

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0256-02

非综合征性唇腭裂与同源异型盒基因1 多态性的相关性研究

张 力¹, 唐君玲², 梁尚争¹

(1.泸州医学院附属医院 口腔颌面外科; 2.血液内科, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的 采用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)方法研究同源异型盒基因(MSX)1外显子1的编码区,探讨非综合征性唇腭裂(NSCL/P)患者MSX1基因外显子1的编码区内是否存在基因突变。方法 采用聚合酶链反应(PCR)和单链构象多态性(SSCP)方法,以45名健康人为对照组,45名NSCL/P患者作为研究对象,分析MSX1基因多态性。结果 SSCP分析显示NSCL/P患者(45名)与对照组(45名)样本的电泳速率相同,提示无多态性存在。结论 MSX1基因外显子1未发现多态性的存在,其与NSCL/P患者之间无明显相关性。

[关键词] 同源异型盒基因; 非综合征性唇腭裂; 多态性

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A

Association of muscle segment homeobox gene 1 polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate ZHANG Li¹, TANG Jun-ling², LIANG Shang-zheng¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Dept. of Hematology and Oncology, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] Objective Muscle segment homeobox gene(MSX)1 has been proposed as a gene in which mutations may contribute to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate(NSCL/P). To study MSX1 polymorphisms in NSCL/P by means of polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism(PCR-SSCP), and investigate the association of MSX1 exons 1 polymorphisms with NSCL/P. Methods DNA were extracted from blood samples from NSCL/P and unrelated normal subjects. Genome DNA from peripheral leukocyte with these blood samples were extracted, which was used as template to amplify desired gene fragment of MSX1 exons 1 by means of polymerase chain reaction(PCR). The PCR products were examined by single-strand conformation polymorphism(SSCP). The MSX1 exons 1 polymorphisms were examined by sequencing if mutations were found. Results MSX1 genes of exon 1 mutation was not been found in the NSCL/P and unrelated normal subjects by SSCP. Conclusion No correlation between MSX1 exon 1 and NSCL/P was found. MSX1 exon 1 may not be a key gene(susceptibility gene) in NSCL/P.

[Key words] muscle segment homeobox gene; nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate; polymorphism

遗传因素是唇腭裂的主要致病因素之一。本实验对非综合征性唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P)患者基因组中同源异型盒基因(muscle segment homeobox gene, MSX)1外显子1进行研究,分析NSCL/P与MSX1基因间的关系。

1 材料和方法

1.1 样本来源

从泸州医学院附属医院住院的汉族患者中选取

单纯唇裂患者15名、唇裂并发腭裂者15名、单纯腭裂者15名,要求均无其他系统性、全身性以及遗传性疾病,年龄为2个月~27岁,平均12.5岁。随机选取在泸州医学院附属医院体检的汉族健康者45名,要求无家族史,且与唇腭裂患者无任何血缘关系,不伴有全身性、系统性和其他遗传性疾病,平均18岁。在征得患者本人或家属同意后,抽取静脉血5 mL,3%枸橼酸钠抗凝,-70℃保存。

1.2 主要实验试剂

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂盒、UNIQ柱式临床样品基因组抽提试剂盒、引物(上海生工生物工程公司),琼脂糖、丙烯酰胺、双丙烯酰胺(BBI公司,加拿大)。

[收稿日期] 2007-05-14; [修回日期] 2007-10-19

[基金项目] 四川省教育厅自然科学基金重点资助项目(2004-A065)

[作者简介] 张 力(1977-),男,山东人,助教,硕士

[通讯作者] 梁尚争, Tel: 0830-3165521

1.3 方法

1.3.1 基因组DNA的提取 对5 mL外周静脉血采用UNIQ柱式临床样品基因组抽提试剂盒提取基因组DNA,应用紫外分光光度计和0.8%琼脂糖凝胶电泳检测所提取基因组DNA的光密度值及纯度。

1.3.2 PCR引物设计和合成 MSX1基因有两个外显子,因而设计引物扩增MSX1外显子1的编码区。引物上游序列为: 5'-CTGCTGGGGAGGGGCG-3';下游序列为: 5'-GGCGAGGAGGTCTGGAACC-3'。

1.3.3 PCR扩增 扩增体系为: 5 μ L 10 \times PCR buffers、5 μ L 2mmol/L dNTPs、3 μ L 25mmol/L氯化镁、2.5 μ L引物1、2.5 μ L引物2、1 μ L Taq DNA多聚酶、25 μ L基因组DNA,加6 μ L去离子水至总体积50 μ L。

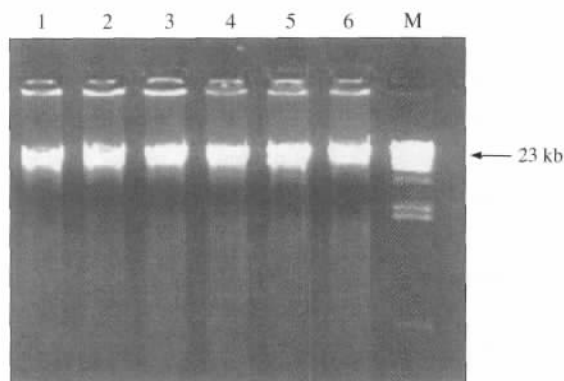
1.3.4 PCR反应条件 94 $^{\circ}$ C预变性5 min后,PCR循环条件为94 $^{\circ}$ C 30s、63 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 30s,共35个循环。最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min,4 $^{\circ}$ C保存。于Eppendorf PCR仪上扩增。

1.3.5 PCR产物电泳 PCR反应结束后,扩增产物各取4 μ L上样于1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,92 V进胶,80 V电泳,25 min后紫外透射观察,凝胶成像。

1.3.6 单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)分析 取1.5 μ L PCR产物,用变性液稀释至20 μ L,混匀后离心。将样品放入沸水浴中保温6 min后立即置于冰浴中,保温10 min。取4 μ L样品加入加样孔中,进行6%聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染、凝胶扫描。观察并记录电泳结果。

2 结果

PCR产物电泳后产生20 kb左右DNA片段(图1)。

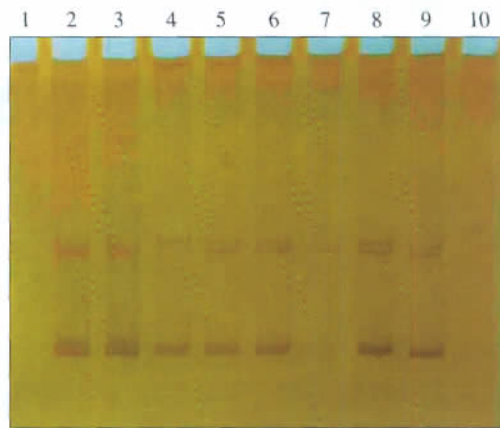


M: Marker(λ DNA/Hind III); 1、3、5: 病例组; 2、4、6: 对照组

图1 0.8%琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 The electrophoresis results of PCR products within 0.8% agarose gel

MSX1外显子1 DNA片段的SSCP分析结果见图2,被检测的45名NSCL/P患者及45名正常人中未发现异常带型。



1、7、10: 空白对照组; 2、4、6、8: 病例组; 3、5、9: 对照组

图2 PCR-SSCP电泳结果

Fig 2 The electrophoresis results of PCR-SSCP

3 讨论

同源盒基因为真核生物中一种DNA的短(180 bp)保守序列,编码60个氨基酸的DNA结合载体,称为同源结构。其功能是调控胚胎的早期发育,将早期胚胎细分为含有转化为特殊组织器官潜力的细胞群,参与特殊的躯体规划和早期图式形成,除同源结构域外,它们编码的蛋白大不相同^[1]。MSX1定位于4p16,具有促进生长发育和抑制分化的作用^[2],其突变与人类口面裂、牙发育不全等有关。对MSX1缺陷小鼠研究发现MSX1作为上游转录因子参与调控骨形态发生蛋白等的信号传导网络^[3]。人类连锁和连锁不平衡研究发现,MSX1基因特殊编码序列的突变,可使编码蛋白缺失,从而引起功能不足,导致腭突萌出缺乏,随之发生一期或二期腭裂^[4],突变使MSX1蛋白缺乏N端结构域,无法调节细胞周期素,故抑制分化。以上研究说明MSX1在哺乳动物颌面部发育过程中起重要作用。

在本实验中显示MSX1基因不存在多态性,与van den Boogaard等^[5]的研究结果不同。其研究发现MSX1基因外显子1内部存在点突变,其与唇腭裂的发生存在相关性,突变导致第752位核苷酸由C变为A,引起基因终止密码子的变异,从而使其编码产物功能变异。分析其原因,一种可能性是在中国南方,特别是四川籍汉族人种NSCL/P患者MSX1基因可能不存在变异,MSX1基因与NSCL/P患者之间可能无相关性;但是NSCL/P是多个基因出现突变引起的疾病,MSX1不是NSCL/P的唯一致病基因,其他相关基因也可能单独或同时起作用从而引起这一疾病。其次,遗传学研究表明同一基因的不同位点遗

用弱酸或酸脂发挥酸性功能。自酸蚀粘接系统中酸性单体的酸性比全酸蚀粘接系统中酸蚀剂的酸性弱,同时粘接过程不去除玷污层,酸蚀跟树脂渗透同时进行,致使牙本质脱矿较浅,粘接剂的渗透较浅^[16]。所以自酸蚀粘接系统形成的混合层薄,树脂突短小。同时也有学者发现全酸蚀与自酸蚀粘接系统在牙本质粘接中存在着不同的物质交换,而前者物质交换的程度超过后者,这也可以用来解释自酸蚀粘接系统形成的混合层薄^[17]。由于粘接界面的复杂性,还需使用多种观察方法联合研究,同时应进一步结合力学实验,从宏观、微观不同的角度来综合研究分析。

[参考文献]

[1] Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, et al. Non-cariou cervical lesions[J]. J Dent, 1994, 22(4) :195-207.

[2] Weber DF. Human dentine sclerosis: A microradiographic survey[J]. Arch Oral Bid, 1974, 19(2) :163-169.

[3] Kusunki M, Itoh K, Hisamitsu H, et al. The efficacy of dentine adhesive to sclerotic dentine[J]. J Dent, 2002, 30(2/3) 91-97.

[4] Tay FR, Pashley DH. Dental adhesives of the future[J]. J Adhes Dent, 2002, 4(2) :91-103.

[5] Perdigao J. Dentine bonding as a function of dentin structure[J]. Dent Clin North Am, 2002, 46(2) :277-301.

[6] 赵三军, 陈吉华, 吴 玮, 等. 牙本质粘接界面纳米渗漏的激光扫描共聚焦显微镜观察[J]. 临床口腔医学杂志, 2005, 21(12) : 718-720.

ZHAO San-jun, CHEN Ji-hua, WU Wei, et al. Nanoleakage observation in resin-dentin interface bonded with three adhesives under confocal laser scanning microscope[J]. J Clin Stomatol, 2005, 21(12) :718-720.

[7] 李 潇, 施长溪, 赵信义, 等. 牙本质表面状态对粘接界面影响的激光扫描共聚焦显微镜研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21

(1) :71-74.

LI Xiao, SHI Chang-xi, ZHAO Xin-yi, et al. Laser scanning confocal microscope study of wet bonding interface on different dentin bonding surfaces[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(1) :71-74.

[8] Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates[J]. J Biomed Mater Res, 1982, 16(3) 265-273.

[9] Inoue S, Vargas MA, Abe Y, et al. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin[J]. J Adhes Dent, 2001, 3(3) 237-245.

[10] Bitter K, Paris S, Martus P, et al. A confocal laser scanning microscope investigation of different dental adhesives bonded to root canal dentine[J]. Int Endod J, 2004, 37(12) :840-848.

[11] Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, et al. Morphological characterization of the interface between resin and sclerotic dentine[J]. J Dent, 1994, 22(3) :141-146.

[12] Porter AE, Nalla RK, Minor A, et al. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin[J]. Biomaterials, 2005, 26(36) :7650-7660.

[13] Kwong SM, Tay FR, Yip HK, et al. An ultrastructural study of the application of dentine adhesives to acid-conditioned sclerotic dentine[J]. J Dent, 2000, 28(7) :515-528.

[14] Tay FR, Kwong SM, Itthagarun A, et al. Bonding of a self-etching primer to non-cariou cervical sclerotic dentin: Interfacial ultrastructure and microtensile bond strength evaluation[J]. J Adhes Dent, 2000, 2(1) :9-28.

[15] Marshall GW Jr, Chang YJ, Saeki K, et al. Citric acid etching of cervical sclerotic dentin lesions: An AFM study[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(3) :338-344.

[16] Pereira PN, Okuda M, Sano H, et al. Effect of intrinsic wetness and regional difference on dentin bond strength[J]. Dent Mater, 1999, 15(1) :46-53.

[17] Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges[J]. Oper Dent, 2003, 28(3) 215-235.

(本文编辑 王 晴)

(上接第257页)

传方式可能不同⁶。再者,基因的突变是否影响蛋白质的功能,其功能可能还受到环境、种族、性别、分子调控网络等的制约。这就是为何相同的基因突变会有不同的临床表现。目前的研究结果大多来自高加索白人,而且在海外对唇腭裂候选基因的研究中还发现大部分候选基因包括MSX1的基因多态性在不同国家的人群及相同国家不同人群间存在着差异。众所周知,NSCL/P患者的发病是多基因、多因素的综合结果,MSX1基因其他位点多态性的存在和其他候选基因多态性的相互作用与NSCL/P患者之间的关系尚有待进一步的探讨。

[参考文献]

[1] Hewitt JE, Clark LN, Ivens A, et al. Structure and sequence of the human homeobox gene Hox7[J]. Genomics, 1991, 11(3) :670-

678.

[2] Hu G, Lee H, Price SM, et al. MSX homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1[J]. Development, 2001, 128(12) :2373-2384.

[3] Zhang Z, Song Y, Zhao X, et al. Rescue of cleft palate in MSX1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis[J]. Development, 2002, 129(17) :4135-4146.

[4] Satokata I, Maas R. MSX1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development[J]. Nat Genet, 1994, 6(4) :348-356.

[5] van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, et al. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans[J]. Nat Genet, 2000, 24(4) :324-343.

[6] Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, et al. Maternal cigarette smoking during pregnancy in relation to oral clefts[J]. Am J Epidemiol, 1990, 132(5) :926-932.

(本文编辑 王 晴)