论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1520-02

生长激素受体基因单核苷酸多态性在下颌前突与下颌正常人群中的分布比较

王豫蓉,余兴华,戴红卫,张定铭,陈允嘉,李文颖
(重庆医科大学附属口腔医院口腔正畸科,重庆 400015)

【摘 要】目的:研究生长激素受体基因(Growth hormone receptor,GHR)的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism,SNP)在前突下颌(实验组)与正常下颌(对照组)中分布有无差异。方法:依照纳入标准从 2005 ~ 2006 年重庆医科大学附属口腔医院就诊的患者中筛选出 187 例受试者(男 86 例,女 101 例),抽取静脉血液 5ml,提取基因组 DNA,PCR 扩增目的基因、测序,将实验测得序列与美国国家生物科技资讯中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)中公布的基因序列对比,最后采用 SPSS 10.0 统计软件对实验组与对照组中基因型与等位基因频率进行 χ^2 检验统计分析。结果:在实验组与对照组中都只发现 1673 这 1 个 SNP 位点,在该位点上存在 A、C2 种碱基及 AC、CC、AA3 种基因型,其基因型与基因频率分布在实验组与对照组中均存在差异($P<0.01$)。结论:实验结果提示 GHR 的 SNP 在下颌正常与下颌前突人群中的分布可能存在差异,但需要更多的标本量进一步证实。

【关键词】生长激素;受体;单核苷酸多态性;正常下颌;前突下颌
【中国图书分类法分类号】R783.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-26

Comparison of distribution of single nucleotide polymorphism in normal mandible and protruding mandible

WANG Yu-rong, et al
(*Department of Orthodontics, College of Stomatology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the differences of growth hormone receptor(GHR) gene between normal mandible(control group)and protruding mandible(study group) in molecular level by comparing the gene's nucleotide sequences. *Methods*: In

作者介绍:王豫蓉(1963-),女,副教授,博士,
研究方向:牙颌畸形相关基因的分子生物学研究。
通讯作者:戴红卫,男,教授,E-mail:dai64@126.com。
基金项目:重庆医科大学附属口腔医院归国留学人员科研启动资金。

城乡和男女之间差别均无统计学意义,这与冠龋多为女性高于男性,农村高于城市的流行特征有所不同,说明根面龋受性别和地域因素影响不明显,主要与牙龈萎缩、牙间隙暴露、口腔卫生不佳、食物嵌塞等因素有关[4],这是因为老年人随着年龄增长,龈退缩发生率增加,而牙龈退缩与根面龋密切相关。牙龈退缩后,菌斑易于附着于釉牙骨质界及根面,而釉牙骨质界是一个薄弱区,易被侵蚀,菌斑内细菌产酸,以及蛋白溶解使 sharpey 纤维破坏。导致牙骨质结构改变而脱矿、软化,钙、磷含量降低而未能及时被再矿化,因而发生根面龋。同时龈退缩发生率增加,釉牙骨质界及根面暴露于口腔的机会增加, 因而根面龋发生的可能性增加。因此提示我们口腔工作者要指导患者正确刷牙,正确使用牙签、牙线,保持牙间隙通畅,正确清洗和保养义齿,养成良好口腔卫生习惯,减少菌斑形成,预防根面龋的发生[5]。

成年人根龋的预防是口腔预防保健工作的薄弱环节,因此,应从预防和临床治疗上对根龋的各个阶段进行干预,治疗早期根龋。随着我国社会经济的发展,文明程度的不断提高,人口结构逐步趋于老龄化,对口腔卫生保健的需求将会愈来愈高,各级医疗卫生保健机构对此必须做好充分地准备,以满足人民群众口腔卫生保健服务的需要。

参 考 文 献

[1] World Health Organization.Oral health surveys:Basic methods[M].4th ed.Geneva:WHO,1997.1-20.
[2] 全国牙病防治指导组. 第二次全国口腔健康流行病学抽样调查[M]. 北京:人民卫生出版社,1997.142-196.
[3] 欧 尧,黄少宏,范卫华,等.2005 年广东省成年人恒牙根龋病抽样调查报告[J]. 广东牙病防治,2007,15(5):220-223.
[4] 刘 虹,谢晓莉.根面龋的临床观察与分析[J]. 中国现代医学杂志,2001,11(1):37-38.
[5] 卞金有.预防口腔医学[M]. 第 4 版.北京:人民卫生出版社,2003.213-218.

(责任编辑:冉明会)

our study, we selected 100 individuals with protruding mandibles and 87 individuals with normal mandibles by the study criterions, diagnosed in Affiliated Stomatological Hospital of Chongqing Medical University during 2005 ~ 2006. 5 ml venous blood was withdraw and the genomic DNA was isolated from the whole blood cells with the use of a DNA Blood Kit. PCR amplification was performed by a standard protocol to increase and sequence the aim gene in normal and protruding individuals. And then we compared the acquired gene sequences with the published ones in NCBI (national center for biotechnology information) database, finally found the positions of single nucleotide polymorphism (SNP) in exon 10 of GHR gene and calculated the allele frequency and genotype frequency in study and control groups by SPSS10.0. *Results*: One SNP position (including study and control groups) was found in our study and his nucleotide code was 1673.In this SNP position, there were two alleles(AC) and three genotypes(AC, AA and CC). The allele frequency and distributions of genotype had a significant difference by χ^2 calculation in 0.01 level. *Conclusion*: Differences in sequences of growth hormone receptor gene exist in individuals with protruding mandibles and individuals with normal mandibles.

【Key words】 Growth hormone; Receptor; Single nucleotide polymorphism; Normal mandible; Protruding mandible

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)是由于单个核苷酸改变而导致的核酸序列多态，由 E. Lander[1]于 1996 年首先提出。SNP 由于具有数量多、分布广泛、适于快速、规模化筛查以及等位基因频率、基因分型计算简便等优点近几年被广泛应用于生物及医学研究的诸多领域。有研究表明 GHR 与颅面结构间线距存在一定关系[2,3]。为了明确生长激素受体基因在分子水平上在正常下颌与前突下颌个体中分布有无差异，为骨性下颌前突畸形的早期预防诊断提供分子生物学的依据，本研究对生长激素受体基因外显子 10 全长进行测序研究。

1 材料与方法

1.1 样本选择

首先从 2005 ~ 2006 年间于重庆医科大学附属口腔医院就诊的患者中选出满足如下条件的普选样本：面部双侧对称，颌面部无发育缺陷，汉族人群、无亲缘关系和异族通婚史，否认不良习惯、替牙障碍。

选取满足上述条件的头颅侧位数码 X 片，再依据下列标准选择研究样本：前后颅底线距、颅底角、下颌角、前后面高比、上颌大小形态正常，头颅侧位片上如果 $2^0 < ANB < 4^0$ 则纳入对照组，$ANB < 0^0$ 则纳入实验组。共收集到样本 187 例（实验组 100 例，对照组 87 例），其中男 86 例，女性 101 例，平均年龄（12.7 ± 2.8）岁。

每位自愿者取静脉血 5 ml，并签定知情同意书。EDTA 抗凝，-20℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取　采用宝生物工程（大连）有限公司生产的小量血液 DNA 提取试剂盒（产品代码：D9081）提取血液基因组 DNA。紫外分光光度计，测定其吸光度值。

1.2.2 PCR 扩增目的基因　参考 NCBI（美国国立生物信息中心）中公布的生长激素受体基因序列，采用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物。

PCR 引物设计如下：

上游引物（5'→3'）：TGCCAATGACATACATGAGGG；

下游引物（5'→3'）：GAGTTTCTCTCATCATGTGG。

PCR 反应体系如下：10 × PCR buffer 2.5 μl，Taq 聚合酶（1U/μl）0.2U，上下游引物（20 μ mol/L）各 1 μl，$MgCl_2$（25 mmol/L）2.0 μl，模板 DNA1 μl（含基因组 DNA50 ng），dNTP（10 mmol/L）1.5 μl，加三蒸水 16 μl 至总体积 25 μl。经 94℃预热温度 4 min，94℃变性 40 s，58℃条件下退火 40 s，72℃延伸 1 min，循环 35 次。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳并经过凝胶成像系统验证。

1.2.3 序列测定　PCR 产物经重庆医科大学教育部重点实验室感染性疾病重点实验室测序，测序峰型图见图 1。

1.2.4 统计分析　采用 SPSS10.0 统计分析软件计算基因型与等位基因频率在实验组与对照组的分布。对基因型和基因频率分布进行 Hardy-Weinberg 检验，对计数资料进行 χ^2 检验，$P<0.01$ 为有统计学差异。

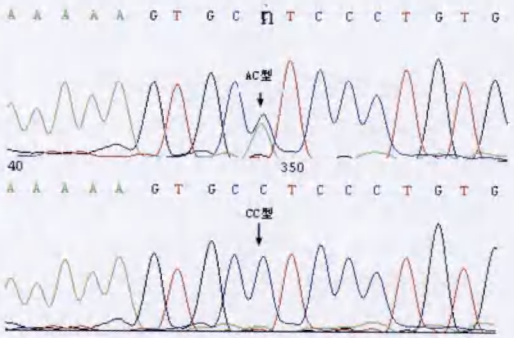


图 1　GHR 基因 1673 位核苷酸测序峰型图

2 结　果

在实验组与对照组中均只发现 1673 这 1 个 SNP 位点，在该位点上存在 2 种碱基 A、C。在该位点上存在 A、C 两种碱基型，正常下颌中等位基因 A 的基因型分布数据为 47，基因型频率为 0.268；C 的

基因型分布数据为 128,基因型频率为 0.732;异常下颌中等位基因 A 的基因型分布数据为 25,基因型频率为 0.125,C 的基因型分布数据为 175, 基因型频率为 0.875。经 χ^2 检验 A、C 两种等位基因基因型与基因频率分布在实验组与对照组中存在统计学上差异($P<0.01$)。

下颌异常个体中 AC 基因型 22 例,CC 型 77 例, AA 型 1 例;正常下颌个体中 AC 基因型 34 例, CC 型 47 例,AA 型 6 例。经 χ^2 检验 AC、CC、AA3 种基因型在实验组与对照组中分布有统计学差异($P<0.01$)。

Hardy-Weinberg 平衡法则吻合度检验:基因型和基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡法则。

表 1 下颌正常个体与下颌前突个体中等位基因分布

等位基因	实验组	对照组
A	25(0.125)	47(0.268)
C	175(0.875)	128(0.732)

表 2 正常下颌与异常下颌中基因型分布

基因型	实验组(例)	对照组(例)
AC	22	34
CC	77	47
AA	1	6

3 讨 论

在本研究中,我们选择下颌发育过度的个体(实验组)与下颌发育正常的个体(对照组)对其生长激素受体基因进行研究,研究发现 GHR 基因在实验组与对照组中无论是基因型或是基因频率均存在明显差异。等位基因分布在实验组与对照组中存在差异。在此位点上,基因碱基发生由 A→C 的突变,导致其编码的氨基酸由异亮氨酸(ATC)到亮氨酸(CTC)的改变。我们推测:由于碱基改变导致编码的氨基酸变化,有可能影响到细胞内生长信号的传递,引起生长激素→生长激素受体→胰岛素样生长因子传递轴下游发生改变,最终影响到骨骼细胞的分化、增殖,从而引起骨骼形态发生变化。

同时研究发现生长激素受体基因在 SNP 位点数目与等位基因频率上都跟以往的研究有所差异。在本研究中实验组跟对照组中都只发现 1673 这一 SNP 位点,这与周晶等 2004 年在对 106 名北方一般汉族人群 GHR 测序研究有差异。在周晶[4]研究中,外显子 10 上一共发现了 5 个 SNP 位点,而在本实验中只发现了 1 个 SNP 位点 (1673), 同时我们发现的 SNP 位点 (1673) 数目与 NCBI 中公布的 SNP 位点 (1362、1516、1526、1673、1778)也有差异(参考截止时间为 2007 年 2 月), 这一方面既可能是生长激素受体基因 SNP 本身在正常下颌与异常下颌中分布存在差异,也可能提示 SNP 存在种族变化,具有遗传异质性。David Cox[5]和他的同事从 71 名欧洲、非洲和中国人后裔志愿者身上获得了 DNA 样本构建了近 160 万个 SNP 图谱。研究发现在所有 71 人构成的单核苷酸多态性图谱中,有 94%的多态性发生在非洲人群群体里,有 81%在欧洲人群群体里,中国人群群体里存在 74%的 SNP 变异,这表明 SNP 在不同种族间存在差异。同样周晶 2004 年对 GHR 基因 SNP 的研究中发现外显子 6 上汉族人群的 SNP 位点数目与 NCBI 中公布的位点数目一样存在差异。这可以部分解释不同民族、不同地区的群体具有特征性的颅面结构,因为 SNP 的变异可能影响 GHR 对生长信号的传递功能,导致在生长激素→生长激素受体→胰岛素样生长因子传递轴发生改变, 由于 GHR 在软骨生长发育中具有重要作用,而下颌骨髁状突软骨的发育直接影响下颌骨的大小、形态,进而影响个体特征。

尽管在本研究中我们发现生长激素受体基因型在前突下颌与正常下颌中的分布上存在差异,但依然不能确定 GHR 是否是引起下颌前突形态异常的致病基因。因为大量研究表明下颌前突是一种多基因遗传病[6],多基因病表型性状由不同座位的较多基因协同决定,在多基因疾病中任何可疑的致病序列改变都应该在进行功能研究后才能够得出是否为致病基因的结论。

参 考 文 献

[1] Lander E.The new genomics:global views of biology[J]. Science, 1996,274(5287):536-539.

[2] Yamaguchi T,Maki K,Shibasaki Y. Growth hormone receptor gene variant and height Japanese population[J]. Am J OrthodDen (mandible) tofacialOrt (in) hop,2001,1(19):650-653.

[3] Zhou J,Lu Y,Gao X H,et al. The growth hormone receptor *gene is associated with mandibular height in a chinese population* [J]. J Dent Res,2005,84(11):1052-1056.

[4] 周 晶,吕 婴,白玉兴,等.106 名中国汉族人生长激素受体基因单核苷酸多态性分析[J].中华口腔医学杂志,2004,39(2):97-99.

[5] David A,Hinds,Laura L,et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations[J]. Science,2005,307 (2):1072-1079.

[6] Litton S F.A gentic study of class Ⅲ malocclusion[J]. Am J Orthod,1970,58:565-577.

(责任编辑:关蕴良)