

新疆维吾尔族和汉族儿童龋病与人类白细胞抗原-DQB1等位基因多态性的相关性研究

张瑞涵¹ 李小兵² 王丽萍¹ 刘奕杉¹

1.新疆医科大学第一附属医院儿牙预防保健科, 乌鲁木齐 830054;

2.口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心

四川大学华西口腔医院儿童口腔科, 成都 610041

[摘要] 目的 探讨人类白细胞抗原(HLA)-DQB1等位基因多态性与新疆维吾尔族和汉族儿童龋病的相关性。方法 采用聚合酶链式反应-序列特异性引物(PCR-SSP) DNA分型技术对新疆维吾尔族和汉族高龋儿童及健康无龋儿童($n=40$)进行HLA-DQB1基因分型,研究HLA-DQB1基因多态性与新疆维吾尔族和汉族儿童龋病的相关性。结果 维吾尔族与汉族儿童在HLA-DQB1座位均检出5个特异性基因位点。汉族高龋组患者HLA-DQB1*02等位基因频率(12.5%)显著低于对照组(32.5%),差异有统计学意义($P<0.05$, $OR=0.297$);维吾尔族高龋组患者HLA-DQB1*05等位基因频率(37.5%)显著高于对照组(17.5%),差异有统计学意义($P<0.05$, $OR=2.829$)。结论 新疆维吾尔族和汉族儿童龋病与HLA-DQB1等位基因多态性具有一定的相关性;HLA-DQB1*02基因可能是新疆汉族儿童龋病的保护因子;而HLA-DQB1*05等位基因是新疆维吾尔族儿童龋病的易感基因。

[关键词] 低龄儿童龋; 人类白细胞抗原; 基因多态性

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2018.01.002

Association between the dental caries and the human leucocyte antigen DQB1 allele polymorphisms among the Uygur and Han children in Xinjiang Zhang Ruihan¹, Li Xiaobing², Wang Liping¹, Liu Yishan¹. (1. Dept. of Pediatric Dentistry & Oral Prevention and Health Care, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Pediatric Dentistry, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Supported by: The National Natural Science Foundation of China (81560178). Correspondence: Liu Yishan, E-mail: lys-tree@126.com.

[Abstract] **Objective** This study aims to investigate the association between human leucocyte antigen (HLA)-DQB1 allele polymorphisms and the presence dental caries among the Uygur and Han children in Xinjiang. **Methods** HLA-DQB1 allele in the Uygur and Han children with dental caries and healthy control in Xinjiang was tested ($n=40$) using the polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) DNA parting technology. **Results** A total of five specific loci were detected in the HLA-DQB1 locus among the Uygur and Han children. The frequency of the HLA-DQB1*02 allele in the Han group with severe caries (12.5%) was significantly lower than in the control group (32.5%) ($P<0.05$, $OR=0.297$). Moreover, the frequency of the HLA-DQB1*05 allele in the Uygur group with severe caries (37.5%) was significantly higher than in the control group (17.5%) ($P<0.05$, $OR=2.829$). **Conclusion** Caries susceptibility among the Uygur and Han children in Xinjiang is related to the HLA-DQB1 allele. The HLA-DQB1*02 allele may protect against caries among the Han children, whereas the HLA-DQB1*05 allele may be responsible for the susceptibility of the Uygur children to caries.

[Key words] early childhood caries; human leucocyte antigen; genetic polymorphism

[收稿日期] 2017-02-28; **[修回日期]** 2017-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金(81560178)

[作者简介] 张瑞涵, 住院医师, 硕士, E-mail: 332666101@qq.com

[通信作者] 刘奕杉, 主任医师, 硕士, E-mail: lys-tree@126.com

龋病是儿童口腔中的常见病, 发病率高居儿童疾病首位, 是发病率位于第二位的哮喘的5倍^[1], 严重危害儿童身心健康和颅颌面的生长发育。70%的

低龄儿童龋 (early childhood caries, ECC) 集中于少数儿童, 可见儿童龋病的分布并非平均, 而是存在患龋风险较高的人群, 即龋高风险儿童^[2]。研究^[3-4]表明, 遗传因素对龋病的易感性发挥着重要作用。人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA) 定位于第6号染色体短臂, 是目前已知人类基因组中最复杂的免疫遗传系统, 其中HLA-DQB1位点是系统中 α 链和 β 链均有多态性的座位, 主要分布于免疫细胞上, 可以作为免疫细胞间相互识别的标记从而诱导免疫应答, 其多态性决定着疾病易感性的个体差异^[5]。已有研究^[6]证实HLA-DQB1基因与儿童龋病具有相关性, 且呈现出种族与地区的差异性。新疆地区是一个以维吾尔族和汉族为主体的多民族聚居的区域, 流行病学调查显示新疆乌鲁木齐市维吾尔族儿童患龋率达66.67%, 汉族儿童患龋率为54.08%^[7]。考虑到不同种族疾病的遗传背景存在差异, 因此明确龋病易感基因对新疆维吾尔族和汉族儿童的龋病预防及病因学研究十分必要。本研究拟采用聚合酶链式反应-序列特异性引物 (polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP) DNA分型技术对新疆维吾尔族和汉族儿童HLA-DQB1等位基因频率分布进行分析, 以探讨遗传多态性与该地区儿童龋病发生的相关性, 为易感人群的监测提供理论基础, 并为新疆维吾尔族和汉族儿童龋病防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取2015年3月—2016年5月在新疆医科大学第一附属医院儿牙预防保健科门诊就诊的3~5岁维吾尔族和汉族儿童作为研究对象。依据世界卫生组织推荐的《口腔健康调查基本方法》中的龋病诊断标准^[8], 由两位经培训和标准一致性检验合格 (Kappa值=0.82) 的儿童口腔专业医师分别对同一受检者的20颗乳牙行专科检查, 并按龋失补牙数 (decay missing filling tooth, dmft) 分为高龋组 (dmft \geq 5) 和无龋组 (dmft=0)。维吾尔族和汉族中高龋组和对照组均各纳入40例, 共160例个体。

纳入标准: 1) 2代以上生活在新疆地区且相互无亲缘关系的维吾尔族或汉族儿童; 2) 无全身系统性疾病、免疫性疾病和遗传性疾病; 3) 生活方式、饮食习惯及口腔卫生习惯相近; 4) 口内无正畸装置。

排除标准: 1) 釉质发育不全或釉质矿化不全; 2) 口内有龋齿之外其他原因造成的牙齿缺失; 3)

曾采用窝沟封闭或氟化物等特殊防龋措施。

1.2 研究方法

1.2.1 样本采集和DNA提取 用无菌棉签刮取每位受试者的双侧颊黏膜脱落细胞, 室温下自然干燥24 h, 置于无菌试管中, -20 °C保存。消毒剪刀剥取颊黏膜拭子表层至离心管内, 采用口腔拭子基因组DNA提取试剂盒 (北京Tiangen公司) 提取DNA。应用核酸定量测定仪测定DNA浓度及纯度, 浓度为50~100 ng $\cdot\mu$ L⁻¹, 光密度值 (optical density, OD) (260/280) 为1.7~1.9的DNA置-20 °C保存备用。

1.2.2 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 采用PCR-SSP法对HLA-DQB1进行基因分型, 具体按照HLA-DQB1 SSP Kit (Protrans公司, 德国) 说明书要求操作。PCR扩增条件: 94 °C起始变性120 s; 94 °C变性10 s, 10个循环; 65 °C退火和延伸60 s; 94 °C变性10 s, 20个循环; 61 °C退火50 s; 72 °C延伸30 s; 4 °C保持。

1.2.3 特异性PCR扩增产物的检测分析 取PCR扩增产物9 μ L, 2%的琼脂糖凝胶 (含溴乙锭) 电泳, 凝胶成像分析系统观察拍照, 根据已公布的HLA-DQB1基因序列分布格局分析基因型。第1至第12泳道为HLA-DQB1特异性基因位点, 第13泳道为阴性对照。共检测5组编码特异性的HLA-DQB1等位基因型: DQB1*02、DQB1*03、DQB1*04、DQB1*05和DQB1*06。

1.2.4 PCR质量控制 所有实验样本的测定均在盲法下进行, PCR扩增均设阴性对照, 并随机抽取10%的样本进行重复性实验, 检测PCR结果的可靠性。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件处理分析数据, 用SHEsis软件进行Hardy-Weinberg平衡检验。应用直接计数法计算基因频率, 组间等位基因频率比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。疾病与HLA-DQB1等位基因的相关性通过比值比 (odds ratio, OR) 进行评估, 计算OR值的95%可信区间 (confidence interval, CI)。

2 结果

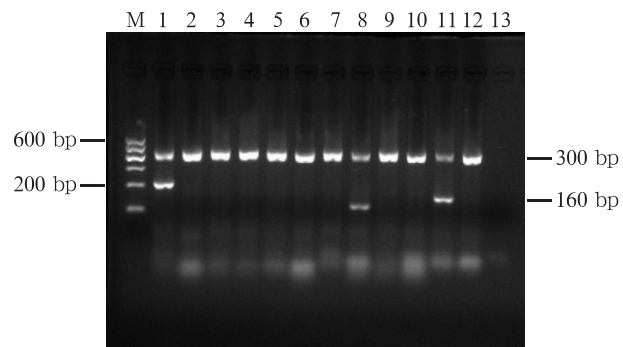
2.1 PCR检测结果

本实验在PCR-SSP检测过程中引入内参质控带, 利用判读规则准确判读检测结果。对随机抽取的10%样本 (共16个) 的重复性实验结果与相同实验样本检测结果一致。基因型测定的典型电泳结果见图1。

2.2 Hardy-Weinberg平衡检验

对两组基因型分布频率进行Hardy-Weinberg平

衡检验, 实验结果显示基因型分布频率符合Hardy-Weinberg平衡定律, 说明各基因位点完全符合随机分布。



M: DNA Marker I; 1~12: HLA-DQB1等位基因特异性引物扩增片段; 13: 阴性对照。

图 1 HLA-DQB1等位基因PCR检测结果

Fig 1 PCR electrophoretic map of the HLA-DQB1 allele

2.3 汉族高龋组与对照组HLA-DQB1等位基因频率分布比较

汉族高龋组与对照组HLA-DQB1等位基因频率和相对危险性分析结果见表1。由表1可见, 汉族高龋组患者HLA-DQB1*02等位基因频率(12.5%)显著低于对照组(32.5%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且HLA-DQB1*02基因的暴露与龋病患者呈负相关($OR=0.297$)。其余位点等位基因频率差异无统计学意义。

表 1 汉族高龋组与对照组HLA-DQB1等位基因频率分布比较

Tab 1 Comparison of allele frequencies of HLA-DQB1 between the Han patients with caries and controls $n=40$

等位基因	高龋组		对照组		χ^2 值	P值	OR	95%CI
	阳性数	等位基因频率/%	阳性数	等位基因频率/%				
DQB1*02	5	12.5	13	32.5	4.588	0.032	0.297	0.094~0.934
DQB1*03	30	75.0	28	70.0	0.251	0.617	1.286	0.480~3.442
DQB1*04	6	15.0	5	12.5	0.105	0.745	1.235	0.344~4.431
DQB1*05	8	20.0	14	35.0	2.257	0.133	0.464	0.169~1.276
DQB1*06	23	57.5	24	60.0	0.052	0.820	0.902	0.370~2.198

表 2 维吾尔族高龋组与对照组HLA-DQB1等位基因频率分布比较

Tab 2 Comparison of allele frequencies of HLA-DQB1 between the Uygur patients with caries and controls $n=40$

等位基因	高龋组		对照组		χ^2 值	P值	OR	95%CI
	阳性数	等位基因频率/%	阳性数	等位基因频率/%				
DQB1*02	17	42.5	22	55.0	1.251	0.263	0.605	0.250~1.463
DQB1*03	27	67.5	29	72.5	0.238	0.626	0.788	0.302~2.055
DQB1*04	7	17.5	5	12.5	0.392	0.531	1.485	0.429~5.143
DQB1*05	15	37.5	7	17.5	4.013	0.045	2.829	1.003~7.977
DQB1*06	17	42.5	14	35.0	0.474	0.491	1.373	0.557~3.386

2.4 维吾尔族高龋组与对照组HLA-DQB1等位基因频率分布比较

维吾尔族高龋组与对照组HLA-DQB1等位基因频率和相对危险性分析结果见表2。由表2可见, 高龋组患者HLA-DQB1*05等位基因频率(37.5%)显著高于对照组(17.5%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且HLA-DQB1*05基因的暴露与龋病呈正相关($OR=2.829$)。其余位点等位基因频率差异无统计学意义。

2.5 维吾尔族和汉族正常对照组HLA-DQB1等位基因频率分布总体比较

维吾尔族和汉族对照组在HLA-DQB1座位均检出5个特异性基因位点。总体比较结果见表3。由表3可见, 两组等位基因频率分布具有相同之处, 均表现为HLA-DQB1*03基因表达最高($\geq 70.0\%$), HLA-DQB1*04基因表达最低(12.5%)。但也存在着明显差异, 汉族对照组所携带的等位基因频率由高至低依次是DQB1*03、DQB1*06、DQB1*05、DQB1*02、DQB1*04; 维吾尔族对照组所携带的等位基因频率由高至低依次是DQB1*03、DQB1*02、DQB1*06、DQB1*05、DQB1*04。维吾尔族对照组HLA-DQB1*02等位基因频率(55.0%)显著高于汉族对照组(32.5%), 而HLA-DQB1*06等位基因频率(35.0%)显著低于汉族对照组(60.0%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 维吾尔族和汉族正常对照组HLA-DQB1等位基因频率分布比较

Tab 3 Comparison of allele frequencies of HLA-DQB1 between the Uygur and Han controls n=40

等位基因	汉族		维吾尔族		χ^2 值	P值	OR	95%CI
	阳性数	等位基因频率/%	阳性数	等位基因频率/%				
DQB1*02	13	32.5	22	55.0	4.114	0.043	0.394	0.159~0.977
DQB1*03	28	70.0	29	72.5	0.061	0.805	0.885	0.336~2.332
DQB1*04	5	12.5	5	12.5	0.000	1.000	1.000	0.266~3.763
DQB1*05	14	35.0	7	17.5	3.164	0.075	2.538	0.895~7.202
DQB1*06	24	60.0	14	35.0	5.013	0.025	2.786	1.125~6.899

3 讨论

龋病的发生与发展是多种致病因素和宿主遗传因素综合作用的结果, 统计资料表明, 儿童龋危险因素中基因遗传因素作用约占56%, 而社会阶层和用糖量等其他因素作用仅占44%^[9-11]。HLA作为人类基因组中最复杂且最具多态性的遗传系统在抗原的递呈、识别及调节免疫应答的强弱等方面具有关键性的作用, 同时在一定程度上影响着疾病的发生和发展。根据分布结构不同, HLA分为I、II、III类区域, 共编码120多种功能基因。HLA II类基因区是递呈抗原和决定疾病易感性个体差异的主要基因, 影响宿主对致龋细菌的免疫反应、变异链球菌在牙面的定植及釉质的正常发育等方面^[12]。其中HLA-DQ位点是系统中 α 链和 β 链均有多态性的座位。1981年Lehner等^[13]首次提出HLA与龋病易感性的关系, 随后国内外学者对此进行了相关研究, 所得结果呈现出种族和地区的差异性, 找出该差异的遗传因素对确定致病基因、明确发病机制至关重要。

新疆地处我国的西北部, 是一个以维吾尔族(45.8%)和汉族(40.1%)为主体的多民族聚居区^[14], 幅员辽阔, 气候因素、地理环境及生活习惯较其他地区有较大差异。维吾尔族世代居住在新疆, 因强烈的宗教信仰鲜有与外族通婚, 基因具有良好的保守性; 新疆汉族不同于其他地区汉族人群, 是由全国各地逐渐迁徙而来, 数十年来其基因频率分布为适应新疆独特的地理环境而发生改变。有研究^[15]表明新疆维吾尔族和汉族HLA等位基因分布与西北地区其他民族有明显差异, 具有较高的遗传多态性, 且自身特点显著。但由于地域、经济等因素的制约, 对新疆地区龋病患者的基因研究十分有限, 对不同民族之间基因分布差异的研究更是缺乏。本研究采用PCR-SSP法对新疆维吾尔族和汉族高龋与无龋儿童HLA-DQB1座位进行基因分型, 对龋病患者所携带的易感基因进行对比分析, 并对维吾尔族和汉族

健康儿童HLA-DQB1等位基因总体分布进行比较。

本研究结果显示, HLA-DQB1*02等位基因在汉族高龋组中出现的频率显著低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 且该基因的暴露与龋病患者呈负相关($OR=0.297$), 提示HLA-DQB1*02基因型与龋病易感性相关, 对龋病起到了一定的拮抗作用, 是新疆汉族儿童龋病的保护因子。维吾尔族高龋组与对照组HLA-DQB1等位基因频率分布比较结果显示, 高龋组患者HLA-DQB1*05等位基因频率显著高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 且该基因的暴露与龋病呈正相关($OR=2.829$), 因此推测HLA-DQB1*05等位基因是新疆维吾尔族儿童龋病的易感基因, 携带这种基因的儿童可能是患龋的高危人群。这与Ozawa等^[6]对106名日本成人的研究结果不同, 其研究表明HLA-DQB1*06基因型与龋病易感性相关, 其中HLA-DQB1*0604与唾液中乳酸杆菌的数量相关, HLA-DQB1*0601与唾液中链球菌的数量有关。但Altun等^[17]研究结果却未显示相关性。这些研究结果的差异性追其原因可能是龋病是多基因遗传易感性疾病, 在有多个易感位点的情形下, 不同位点在不同人群中具有不同优势, 产生与相同疾病关联的多样性, 从而产生不同的研究结果。其次也可能是由不同种族、不同地域的遗传学特征不同所造成的, 此外可能与样本量大小、实验方法不同有关。因此, 要阐明HLA-DQB1基因多态性与龋病之间的关系还需要在不同地区、不同民族之间进行更大样本量的研究, 并对其他可能的易感基因进行连锁分析。

本研究还对新疆维吾尔族和汉族儿童正常对照组的HLA-DQB1等位基因频率总体分布进行了比较。研究结果显示, 汉族对照组所携带的等位基因频率由高至低依次是DQB1*03、DQB1*06、DQB1*05、DQB1*02、DQB1*04; 维吾尔族对照组所携带的等位基因频率由高至低依次是DQB1*03、DQB1*02、DQB1*06、DQB1*05、DQB1*04。HLA-DQB1位点在两组中表达最高的均是HLA-DQB1*03基因型, 且

频率极为相近, 该等位基因在国内外其他人群中也十分常见^[8]。两组人群HLA-DQB1等位基因总体分布差异主要在于HLA-DQB1*02和HLA-DQB1*06基因型 ($P<0.05$), 此差异可能也是造成维吾尔族和汉族龋病易感基因不同的原因, 有待进一步研究。

总之, 本研究提示新疆维吾尔族和汉族儿童龋病遗传易感性与HLA-DQB1等位基因多态性存在差异, 初步认为HLA-DQB1*02基因可能是新疆汉族儿童龋病的保护因子; 而HLA-DQB1*05等位基因是新疆维吾尔族儿童龋病的易感基因。不同种族疾病的遗传背景存在差异, 因此筛选并探究疾病的易感基因将有助于从分子水平了解疾病的发病机制, 为龋病高危人群以及易感人群监测提供理论基础, 并为新疆维吾尔族和汉族儿童龋病早期防治提供依据, 有助于从个体水平上提供适当的防龋措施。但龋病易感性是由多基因联合决定的, 目前对龋病易感基因的研究还处于初步阶段, 因此在今后的研究中, 还应进一步加大实验样本量并对宿主患龋的严重程度进行分析, 以期对易感基因多态性与新疆儿童龋病的相关性进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Benjamin RM. Oral health: the silent epidemic[J]. Public Health Rep, 2010, 125(2):158-159.
- [2] 邹静. 儿童龋病的风险性评估[J]. 华西口腔医学杂志, 2014, 32(1):1-4.
Zou J. Caries risk assessment in children[J]. West Chin J Stomatol, 2014, 32(1):1-4.
- [3] Yildiz G, Ermis RB, Calapoglu NS, et al. Gene-environment interactions in the etiology of dental caries[J]. J Dent Res, 2015, 95(1):74-79.
- [4] Kobierska-Brzoza J, Kaczmarek U. Genetic aspects of dental caries[J]. Dent Med Problems, 2016, 53(3):413-418.
- [5] Thorsby E. On the future of HLA[J]. Tissue Antigens, 2011, 78(4):229-240.
- [6] Bagherian A, Nematollahi H, Afshari JT, et al. Comparison of allele frequency for HLA-DR and HLA-DQ between patients with ECC and caries-free children[J]. J Indian Soc Pedod Prev Dent, 2008, 26(1):18-21.
- [7] 努尔比亚木·麦提依明, 赵今, 程春, 等. 乌鲁木齐市3~5岁维吾尔族、汉族儿童龋病流行病学调查分析[J]. 口腔医学, 2011, 31(8):488-490.
NURBIYE·muhammatimin, Zhao J, Cheng C, et al. Epidemiological investigation on deciduous caries of 3-to-5-year-old Uyghur and Chinese children in Urumqi[J]. Stomatology, 2011, 31(8):488-490.
- [8] World Health Organization. Oral health surveys: basic methods[M]. 4th ed. Geneva: WHO, 1997:32-33.
- [9] Fernando S, Speicher DJ, Bakr MM, et al. Protocol for assessing maternal, environmental and epigenetic risk factors for dental caries in children[J]. BMC Oral Health, 2015, 15:167.
- [10] Drifzah D, Prahlad DD, Subramaniam DP, et al. Genetics in pediatric dentistry—a review[J]. Dent Med Sci, 2016, 15(7):120-128.
- [11] Opal S, Garg S, Jain J, et al. Genetic factors affecting dental caries risk[J]. Aust Dent J, 2015, 60(1):2-11.
- [12] Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries[J]. J Dent Res, 2014, 6(8):788-793.
- [13] Lehner T, Lamb JR, Welsh KL, et al. Association between HLA-DR antigens and helper cell activity in the control of dental caries[J]. Nature, 1981, 292(5825):770-772.
- [14] 刘爽, 冯解忧. 新疆民族人口空间分布的测量与分析—基于“五普”、“六普”数据[J]. 南方人口, 2014, 29(6):33-41.
Liu S, Feng JY. The spatial distribution measurement of the ethnic population in Xinjiang: an analysis of the fifth and sixth national population census[J]. South China Popul, 2014, 29(6):33-41.
- [15] 吴江东, 卢丽君, 左维泽, 等. 新疆地区汉族和维吾尔族部分人群HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DPB1基因多态性与单倍型的比较[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(4):518-526.
Wu JD, Lu LJ, Zuo WZ, et al. Comparison of HLA-DRB1, HLA-DQB1 and HLA-DPB1 gene polymorphisms and haplotypes in partial Han and Uyghur populations of Xinjiang region[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2016, 32(4):518-526.
- [16] Ozawa Y, Chiba J, Sakamoto S. HLA class II alleles and salivary numbers of mutans streptococci and lactobacilli among young adults in Japan[J]. Oral Microbiol Immunol, 2001, 16(6):353-357.
- [17] Altun C, Guven G, Orkunoglu F, et al. Human leukocyte antigen class II alleles and dental caries in a child population[J]. Pediatr Dent, 2008, 30(2):154-159.
- [18] In JW, Roh EY, Oh S, et al. Allele and haplotype frequencies of human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 from sequence-based DNA typing data in Koreans[J]. Ann Lab Med, 2015, 35(4):429-435.

(本文采编 王晴)