

儿童氟斑牙与维生素 D受体 FokI 基因多态性关系*

杨跃进¹, 王刚², 李世宏¹, 尹¹, 程学敏², 王娜², 崔留欣², 巴月²

摘要:目的 探讨儿童氟斑牙与维生素 D受体(VDR)FokI 基因多态性的关系。方法 选取河南省开封、通许 2县 8~12岁儿童高氟区 143人和对照区 94人为对象,按照氟斑牙患病情况分为高氟区患者组,高氟区非患者组及对照组;采用氟离子选择电极法检测尿氟含量,利用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术分析雌激素受体(VDR)FokI 基因多态性。结果 高氟区儿童氟斑牙患病率为 51.7%,对照区未检出氟斑牙患者;高氟区 VDR FokI 基因型分布频率氟斑牙患者为 FF 32.4% (24/74), Ff 45.9% (34/74), ff 21.6% (16/74);非患者为 FF 40.6% (28/69), Ff 36.2% (25/69), ff 23.2% (16/69),对照区儿童为 FF 31.9% (30/94), Ff 50.0% (47/94), ff 18.1% (17/94);3组儿童基因型频率分布差异无统计学意义($P > 0.05$);VDR FokI 基因型在高氟区不同性别儿童中分布相同,差异无统计学意义($P > 0.05$);VDR FokI 基因型在尿氟超标的氟斑牙患者和非患者中分布相同,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 高氟区儿童氟斑牙发生与 VDR FokI 基因型无明显关系。

关键词: 氟斑牙;基因多态性;维生素 D受体

中图分类号: R 188

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)02-0172-03

Relationship between vitamin D receptor FokI gene polymorphism and children's dental fluorosis YANG Yuejin, WANG Gang, LI Shihong et al Department of Endemic Disease, Kaifeng Municipal Center for Disease Prevention and Control (Kaifeng 475000, China)

Abstract Objective To explore the distribution of VDR FokI genotype in children who lived in areas with or without high fluoride and to evaluate the relationship between children's dental fluorosis and VDR FokI gene polymorphism. **Methods** Children aged 8 to 12 years born and raised in high fluoride areas and control areas in two counties of Henan province were recruited. They were divided into three groups according to dental fluorosis status: dental fluorosis group, non-dental fluorosis group from high fluoride area and control group. The FokI marker of VDR gene was genotyped using PCR-RFLP procedure. Fluoride levels in urine samples from the three groups were detected by fluoride ion selective electrode method. **Results** The prevalence rate of dental fluorosis in high fluoride areas was 51.7%. No dental fluorosis case was found in control areas. The frequency distribution of VDR FokI genotype was FF 32.4% (24/74), Ff 45.9% (34/74), ff 21.6% (16/74) in children with dental fluorosis; FF 40.6% (28/69), Ff 36.2% (25/69), ff 23.2% (16/69) in children without dental fluorosis from high fluoride areas; and FF 31.9% (30/94), Ff 50.0% (47/94), ff 18.1% (17/94) in the children from control areas respectively. There was no significant difference among the three groups ($P > 0.05$).

Conclusion There was no correlation between dental fluorosis and VDR FokI polymorphism.

Key words dental fluorosis; gene polymorphism; vitamin D receptor

地方性氟中毒是一种慢性全身性疾病,主要表现为氟斑牙和氟骨症。近年来,对氟中毒发病机制的深入研究中,与骨代谢疾病有关的基因多态性研究受到关注,但氟斑牙作为骨代谢疾病,关注遗传易感性对其影响的研究较少。以往研究发现,并非高氟区内暴露水平较高儿童都患氟斑牙^[1],因此可能与遗传易感性有密切关系。已有研究发现,维生素 D受体(vitamin D, VDR)基因多态性与骨代谢相关疾病有关^[2-3]。氟斑牙作为氟中毒的主要表现是否与 VDR 基因多态性有关,目前尚不清楚。本研究采用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,对 2006年采集的河南省开封地区高氟区及对照区 237名 8~12岁儿童外周血进行 VDR FokI 基因多态性分析,以探讨儿童氟斑牙与 VDR FokI 基因型之间的关系,为地方性氟病防治提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 对象 在监测水氟浓度的基础上,分别选择河南省开封市开封及通许 2县为调查点,其中每县分别包括 1个高氟区

(水氟测定结果 $> 2.0 \text{ mg/L}$)、1个对照区(水氟测定结果 $< 1.0 \text{ mg/L}$)。除水氟浓度不同,高氟区与对照区其他自然状况、经济条件、人口构成、农作物种类、生活习惯等条件均相似,2区饮水钙、镁离子浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。整群随机抽取每地各 2所学校 8~12岁儿童进行健康体检,排除临床上患有影响钙磷代谢疾病和近期服用钙制剂的儿童后,共 237名儿童符合调查要求,其中高氟区 143人,对照区 94人;所有儿童检查氟斑牙患病情况,并依据氟斑牙患病情况将高氟区儿童分为高氟区患者组(74人)及高氟区非患者组(69人)。全部调查对象均知情同意。

1.2 仪器与试剂 温度梯度 PCR 仪(德国 Bimeta公司);PF-1型 pH 离子测定仪(上海电元器件厂);TGL-16G 台式高速离心机(上海安亭公司);Bio Imaging System(美国 SYNGEN公司)。全血基因组 DNA 小量制备试剂盒(美国 Axyprep Biosciences 公司,批号:20050420);限制性内切酶 FokI(立陶宛 MBI公司);Taq 酶(日本 TaKaRa公司);

1.3 生物样本的采集及测定 采集对象空腹静脉血 6mL,即时尿液 10 mL,分别用于多态性分析及尿氟测定。尿氟测定应用氟离子选择电极法;以尿氟浓度超过 1.5 mg/L 判断为高氟负荷状态^[4]。

1.4 儿童氟斑牙检查及结果判定 由口腔科执业医师和地氟病防治公共卫生执业医师按照 Dean 法诊断氟斑牙,计算氟

* 基金项目:国家自然科学基金(81072247);河南省自然科学基金(102300410073)

作者单位: 1. 开封市疾病预防控制中心地方病科,河南 475000
2. 郑州大学公共卫生学院环境卫生学教研室

作者简介: 杨跃进(1960-),男,河南郑州人,副主任医师,本科,研究方向:地方病学。

通讯作者: 巴月, E-mail: bayue1963@hotmail.com

班牙 (dental fluorosis, DF) 患病率和氟斑牙指数 (community fluorosis index, CFI)^[5]。CFI反应病区不同程度氟斑牙患者的比例, CFI越大, 表明病区患者中中、重度患者所占比例越高。

$CFI = [(可疑人数 \times 0.5) + (极轻人数 \times 1) + (轻度人数 \times 2) + (中度人数 \times 3) + (重度人数 \times 4)] / 被检查总人数。$

1.5 基因组 DNA 的提取及 PCR-RFLP

1.5.1 全血基因组 DNA 提取 应用全血基因组 DNA 小量制备试剂盒。

1.5.2 PCR-RFLP 以 VDR 第 2 外显子的 FokI RFLP 为检测标志物。引物^[6]由上海生工生物工程技术有限公司合成, 上游引物 5'-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT-3, 下游引物 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3 扩增片段长度为 265 bp。每个 PCR 反应体系 50 μL, 包括 Mg²⁺ 1.5 mM, dNTP 200 μM, Taq 酶 2.5 U, 0.5 μL 引物, 基因组 DNA 200 ng, PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 20 s, 53℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 35 次, 72℃ 末端延伸 5 min。应用限制性内切酶 FokI 对 PCR 产物进行酶切, 反应体系为 20 μL, 含扩增产物 10 μL, FokI 内切酶 10 U, 于 55℃ 水浴 4 h。反应产物经 25 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后凝胶成像仪下观察结果, 以 FokI 内切酶的第一个字母作为标记, 以出现或不出现 FokI 切点分别记为 F 和 F。

1.6 统计分析 所有数据均采用 SPSS 12.0 软件进行分析。以 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验确定对照组遗传平衡状况, 结果基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P = 0.850$)。运用列联表资料的 χ^2 检验分析 VDR FokI 各基因型在不同组别儿童中分布。非条件 Logistic 回归计算比值比 (OR) 以及 95% CI 用于进行危险度评价。以年龄作为多元回归分析中的混杂因素, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 调查对象基本情况 调查对象中被诊断为氟斑牙患者 74 例, 均来自高氟区, 高氟区氟斑牙患病率为 51.7% (74/143), 氟斑牙指数为 1.35, 对照区氟斑牙指数为 0.021。高氟区和对照区儿童尿氟超标率分别为 84.6% (121/143) 和 9.6% (9/94), 高氟区氟斑牙患者年龄大于非患者 ($P < 0.05$)。

2.2 不同组别儿童尿氟测定结果 (表 1) 3 组儿童尿氟差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 氟斑牙患者中 89.2% (66/74)、高氟区非患者中 79.7% (55/69) 尿氟超标, 对照区儿童中 9.6% (9/94) 尿氟超标, 高氟区患者及非患者尿氟均高于对照区健康儿童, 其差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 但高氟区患者及非患者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 不同组别儿童尿氟测定结果比较

组别	例数	尿氟范围	尿氟 ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
高氟区患者	74	1.05~5.71	2.49 ± 0.79		
高氟区非患者	69	1.14~5.14	2.33 ± 0.75	164.99	0.00
对照区	94	0.11~2.30	0.81 ± 0.45 ^a		

注: 与高氟区 2 组儿童比较, $aP < 0.01$ 。

2.3 儿童外周血 VDR FokI 基因型分布及其与氟斑牙关系

2.3.1 各组儿童 VDR FokI 基因型分布比较 (表 2) VDR FokI 基因型在 3 组儿童中的分布比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.28 P > 0.05$); 高氟区患者与非患者等位基因频率比

较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.043 P > 0.05$; OR = 0.952, 95% CI = 0.595~1.521)。

表 2 不同组别儿童 VDR FokI 各基因型及等位基因频率分布 (人数, %)

组别	人数	基因型			等位基因频率	
		FF	Ff	ff	F	f
高氟区患者	74	24 (32.4)	34 (45.9)	16 (21.6)	82 (55.4)	66 (44.6)
高氟区非患者	69	28 (40.6)	25 (36.2)	16 (23.2)	81 (58.7)	57 (41.3)
对照区	94	30 (31.9)	47 (50.0)	17 (18.1)		

注: 经年龄校正。

2.3.2 不同性别氟斑牙儿童 VDR FokI 基因型分布比较 高氟区氟斑牙男性患者 33 人, 患病率为 44.6% (33/74), 女性患者 41 人, 患病率为 59.4% (41/69), 不同性别儿童氟斑牙患病率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.14 P > 0.05$)。VDR FokI 基因型在不同性别氟斑牙儿童中的分布差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.12 P > 0.05$)。

2.3.3 尿氟超标儿童 VDR FokI 基因型分布比较 (表 3) 在调整年龄因素后, 以 ff 基因型为参照, 分别检验其他 2 种基因型对儿童氟斑牙易感性的影响, 在尿氟超标的氟斑牙患者和非患者中, VDR FokI 3 种基因型分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。VDR FokI 等位基因频率在 2 组之间差异亦无统计学意义 (OR = 0.76, 95% CI = 0.45~1.29)。

表 3 尿氟超标儿童中氟斑牙患者与非患者 VDR FokI 基因型分布 (人数, %)

组别	人数	基因型			等位基因频率	
		FF	Ff	ff	F	f
高氟区患者	66	21 (31.8)	31 (40.7)	14 (21.2)	73 (55.3)	59 (44.7)
高氟区非患者	55	24 (43.6)	20 (36.4)	11 (20.0)	68 (61.8)	42 (38.2)

注: 经年龄校正。

3 讨论

维生素 D 可以控制骨骼中钙与磷的贮存, 改善骨骼中钙磷的活动状态, 对骨吸收和骨形成起到直接作用^[7], 因此 VDR 基因的遗传多态性可能对维生素 D 的结合及生物学活性产生影响。牙齿的形成与骨骼有相似之处, 氟斑牙的某些病理改变也与氟骨症相似, 与成骨细胞活性、分泌型结构蛋白和多种蛋白酶以及包括钙、氟等离子在内的液体成分密切相关, 故 VDR 基因多态性可能与骨骼病理变化有关, 同时可能影响高氟区儿童氟斑牙的形成。FokI 多态性位点位于 VDR 基因第 2 外显子的起始区, 是目前所了解的 VDR 基因多态性中唯一一个改变氨基酸序列长度的位点^[8]。这种改变可能影响 VDR 基因 mRNA 的表达与稳定性, 造成其受体蛋白在数目或活力上的细微差异, 进而通过对其所调节基因的反式放大作用, 表现为骨密度及相关代谢指标的较大差异^[9]。

本次研究结果表明, 高氟区患者、非患者及对照区儿童 VDR FokI 基因型分布差异无统计学意义, 进一步对内暴露水平较高的氟斑牙患者与非患者的基因型分布进行比较, 也未发现 VDR FokI 基因型分布以及等位基因频率不同, 提示儿童氟斑牙发生与 VDR FokI 基因多态性之间无明显关系。该结果与章润真^[10]报道的 VDR FokI 基因多态性与所调查儿童氟斑牙发生无明显关系结果一致, 但与范勇等^[11]研究结果不尽相同。不同的研究结果提示, VDR FokI 多态性对牙

齿和骨骼或骨骼不同部位的影响不一致; Kanan^[12]与韩昕^[13]的研究结果显示, *FokI* 多态性位点与男性腰椎骨密度明显相关, 而与股骨颈骨密度无关。由于骨代谢受多种基因调控, 因此要阐明儿童氟斑牙易感性特征, 需要扩大样本含量, 并对更多的钙代谢相关基因多态性进行分析, 以便筛选出对氟敏感的基因型, 为保护易感人群提供实验依据。

参考文献

- [1] 丛旭滋, 李福成, 杨莹, 等. 贵州燃煤氟病区小学生氟斑牙病情与尿氟含量关系的分析探讨 [J]. 当代医学, 2009, 15(1): 6-7.
- [2] 周丽, 李宇宁, 金玉, 等. 维生素 D 受体基因多态性与婴幼儿佝偻病的相关性 [J]. 兰州大学学报, 2009, 35(4): 1-4.
- [3] 张红红, 陶国枢, 高宇红, 等. 我国四种民族维生素 D 受体基因多态性分布的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(1): 1-3.
- [4] 卫生部地方病防治司. 地方性氟中毒防治手册 [M]. 北京: 华夏出版社, 1991: 9-10.
- [5] Dean HT. Classification of mottled enamel diagnosis [J]. Am Dent Assoc, 1934, 21(8): 1421-1426.
- [6] Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ et al The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal

- Mexican American women [J]. Bone Miner Res, 1996, 11(12): 1850-1855.
- [7] 周向红. 维生素 D 受体基因多态性与骨代谢疾病研究进展 [J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(2): 107-109.
- [8] Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ et al The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of *FokI* variants [J]. Bone Miner Res, 1998, 13(11): 1691-1699.
- [9] Christakos S, Dhawan P, Benn B, et al Vitamin D: molecular mechanism of action [J]. Ann NY Acad Sci, 2007, 1116: 340-348.
- [10] 章润真, 潘莉, 岳岚, 等. 维生素 D 受体基因多态性与汉族儿童氟斑牙易感性的关系研究 [J]. 中国地方病学杂志, 2010, 29(3): 282-286.
- [11] 范勇, 张春莲, 易国勤, 等. VDR 基因多态性与儿童骨密度关系 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(11): 1317-1318.
- [12] Kanan RM, Varanasi SS, Francis RM, et al Vitamin D receptor gene start codon polymorphism (*FokI*) and bone mineral density in healthy male subjects [J]. Clin Endocrinol [Oxf], 2000, 53(1): 93-98.
- [13] 韩昕, 詹志伟, 张红红, 等. 北京部分汉族男性维生素 D 受体基因 *FokI* 多态性与骨密度的关系 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(24): 4763-4766.

收稿日期: 2010-08-13

(郑新编辑 郭长胜校对)

【论 著】

山东省鲁西北地区地方性氟中毒流行病学调查*

云中杰, 陈培忠, 边建朝, 王玉涛, 高杰, 马爱华, 刘源, 李亨祥

摘要: 目的 了解山东省鲁西北地区地方性氟中毒的流行现状, 为制定防制策略提供科学依据。方法 选择山东省鲁西北地区 11 个县进行水、尿氟含量测定、8~12 岁儿童氟斑牙诊断及临床和 X 线摄片检查氟骨症调查。结果 在 11 个县调查 17 个改水村, 水氟均值 ≤ 1.00 mg/L 的村 12 个, 占 70.59% (12/17); > 1.00 mg/L 的村 5 个, 占 29.41% (5/17); 水氟最大值为 4.46 mg/L; 调查 16 个未改水村, 水氟均值 ≤ 1.00 mg/L 的村 5 个, 占 31.25% (5/16); > 1.00 mg/L 的村 11 个, 占 68.75% (11/16), 水氟最大值为 4.09 mg/L; 8~12 岁儿童氟斑牙总患病率为 51.51% (701/1361), 氟斑牙指数为 1.05 缺损率为 6.25% (85/1361); 儿童尿氟均值在 > 1.40 mg/L 的占 60.86% (510/838), 最高值为 15.20 mg/L; > 16 岁成人的氟骨症临床和 X 线检出率分别为 2.49% (454/18257), 15.79% (3/19); 成人尿氟均值在 > 1.60 mg/L 的占 62.27% (406/652), 最高值为 25.44 mg/L。结论 山东省鲁西北地区地方性氟中毒病情尚未得到有效的控制, 防制形势依然比较严峻, 须进一步加大防制力度。

关键词: 地方病; 氟斑牙; 氟骨症; 流行病学调查; 鲁西北地区

中图分类号: R 188

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)02-0174-03

Endemic fluorosis in northwestern region of Shandong province YUN Zhong-jie, CHEN Pei-zhong, BIAN Jian-chao, et al Department of Endemic Fluorosis, Shandong Institute of Prevention and Control for Endemic Disease (Jinan 250014, China)

Abstract Objective To investigate the prevalence of endemic fluorosis in the northwestern region of Shandong province and to provide scientific evidence for making strategies for the prevention and control of the disease. **Methods** Eleven counties were chosen to carry out the investigation of endemic fluorosis. The content of fluoride in drinking water and urine was determined with F⁻ ion selective electrode. Dental fluorosis of children aged 8 to 12 years was diagnosed with Dean's method and skeletal fluorosis were diagnosed with clinic examination and X-rays. **Results** The investigation was conducted in 17 water improvement villages of 11 counties, among which 12 villages (70.59%) had water fluoride content ≤ 1.00 mg/L, 5 villages (29.41%) had water fluoride content > 1.00 mg/L and the highest water fluoride content was 4.46 mg/L. The investigation was also conducted in 16 non-water improvement villages in 11 counties, among which 5 villages (31.25%) had water fluoride content ≤ 1.00 mg/L, 11 villages (68.75%) had water fluoride content > 1.00 mg/L and the highest water fluoride content was 4.09 mg/L. The total prevalence of dental fluorosis among the children was 51.51% (701/1361). The index of dental fluorosis was 1.05 and the rate of dental damage was 6.25% (85/1361). The urinary fluoride values above 1.40 mg/L were found in 60.86% (510/838) of the children, with the highest urinary fluoride concentration

* 基金项目: 中央补助地方公共卫生专项资金地方病防治项目 (2008)

作者单位: 山东省地方病防治研究所地氟病科, 济南 250014

作者简介: 云中杰 (1956-), 男, 山东无棣人, 副主任医师, 本科, 主要从事地方病防治研究。