with diabetes group, CP group, diabetes group and health control group(χ^2=12.444, P=0.006). ***Conclusion***: Susceptibility of CP and diabetes may associate with PON1 Leu55Met polymorphisms.

【Key words】chronic periodontitis; diabetes mellitus; gene polymorphism; paraoxonase 1

牙周炎和糖尿病（diabetes mellitus，DM）都是多基因疾病，存在双向联系：一方面 DM 是牙周炎的危险因素，牙周炎受其影响机体可表现出相应的免疫应答反应[1]；另一方面牙周炎作为慢性炎症对于 DM 的代谢控制具有负面影响，内分泌学者提出将牙周炎列为 DM 的第六大并发症[2]。

对氧磷酶（paraoxonase，PON）为来源于肝脏的一类能与高密度脂蛋白相结合的芳香醇[3]，它在血清中紧密结合高密度脂蛋白，复合物可保护低密度脂蛋白过氧化，免受氧化修饰，在脂质代谢过程中有重要生理作用[4]。PON 家族中至少有 3 个成员：PON1，PON2，PON3。PON1 是 PON 多基因家族中发现最早，研究最多的成员，PON1 的基因产物在循环中是高密度脂蛋白的组成部分，可阻止低密度脂蛋白氧化，在氧化应激中起重要作用[5]。PON1 有 2 个位点具有多态性，即 192 位谷氨酸（Glu，Q）/精氨酸（Arg，R），55 位亮氨酸（Leu，L）/蛋氨酸（Met，M）颠换，PON1 活性主要与 PON1 55 有关[6]，PON1 Leu55Met 基因多态性与 DM、帕金森病、动脉粥样硬化等疾病的发生发展密切相关[5]。

作者介绍：李永凯，Email：yongkai_li@163.com，
研究方向：牙周病学。
通信作者：侯海娟，Email：13883263974@163.com。
基金项目：重庆市卫生局中医药科研计划资助项目（编号：2010-2-67）；
渝中区科学技术委员会资助项目（编号：20110312）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxb.000115.html

研究发现，牙周炎的炎症程度与 PON1 有关，PON1 具有 PON、酯酶和内酯酶活性，它同时可催化分解过氧化物，产生氧化自由基，进而降低单核细胞对内皮细胞的黏附力和趋化性，使细胞因子产生减少，这就可能对牙周组织起到了保护作用。Ozer 等[7]的研究证实 PON1 具有内酯酶活性，而高丝氨酸内酯是革兰阴性细菌群体密度感应的主要信号分子，通过作用于密度感应系统，PON1 可影响到牙周菌斑生物膜的形成，进而可能对牙周炎的发生发展产生影响。

现阶段对于 PON 与口腔疾病的研究甚少，PON1 Leu55Met 基因多态性与慢性牙周炎伴(chronic periodontitis，CP)DM 关系的研究国内外鲜有报道。本文旨在研究 PON1 Leu55Met 的基因多态性与 CP 伴DM 的易感性是否相关，为进一步探讨 PON1在牙周炎和 DM 及牙周炎与其它全身系统性疾病中的相关作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

200 例汉族病人来源于重庆医科大学附属口腔医院和重庆医科大学附属第一医院：包括 CP 组即 CP 组男25 人；女 25 人，年龄 30~60 岁、CP 伴 DM 组男 28 人；女 22 人，年龄 31~64 岁、DM 组男 28 人；女 22 人，年龄 31~64 岁及牙周健康组即 H 组男 24 人，女 26 人，年龄 30~63 岁。(1)CP 患者的接纳标准：①年龄 30~65 岁，大致按性别、年龄配对，且全身健康；②全口至少有 10 颗可进行牙周评价的牙齿，至少有 4 颗磨牙(不包括第三磨牙)；③至少有 3 个象限内有 1 个或多个位点探诊深度(probing depth，PD)≥6 mm、附着丧失(attachment loss，AL)≥5 mm；④X 线显示牙槽骨吸收≥1/3[6]。(2)DM 诊断标准：空腹血糖浓度≥7.0 mmol/L，餐后 2 h 血糖浓度≥11.1 mmol/L，存在明显的胰岛素抵抗为主并且伴有胰岛素分泌相对不足，或者胰岛素单纯分泌不足为主所致的 DM；无其他系统性疾病。(3)既符合 CP 诊断标准又符合 DM 诊断标准汉族病人纳入 CP+DM 组。(4)H 组参照 Armitage 等[8]标准，牙周健康定义：口腔卫生情况良好，平均临床附着丧失≤0.5 mm，无邻面临床附着丧失≥3 mm 的位点，失牙数≤2 颗(先天性缺牙、第三磨牙、正畸拔牙、外伤、重度龋失牙等除外)，X 线片显示未见牙槽骨的水平性或垂直性吸收吸收，并且全身健康。以上各组要求：①大致按年龄、性别配对，年龄限制在 30~65 岁；②实验前 1 月内未服用抗生素；③实验前 6 月内未行牙周治疗；④无妊娠妇女；⑤无吸烟和饮酒等不良嗜好。所有研究对象均知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取程序 取一根医用消毒棉签(手勿碰触脱脂棉部位)，伸进口腔，靠近颊黏膜内侧来回刮拭 20 次(不是旋转棉签)以涂取颊黏膜拭子，室温下放置干燥过夜，放置于无菌封闭容器进行保存。剥取拭子表层加入 1 000 μl 无菌水试管内，旋转拧干，12 000 r/min 离心 5 min，弃上清液。加入 5% Chelex-100 液 200 μl 浸没标本，再加入蛋白酶 K(20 mg/ml) 10 μl 漩涡震荡混匀，55 ℃水浴 3 h，煮沸 8 min，-20 ℃保存。

1.2.2 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP 法)检测 PON1 Leu55Met 的基因多态性 引物设计如下(大连宝生物工程有限公司提供)：上游 5'-GAAGAGTGATGT-ATAGCCCCAG-3'，下游 5'-TTTAATCCAGAGCTAATCGAA-AGCC-3'，PCR 反应体系(25 μl)：DNA 模板 6 μl；2×Taq PCR MasterMix 12.5 μl；上下游引物各 1.25 μl；dd H_2O 4 μl，吹打后轻弹管壁混匀，1 000 r/min 瞬时离心。

PCR 循环参数：变性 94 ℃ 5 min；循环 94 ℃ 30 s，60 ℃ 1 min，72 ℃ 30 s，共包括 35 个循环；延伸为 72 ℃ 10 min。1%。PCR 扩增经过琼脂糖凝胶电泳证实成功后，应用限制性内切酶 *Nia*Ⅲ酶切纯化扩增产物，37 ℃恒温水浴箱水浴过夜，酶切片段经 2.5 %琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色后通过 UV 凝胶成像系统判定结果[9]。

1.3 PCR 质量控制方法

单盲情况下随机抽取 10%位点重复测定基因型，以确保各位点基因型的重复性和可靠性[9]。

1.4 统计分析

应用 SAS 9.2 统计软件进行统计学分析，计数资料以率表示，根据 Hardy-Weinberg 平衡估计等位基因频率，4 组间基因型分布采用行×列表 χ^2 检验，相关疾病危险因素分析采用二分类 logistic 回归分析，计算其比值比(odds ratio，*OR*)及 95%可信区间(confidence interval，*CI*)，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 PON1 Leu55Met 多态性目的基因扩增和酶切分析

目的基因扩增片段长度为 170 bp，根据限制性内切酶 *Nia*Ⅲ酶切结果，LL 型(170、126、44 bp)为 3 条电泳带；MM 型(126、44 bp)者为 2 条电泳带；LM 型(170 bp)者占 1 条电泳带，见图 1、图 2。



图 1 PON1 Leu55Met 扩增电泳图

Fig.1 Amplication of PON1 Leu55Met using agarose gel electrophoresis

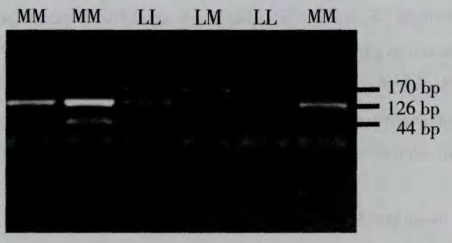


图 2 PON1 Leu55Met 产物经限制性内切酶 *Nia*Ⅲ酶切后的电泳图

Fig.2 Product of PON1 Leu55Met digested with *Nia*Ⅲ using agarose gel electrophoresis

本实验中共有 LL 型 180 例，其中 CP 组 47 例，DM 组 49 例，CP+DM 组 39 例，H 组 45 例；LM 型 11 例，CP 组 0 例，DM 组 0 例，CP+DM 组 11 例，H 组 0 例；MM 型 9 例，CP 组 3 例，DM 组 1 例，CP+DM 组 0 例，H 组 5 例。因 LM 型在各组中例数极少，统计分析时时把 LM 型和 MM 型进行合并，称为非 LL 型。统计分析显示 4 组间在 PON1 Leu55Met 基因型 LL、非 LL 分布有统计学差异（χ^2=12.444，P=0.006），具体见表 1。

表 1 PON1 Leu55Met 基因多态性的基因型和等位基因分布

Tab.1 Distribution of genotypes and alleles of PON1 Leu55Met gene polymorphisms

分组	例数	基因型（*n*/%）			等位基因频率	
		LL	LM	MM	L	M
CP	50	47/94	0/0	3/6	94	6
DM	50	49/98	0/0	1/2	98	2
CP+DM	50	39/78	11/22	0/0	89	11
H	50	45/90	0/0	5/10	90	10

2.2 危险因素评估

2.2.1 CP 伴 DM 组与 H 组 CP 伴 DM 组与 H 组相比，χ^2=0.053，P=0.818，差异无统计学意义，表明等位基因型不是 CP 伴 DM 的影响因素，具体见表 2。

2.2.2 DM 组与 H 组 由表 3 可知，χ^2=4.622，P=0.032，表明等位基因型是 DM 组的影响因素。当 L 基因型作为暴露因素时，*OR* 为 2.333，95%*CI* 为 1.078~5.052，表示 L 基因型的暴露危险度是 M 型的 2.333 倍；当 M 基因型作为暴露因素时，*OR* 为 0.429，95%*CI* 为 0.198~0.928，表示 M 等位基因的暴露危险度是 L 型的 0.429 倍。

2.2.3 CP 组与 H 组 CP 与 H 组相比，χ^2=1.065，P=0.302，差异无统计学意义，表明等位基因型不是 CP 的影响因素，具体见表 4。

3 讨 论

DM 临床实践中 2 型 DM 最为常见，DM 与牙周炎同为多基因疾病，都有一定程度的免疫异常，互相影响，互为因果[10]。临床对照研究结果表明，在局部刺激因素相似的情况下，有 DM 的牙周病发生率及严重程度均大于无 DM 者；牙周炎患者中 DM 的患病率为无牙周炎者的 2 倍，对牙周炎的彻底有效治疗可显著降低 DM 患者的糖化血红蛋白，进而改善对 DM 治疗的效果[11]。DM 与牙周炎作为与遗传因素密切相关的疾病，其基因多态性的研究为当今研究的热点问题。

PON1 作为 PON 多基因家族中研究最多的成

表 2 CP 伴 DM 组与 H 组等位基因频率的比较

Tab.2 Comparison on allele frequencies between chronic periodontitis with diabetic group and healthy control group

分组	等位基因型		χ^2 值	P 值	L		M	
	L	M			*OR*	95%*CI*	*OR*	95%*CI*
CP+DM	89	11	0.053	0.818	0.965	0.714~1.305	1.036	0.766~1.401
H	90	10						

表 3 DM 组与 H 组等位基因频率的比较

Tab.3 Comparison on allele frequencies between diabetic group and healthy control group

分组	等位基因型		χ^2 值	P 值	L		M	
	L	M			*OR*	95%*CI*	*OR*	95%*CI*
CP+DM	98	2	4.622	0.032	2.333	1.078~5.052	0.429	0.198~0.928
H	90	10						

表 4 CP 组与 H 组等位基因频率的比较

Tab.4 Comparison on allele frequencies between chronic periodontitis group and healthy control group

分组	等位基因型		χ^2 值	P 值	L		M	
	L	M			*OR*	95%*CI*	*OR*	95%*CI*
CP	94	6	1.065	0.302	1.741	0.608~4.987	0.574	0.201~1.646
H	90	10						

员，与牙周炎症程度及 DM 发病密切相关[12-13]，其活性与多种因素有关，基因多态性是其活性的决定因素，PON1 Leu55Met 基因多态性可调节其活性[14-15]。

大量临床研究证实与正常人相比，DM 患者 PON1 活性降低 40%以上，而且机体的抗氧化能力明显减弱。Sözmen 等[16]对 DM 患者中 PON1 与血糖控制研究发现，过氧化氢酶中 PON1 与糖化血红蛋白呈正相关，其比率升高提示血糖控制不佳，血清 PON1 活性与高密度脂蛋白的氧化程度呈负相关，PON1 可逆转氧化的低密度脂蛋白，进而保护高密度脂蛋白不被氧化。

本实验总体结果显示 PON1 Leu55Met 基因型 LL>非 LL(LM+MM)，基因型 LL、非 LL 分布有显著性差异，初步显示其与牙周炎及 DM 相关，这与国外一些学者的研究结果相似。Flekac 等[17]对 246 例 DM 患者、110 例正常人研究发现，PON1 Leu55Met 基因多态性在 DM 患者中差异有统计学意义，DM 患者血清 PON1 活性明显降低，同时 55MM 基因型明显增多，血糖控制良好的 DM 患者，55LL 基因型明显增多，基因型 LL 与 MM 分布有统计学差异。Unür 等[12]学者对土耳其国 51 例 DM 患者口腔状况研究发现：牙周炎症程度受 PON1 活性影响，PON155 M 等位基因型携带者牙周炎发病率是正常 3.6 倍；DM 组 PON1 活性明显降低；PON1 活性主要与 PON1 55 有关，PON1 55 LL 基因型在实验组更常见，LL 基因携带者增加 DM 易感性。Noack 等[13]的研究发现，DM 患者 PON1 活性减低，牙周炎的患病易感性也可能升高。

本实验初步研究发现 PON1 Leu55Met 基因多态性与牙周炎、DM 相关，然而研究结果有待加大样本量进一步证实。由于 PON1 Leu55Met 与机体炎症过程存在互动，并且与 DM、心脑血管等多种疾病的发生、发展有关，深入探讨其内在关系有重大意义。

参 考 文 献

[1] Chee B, Park B, Bartold PM. Periodontitis and type Ⅱ diabetes: a two-way relationship[J]. Int J Evid Based Healthc, 2013, 11(4): 317-329.

[2] Meenawat A, Punn K, Srivastava V, et al. Periodontal disease and type I diabetes mellitus: associations with glycemic control and complications[J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17(5): 597-600.

[3] Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, et al. Purification of rabbit and human serum paraoxonase[J]. Biochemistry, 1991, 30(42): 10133-10140.

[4] Sapian-Raczkowska B, Rabczyński M, Adamiec R. Paraoxonase-important enzyme of the lipid metabolism and potential ally in the antiatherosclerotic treatment[J]. Pol Merkur Lekarski, 2010, 29(173): 325-327.

[5] Rosenblat M, Ward S, Volkova N, et al. VLDL triglycerides inhibit HDL-associated paraoxonase 1 (PON1) activity: in vitro and in vivo studies[J]. Biofactors, 2012, 38(4): 292-299.

[6] Bhaskar S, Ganesan M, Chandak GR, et al. Association of PON1 and APOA5 gene polymorphisms in a cohort of Indian patients having coronary artery disease with and without type 2 diabetes[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15(7-8): 507-512.

[7] Ozer EA, Pezzulo A, Shih DM, et al. Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 253(1): 29-37.

[8] 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.

[9] Fakruddin M, Mannan KS, Chowdhury A, et al. Nucleic acid amplification: alternative methods of polymerase chain reaction[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2013, 5(4): 245-252.

[10] Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis: oral complication of diabetes[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2013, 42(4): 849-867.

[11] Botero JE, Yepes FL, Ochoa SP, et al. Effects of periodontal nonsurgical therapy plus azithromycin on glycemic control in patients with diabetes: a randomized clinical trial[J]. J Periodontal Res, 2013, 48(6): 706-712.

[12] Unür M, Demirez E, Ağachan B, et al. The relationship of oral disturbances of diabetes mellitus patients with paraoxonase gene polymorphisms[J]. Cell Biochem Funct, 2008, 26(8): 870-873.

[13] Noack B, Aslanhan Z, Boué J, et al. Potential Association of Paraoxonase-1, type 2 diabetes mellitus, and periodontitis[J]. J Periodontol, 2013, 84(5): 614-623.

[14] Amine K, Atouk A, Moussamih S, et al. Paraoxonase-1 (PON1) activity in patients with coronary artery diseases and in diabetic patients [J]. Ann Biol Clin (Paris), 2011, 69(6): 671-677.

[15] Maekness B, Maekness ML, Arro LS, et al. Serum paraoxonase (PONI) 55 and 192 polymor Phismand paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus[J]. Atherosclerosis, 1998, 139(2): 341-349.

[16] Sözmen EY, Sözmen B, Delen Y, et al. Catalase/Superoxi dedismutase (SOD) and Catalasse/paraoxonase (PON) ratios may implicate poor Glycemi control[J]. Arch Med Res, 2001, 32(4): 283-287.

[17] Flekac M, Skrha J, Zídková K, et al. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in diabetes mellitus[J]. Physiol Res, 2008, 57(5): 717-726.

（责任编辑：关蕴良）