

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.05.019

基质金属蛋白酶-1 基因多态性对汉族人群牙种植早期失败的影响

何世林¹,徐鹏^{2△},白石²

(1.重庆市永川区妇幼保健院口腔科 402160;2.重庆医科大学附属口腔医院种植科 400015)

[摘要] **目的** 从遗传学的角度探讨基质金属蛋白酶-1(MMP-1)的基因多态性是否与种植体早期失败有关。**方法** 采用病例对照的临床试验设计方法,将选取的 53 例不吸烟、无牙周炎的汉族种植患者根据有无种植体早期失败(1 个月内)分为失败种植体组和成功种植体组;同时收集所有患者的静脉血提取 DNA;采用聚合酶链式反应和限制性片段长度多态性方法对 MMP-1-1607 位点进行基因型的测定。**结果** 携带 MMP-1-1607 基因型 1G/2G 杂合子的患者其种植体早期失败的发生率明显高于携带 MMP-1-1607 基因型 1G/1G 纯合子患者。多元 Logistic 回归分析结果显示:MMP-1-1607 1G/2G 基因型相对于 MMP-1-1607 1G/1G 基因型的比值比是 13.894($P<0.05$)。**结论** MMP-1-1607 1G/2G 基因型和种植体早期失败有相关性。

[关键词] 牙种植体;基质金属蛋白酶 1;遗传学研究;基因多态性**[中图分类号]** R782.12**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)05-0635-03

The relationship between MMP-1 genetic polymorphisms and dental implant early failure in Chinese Han nationality

He Shilin¹, Xu Peng^{2△}, Bai Shi²

(1. Department of Stomatology, Maternal and Child Health Hospital of Yongchuan District, Chongqing 402160, China; 2. Department of Implantology, the Affiliated Stomatology Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

[Abstract] **Objective** To make clear the relationship between the genetic polymorphism of MMP-1 and implant early failure. **Methods** We conducted a case control study, 53 cases patients (no smoking history and without periodontitis) who have underwent dental implant were divided into experimental group (with dental implant failure) and control group (with dental implant success) according to early failure of dental implant (within one month). DNA of 53 patients in Han nationality were extracted by using Chelex-100 method and polymorphisms of the mmp-1-1607 gene were detected by restriction fragment length polymorphism after polymerase chain reactions. **Results** Patients with MMP-1-1607 (1G/2G) genotype exhibited a significantly higher occurrence of implant early failure than those with MMP-1-1607 (1G/1G) gene type ($P<0.05$). The OR of the 1G/2G versus the 1G/1G of the MMP-1-1607 genotype was 13.894 ($P<0.05$). **Conclusion** MMP-1-1607 (1G/2G) genotype is associated with implant early failure.

[Key words] dental implants; matrix metalloproteinase 1; genetic research; polymorphism

口腔种植失败主要分为早期和晚期(指承担咬合力以后)两类^[1-2]。早期失败的主要原因一般是吸烟、年龄、系统疾病、骨的质量和数量、外科损伤和手术中感染^[3-4]。而晚期失败主要原因是种植体周围炎和咬合力量过大^[5]。种植失败的发生并不是平均分布的,主要发生在高危的人群,基因的表现型会影响骨结合,因此种植的失败和基因的表现相关^[6]。

基因多态性是指在生物种群中,同时和经常出现两种或多种等位基因。一般基因多态性分 3 大类:DNA 片段长度多态性, DNA 重复序列多态性,单核苷酸多态性(SNP)。而单核苷酸多态性是最常见的一种,占多态性的 90%。基质金属蛋白酶类(MMPs)有多种生理作用,能调节各种细胞的行为,如血管生成、细胞增殖、凋亡等。MMP-1 是间质胶原酶中表达最为普遍的一种内源性肽酶,主要作用是降解坏死组织的胶原纤维^[7]。正常情况下在组织中表达比较低,但在生长因子和炎症因子的刺激下,其表达会上调。有大量文献证明, MMPs 参与了许多基质炎症的疾病。MMP-1 基因启动子-1607 位点插入一个鸟嘌呤 G 使序列由 5-CGAT-3 变为 5-CGGAT-3, 导致 1G/2G 单核苷酸多态性。

某些遗传因素的存在能影响宿主对微生物的反应,自身的

免疫应答反应能决定疾病的严重程度,因此宿主的易感性也是重要因素。有研究表明,在汉族人群中 MMP-1 基因启动子区-1607 1G/2G 的基因多态性与牙周炎发生发展存在着相关性^[8-9]。种植体周围炎和牙周炎有相似性,但在炎症进展速度和细胞组成方面仍有差别^[10]。研究表明 MMP-1 基因多态性对种植早期失败有影响。Santos 等^[7]在种植体失败的病例中发现, MMP-1-1607 2G 等位基因可能与种植体失败有关。目前有关 MMP-1 基因多态性在汉族人群中对成功种植早期失败的影响,还少见相关报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 3 月至 2013 年 3 月在重庆医科大学附属口腔医院种植科接受种植义齿修复的患者,共 53 例。其中,男 31 例,女 22 例,均为汉族。年龄 21~62 岁。患者的病史和临床检查包括:年龄、性别、民族、植入部位、骨质量、种植体类型(奥齿泰 osstem 和赛弗 xive)、术中是否有穿孔、术后有无感染、邻牙周状况。系统病史:血液病史、牙周病家族史、高血压、心脏病、糖尿病、甲状腺病、消化道疾病、女性患者的月经状况。其中所有纳入患者均没有吸烟史和牙周炎。种植成功标准:排除患者初期种植体稳定性不足 35N.cm 的;口腔内植

表 1 不同基因型在两组中的分布[n(%)]

基因型	1G	2G	1G/1G	2G/2G	1G/1G	1G/2G	1G/2G	2G/2G
成功种植体组	35(65)	19(35)	17(63)	9(33)	17(63)	1(4)	1(4)	9(33)
种植失败组	21(40)	31(60)	0(0)	5(14)	0(0)	21(86)	21(86)	5(14)
P	0.012		0.012		<0.010		<0.010	

入奥齿泰 osstem 或赛弗 xive,按 1 个月内未出现种植体松动、脱落(没有负载);同时种植修复后一年正常行使功能。种植失败组 26 例,男 18 例,女 8 例。成功种植体组 27 例,男 13 例,女 14 例。

1.2 样本采集和 DNA 提取 种植手术前,抽取患者的静脉血,采用 TIANamp Blood DNA Kit(中国 Tiangen 公司)提取基因组 DNA。

1.3 基因多态性分析

1.3.1 PCR 扩增 MMP-1 基因启动子区域 使用两对引物分别扩增 MMP-1 基因启动子区域,引物序列如下:引物 MMP-1F,5'-GTT ATG CCA CTT AGA TGA GG-3'和引物 MMP-1R,5'-TTC CTC CCC TTA TGG ATT CC-3'。上述引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。PCR 反应体系终体积 25 μ L,其中含 10 \times PCR buffer 2.5 μ L,样本 DNA 2 μ L(约 50~100 ng),LATAq DNA 聚合酶(大连 TaKaRa 公司)1 U;dNTP、MgCl₂ 终浓度分别为 0.2、1.5 mmol/L,引物终浓度为 0.24 μ mol/L。PCR 反应循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,循环 32 次;最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 2.0%琼脂糖凝胶 10 V/cm 电泳 10 min,确定扩增片段的特异性。

1.3.2 PCR 扩增产物的纯化 利用虾碱性磷酸酶(SAP,1 U/ μ L,美国 Promega 公司)和核酸外切酶 I (Exo I,5 U/ μ L,大连 TaKaRa 公司)纯化 PCR 扩增产物。在每 5 微升的 PCR 产物中分别加入 SAP 和 Exo I 各 0.75 μ L,37 $^{\circ}$ C 30 min 酶切反应,80 $^{\circ}$ C 15 min 酶失活。

1.3.3 PCR 纯化产物的直接测序 使用 BigDye terminator v3.1 sequencing Kit(美国 ABI 公司)试剂进行双向测序反应,测序引物为上述的扩增引物 MMP-1F、MMP-1R。采用乙醇/醋酸钠法纯化测序反应的扩增产物,然后在 ABI 3130 基因测序仪上检测分析结果。根据测序结果,判定 MMP-1 基因的基因型。

1.4 统计学处理 所有的分析均用 SPSS11.5 统计软件处理。两组比较采用的 Fisher exact test;相关因素的相对危险度分析用 Logistic 回归分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 种植体周围炎组和成功种植体组基因型分布 种植体周围炎组中发现 2G 等位基因的比例明显高于成功种植体组。其中成功种植体组中 1G/1G 基因型为 17 位患者(占有所有患者的比例为 63%),2G/2G 基因型为 9 位患者(占比 33%)。种植体周围炎组中 1G/1G 基因型为 0 位患者(占比 0%),2G/2G 基因型为 5 位患者(占比 14%)。

2.2 不同基因型在对照组和试验组中的分布 在种植失败组中出现 1G/2G 或者 2G/2G 基因类型的概率是较高。见

表 1。

2.3 相关因素多元 Logistic 回归分析 年龄、绝经与否、骨质是否 4 类 3 个影响因素的比值比分别为 0.968、0.845、0.724,相应的 P 值为 0.720、0.521、0.652。

3 讨 论

种植植入前备洞是一种潜在的骨损伤,从而机体对损伤会有炎症反应。不同细胞(如中性粒细胞,巨噬细胞,T、B 淋巴细胞,角质形成细胞,内皮细胞,成纤维细胞,破骨细胞和成骨细胞等)的异常免疫应答,都可以破坏种植体周围骨组织。在炎症情况下,炎症细胞会释放出炎症信号因子。MMPs 是一组含 Zn⁺ 的能够降解细胞外间质的蛋白酶。MMP-1 是间质胶原酶中表达最为广泛的一种内源性肽酶,主要作用是降解坏死组织的胶原纤维(主要是 I 型胶原),并促进组织重建^[6]。正常情况下在组织中表达比较低,但在生长因子和炎症因子等内源性因素的刺激下,其表达会上调。因此,MMP-1 在炎症情况下会对种植体周围组织造成破坏。特别是早期,种植体在初期机械稳定性下降的情况下,而骨结合没有完全形成。此时如果患者的 MMP-1 表达过多,将对种植体周围组织产生过多的破坏,导致种植体早期失败。同时 MMP-1 表达过多的患者即使种植体形成骨结合,也更容易患种植体周围炎^[11]。

国内林映荷等^[12]对白细胞介素(IL)-1 的基因多态性和种植体周围炎的相关性进行了研究,发现 IL-1 β +3954 基因型 I/II 杂合子和种植体周围炎的发病相关。但是研究均纳入了吸烟患者,由于长期吸烟者影响牙周健康和种植体的长期效果,故对研究结果有一定的影响。本研究所有纳入患者均为不吸烟患者,保证了研究的准确性。

Santos 等^[7]在巴西拉丁裔患者中,种植体失败的病例中发现 2G 等位基因的比例(50%)明显高于对照组(25%)。同时,MMP-1-519 等位基因如果由 A 替换为 G,则 MMP-1 的表达会增加。但研究发现该等位基因的替换对种植早期失败没有影响^[10]。而本研究结果显示,在汉族人群中,失败种植体组中发现 2G 等位基因的比例(60%)也明显高于成功种植体组(35%),和 Santos 等^[7]的结果一致。

种植体失败的原因一般和牙周病息息相关。毕竟种植体周围炎和牙周炎有相似的病理过程,而且种植体周围炎是种植体失败的重要原因^[13]。通过基因多态性的筛查能确定种植可能失败的高风险人群,有助于适当的术前预防和方案选择,以此提高种植的成功率。但这种研究时间不长,国内外研究的病例数量都偏少。而且影响牙种植体的局部因素和全身因素较多,仍然缺乏更多的循证医学支持。因而还需要更多研究来证实 MMP-1 基因多态性在汉族人群中与种植体早期失败的相关性。

参考文献

[1] Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, et al. Differential diag-

- nosis and treatment strategies for biologic complications and failing oval implants: A review of the literature[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1999, 14(4): 473-490.
- [2] Ganeles J, Wismeijer D. Early and immediately restored and loaded dental implants for single-tooth and partial-arch applications [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2004, 19(suppl): 92-102.
- [3] Moy PK, Medina D, Shetty V, et al. Dental implant failure rates and associated risk factors[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2005, 20(4): 569-577.
- [4] Gruica B, Wang HY, Lang NP, et al. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2004, 15(4): 393-400.
- [5] Hutton JE, Heath MR, Chai JY, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multi-center study of overdentures supported by Brnemark implants[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1995, 10(1): 33-42.
- [6] Yamada Y, Ando F, Niino N, et al. Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density[J]. *Matrix Biology*, 2002, 21(5): 389-392.
- [7] Santos MC, Campos MI, Souza AP, et al. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2004, 19(1): 38-43.
- [8] Cao Z, Li C, Zhu G. MMP-1 promoter gene polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis in a Chinese population[J]. *Tissue Antigens*, 2006, 68(1): 38-43.
- [9] Lang NP, Berglundh T. Working Grp 4 Seventh European Wor. Periimplant diseases; where are we now? - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology [J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38(11): 178-181.
- [10] Yamada Y, Ando F, Niino N, et al. Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density[J]. *Matrix Biology*, 2002, 21(5): 389-392.
- [11] Irshad M, Scheres N. Cytokine and matrix metalloproteinase expression in fibroblasts from peri-implantitis lesions in response to viable *Porphyromonas gingivalis*[J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(5): 647-656.
- [12] 林映荷, 管东华, 陆轩, 等. 白细胞介素-1 基因多态性和种植体周围炎的相关研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2008, 24(4): 586-589.
- [13] Silveira VR, Pigossi SC, Scarel-Caminaga RM, et al. Analysis of polymorphisms in interleukin 10, NOS2A, and ESR2 genes in chronic and aggressive periodontitis[J]. *Braz Oral Res*, 2016, 30(1): e105.
- (收稿日期: 2016-06-21 修回日期: 2016-08-19)
-
- (上接第 634 页)
- 位并急性截瘫的诊治: 14 例报告[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2014, 13(6): 552-554.
- [7] 王忠诚. *神经外科学*[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 97-101.
- [8] 杨树源, 洪国良. 椎管内肿瘤 402 例报告[J]. *中华神经外科杂志*, 2000, 16(3): 162.
- [9] 杨期东. *神经病学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 114-117.
- [10] Srivastava T, Kochar DK. Asymptomatic spinal arachnoiditis in patients with tuberculous meningitis[J]. *Neuroradiology*, 2003, 45(10): 727-729.
- [11] Barrenechea IJ, Lesser JB, Gidekel AL, et al. Diagnosis and treatment of spinal cord herniation: a combined experience[J]. *J Neurosurg Spine*, 2006, 5(4): 294-302.
- [12] 高绪文, 郑明新. *临床脊髓病学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 121-130.
- [13] Smith PM, Jeffery ND. Spinal shock--comparative aspects and clinical relevance[J]. *J Vet Intern Med*, 2005, 19(6): 788-793.
- [14] 唐硕, 许扬滨. 脊髓损伤的治疗原则及进展[J]. *临床急诊杂志*, 2011, 12(5): 312-315.
- [15] Lawton MT, Porter RW, Heiserman JE, et al. Surgical management of spinal epidural hematoma: relationship between surgical timing and neurological outcome[J]. *J Neurosurg*, 1995, 83(1): 1-7.
- [16] Hakalo J, Wroński J. Importance of early operative decompression of spinal cord after cervical spine injuries [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2004, 38(3): 183-188.
- [17] Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, et al. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32037.
- [18] Fehlings MG, Rabin D, Sears W, et al. Current practice in the timing of surgical intervention in spinal cord injury [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35(21 Suppl): S166-173.
- (收稿日期: 2016-06-24 修回日期: 2016-08-22)