

肌节同源盒-1 基因 A448T 多态性与山西部分人群非综合征性唇腭裂发病的相关性

谢耕耘, 南欣荣, 李点典

(山西医科大学第一医院口腔科 山西 太原 030001)

[摘要] 目的 探讨肌节同源盒(*msx*)-1 基因 A448T 的多态性与山西部分人群非综合征性唇腭裂(NSCL/P)发病间的关系。方法 以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法行 *msx*-1 基因 A448T 的多态性检测, 并行其遗传统计分析。结果 *msx*-1 等位基因频率在对照组和 NSCL/P 组之间的差异有显著性统计学意义($P < 0.01$), 对照组 T 位点频率明显高于 NSCL/P 组(对照组 0.55, NSCL/P 组 0.26)。结论 *msx*-1/A448T(rs13127820) 基因的多态性与山西部分人群 NSCL/P 发病可能相关, 此位点的 T 等位基因在 NSCL/P 的发生中可能起保护效应。

[关键词] 肌节同源盒-1 基因; 非综合征性唇腭裂; 基因多态性

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.05.006

Relationship between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and genetic polymorphisms of muscle segment homeobox gene-1 A448T XIE Geng-yun, NAN Xin-rong, LI Dian-dian. (Dept. of Stomatology, The First Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) and genetic polymorphism of muscle segment homeobox gene(*msx*)-1 A448T in Shanxi province population. **Methods** Case-control study design was employed. *msx*-1 genotypes were determined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism techniques. **Results** It was obvious difference between NSCL/P group and control group in *msx*-1 A448T mutation allele(T) frequency($P < 0.01$). The frequency of allele (T) of control group was higher than NSCL/P group(0.55>0.26). **Conclusion** We could confirm a significant association between *msx*-1/A448T polymorphism and NSCL/P in Shanxi province, China. T allele has protective effect in NSCL/P occurrence.

[Key words] *msx*-1 gene; nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate; genetic polymorphism

非综合征性唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without palate, NSCL/P)是一种复杂的由遗传和环境因素相互作用所致的多基因多因素的遗传性疾病^[1]。在众多候选基因中, 肌节同源盒(muscle segment homeobox, *msx*)-1 基因一直是研究的热点。本研究以中国山西部分人群为对象, 采用病例对照, 以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法检测 *msx*-1 基因 A448T 的多态性, 进一步探讨 *msx*-1 基因的多态性与 NSCL/P 发病间的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 NSCL/P 组 全血标本来源于山西医科大学第一医院口腔科 2008 年 6~11 月收治的 NSCL/P 患儿。全部病例经体格检查排除其他系统畸形或综合征之内的唇腭裂。其中, 男性 46 例、女性 54 例, 年龄最小 5 个月、最大 22 岁, 单发性唇裂 56 例、单发性腭裂 10 例、唇腭裂 34 例。

1.1.2 健康对照组 全血标本来源于山西医科大学第一医院体检科筛选的 80 名体检者, 其中男性 49 例、女性 31 例, 年龄最小 4 岁、最大 30 岁。全部行严格的体格检查, 以排除其遗传性和先天性疾病以及其他综合征性疾病及家族史。

1.2 基因多态性检测

1.2.1 样本采集 两组人员均来自山西地区, 标

[收稿日期] 2010-02-08; [修回日期] 2010-06-30

[基金项目] 山西省太原市科技计划基金资助项目(085191)

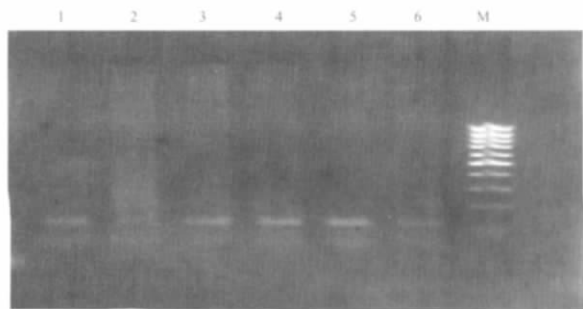
[作者简介] 谢耕耘(1975—), 男, 河北人, 硕士, 现工作于山西省大同市第五人民医院

[通讯作者] 南欣荣, Tel: 13903434186

本采集时征得受试对象及其家长的同意。采集静脉外周全血 2 mL，乙二胺四乙酸钠抗凝，迅速置于 -20 °C 冰箱内冷冻备用。

1.2.2 DNA 提取 于 -20 °C 冰箱中取出血液标本，室温下自然溶解，采用酚-三氯甲烷法提取全血白细胞基因组 DNA。Gene quant pro 核酸分析仪 (Eppen Dorf 公司，德国) 对 DNA 进行定量，并将其稀释到 100 g·L⁻¹ 备用。

1.2.3 PCR 扩增 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。A448T 基因的引物序列为 F：5'-AGAAGATGCGCTCGTCAAAG-3'，其中 GC 50.00%，解链温度 (T_m) 57.80 °C，扩增长度 109 bp；rs13127820 的引物序列为 R：5'-CCTGGGTT-CTGGCTACTCACT-3'，其中，GC 54.14%， T_m 61.92 °C，扩增长度 109 bp。扩增反应体系：总反应体系 50 μL，其中上下游引物各 0.2 μL，10 倍缓冲液 5.0 μL，Taq 酶 2.0 μL，25 mmol 氯化镁 4.0 μL，试验样品 DNA 10.0 μL。94 °C 变性 4 min，扩增循环条件为 94 °C 20 s、56 °C 20 s、72 °C 30 s，共 35 个循环，最后 72 °C 延伸 4 min。质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色检测 PCR 扩增结果 (图 1)。



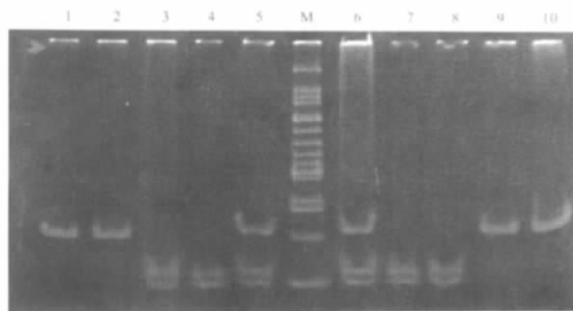
1-6 为 PCR 扩增产物，约 109 bp；M 为 50 bp DNA 标志物。

图 1 msx-1 基因的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of msx-1 gene

1.2.4 扩增产物 PCR-RFLP 分析 以限制性内切酶 *BtsC* 酶切消化 A448T 的扩增产物。此 *BtsC*

酶切反应在 25 μL 反应体系中进行，其中扩增产物 20 μL、*BtsC* 0.5 μL，补水至 25 μL 混匀后 50 °C 温育 15 h。再以聚丙烯酰胺凝胶 60 V 恒压电泳 4 h，将其凝胶移入 EB 溶液，染色 30 min。紫外灯下观察凝胶，照相，记录基因型 (图 2)。



1、2、9、10 为 TT，5、6 为 AT，3、4、8 为 AA，M 为 50 bp DNA 标志物。

图 2 msx-1 A448T 的 PCR-RFLP 扩增产物的 *BtsC* I 酶切电泳图

Fig 2 *BtsC* I enzyme cut electropherogram of PCR-RFLP of amplification products of msx-1 A448T

1.3 统计学分析

以 SPSS 13.0 统计学软件分析 NSCL/P 组和对照组 msx-1 的等位基因及其频率，同时行其相关优势率 (OR) 分析和 95% 可信区间 (95% CI) 估计。

2 结果

2.1 A448T 的基因分型

A448T 扩增目的片段长 109 bp，经过酶切后共产生 3 个片段；448AA 野生型只有 109 bp，A→T 突变后产生一个酶切位点；扩增片段本身就含有一个酶切位点。因此，纯和突变型 448TT 产生 58 bp 和 51 bp 两个片段，突变杂合型 448AT 则产生 109 bp、51 bp 和 58 bp 三个片段 (图 1、2)。

2.2 NSCL/P 组和对照组的等位基因频率

msx-1 等位基因分布在 NSCL/P 组和对照组的差异有显著性统计学意义，对照组 T 位点频率明显高于 NSCL/P 组 (表 1)。

表 1 NSCL/P 组和对照组的 msx-1 等位基因频率及其 OR 和 95% CI

Tab 1 msx-1 frequency of mutant allele and OR and 95% CI in NSCL/P cases and controls

组别(例数)	等位基因			χ^2	P 值	OR	95% CI
	基因	频数	频率				
对照组(80)	A	36	0.45
	T	44	0.55
NSCL/P 组(100)	A	74	0.74	7.93	0.0048 ⁰	0.288	0.118-0.698
	T	26	0.26

注：⁰NSCL/P 组与对照组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

近来,国内外学者以 PCR 技术从血液中提取 DNA,对 *msx-1* 基因突变与 NSCL/P 发病间的关系作了大量的研究。Lidral 等^[2]证实, *msx-1* 等位基因与 NSCL/P 患儿的连锁不平衡统计分析结果有关联性,同时在 *msx-1* 等位基因上发现了可改变基因正常功能的数种罕见突变。Jezewski 等^[3]对 *msx-1* 基因进行测序分析,48 个变异位点被识别。2004 年, Vieira 等^[4]在对智利 45 个 NSCL/P 家系进行的研究中发现, *msx-1* 基因的 G16D 错义突变可能破坏了一个剪接位点,故导致唇腭裂的形成。同年, Suzuki 等^[5]在对越南 168 名散在 NSCL/P 病例和 7 个有阳性家庭史的家系测序分析时,发现了 *msx-1* 基因的 P147Q 和 G98E 错义突变。De Muynck 等^[6]在一唇腭裂家系的 3 个个体中发现了一个新的 *msx-1* 突变 C559T,而 C559T 导致编码氨基酸由谷氨酸转变成终止信号。

2006 年, Tongkobpetch 等^[7]发现在泰国的唇腭裂患儿中,2% 的有 *msx-1* 基因突变,并且有 8 个突变位点。同年, Lace 等^[8]在对拉脱维亚人口进行的研究中,证实了 *msx-1* 基因突变在其 NSCL/P 患儿中的病因学作用。2007 年, Park 等^[9]以 52 名韩国 NSCL/P 患儿为研究对象,对其 *msx-1* 基因内部及其周围 9.8 kb 的序列行测序分析,结果发现了 6 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点。其中,位于第 2 外显子的第 6 个 SNP、1170G/A 在韩国 NSCL/P 患儿中有着显著意义:当以基因型 GG 为参照时,等位基因 A 的患病风险显著下降;当以等位基因 A 为参照时,患此病的风险随着等位基因 G 出现率的增加而增大。

2007 年,吴平安等^[10]从 *msx-1* 基因的 DNA 入手,以其内含子区的(CA)_n微卫星作为遗传标志,对中国湖南汉族 129 例 NSCL/P 患儿和 108 名正常儿童采用 PCR-变性聚丙烯酰胺凝胶基因分型技术行基因分型,结论为 *msx-1* 基因可能与湖南汉族人群 NSCL/P 的发病相关。Marazita 等^[11]则认为:在高加索人中, *msx-1* 基因与 NSCL/P 的发病有关;但在菲律宾人和中国的上海人中, *msx-1* 基因与 NSCL/P 的发病则无关。黄永清等^[12]以酚-三氯甲烷法从血液中提取 DNA,在对中国西部人群 *msx-1* 基因 SNP 与 NSCL/P 发病所作的相关性研究中发现,尚不能确定 *msx-1* 基因 3 个杂

合度高的具有代表性的 SNP 位点(Q147I、rs3821949 和 rs12532)与 NSCL/P 发病有相关性。此研究从一个侧面也印证了 NSCL/P 病因复杂。

本研究说明, A448T 多态性位点与 NSCL/P 的发病相关, T 等位基因在健康人群中的频率高,提示该等位基因在 NSCL/P 的发病中起保护效应。

4 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] Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, et al. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(2): 557-568.
- [3] Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate[J]. *J Med Genet*, 2003, 40(6): 399-407.
- [4] Vieira AR, Castillo Taucher S, Aravena T, et al. Mutational analysis of the muscle segment homeobox gene 1 (MSX1) in Chilean patients with cleft lip/palate[J]. *Rev Med Chil*, 2004, 132(7): 816-822.
- [5] Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, et al. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate[J]. *Genet Med*, 2004, 6(3): 117-125.
- [6] De Muynck S, Schollen E, Matthijs G, et al. A novel MSX1 mutation in hypodontia[J]. *Am J Med Genet A*, 2004, 128A(4): 401-403.
- [7] Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V. MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population[J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(8): 671-676.
- [8] Lace B, Vasiljeva I, Dundure I, et al. Mutation analysis of the MSX1 gene exons and intron in patients with nonsyndromic cleft lip and palate[J]. *Stomatologija*, 2006, 8(1): 21-24.
- [9] Park J, Park BY, Kim HS, et al. MSX1 polymorphism associated with risk of oral cleft in Korea: Evidence from case-parent trio and case-control studies[J]. *Yonsei Med J*, 2007, 48(1): 101-108.
- [10] 吴平安, 李运良, 范国正, 等. MSX1 基因微卫星多态性与非综合征性唇腭裂的相关性研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2007, 24(3): 325-327.
- [11] Marazita ML, Field LL, Cooper ME, et al. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: Assessment of candidate regions[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2002, 39(2): 149-156.
- [12] 黄永清. 中国西部人群 IRF6、MSX1 基因 SNP 与非综合征性唇腭裂相关性的研究[D]. 四川: 四川大学, 2007.