

[文章编号] 1000-1182 2006)06-0533-03

· 专栏论著 ·

转化生长因子- α 基因多态性与山东汉族人非综合征性唇腭裂的关系

袁奎封¹, 来庆国¹, 李德仁², 杨中军¹, 周晓红³

(1.山东大学第二医院 口腔颌面外科, 山东 济南 250033;

2.山东省安丘市人民医院 口腔科, 山东 安丘 262100; 3.山东省医学科学院 基础医学研究所, 山东 济南 250062)

[摘要] 目的 研究转化生长因子- α (TGF- α)基因多态性与山东汉族人非综合征性唇腭裂的关系。方法 应用多聚酶链反应 (PCR)结合限制性酶切方法,对98例非综合征性唇腭裂患者与101例正常人进行TGF- α 基因突变检测分析。结果 非综合征性唇腭裂患者的C2等位基因频率比正常对照组明显增高,有显著性差异 ($P < 0.05$);有家族史的患者,其TGF- α 基因型与无家族史患者比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 TGF- α 基因的突变与山东汉族人非综合征性唇腭裂的发生有相关性,对有家族史的影响可能更明显。

[关键词] 非综合征性唇腭裂; 转化生长因子- α ; 基因多态性

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

Relationship between Transforming Growth Factor- α Gene Polymorphism and Non-syndromic Cleft Lip

with Cleft Palate YUAN Kui-feng¹, LAI Qing-guo¹, LI De-ren², YANG Zhong-jun¹, ZHOU Xiao-hong³. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China; 2. Dept. of Stomatology, Anqiu People's Hospital, Anqiu 262100, China; 3. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

[Abstract] **Objective** To study the association of TGF- α gene polymorphism and non-syndromic cleft lip with cleft palate in Shandong province. **Methods** Polymerase chain reaction combined with restrict enzyme digestion was used to detect the target gene variation in 98 patients with non-syndromic cleft lip with cleft palate and 101 healthy controls. **Results** The C2 allele frequency in patients with non-syndromic cleft lip with cleft palate was significantly higher than that in healthy controls. The genotype frequency in patients with positive family history was significantly higher than that without positive family history. **Conclusion** TGF- α gene polymorphism is closely associated with non-syndromic cleft lip with cleft palate in Shandong, especially in patients with positive family history.

[Key words] non-syndromic cleft lip with cleft palate; transforming growth factor- α ; gene polymorphism

唇腭裂是口腔颌面部最常见的先天性畸形,全世界发病率约为1/700~1/500,其中主要为非综合征性唇腭裂。综合征性唇腭裂的病因目前较为明确,而非综合征性唇腭裂的病因十分复杂,大量研究表明,相关基因、环境以及它们之间的相互作用在唇腭裂发病中占很重要的地位。随着分子遗传学技术的发展,近年来的研究集中在寻找与唇腭裂有关的基因上,由于不同人种间存在基因多态性差异,而相同人种间不同地区其发病率也存在差异,因此,本研究对山东地区98例非综合征性唇腭裂汉族患儿进行转化生长因子- α (transforming growth factor- α ,

TGF- α)基因多态性研究,以便分析山东地区人群非综合征性唇腭裂与TGF- α 基因的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

PCR扩增仪 (MJ Research公司,美国); TGF- α 基因PCR扩增引物^[1],上游引物为5'-TCACTTCCCC-TTTTTCTGCAT-3',下游引物为5'-CGAGGAGGC-TCTGAGGTG-3',引物由上海生物工程公司合成。限制性内切酶、耐热DNA多聚酶、琼脂糖 (宁波科瑞生物工程公司),脱氧核糖核苷酸dNTP (大连宝生物公司)。

1.2 研究对象

选取山东大学第二医院口腔颌面外科“微笑列

[收稿日期] 2006-04-11; [修回日期] 2006-10-08

[作者简介] 袁奎封 (1963-),男,山东人,副教授,硕士

[通讯作者] 袁奎封, Tel: 13370518200

车”活动手术患者98例，均确诊为非综合征性唇腭裂，其中男67例，女31例，年龄为4个月~18岁，平均5岁，均为山东地区汉族人。其中双侧唇裂伴腭裂者为18例，占18%；左侧唇裂伴腭裂者为44例，占45%；右侧唇裂伴腭裂者为36例，占37%。对照组共101例，选自山东大学第二医院口腔颌面外科病房其他疾病的同年龄患儿，其中男78例，女23例，年龄为11个月~19岁，平均6岁。

1.3 方法

1.3.1 白细胞DNA的提取 取抗凝血，低渗溶血法裂解红细胞后，常规酚-氯仿提取DNA。

1.3.2 TGF- α 基因的PCR扩增 PCR扩增反应体系为30 μ L，含待测DNA模板100 μ g，dNTP 200 μ mol/L，TaqDNA聚合酶1 U及其相应的10 \times buffer 3 μ L。上下游引物各20 pmol，用去离子水补足为30 μ L。混匀后用液体石蜡覆盖，放入PCR扩增仪内，93 $^{\circ}$ C预变性3 min，然后93 $^{\circ}$ C变性30 s，55 $^{\circ}$ C退火30 s，72 $^{\circ}$ C延伸30 s，10个循环，然后90 $^{\circ}$ C变性30 s，55 $^{\circ}$ C退火30 s，72 $^{\circ}$ C延伸30 s，20个循环，最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

1.3.3 酶切 取PCR扩增产物10 μ L，加Taq I限制性内切酶10 U及相应的10 \times buffer 2.2 μ L，0.1%BSA 2 μ L，DDW补足20 μ L，65 $^{\circ}$ C水浴酶切1 h以上。

1.3.4 电泳 取20 μ L酶切产物上样，在3%琼脂糖凝胶上进行电泳，分析酶切产物，紫外灯下观察结果并照相。

1.3.5 测序 PCR产物经QIA quick试剂盒纯化后，用下游引物在ABI PRISM TM310 Genetic Analyzer上进行直接测序。

1.4 统计学分析

用SPSS统计软件处理数据，两组频数分布采用卡方检验，比较等位基因频率及基因型频率。

2 结果

2.1 TGF- α 基因的PCR扩增产物

TGF- α 基因的PCR扩增产物为1条178 bp (174 bp)的DNA片段，经Taq I酶切消化后，产生两条片段，分别为122 bp和52 bp，若2个等位基因均含有内切酶识别位点，在酶切后产生122 bp和52 bp两个片段的定为C2C2型，产生178 bp、122 bp和52 bp3个片段的定为C1C2型，178 bp片段不能被酶切的定为C1C1型。

2.2 测序

在TGF- α 基因第5内含子离第6外显子1 602 bp处有一4 bp的碱基缺失，产生了一个新的酶切位点，因而C2C2扩增产物能被Taq I内切酶切成122 bp及

52 bp两条片段，而C1C1无Taq I内切酶酶切位点，不能被Taq I内切酶切成两条片段，只有1条178 bp片段。测序结果与文献报道结果^[2]一致。

2.3 TGF- α 基因的多态性

根据电泳结果确定被检测人员的基因型，各组的TGF- α 等位基因频率及基因型频率见表1，非综合征性唇腭裂组与对照组等位基因C2的频率有统计学差异 ($P < 0.05$)。

表 1 非综合征性唇腭裂组与对照组的TGF- α 等位基因及基因型频率的比较 (n)

Tab 1 Comparison of allele and genotype frequencies in transforming growth factor- α among cases and controls (n)

组别	人数	等位基因频率		基因型频率		
		C1	C2	C1C1	C1C2	C2C2
唇腭裂组	98	162	33	70	26	2
对照组	101	183	17	87	14	0

2.4 唇腭裂家族史与TGF- α 基因多态性的关系

在调查的非综合征性唇腭裂组患者中，15例有家族史，患者父母至少有1人患有唇腭裂，83例无家族病史，有家族史的非综合征性唇腭裂组患者与无家族史的患者的TGF- α 基因型频率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。有家族史的患者与对照组比较，其TGF- α 基因型的频率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，而无家族史的非综合征性唇腭裂患者与对照组比较，TGF- α 基因型频率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 TGF- α 基因多态性与唇腭裂类型的关系

非综合征性左侧唇腭裂、右侧唇腭裂和双侧唇腭裂的TGF- α 基因型见表2。3组基因型频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 基因型与唇腭裂类型的关系 (n)

Tab 2 The relation between genotype and the type of nonsyndromic cleft lip with cleft palate (n)

基因型	唇腭裂类型			合计
	左侧唇腭裂	右侧唇腭裂	双侧唇腭裂	
C1C1	35	23	12	70
C1C2	8	13	5	26
C2C2	1	0	1	2
合计	44	36	18	98

3 讨论

唇腭裂是一种高发的先天性发育畸形。它不仅影响患儿的吸吮、发音、咀嚼，而且对患者的心理

健康也有很大影响。它的发生与环境、遗传及相互作用有关,具有多基因遗传的特点,20世纪90年代以来,国外一些学者开始从基因角度来研究唇腭裂的发病原因。Ardinger等^[1]以高加索人群为研究对象,首次发现TGF- β 基因多态性与非综合征性唇裂或唇裂伴腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P)有显著性关系。在其他地区的人群中也证实TGF- β 基因与NSCL/P相关联^[2]。本实验采用分子生物学方法发现TGF- β 基因与山东地区非综合征性唇腭裂密切相关,这与以上研究相一致。但是,Lidral等^[3]对高加索人群的研究中没有发现TGF- β 基因与非综合征性唇腭裂关联。Wyszynski等^[4]对美国的35个家系及墨西哥中部的22个家系进行研究,也没有发现TGF- β 基因与NSCL/P关联。Lidral等^[3]对菲律宾人群的研究也排除了TGF- β 基因与NSCL/P相关联。因此,TGF- β 基因在唇腭裂发生中的作用可能具有人群特异性。

TGF- β 在腭部正常发育过程中起重要作用,TGF- β 属表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)家族,它能激活受体上的酪氨酸激酶,激活MAPK信号系统(Raf-MEK-ERK),ERK通路激活后,信号传导因子细胞外调节蛋白激酶(ERK)进入细胞核,引起转录因子的磷酸化,导致细胞增殖。因此认为可能是TGF- β 基因多态性改变了TGF- β 的空间结构、组织表达及TGF- β 在腭突组织中正常的表达,从而影响唇腭的正常发育。Miettinen等^[5]通过对唇腭裂动物模型的研究,认为正常颌面发育与腭闭合必须有表皮生长因子受体的作用。通过小鼠的动物实验发现,在小鼠胚胎第2~13天时,正常腭突上皮及间充质均表达TGF- β ,而且它们之间没有明显量的差异。随着腭突的发育,TGF- β 分布发生变化。在小鼠胚胎发育过程中,TGF- β 表达水平呈现逐渐下降的趋势,同时表皮生长因子的表达水平逐渐升高。在小牛血清的培养基中,加入TGF- β 可抑制腭中嵴上皮细胞退化,使口腔上皮过度角化。TGF- β 及其结合产生生物学效应的受体(表皮生长因子受体)在发育的腭突中,特别是腭中嵴上皮细胞中广泛表达,它可刺激腭突细胞合成细胞外基质,对腭突的生长、上抬和融合都具有重要的作用。以上研究表明TGF- β 基因与人类唇腭裂的发生密切相关。

本研究发现山东地区非综合征性唇腭裂组患者的等位基因与非综合征性唇腭裂显著关联,表明转化生长因子- β 基因可能与山东人非综合征性唇腭裂的发生有关。其与非综合征性唇腭裂的关联强度弱于Ardinger等^[1]和Holder等^[4]的报道,而强于

Chenevix-Trench等^[3]的报道。研究发现TGF- β 基因酶切片段与非综合征性唇腭裂显著关联,TGF- β 的C2等位基因传递给有家族史的唇腭裂患者比传递给无家族史患者的频率高得多,有显著性差异。对非综合征性唇腭裂组中有无家族史与TGF- β 基因多态性进行研究发现,两组患者TGF- β 基因型频率差异有显著性,提示先天性唇腭裂家族史可能与TGF- β 少见变异相互关联。当然,由于本研究病例数较少,且有家族史病例数少,要进一步明确TGF- β 基因变异与家族史的关系,尚需增加病例数及家系研究。

此外,TGF- β 基因多态性与唇腭裂类型进行比较,差异无统计学意义。因此,非综合征性唇腭裂是一种多基因遗传病,只有对其他易感基因、易感基因间及与环境因素的相互作用作更深入的研究才能进一步阐明非综合征性唇腭裂的发病机制和原因。

参考文献

- [1] Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, et al. Association of genetic variation of the transforming growth factor- α gene with cleft lip and palate[J]. *Am J Hum Genet*, 1989, 45(3):348-353.
- [2] Qian JF, Feingold F, Stoll C, et al. Transforming growth factor- α : Characterization of the BamHI, RsaI, and TaqI polymorphic regions[J]. *Am J Hum Genet*, 1993, 53(1):168-175.
- [3] Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, et al. Cleft lip with or without cleft palate: Associations with transforming growth factor- α and retinoic acid receptor loci[J]. *Am J Hum Genet*, 1992, 51(6):1377-1385.
- [4] Holder SE, Vintiner GM, Farren B, et al. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor- α locus and non-syndromic cleft lip and palate[J]. *J Med Genet*, 1992, 29(6):390-392.
- [5] Sassani R, Bartlett SP, Feng H, et al. Association between alleles of the transforming growth factor- α locus and the occurrence of cleft lip[J]. *Am J Med Genet*, 1993, 45(5):565-569.
- [6] Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, et al. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(2):557-568.
- [7] Wyszynski DF, Maestri N, Lewanda AF, et al. No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor- α locus in two populations[J]. *Hum Hered*, 1997, 47(2):101-109.
- [8] Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, et al. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 1997, 34(1):1-6.
- [9] Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, et al. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure[J]. *Nat Genet*, 1999, 22(1):69-73.

(本文编辑 王 晴)