

[文章编号] 1000-1182(2007)03-0285-04

汉族人转化生长因子- 基因多态性与环境因素和非综合征性唇腭裂的关系

袁奎封¹, 来庆国¹, 周晓红², 秦一飞³

(1.山东大学第二医院 口腔颌面外科, 山东 济南 250033;

2.山东省医学科学院 基础医学研究所, 山东 济南 250062; 3.山东大学口腔医学院, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的 研究汉族人转化生长因子- (TGF-)基因多态性与环境因素和非综合征性唇腭裂(NSCL/P)的关系。方法 通过问卷调查获得所有研究对象母亲孕早期感染史、孕期服药史及叶酸补充等资料。应用多聚酶链反应(PCR)结合限制性酶切方法, 确定199例NSCL/P患者与203例正常人的基因型。将基因型与孕早期感染史、孕期服药史及叶酸补充因素进行分析。结果 NSCL/P患者的C2等位基因频率比正常对照组明显增高, 其差异有统计学意义($P < 0.05$)。孕早期感染、孕期服药及不补充叶酸的孕妇发生NSCL/P增多。C1C2基因型与孕早期感染、孕期服药和叶酸补充3个因素有交互作用。结论 TGF- 基因的突变与汉族人NSCL/P的发生有相关性, 孕早期感染史、孕期服药史及叶酸补充等环境因素与NSCL/P的发生有关。含有C2等位基因的个体对孕早期感染、孕期服药和叶酸缺乏3个危险因素更为敏感。

[关键词] 非综合征性唇腭裂; 转化生长因子- ; 基因多态性; 环境因素

[中图分类号] R786 [文献标识码] A

Association of Transforming Growth Factor- Gene Polymorphism and Environment Factors with Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in Han Nationality YUAN Kui-feng¹, LAI Qing-guo¹, ZHOU Xiao-hong², QIN Yi-fei³. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China; 2. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China; 3. School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] Objective To study the association of transforming growth factor- (TGF-) gene polymorphism and environment factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate(NSCL/P) in Han nationality. Methods Data related to infection, drug intake and folic acid supplement during pregnancy were gained through investigation of mothers. Polymerase chain reaction combined with restrict enzyme digestion was used to detect the target gene variation in 199 patients with NSCL/P and 203 healthy controls. Analysis was carried on the genotype and infection, drug intake and folic acid supplement. Results The C2 allele frequency in patients with NSCL/P was significantly higher than that in healthy controls. There was a significant increase of patients with NSCL/P in pregnant women exposed to infection, drug intake and folic acid deficiency. There was an interaction between C1C2 genotype and infection, drug intake and folic acid supplement. Conclusion TGF- gene polymorphism is associated with NSCL/P. Infection, drug intake and folic acid supplement during pregnancy were associated with the occurrence of NSCL/P. Individuals containing C2 allele were more sensitive to infection, drug intake and folic acid deficiency.

[Key words] nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate; transforming growth factor- ; polymerase; environment factor

非综合征性唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P)是指不伴发其他系统器官畸形的, 不在综合征之内的唇裂或唇裂合并

腭裂的总称, 是口腔颌面部最常见的先天性疾病之一。目前认为, NSCL/P是环境和遗传因素共同作用的结果, 在人类遗传易感性的基础上, 在环境危险因素的作用下发生, 其遗传方式复杂, 绝大多数不符合孟德尔遗传模式^[1]。因此, 探讨NSCL/P的病因应将遗传基因与环境因素结合起来进行研究。本研

[收稿日期] 2007-02-07; [修回日期] 2007-04-07

[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

究选择汉族人作为研究对象，探讨转化生长因子-
(transforming growth factor- , TGF-)基因多态性
和环境因素与NSCL/P的关系。

1 材料和方法

1.1 实验仪器和试剂

PCR扩增仪Hema 4800(MJ Research公司, 美国), TGF- 基因Taq 限制性片段多态性特异性PCR扩增引物^[2], 上游引物顺序为: 5 - TCACTTCCC-CTTTTTCTGCAT- 3 , 下游引物顺序为: 5 - CGAG-GAGGCTCTGAGGTG- 3。引物由上海生物工程公司合成。限制性内切酶、耐热DNA多聚酶及琼脂糖(浙江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 对象

选择山东大学第二医院口腔颌面外科确诊为非综合征性唇腭裂的手术患者199例为唇裂伴腭裂组。其中男112例, 女87例, 年龄为3个月~20岁, 平均8岁, 均为汉族人。其中双侧唇裂伴腭裂28例, 占14%; 左侧唇裂伴腭裂84例, 占42%; 右侧唇裂伴腭裂66例, 占33%; 单纯唇裂21例, 占11%。选取山东大学第二医院口腔颌面外科病房的同年龄患儿203例为对照组, 其中男121例, 女82例, 年龄为11个月~19岁, 平均7岁。对所有研究对象运用统一调查表进行流行病学问卷调查, 获得研究对象母亲孕早期感染(病毒性感冒)、孕期服药史(抗感冒药、止吐药)及叶酸补充等资料。

1.3 方法

所有研究对象抽取抗凝血, 低渗溶血法裂解红细胞, 常规酚- 氯仿抽提DNA。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 预变性3 min, 然后于93 变性30 s, 55 退火30 s, 72 延伸30 s, 10个循环, 90 变性30 s, 55 退火30 s, 72 延伸30 s, 20个循环, 最后72 延伸10 min。取PCR扩增产物10 μ L, 加Taq 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, 65 水浴酶切1 h以上。电泳分析酶切产物, 取20 μ L酶切产物上样, 在3%琼脂糖凝胶上进行电泳, 紫外灯下观察结果, 确定个体的基因型。

1.4 统计方法

采用SPSS 10.0统计软件处理数据, 计数资料采用卡方检验, 运用Mantel- Haenszel法计算OR及95%可信区间判断基因- 环境之间的交互作用是否存在。

2 结果

2.1 TGF- 基因型分析

PCR扩增产物为178 bp(174 bp)的DNA片段, 经Taq 酶切消化后产生2条片段分别为122 bp和52 bp, 共有C1C1、C1C2、C2C2 3种基因型(具有178 bp片段且不能被酶切的定为C1C1基因型; 具有122 bp片段和52 bp片段者为C2C2基因型; 同时具有178 bp、122 bp和52 bp片段者为C1C2基因型)。根据电泳结果确定2组研究对象的基因型, 2组的TGF- 等位基因频率及基因型频率见表1, 唇裂伴腭裂组与对照组的等位基因C2频率相比有统计学差异($P < 0.05$), C1C1、C1C2和C2C2基因型频率差异无统计学意义。

表1 唇裂伴腭裂组与对照组的TGF- 等位基因及基因型频率的比较

Tab 1 Comparison of allele and genotype frequencies in transforming growth factor alpha among patients with NSCL/P and controls

组别	人数	等位基因频率		基因型频率		
		C1	C2	C1C1	C1C2	C2C2
唇裂伴腭裂组	199	333	65	140	53	6
对照组	203	374	32	173	28	2

2.2 环境因素与非综合征性唇腭裂的关系

孕早期感染史、孕期服药史和叶酸补充3种环境因素与非综合征性唇腭裂的关系见表2。在3种环境因素存在情况下, 唇裂伴腭裂组与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 环境因素与非综合征性唇腭裂的关系

Tab 2 The relation between environment factors and nonsyndromic NSCL/P

组别	孕早期感染史		孕期服药史		叶酸补充	
	有	无	有	无	有	无
唇裂伴腭裂组	109	90	100	99	130	69
对照组	91	112	82	121	156	47

2.3 TGF- 基因型与孕早期感染、孕期服药史及叶酸补充的交互作用

以C1C1+无孕早期感染为参照, C1C1+有孕早期感染的OR值为1.300, 归因危险度百分比AR(%)为23.08%, C1C2+有孕早期感染的OR值为3.137, AR(%)为68.12%, C2C2+孕早期感染的OR值为5.577, AR(%)为82.07%, 但只有C1C2+有孕早期感染的OR值和AR(%)与对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示C1C2基因型或C2等位基因与孕早期感染有交互作用(表3)。

以C1C1+无孕期服药为参照 C1C1+有孕期服

药的OR值为1.470, AR(%)为31.97%, C1C2+有孕早期服药的OR值为2.810, AR(%)为64.41%, C2C2+孕早期服药的OR值为2.171, AR(%)为53.94%, 但只有C1C2+有孕早期服药的OR值和AR(%)与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$), 提示C1C2基因型或C2等位基因与孕早期服药有交互作用(表4)。

表 3 TGF- 基因型与孕早期感染的交互作用

Tab 3 The interaction between TGF- genotype and infection during early phase of gestation

组别	孕早期感染	基因型		
		C1C1	C1C2	C2C2
唇裂伴腭裂组	无	71	17	2
	有	69	36	4
对照组	无	99	12	1
	有	74	16	1

表 4 TGF- 基因型与孕早期服药的交互作用

Tab 4 The interaction between TGF- genotype and drug intake

组别	孕早期服药	基因型		
		C1C1	C1C2	C2C2
唇裂伴腭裂组	无	76	20	3
	有	64	33	3
对照组	无	110	11	0
	有	63	17	2

以C1C1+无补充叶酸为参照, C1C1+补充叶酸的OR值为1.084, AR(%)为23.08%, C1C2+不补充叶酸的OR值为3.652, AR(%)为72.62%, C2C2+不补充叶酸的OR值为6.087, AR(%)为83.57%, C1C2+不补充叶酸的OR值和AR(%)与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$), 提示C1C2基因型或C2C2基因型与不补充叶酸有交互作用(表5)。

表 5 TGF- 基因型与补充叶酸的交互作用

Tab 5 The interaction between TGF- genotype and folic acid supplement

组别	补充叶酸	基因型		
		C1C1	C1C2	C2C2
唇裂伴腭裂组	无	25	39	5
	有	115	14	1
对照组	无	33	13	1
	有	140	15	1

3 讨论

随着医学遗传学和分子生物学的发展, 在探讨

唇腭裂的病因时, 越来越重视分子遗传因素与环境因素的结合。众所周知, 人类不仅有大量的基因多态性, 而且有广泛的受环境因素影响的遗传表型。以往对TGF- 基因和环境因素方面都进行了一些研究, Ardinger等^[2]以高加索人群为研究对象, 首次发现TGF- 基因多态性与NSCL/P有显著性关系。在其他地区的人群中也证实TGF- 基因与NSCL/P相关联^[3-5]。前期采用分子生物学方法发现TGF- 基因与山东地区非综合征性唇腭裂密切相关^[6], 这与以上研究相一致。但Lidral等^[7]对一高加索人群的研究中并没有发现TGF- 基因与NSCL/P关联。Wyszynski等^[8]对美国35个家系及墨西哥中部22个家系进行研究, 也没有发现TGF- 基因与NSCL/P连锁。Lidral等^[9]对一菲律宾人群的研究也排除了TGF- 基因与NSCL/P相关联。

在环境因素研究方面, Beaty等^[10]证实母亲吸烟、饮酒、服用维生素C、尿路感染和吸毒等因素与NSCL/P、非综合征性单纯腭裂发生的关联分析没有统计学意义, 但是病历组母亲孕前1月至怀孕3个月饮酒人数多于对照组, 患儿同胞患病风险较对照组高10倍, 有出生缺陷家族史者, NSCL/P和非综合征性单纯腭裂患病风险相对较高。Barrow等^[11]证实患者父母接触农药与NSCL/P发生有关联。本研究以部分汉族人为研究对象, 将TGF- 基因多态性与孕早期感染史、孕早期服药史及叶酸补充等环境因素结合起来进行研究, 以探讨基因与环境因素对NSCL/P的影响, 克服了只研究基因或者只研究环境的不足。

本研究选择的对象是长期居住在山东地区的汉族人, 生活习惯相似, 因此这一研究人群不论在遗传学方面, 还是在环境方面都具有一定的同质性, 有助于阐明遗传与环境的相对作用。本研究选择孕早期感染史、孕早期服药史及叶酸补充作为环境因素, 并对TGF- 的基因型进行分析, 在此基础上, 对TGF- 的基因型和环境因素是否存在交互作用进行分析。分析结果显示母亲孕早期感染史、孕早期服药史及叶酸补充与NSCL/P的发生有关, 虽然其病理机制尚不清楚, 但是目前认为环境因素可以作为一种诱变剂, 诱导基因突变, 或者直接影响蛋白质等细胞成分的合成, 从而影响细胞的生长、分化和迁移过程, 导致唇腭裂的发生, 因此, 孕早期要防止上述一些有害因素, 以降低唇腭裂发生的风险。

本研究结果显示汉族人唇裂伴腭裂组的等位基因与非综合征性唇腭裂显著关联, 表明TGF- 基因可能与汉族人NSCL/P的发生有关。但是二者的关联强度弱于Ardinger等^[2]和Holder等^[4]的研究结果, 而强

于Chenevix-Trench等^[3]的研究结果。本研究结果发现TGF- 基因酶切片段与NSCL/P显著关联。

本研究还发现C1C2基因型与孕早期感染、孕期服药和叶酸服用3个环境因素的交互作用有统计学意义(P<0.05), 这说明含有C2等位基因的个体对孕早期发生感染、孕期服药和叶酸缺乏3个危险因素更为敏感, 因此, 对具有C2等位基因者在孕期有效避免各种感染、服药和补充叶酸会预防唇腭裂的发生。这与Jugessur等^[12]研究结果不一致, Jugessur等^[12]认为TGF- 等位基因和母亲吸烟、饮酒、服用叶酸及多种维生素的基因- 环境相互作用没有统计学意义, 但是没有服用叶酸的母亲其子女携带2拷贝TGF- 等位基因的风险明显高于服用叶酸母亲的子女。研究结果的差异可能与入种、种族及样本量有关。

在此研究的基础上, 应该进一步开展多个基因的组合与环境因素作用的研究, 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] Kanno K, Suzuki Y, Yang X, et al. Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population[J]. *J Hum Genet*, 2002, 47(6) :269- 274.

[2] Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, et al. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate[J]. *Am J Hum Genet*, 1989, 45(3) :348- 353.

[3] Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, et al. Cleft lip with or without cleft palate: Associations with transforming growth factor alpha 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-alpha 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-alpha locus and the occurrence of cleft lip[J]. *Am J Med Genet*, 1993, 45(5) :565- 569.

[6] 袁奎封, 来庆国, 李德仁, 等. 转化生长因子- 基因多态性与山东汉族人非综合征性唇腭裂的关系[J]. *华西口腔医学杂志*, 2006, 24(6) :533- 535.

YUAN Kui-feng, LAI Qing-guo, LI De-ren, et al. The relationship between TGF- gene polymorphism and nonsyndromic cleft lip with cleft palate[J]. *West China J Stomatol*, 2006, 24(6) :533- 535.

[7] Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, et al. Association of MSX1 and TG-FB3 with nonsyndromic clefting in humans[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(2) :557- 568.

[8] 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 alpha locus in two populations[J]. *Hum Hered*, 1997, 47(2) :101- 109.

[9] 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.

[10] Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, et al. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland[J]. *Ann Epidemiol*, 2001, 11(6) :434- 442.

[11] Barrow LL, Wines ME, Romitti PA, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2(ARNT2): Structure, gene mapping, polymorphisms, and candidate evaluation for human orofacial clefts [J]. *Teratology*, 2002, 66(2) :85- 90.

[12] Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, et al. Cleft palate, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal exposures: Assessing gene-environment interactions in case-parent triads[J]. *Genet Epidemiol*, 2003, 25(4) :367- 374.

(本文编辑 王 晴)

全身健康, 口腔先行——口腔健康与糖尿病、心血管疾病学术研讨会

2007年4月26日, 由高露洁公司支持的“全身健康, 口腔先行——口腔健康与糖尿病、心血管疾病”学术研讨会, 通过卫星连线同时在北京、天津、广州、沈阳、上海、成都、重庆、武汉8大城市举办。全国有近千名牙科医生共同出席了此次盛事。会议紧扣主题, 首先由胡德渝教授进行“国内口腔疾病第3次流行病学调查结果总结报告”, 牙周相关问题已成为目前有关全民口腔卫生的首要问题。之后金力坚教授介绍了糖尿病、心血管疾病在亚洲的现状及其对口腔治疗的影响, 北京大学口腔医学院孟焕新教授也就“口腔健康与全身系统性疾病——糖尿病、心血管疾病的关系”进行了演讲。牙周疾病作为影响全身健康的危险因素之一, 如何对其进行科学有效的防治已成为业内人士越来越关注的热点问题。高露洁公司的Diane博士向参会医生报告了高露洁360牙刷和高露洁全效牙膏在“维护口腔卫生, 促进全身健康”方面的功效。最后各会场参会医生纷纷对报告中所关心的问题和专家进行了探讨交流, 会场气氛热烈, 会后很多参会医生表示通过会议了解到很多与牙周病息息相关的全身疾病的研究新进展, 对今后的临床工作有重要的指导意义。

广州高露洁棕榄有限公司