· 论著 ·

转化生长因子 β 信号通路与非综合征型唇腭裂发病风险的基因-基因及基因-环境交互作用

侯天姣[1,2*],周治波[3*],王竹青[1],王梦莹[2,4],王斯悦[1,2],彭和香[1,2],郭煌达[1,2],李奕昕[1,2],章涵宇[1,2],秦雪英[1,2],武轶群[1,2],郑鸿尘[1],李 静[5],吴 涛[1,2△],朱洪平[3△]

[1. 北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系,北京 100191;2. 重大疾病流行病学教育部重点实验室(北京大学),北京 100191;3. 北京大学口腔医院·口腔医院口腔颌面外科,国家口腔医学中心,国家口腔疾病临床医学研究中心,口腔生物材料和数字诊疗装备国家工程研究中心,口腔数字医学北京市重点实验室,国家卫生健康委员会口腔医学计算机应用工程技术研究中心,国家药品监督管理局口腔材料重点实验室,北京 100081;4. 北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,北京 100191;5. 北京大学口腔医院·口腔医院儿童口腔科,国家口腔医学中心,国家口腔疾病临床医学研究中心,口腔生物材料和数字诊疗装备国家工程研究中心,口腔数字医学北京市重点实验室,国家卫生健康委员会口腔医学计算机应用工程技术研究中心,国家药品监督管理局口腔材料重点实验室,北京 100081]

[摘 要] **目的**:探索亚裔人群中转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)信号通路基因多态性与非综合征型唇裂合并或不合并腭裂(non-syndromic cleft lip with or without cleft palate,NSCL/P)的关联及可能存在的基因-基因、基因-环境交互作用。**方法**:选取 1 038 个 NSCL/P 核心家系作为研究对象。对 TGF-β 信号通路上的 10 个基因的 343 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)位点进行了传递不平衡检验(transmission disequilibrium test,TDT),采用条件 Logistic 回归模型进行基因-基因交互作用分析和基因-环境交互作用分析。研究收集的环境因素包括患儿母亲孕期吸烟、被动吸烟、乙醇摄入量以及维生素使用情况。由于患儿母亲孕期吸烟和饮酒暴露率较低(<3%),因此,仅对母亲孕期被动吸烟及补充多种维生素这两个环境因素与基因之间的交互作用进行了分析。采用 Bonferroni 法对结果进行多重检验校正,显著性的阈值设置为 $P = 1.46 \times 10^{-4}$。**结果**:共有 4 个基因的 23 个 SNP 位点与 NSCL/P 之间存在关联($P < 0.05$),但经过 Bonferroni 多重检验校正后,这些关联均未达到统计学显著性水平。经过 Bonferroni 多重检验校正之后,6 对 SNP[rs4939874(*SMAD2*)与 rs1864615(*TGFBR2*),rs2796813(*TGFB2*)与 rs2132298(*TGFBR2*),rs4147358(*SMAD3*)与 rs1346907(*TGFBR2*),rs4939874(*SMAD2*)与 rs1019855(*TGFBR2*),rs4939874(*SMAD2*)与 rs12490466(*TGFBR2*),以及 rs2009112(*TGFB2*)与 rs4075748(*TGFBR2*)]存在显著的统计学交互作用($P < 1.46 \times 10^{-4}$),基因-环境交互作用的分析没有达到多重检验校正阈值的显著结果。**结论**:未发现 TGF-β 通路基因多态性与 NSCL/P 的关联,该通路上部分基因可能通过基因-基因交互作用影响 NSCL/P 的发病风险。未来仍需其他独立研究的证据支持,以进一步的探索其中潜在的生物学机制。

[关键词] 非综合征型唇腭裂;转化生长因子 β 信号通路;全基因组关联研究;核心家系
[中图分类号] R195.4 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2024)03-0384-06
doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2024.03.002

Gene-gene/gene-environment interaction of transforming growth factor-β signaling pathway and the risk of non-syndromic oral clefts

HOU Tianjiao[1,2*], ZHOU Zhibo[3*], WANG Zhuqing[1], WANG Mengying[2,4], WANG Siyue[1,2], PENG Hexiang[1,2], GUO Huangda[1,2], LI Yixin[1,2], ZHANG Hanyu[1,2], QIN Xueying[1,2], WU Yiqun[1,2], ZHENG Hongchen[1], LI Jing[5], WU Tao[1,2△], ZHU Hongping[3△]

[1. Department of Epidemiology and Biostatistics, Peking University School of Public Health, Beijing 100191, China; 2. Key Laboratory of Epidemiology of Major Diseases (Peking University), Ministry of Education, Beijing 100191, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University School and Hospital of Stomatology & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Research Center of Oral Biomaterials and Digital Medical Devices, Beijing Key Laboratory of Digital Stomatology, NHC Research Center of Engineering and Technology for Computerized Dentistry, NMPA Key Laboratory for Dental Materials, Beijing 100081, China; 4. Department of Nutrition and Food Hygiene, Peking University School of Public Health, Beijing 100191, China; 5. Depart-

基金项目:国家自然科学基金(81573225)Supported by the National Natural Science Foundation of China (81573225)
△ Corresponding author's e-mail, twu@bjmu.edu.cn, zhuhongping@cndent.com
* These authors contributed equally to this work
网络出版时间:2024-04-16 10:07:53 **网络出版地址**:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20240412.2023.005.html

ment of Pediatric Dentistry, Peking University School and Hospital of Stomatology & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Research Center of Oral Biomaterials and Digital Medical Devices, Beijing Key Laboratory of Digital Stomatology, NHC Research Center of Engineering and Technology for Computerized Dentistry, NMPA Key Laboratory for Dental Materials, Beijing 100081, China]

ABSTRACT **Objective**: To explore the association between polymorphisms of transforming growth factor-β (TGF-β) signaling pathway and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) among Asian populations, while considering gene-gene interaction and gene-environment interaction. **Methods**: A total of 1 038 Asian NSCL/P case-parent trios were ascertained from an international consortium, which conducted a genome-wide association study using a case-parent trio design to investigate the genes affecting risk to NSCL/P. After stringent quality control measures, 343 single nucleotide polymorphism (SNP) spanning across 10 pivotal genes in the TGF-β signaling pathway were selected from the original genome-wide association study(GWAS) dataset for further analysis. The transmission disequilibrium test (TDT) was used to test for SNP effects. The conditional Logistic regression models were used to test for gene-gene interaction and gene-environment interaction. Environmental factors collected for the study included smoking during pregnancy, passive smoking during pregnancy, alcohol intake during pregnancy, and vitamin use during pregnancy. Due to the low rates of exposure to smoking during pregnancy and alcohol consumption during pregnancy (<3%), only the interaction between maternal smoking during pregnancy and multivitamin supplementation during pregnancy was analyzed. The threshold for statistical significance was rigorously set at $P=1.46\times10^{-4}$, applying Bonferroni correction to account for multiple testing. **Results**: A total of 23 SNPs in 4 genes yielded nominal association with NSCL/P ($P<0.05$), but none of these associations was statistically significant after Bonferroni's multiple test correction. However, there were 6 pairs of SNPs rs4939874 (*SMAD2*) and rs1864615 (*TGFBR2*), rs2796813 (*TGFB2*) and rs2132298 (*TGFBR2*), rs4147358 (*SMAD3*) and rs1346907 (*TGFBR2*), rs4939874 (*SMAD2*) and rs1019855 (*TGFBR2*), rs4939874 (*SMAD2*) and rs12490466 (*TGFBR2*), rs2009112 (*TGFB2*) and rs4075748 (*TGFBR2*) showed statistically significant SNP-SNP interaction ($P<1.46\times10^{-4}$). In contrast, the analysis of gene-environment interactions did not yield any significant results after being corrected by multiple testing. **Conclusion**: The comprehensive evaluation of SNP associations and interactions within the TGF-β signaling pathway did not yield any direct associations with NSCL/P risk in Asian populations. However, the significant gene-gene interactions identified suggest that the genetic architecture influencing NSCL/P risk may involve interactions between genes within the TGF-β signaling pathway. These findings underscore the necessity for further investigations to unravel these results and further explore the underlying biological mechanisms.

KEY WORDS Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate; Transforming growth factor-β signaling pathway; Genome-wide association study; Case-parent trio

非综合征型唇裂伴或不伴腭裂(non-syndromic cleft lip with/without palate,NSCL/P)是非综合征型唇腭裂最常见的亚型,是基因与环境因素共同作用的复杂疾病,其发病风险有可能受到基因-基因交互作用和基因-环境交互作用的影响。既往候选基因研究和全基因组关联研究(genome-wide association study,GWAS)等发现约60个常见风险位点[1],但仍有很大一部分未被发现的遗传危险因素,而交互作用是遗传因素影响疾病风险的重要形式之一[2],因此,探索基因-基因交互作用以及基因-环境交互作用有助于正确评价候选基因的病因学作用。

转化生长因子β(transforming growth factor-β,TGF-β)信号通路在促进腭融合方面起着重要作用[3-4]。TGF-β信号通路包含多个非综合征型唇腭裂的候选基因,既往研究以及meta分析发现*TGFB3*、*TGFB1*等基因与NSCL/P之间存在关联[5-10],但是研究结果尚存在不一致,且GWAS研究中未发现上述基因单位点多态性与NSCL/P之间的关联[11],因此,这些基因有可能通过TGF-β信号通路上的基因-基因交互作用以及基因-环境交互作用影响NSCL/P的发病风险,然而目前的研究尚不充分。为了探讨亚裔人群中TGF-β信号通路的基因多态性与NSCL/P的关系,本文采用核心家系设计,选取1 038个亚裔NSCL/P核心家系,针对TGF-β信号通路10个基因上的343个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism,SNP)进行关联分析以及基因-基因和基因-环境交互作用分析,以期为NSCL/P的遗传流行病学研究产出新的证据。

1　资料与方法

1.1　研究对象

唇腭裂危险基因和交互作用的国际合作研究项目[12]是一项采用核心家系设计方法进行的GWAS研究,在七个亚洲地区和六个欧美地区招募研究人群,该项目中由临床专家和医学遗传学专家负责非综合征型唇腭裂患者的诊断。本研究是在该项目基础上进行的亚裔人群数据分析,选取其中经主成分分析法确定的亚裔NSCL/P核心家系作为研究对

象,共有 1 038 个核心家系(3 114 人),核心家系由患儿及其父母双亲组成,研究对象均为医院来源的方便样本。本研究获得北京大学生物医学伦理委员会批准(批准号:IRB00001052-15081),研究对象(包括患者和健康人)均签署知情同意书。

1.2 环境暴露情况

通过问卷调查收集母亲孕期的环境因素暴露情况,包括母亲孕期吸烟、被动吸烟、乙醇摄入量以及维生素使用情况。环境因素暴露的时间定义为孕前 3 个月至怀孕后第 3 个月。在问卷中,被调查的母亲通过回答是或否来反映自身的环境暴露情况,母亲服用多种维生素未区分具体维生素的种类,母亲孕期的环境因素暴露收集情况见表 1。

表 1 母亲孕期环境因素暴露情况

Table 1 Exposure status among mothers of affected children during pregnancy

Exposure factor	Exposed, *n*	Unexposed, *n*	Missing information, *n*	Exposure rate/%
Smoking during pregnancy	29	1 007	2	2.80
Passive smoking during pregnancy	355	564	119	34.20
Alcohol consumption during pregnancy	21	1 004	13	2.00
Multivitamin supplementation during pregnancy	149	734	155	14.40

1.3 基因型测定和质量控制

纳入分析的 TGF-β 信号通路上的 10 个基因包括 *TGFB2*、*TGFBR2*、*TGFBR1*、*BAMBI*、*DCN*、*TGFB3*、*SMAD3*、*SMAD2*、*SMAD4*、*TGFB1*。使用的检测芯片为 Illumina Human610-Quad v. 1_B BeadChip(Illumina 公司,美国)。基因型数据质量采用如下控制标准:(1)父母亲人群中的等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$);(2)缺失率≤10%;(3)SNP 位点弱势等位基因频率(minor allele frequency, MAF)需≥1%;(4)父母和子女之间位点的孟德尔错误率≤5%。符合上述条件的位点进入下一步分析,相关计算通过 plink v1.07 软件实现。本研究的 10 个 TGF-β 信号通路基因的 SNP 位点共有 408 个,经过数据质量控制的筛选后,最终共有 343 个 SNP 位点纳入分析。

1.4 统计学分析

1.4.1 关联分析 采用核心家系设计方法,通过传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT)分析候选基因中每一个位点与疾病的关系。TDT 使用的分析软件为 plink v1.07。

1.4.2 基因-基因交互作用 采用 Cordell 法分析基因-基因交互作用,Cordell 法主要用于家系中进行二维基因-基因交互作用分析[13]。以患儿的基因型作为病例组,根据每一个核心家系中父母与患儿的基因型,将未传递给子代的基因型构建成虚拟同胞对照数据库,与患儿的基因型组成 1∶15 匹配的病例对照样本,在加性遗传模式下建立条件 Logistic 回归模型:

$$\mathrm{Logit}(P)=a_1x_1+d_1z_1+a_2x_2+d_2z_2+i_{aa}x_1x_2+i_{ad}x_1z_2+i_{da}z_1x_2+i_{dd}z_1z_2 \quad (1)$$

$$\mathrm{Logit}(P)=a_1x_1+d_1z_1+a_2x_2+d_2z_2 \quad (2)$$

模型中的 x 和 z 分别代表两个位点潜在基因型的哑变量,a 和 d 是哑变量效应的系数,i 为交互作用项的系数。用四个自由度(d*f*)的似然比检验(likelihood ratio test, LRT)比较上述两个模型,评估是否存在统计学意义的基因-基因交互作用。此方法仅考虑不同基因之间的交互作用,不考虑同一个基因内的 SNP 位点之间的交互作用。采用 R 软件(3.4.0)中的 trio 软件包(3.8.0)进行基因-基因交互作用分析。

1.4.3 基因-环境交互作用 与基因-基因交互作用分析中构建虚拟对照数据库类似,以患儿的基因型作为病例组,根据每一个核心家系中父母与患儿的基因型,将未传递给子代的基因型构建成虚拟同胞对照数据库,与患儿的基因型组成 1∶3 匹配的病例对照样本。在加性遗传的模式下建立条件 Logistic 回归模型来分析基因环境交互作用,即:

$$\mathrm{Logit}(P)=\beta_G(G)+\beta_{G\times E}(G\times E) \quad (3)$$

$$\mathrm{Logit}(P)=\beta_G(G) \quad (4)$$

模型 3 中 G 代表基因型,G 为 0、1 或 2,代表患儿基因型中弱势等位基因个数;E 代表环境因素,E 为 0 或 1,分别代表未暴露和暴露于环境因素;β 为模型的偏回归系数。采用 LRT 的方法对模型的偏回归系数进行检验。将模型 3 与仅含有基因型变量的模型 4 进行比较,可得到自由度为 1 的似然比统计量及其 P 值。拒绝无效假设时,提示模型中的位点与环境暴露因素之间的交互作用的差异具有统计学意义。模型 3 与无效假设模型进行比较,可得到自由度为 2 的似然比统计量及其 P 值。拒绝无效假设

提示在考虑基因环境交互作用后,模型中的位点多态性与疾病之间的关联的差异具有统计学意义。采用R软件(3.4.0)中的trio软件包(3.8.0)进行基因-环境交互作用分析。

1.4.4 显著性阈值　本研究纳入多个位点进行分析,因此采用Bonferroni法对关联分析及交互作用的结果进行多重检验校正,即0.05除以SNP个数,本研究显著性阈值定为$P=1.46\times10^{-4}$。

1.4.5 置换检验　对基因-基因交互作用分析后有显著性($P<1.46\times10^{-4}$)的结果进行置换检验。将病例和虚拟同胞对照状态进行10 000次随机化,得到交互作用检验统计量,置换检验的P值(empirical P)表示在10 000次置换检验中获得的检验统计量≥交互作用分析中观察到的检验统计量(likelihood ratio,LR)的概率。

2　结果

2.1　研究对象基本情况

研究对象包含1 038个亚裔核心家系,共3 114人。所有NSCL/P患儿中,单纯唇裂患儿占23.4%,唇裂合并腭裂占76.6%;男性患儿占65.6%,女性患儿占34.4%。

2.2　TDT检验

对343个SNP位点进行TDT检验,结果显示来自4个基因的23个SNP位点与NSCL/P存在关联($P<0.05$),分别是*TGFBR2*、*SMAD2*、*TGFB2*、*DCN*。在进行Bonferroni多重检验校正后,所有SNP位点的TDT检验结果均未达到统计学显著性水平($P>1.46\times10^{-4}$)。

2.3　基因-基因交互作用分析结果

对TGF-β信号通路上的10个基因进行SNP之间的交互作用分析,同一个基因上的位点之间不进行交互作用分析。一共有1 658对SNP位点之间的交互作用达到了名义上的显著性水平(即$P<0.05$),经过Bonferroni校正之后,有6对SNP位点之间的交互作用达到了统计学显著性水平($P<1.46\times10^{-4}$),分别为rs4939874(*SMAD2*)与rs1864615(*TGFBR2*),rs2796813(*TGFB2*)与rs2132298(*TGFBR2*),rs4147358(*SMAD3*)与rs1346907(*TGFBR2*),rs4939874(*SMAD2*)与rs1019855(*TGFBR2*),rs4939874(*SMAD2*)与rs12490466(*TGFBR2*),以及rs2009112(*TGFB2*)与rs4075748(*TGFBR2*)。置换检验得到的P值(empirical P)均<0.01,结果如表2所示。

表2　TGF-β信号通路基因-基因交互作用分析

Table 2　Gene-gene interaction analysis of TGF-β signaling pathway

Gene1	Chr_{Gene1}	Gene2	Chr_{Gene2}	SNP1	SNP2	MAF1	MAF2	LR	P value	Empirical P
SMAD2	18	*TGFBR2*	3	rs4939874	rs1864615	0.48	0.39	24.10	7.62×10^{-5}	<0.01
TGFB2	1	*TGFBR2*	3	rs2796813	rs2132298	0.24	0.21	23.54	9.88×10^{-5}	<0.01
SMAD3	15	*TGFBR2*	3	rs4147358	rs1346907	0.41	0.34	23.25	1.13×10^{-4}	<0.01
SMAD2	18	*TGFBR2*	3	rs4939874	rs1019855	0.48	0.38	23.02	1.25×10^{-4}	<0.01
SMAD2	18	*TGFBR2*	3	rs4939874	rs12490466	0.48	0.38	23.02	1.25×10^{-4}	<0.01
TGFB2	1	*TGFBR2*	3	rs2009112	rs4075748	0.14	0.37	22.77	1.40×10^{-4}	<0.01

TGF-β, transforming growth factor-β; Chr_{Gene1}, the chromosome on which gene1 is located; Chr_{Gene2}, the chromosome on which gene2 is located; SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, minor allele frequency; LR, likelihood ratio.

2.4　基因-环境交互作用分析结果

由于患儿母亲孕期吸烟和饮酒暴露率较低(<3%),本研究仅对母亲孕期被动吸烟及补充多种维生素与基因之间的交互作用进行了分析。表3列出了多重检验校正之前自由度分别为1和2时基因环境交互作用的P值均小于0.05的SNP位点,并列出了在不考虑交互作用的传递不平衡检验中这些SNP位点的P值。达到名义上的显著性水平($P<0.05$)的基因环境交互作用包括*SMAD2*、*SMAD3*、*TGFBR2*、*DCN*基因中的14个SNP与被动吸烟之间的交互作用,以及*DCN*、*BAMBI*、*SMAD2*、*TGFBR2*基因中的5个SNP与维生素补充之间的交互作用,但是经过多重检验校正之后,这些位点与环境危险因素之间的交互作用均未达到统计学显著性阈值($P>1.46\times10^{-4}$)。

3　讨论

非综合征型唇腭裂是最常见的颅面部先天畸形[14],该疾病严重影响患者的生活质量、心理健康、社会交往,并给其家庭带来极大的经济负担[15]。探索NSCL/P的病因将为明确其发病机制、制定有效的预防策略、更好地预测和降低人群

发病风险提供重要依据。本研究发现 *SMAD2* 与 *TGFBR2*、*TGFB2* 与 *TGFBR2*、*SMAD3* 与 *TGFBR2* 基因间存在基因-基因交互作用,影响 NSCL/P 的发生风险。

表 3 TGF-β 信号通路基因-环境交互作用分析结果

Table 3 Results of gene-environment interaction analysis of TGF-β signaling pathway

Chromosome	Gene	SNP	Position	MAF	χ^2	*P*(TDT)	LR (1d*f*)	*P*(LRT 1d*f*)	LR (2d*f*)	*P*(LRT 2d*f*)
Passive smoking during pregnancy										
18	*SMAD2*	rs3813071	43411179	0.27	4.14	0.04	12.75	3.57×10^{-4}	16.86	2.18×10^{-4}
18	*SMAD2*	rs8083993	43402114	0.27	4.48	0.03	11.82	5.87×10^{-4}	16.65	2.40×10^{-4}
15	*SMAD3*	rs16950543	65130135	0.16	1.38	0.24	11.68	6.30×10^{-4}	12.92	1.56×10^{-3}
18	*SMAD2*	rs10853557	43467495	0.26	5.04	0.02	11.64	6.40×10^{-4}	16.72	2.30×10^{-4}
3	*TGFBR2*	rs1461084	30724669	0.39	2.03	0.15	10.62	1.12×10^{-3}	12.69	1.75×10^{-3}
18	*SMAD2*	rs8089400	43417118	0.39	4.30	0.04	9.17	2.46×10^{-3}	13.30	1.30×10^{-3}
18	*SMAD2*	rs1995415	43429400	0.39	4.30	0.04	9.01	2.69×10^{-3}	12.99	1.51×10^{-3}
18	*SMAD2*	rs905313	43461891	0.34	3.72	0.05	7.88	4.99×10^{-3}	12.44	1.98×10^{-3}
15	*SMAD3*	rs2053295	65178793	0.12	0.00	0.96	7.86	5.04×10^{-3}	7.94	1.88×10^{-2}
3	*TGFBR2*	rs3773663	30705876	0.47	0.25	0.62	7.47	6.27×10^{-3}	7.65	2.18×10^{-2}
15	*SMAD3*	rs2053294	65186138	0.10	0.03	0.87	7.09	7.74×10^{-3}	7.10	2.88×10^{-2}
15	*SMAD3*	rs17293443	65224917	0.07	0.00	1.00	6.74	9.41×10^{-3}	6.83	3.29×10^{-2}
15	*SMAD3*	rs920293	65201479	0.08	0.38	0.54	5.13	2.35×10^{-2}	6.04	4.88×10^{-2}
12	*DCN*	rs1389057	90251542	0.41	4.15	0.04	4.21	4.01×10^{-2}	9.47	8.77×10^{-3}
Multivitamin supplementation during pregnancy										
12	*DCN*	rs7960169	90360991	0.05	0.21	0.64	10.04	1.53×10^{-3}	10.28	5.87×10^{-3}
12	*DCN*	rs7974879	90360968	0.05	0.29	0.59	9.81	1.73×10^{-3}	10.13	6.31×10^{-3}
10	*BAMBI*	rs2065693	29035015	0.27	1.13	0.29	4.59	3.22×10^{-2}	6.73	3.46×10^{-2}
18	*SMAD2*	rs1792658	43636603	0.48	3.34	0.07	4.53	3.32×10^{-2}	8.07	1.77×10^{-2}
3	*TGFBR2*	rs13075948	30658510	0.04	1.71	0.19	4.22	4.00×10^{-2}	6.06	4.84×10^{-2}

TGF-β, transforming growth factor-β; SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, minor allele frequency; *P* (TDT), *P*-value of the transmission disequilibrium test; LR (1d*f*), the likelihood ratio test statistic with one degree of freedom; LR (2d*f*), the likelihood ratio test statistic with two degrees of freedom; *P* (LRT 1d*f*), the *P*-value of the likelihood ratio test with one degree of freedom; *P* (LRT 2d*f*), the *P*-value of the likelihood ratio test with two degrees of freedom.

在非综合征型唇腭裂的病因学研究中,越来越多的研究关注到交互作用在疾病发生风险中的作用[16-18],而基于生物学通路的分析则从候选基因的生物学功能入手建立假设,得到的研究结果在一定程度上便于解释其潜在致病机制[19]。同时,探索基因-基因以及基因-环境交互作用有利于更准确地估计候选基因的病因学效应,进而助力风险评估及高危人群的确定,对于制定针对性的预防策略和干预措施亦具有重要意义。

本研究选取了在唇与腭的发育过程中起到重要作用的 TGF-β 信号通路,该通路基因变异可能导致各种口面和颅面畸形[20-21]。*TGFB1*、*TGFB2*、*TGFB3* 基因编码 TGF-β 家族的细胞因子和蛋白质,通过Ⅰ型受体和Ⅱ型受体(TGFβR1 和 TGFβR2)以及下游的 SMAD 蛋白质家族转导信号,该通路广泛参与调节细胞的增殖、分化、黏附、迁移等功能[22],多项研究证明该通路基因在以腭裂为特征的 Loeys-Dietz 综合征中起到重要作用[23]。*TGFB2* 基因位于染色体 1q41,编码该通路上的 TGFβ2 蛋白质,*SMAD2*、*SMAD3* 基因分别位于染色体 18q21.1、15q22.33,编码对应的 SMAD 家族的蛋白质,是 TGF-β 受体的下游作用因子。

TGFBR2 蛋白由位于染色体 3q24.1 的 *TGFBR2* 基因编码,是转录因子 TGF-β 直接结合的受体。TGFBR2 是一种独立于配体结合的组成型活性激酶,可使自身、TGFBR1 或其他受体磷酸化,这一特征是 TGF-β 通路上多种信号作用的基础[24]。TGF-β 配体可与质膜上的 TGF-β2 型受体结合,形成 TGF-β1 型受体与 TGF-β2 型受体的复合物。随后,TGF-β2 型受体使 TGF-β1 型受体磷酸化。反过来,活化的 TGF-β1 型受体又使 SMAD2 和 SMAD3 蛋白磷酸化。磷酸化的 SMAD2 和 SMAD3 蛋白与 SMAD4 蛋白形成复合物,SMAD4 蛋白随后被转运到细胞核中,调节特定靶基因的表达[25],这一生物

学途径可以协助我们理解和解释本研究中部分基因-基因交互作用的结果。

本研究结果提示即使没有显著的遗传主效应,候选基因仍可能通过交互作用影响疾病发生的风险。本研究发现 *SMAD2* 基因上的 rs4939874 位点与 *TGFBR2* 基因中的 3 个 SNP 位点(rs1864615、rs1019855、rs12490466)存在显著的交互作用,在中国台湾人群代谢综合征的研究中曾发现这两个基因可能存在统计学交互作用[26]。本研究亦发现了 *TGFB2* 与 *TGFBR2*、*SMAD3* 与 *TGFBR2* 之间存在显著的统计学交互作用。本研究结果仍需其他独立研究的证据支持,相关生物学机制仍有待阐明。

既往有部分候选基因研究以及 meta 分析发现了该信号通路上的相关基因可与 NSCL/P 之间存在关联[9],并可能通过基因-环境交互作用影响 NSCL/P 的发生风险[27]。本研究却没有发现类似的结果,原因可能在于不同研究的设计方法、不同研究对疾病表型的定义可能存在差异;在不同种族人群中开展的研究,种族异质性会造成结果的差异。另外,本研究中还有部分未收集和分析的环境危险因素,例如母亲孕期接触的环境污染物、药物摄入、感染等,这些因素可能直接或通过与 TGF-β 信号通路上的基因发生基因-环境交互作用,影响 NSCL/P 的发病风险。

综上所述,本研究利用 1 038 个 NSCL/P 亚裔核心家系,对 TGF-β 信号通路上 10 个基因中的 343 个 SNP 位点进行了关联分析、基因-基因交互作用分析以及基因-环境交互作用分析,结果表明该通路上的 *TGFB2* 与 *TGFBR2*、*SMAD2* 与 *TGFBR2* 以及 *SMAD3* 与 *TGFBR2* 基因可能通过交互作用影响亚裔人群中 NSCL/P 的发生风险。

(志谢:感谢参与此项研究的所有家庭对本项目的支持,感谢临床专家、调查现场和实验室的工作人员为此项目所做出的贡献。)

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明　侯天姣:设计研究思路,撰写论文,分析数据;周治波、王竹青:参与研究设计及数据的分析整理;王梦莹、王斯悦、彭和香、郭煌达、李奕昕、章涵宇、秦雪英、武轶群、郑鸿尘、李静:稿件修改;吴涛、朱洪平:总体把关和审定论文。

参考文献

[1] Awotoye W, Mossey PA, Hetmanski JB, et al. Whole-genome sequencing reveals de-novo mutations associated with nonsyndromic cleft lip/palate[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 11743.
[2] Razaghi-Moghadam Z, Namipashaki A, Farahmand S, et al. Systems genetics of nonsyndromic orofacial clefting provides insights into its complex aetiology[J]. Eur J Hum Genet, 2019, 27(2): 226-234.
[3] Won HJ, Kim JW, Won HS, et al. Gene regulatory networks and signaling pathways in palatogenesis and cleft palate: A comprehensive review[J]. Cells, 2023, 12(15): 1954.
[4] Li J, Rodriguez G, Han X, et al. Regulatory mechanisms of soft palate development and malformations[J]. J Dent Res, 2019, 98(9): 959-967.
[5] Smane-Filipova L, Pilmane M, Akota I. Immunohistochemical analysis of nestin, CD34 and TGFβ3 in facial tissue of children with complete unilateral and bilateral cleft lip and palate[J]. Stomatologija, 2016, 18(3): 98-104.
[6] Guo Z, Huang C, Ding K, et al. Transforming growth factor beta-3 and environmental factors and cleft lip with/without cleft palate[J]. DNA Cell Biol, 2010, 29(7): 375-380.
[7] Zhang W, Shen Z, Xing Y, et al. MiR-106a-5p modulates apoptosis and metabonomics changes by TGF-β/Smad signaling pathway in cleft palate[J]. Exp Cell Res, 2020, 386(2): 111734.
[8] Panetta NJ, Gupta DM, Slater BJ, et al. Tissue engineering in cleft palate and other congenital malformations[J]. Pediatr Res, 2008, 63(5): 545-551.
[9] Tang M, Wang Y, Han S, et al. Transforming growth factor-beta 3 gene polymorphisms and nonsyndromic cleft lip and palate risk: A meta-analysis[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2013, 17(12): 881-889.
[10] Shi X, Wang Q, Sun C, et al. Study on the role of methylation in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate using a monozygotic twin model[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2021, 143: 110659.
[11] 王竹青, 王苹, 吴雅慧, 等. 中国人群转化生长因子β信号通路上的基因多态性与非综合征型唇腭裂的关联研究[J]. 北京大学学报(医学版), 2015, 47(3): 384-389.
[12] Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4[J]. Nat Genet, 2010, 42(6): 525-529.
[13] Weinberg CR. Methods for detection of parent-of-origin effects in genetic studies of case-parents triads[J]. Am J Hum Genet, 1999, 65(1): 229-235.
[14] Mossey PA, Little J, Munger RG, et al. Cleft lip and palate[J]. Lancet, 2009, 374(9703): 1773-1785.
[15] Lewis CW, Jacob LS, Lehmann CU. The primary care pediatrician and the care of children with cleft lip and/or cleft palate[J]. Pediatrics, 2017, 139(5): e20170628.
[16] Azevedo CMS, Machado RA, Martelli-Júnior H, et al. Exploring GRHL3 polymorphisms and SNP-SNP interactions in the risk of non-syndromic oral clefts in the Brazilian population[J]. Oral Dis, 2020, 26(1): 145-151.
[17] 郝嫣汝, 王岩, 孙晓梅. 非综合征性唇腭裂环境因素的研究进展[J]. 中华整形外科杂志, 2019, 35(7): 702-705.
[18] Lara LDS, Coletta RD, Assis MR, et al. Exploring the role of the WNT5A rs566926 polymorphism and its interactions in nonsyndromic orofacial cleft: A multicenter study in Brazil[J]. J Appl Oral Sci, 2024, 32: e20230353.
[19] Li M, Wang H. Pathway analysis identified a significant association between cell-cell adherens junctions-related genes and nonsyndromic cleft lip/palate in 895 Asian case-parent trios[J]. Arch Oral Biol, 2022, 136: 105384.
[20] Yapijakis C, Davaria S, Gintoni I, et al. The impact of genetic variability of TGF-beta signaling biomarkers in major craniofacial syndromes[J]. Adv Exp Med Biol, 2023, 1423: 187-191.
[21] Saroya G, Hu J, Hu M, et al. Periderm fate during palatogenesis: TGF-β and periderm dedifferentiation[J]. J Dent Res, 2023, 102(4): 459-466.
[22] Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF-β family signaling[J]. Sci Signal, 2019, 12(570): eaav5183.
[23] Chen PY, Qin L, Simons M. TGF-β signaling pathways in human health and disease[J]. Front Mol Biosci, 2023, 10: 1113061.
[24] Vander AA, Cao J, Li X. TGF-β receptors: In and beyond TGF-β signaling[J]. Cell Signal, 2018, 52: 112-120.
[25] Hata A, Chen YG. TGF-β signaling from receptors to smads[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(9): a022061.
[26] Lin E, Kuo PH, Liu YL, et al. Transforming growth factor-β signaling pathway-associated genes SMAD2 and TGFBR2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13589.
[27] Babai A, Irving M. Orofacial clefts: Genetics of cleft lip and palate[J]. Genes (Basel), 2023, 14(8): 1603.

(2024-02-18 收稿)
(本文编辑:刘淑萍)