

# PRDM16基因及母亲孕期环境暴露因素与非综合征型唇腭裂相关性研究

殷斌 石冰 贾仲林

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唇腭裂外科, 成都 610041

**[摘要]** **目的** 探究PRDM16基因rs7525173、rs2236518、rs2493264及母亲孕早期吸烟饮酒与非综合征型唇腭裂(NSCL/P)发生的相关性。**方法** 收集157个患者-父母核心家系,采用连接酶检测反应(LDR)和直接测序两种方法进行基因分型,使用传递不平衡检验(TDT)、连锁不平衡检验(LD)等对数据进行统计分析。收集1 710例唇腭裂患者及956例健康新生儿,填写《唇腭裂患者流行病学调查问卷》,对孕期父母吸烟饮酒暴露因素进行分析。**结果** rs2236518位点C等位基因在腭裂组中存在过传递( $P<0.05$ ),其余位点在各组中均无明显统计学意义。母亲吸烟、母亲被动吸烟及母亲饮酒3个因素存在统计学差异( $P<0.05$ )。**结论** PRDM16基因rs2236518多态性与NSCL/P存在相关性,母亲吸烟、母亲被动吸烟及母亲饮酒与唇腭裂的发生存在密切联系。

**[关键词]** 非综合征型唇腭裂; PRDM16基因; 单核苷酸多态性; 传递不平衡检验; 连锁不平衡检验

**[中图分类号]** R 782.21 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2018.05.008

**Associations among PRDM16 polymorphisms, environmental exposure factors during mother's pregnancy, and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate** Yin Bin, Shi Bing, Jia Zhonglin. (State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Cleft Lip and Palate Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Supported by: The National Key Research and Development Plan Precision Medicine Project (2016YFC0905203); The National Natural Science Foundation of China (81271118); The National Natural Youth Science Foundation of China (81600849).  
Correspondence: Jia Zhonglin, E-mail: zhonglinjia@sina.com.

**[Abstract]** **Objective** We aimed to study the association between rs7525173, rs2236518, rs2493264 single nucleotide polymorphism (SNP) in the PRDM16 gene, smoking, alcohol exposures, and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P). **Methods** A total of 157 case-parent trios were selected, and SNPs were genotyped by using ligase detection reaction (LDR) and direct sequencing methods. Transmission disequilibrium test (TDT) and linkage disequilibrium (LD) tests were conducted to analyze the data. A total of 1 710 patients with orofacial clefts and 956 healthy newborns were enrolled in the epidemiological survey. The smoking and drinking exposures of parents during early pregnancy were analyzed. **Results** The C allele at rs2236518 was over-transmitted for NSCPO ( $P<0.05$ ). Statistical differences were observed among three factors, namely, maternal smoking, maternal passive smoking, and maternal drinking ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The rs2236518 at PRDM16 gene, maternal smoking, maternal passive smoking, and maternal drinking were closely related to the occurrence of NSCL/P.

**[Key words]** nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate; PRDM16 gene; single nucleotide polymorphism; transmission disequilibrium test; linkage disequilibrium

**[收稿日期]** 2018-01-03; **[修回日期]** 2018-07-06  
**[基金项目]** 国家重点研发计划精准医学研究项目(2016YFC09052-03); 国家自然科学基金(81271118); 国家自然科学基金青年科学基金(81600849)  
**[作者简介]** 殷斌, 硕士, E-mail: 17713554746@163.com  
**[通信作者]** 贾仲林, 副教授, 博士, E-mail: zhonglinjia@sina.com

唇腭裂是人类最常见的先天性颅面畸形之一<sup>[1]</sup>, 其发病率约为1%~2%。在不同种族间差异明显<sup>[2]</sup>。我国唇腭裂发病率为1.8%, 在出生缺陷发生率中排第二位<sup>[3]</sup>。

非综合征型唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with

or without cleft palate, NSCL/P) 是遗传因素/环境因素及其交互作用共同作用的结果<sup>[4]</sup>。随着分子遗传学和生物学方面技术的进步,越来越多的易感基因和区域被逐步发现,现已明确和NSCL/P相关的基因和染色体区域包括:候选基因IRF6、FOXE1、MSX1、BCL3、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 和染色体1p22、8q24、10q25、17q22、20q12等<sup>[5-11]</sup>。

PRDM16基因位于1号染色体p36.32,其主要作用是参与调节小鼠体内棕色脂肪组织的分化。2009年,Bjork等<sup>[12]</sup>观察到PRDM16基因内含子上的一个剪接突变可诱发小鼠发生完全性腭裂。由PRDM16基因编码的转录因子可以参与调节TGF- $\beta$ 信号通路,当PRDM16被敲除后TGF- $\beta$ 的表达也显著下调。Warner等<sup>[13]</sup>进一步发现在小鼠腭间充质细胞中PRDM16基因能参与调控包括TGF- $\beta$ 在内的多达122个基因。而当前大量研究结果已表明TGF- $\beta$ 在颅颌面发育过程中起非常重要的作用。由此认为在小鼠继发腭的形成过程中,PRDM16基因参与调节腭部间充质细胞的分化,其突变与腭裂的发生关系密切,但目前尚未见PRDM16基因与唇腭裂相关的人类遗传学报道。

此外,唇腭裂流行病学研究是探索唇腭裂发病机制的另一个重要途径,对NSCL/P进行流行病学统计分析,不仅能够探明其发生的相关因素,还能够基于发现的风险因素做好应对预防措施,从而达到减少唇腭裂发生的目的。吸烟和过量饮酒有害健康早已是人类的共识,当前众多研究<sup>[14]</sup>都支持吸烟酗酒等不良嗜好是导致胎儿畸形的重要因素。国内外有很多关于母亲吸烟饮酒与唇腭裂发生相关性的研究<sup>[15-16]</sup>,然而结果却不尽相同,而国内外对于父亲吸烟饮酒与唇腭裂发生相关性的研究相对较少。

因此,本研究将从遗传和环境两方面进行研究,首先选择PRDM16作为候选基因,从人类基因组计划数据库中选取杂合度大于10%的3个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点(rs7525173、rs2236518、rs2493264),验证PRDM16基因SNP与NSCL/P的相关性。再对唇腭裂患者父母吸烟和饮酒情况进行调查,并与同期正常新生儿父母作对比,观察孕期父母吸烟和饮酒对唇腭裂发生的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象和实验设计

本研究收集2006年1月—2012年1月期间于四川大学华西口腔医院唇腭裂外科住院手术的157例三人核心家系(表1)。所有研究对象均属于中国汉族人

群,且符合先天性NSCL/P诊断标准,不合并其他先天畸形或先天性疾病。签订书面知情同意后,采集患者及其父母外周全血5 mL。另外再收集2006年1月—2017年1月期间于四川大学华西口腔医院唇腭裂外科住院手术的1 710例唇腭裂患者,同时收集来自四川大学附属第二医院出生的健康新生儿956例,由参与者母亲详细填写《唇腭裂患者流行病学调查问卷》,对孕期母亲吸烟,被动吸烟及饮酒;父亲吸烟和父亲饮酒暴露因素进行统计分析。本研究获得伦理委员会批准。

表 1 患者的性别和裂隙分类

Tab 1 Classification of gender and fissure in patients

项目	NSCL/P	NSCPO	NSOCs
病例数	118	39	157
单发病例	109	34	143
有家族史病例	9	5	14
性别			
男性	79	19	98
女性	39	20	59

注: NSCPO为单纯性腭裂; NSOCs为NSCL/P和单纯性腭裂。

### 1.2 SNPs位点的选择和基因分型

从HapMap Project数据库(<http://www.hapmap.org>)中寻找杂合度大于10%的3个Tag SNPs位点(rs7525173、rs2236518、rs2493264), SNP分型主要采用连接酶检测反应(ligase detection reaction, LDR)和直接测序两种方法,均委托上海翼和生物技术应用有限公司(<http://www.biowing.com.cn/>)完成。所选SNPs位点信息,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物序列和探针序列见表2。

### 1.3 数据统计分析

分别对患者双亲rs7525173、rs2236518和rs2493264位点进行哈温平衡检验。使用Haploview软件对rs7525173、rs2236518和rs2493264进行连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析。使用FBAT软件对父母至少一方为杂合子的家庭进行传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT),检测等位基因在父母和患儿之间的传递情况。对怀孕期间母亲吸烟、母亲被动吸烟、母亲饮酒、父亲吸烟及父亲饮酒环境暴露因素采用卡方检验、Logistic单因素及多因素回归分析。

## 2 结果

### 2.1 哈温平衡检验和LD分析

rs7525173、rs2236518和rs2493264 3个SNP位点符合Hardy-Weinberg平衡( $P>0.05$ ),具有群体代

表性。通过Haploview 4.2软件进行LD分析，发现rs7525173位点与rs2236518位点D'值趋近于0， $r^2=0$ ，说明rs7525173位点与rs2236518位点没有发生连锁；

rs2236518位点与rs2493264位点D'值=0.695， $r^2<1$ ，说明这两个位点存在一定程度的连锁（表3）。

表 2 PRDM16基因各SNPs位点引物和探针序列

Tab 2 PCR primers and probe sequence of the SNPs at PRDM16

SNP	等位基因	PCR引物序列 (5'-3')	扩增长度/bp	探针序列
rs7525173	C/G	F: TCTGGCCAAGAAAACACCC	100	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGTAGTTCAGAA- ACGCATCGGG
		R: TCACCCGCAGGCTCTTATTC		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGTAGTTCAGA- AACGCATCGGC
rs2236518	A/C	F: CTTTTCAGCAGGAGCAGAAC	82	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGGATC- CGGAGACCAACGGT
		R: AAAACGGCGGGATGGGACTG		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGGA- TCCGGAGACCAACGGG
rs2493264	C/T	F: GGCAGGGGACCACAATCCA	99	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTATTTTAGACTCGAAG- CCTCG
		R: GTCTGCAAAACACTGCCTG		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTATTT

表 3 PRDM16基因3个SNP位点的配对LD检验

Tab 3 Paired LD test of the three SNPs at PRDM16

SNPs	D'值	95%可信区间	$\chi^2$ 值
rs7525173与rs2236518	0.035	-0.01, 0.23	0.000
rs7525173与rs2493264	0.185	0.01, 0.52	0.001
rs2236518与rs2493264	0.695	0.57, 0.79	0.140

## 2.2 PRDM16等位基因TDT分析

将双亲中含有杂合子的家系进行TDT分析，发现PRDM16基因rs2236518位点C等位基因在腭裂组中存在过传递 ( $P=0.0196$ )，表明rs2236518位点C等位基因是单纯性腭裂发生的危险因素。其余SNP位点在各裂隙组中均未发现明显统计学意义（表4）。

表 4 PRDM16基因各SNPs位点等位基因TDT检验结果

Tab 4 Allelic TDT results for SNPs in PRDM16

类型	SNP	等位基因	MAF	T/U	$\chi^2$ 值	P值
NSCL/P	rs7525173	G	0.10	28 : 21	1.0	0.317 3
	rs2236518	C	0.42	56 : 51	0.234	0.628 8
	rs2493264	T	0.18	36 : 34	0.057	0.811 0
NSCLP	rs7525173	G	0.10	35 : 28	0.778	0.377 8
	rs2236518	C	0.42	76 : 67	0.566	0.451 7
	rs2493264	T	0.18	51 : 47	0.163	0.686 2
NSCPO	rs7525173	G	0.10	7 : 7	0.0	1.0
	rs2236518	C	0.42	25 : 11	5.444	0.019 6
	rs2493264	T	0.18	15 : 13	0.143	0.705 5

注：NSCPO：单纯性腭裂；MAF：最小等位基因频率；T/U：传递/未传递。

## 2.5 多因素Logistic回归分析

将单因素Logistic分析筛选出的3个危险因素（母

## 2.3 孕早期环境暴露因素的卡方检验

卡方检验结果发现5个可能的危险因素：母亲吸烟、母亲被动吸烟、母亲饮酒、父亲吸烟、父亲饮酒。其中，母亲吸烟、母亲被动吸烟、母亲饮酒3个因素在病例组和对照组中存在统计学差异 ( $P<0.05$ )。没有发现父亲吸烟和父亲饮酒这2个因素在病例组和对照组中存在显著性差异 ( $P>0.05$ )（表5）。

## 2.4 唇腭裂环境暴露因素的单因素Logistic回归分析

以患儿是否发病为因变量，分别以上述发现的5个可能的危险因素为自变量进行Logistic单因素分析。结果显示：母亲吸烟、母亲被动吸烟及母亲饮酒有统计学意义 ( $P<0.05$ )（表6）。

亲吸烟、母亲饮酒和母亲被动吸烟)作为自变量进行多因素分析。Logistic回归分析结果显示：母亲吸

烟、母亲被动吸烟、母亲饮酒等3个因素在病例组和对照组中存在统计学差异 ( $P<0.05$ ), 且B值都为正值, 说明这3个因素都是唇腭裂发生的危险因素(表7)。

表 5 主要危险因素人数分布

Tab 5 People distribution of major risk factors

因素	病例组		对照组		$\chi^2$ 值	P值
	是	否	是	否		
母亲吸烟	44	1 666	2	954	20.207	0.000
母亲被动吸烟	424	1 286	83	873	103.377	0.000
母亲饮酒	425	1 285	74	882	118.037	0.000
父亲吸烟	859	851	496	460	0.667	0.414
父亲饮酒	1 085	625	575	381	2.849	0.091

表 6 Logistic单因素回归分析结果

Tab 6 The results of single factor regression analysis of Logistic

危险因素	P值	比值比	95%可信区间
母亲吸烟	0.000	12.598	3.047, 52.081
母亲被动吸烟	0.000	3.468	2.700, 4.455
母亲饮酒	0.000	3.942	3.035, 5.119
父亲吸烟	0.414	0.936	0.799, 1.097
父亲饮酒	0.092	1.150	0.978, 1.353

表 7 Logistic多因素回归分析结果

Tab 7 The results of multiple factor regression analysis of Logistic

危险因素	B	S.E	P值	比值比	95%可信区间
母亲吸烟	2.172	0.732	0.003	8.776	2.092, 36.815
母亲饮酒	1.094	0.138	0.000	2.985	2.280, 3.909
母亲被动吸烟	1.022	0.132	0.000	2.780	2.147, 3.599
常数项	-8.816	1.489	0.000	0.000	

### 3 讨论

NSCL/P是一种多基因遗传病, 其不符合孟德尔遗传模式, 具有显著的遗传异质性。资料显示遗传因素在NSCL/P的发生过程中所起作用大约可占到50%或者更高<sup>[17]</sup>。Warner等<sup>[18]</sup>在E13.5-E14.5老鼠胚胎中发现PRDM16基因在多部位都有表达, 包括心脏、大脑、四肢、腭部、鼻中隔、上唇等。动物模型显示, PRDM16基因缺失将会引起部分与TGF- $\beta$ 、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号通路相关基因的表达发生改变, 而这些基因在软骨及骨的改建中也发挥着极其重要的作用, 继而Warner等<sup>[19]</sup>在PRDM16<sup>(-/-)</sup>小鼠正在发育的继发腭中

也发现这些与骨形成相关基因的表达产生了变化, 这些数据表明, PRDM16可能通过调节间充质细胞向成骨细胞分化来促进腭部发育。此外, Bjork等<sup>[20]</sup>于2006年发现了位于小鼠PRDM16基因上的一个错义突变确实导致了单纯性腭裂的发生, 这更加证明PRDM16基因与NSCL/P的密切联系。

本研究从HapMap数据库中选取3个Tag SNPs位点, 研究其与中国汉族人群唇腭裂发生的相关性。TDT结果表明, rs2236518位点C等位基因是单纯性腭裂的危险因素。为了证实这3个Tag SNPs是否相互独立, 本研究进行了LD分析, 结果表明3个SNP间表现出弱连锁, 具有良好的代表性。本研究没有发现PRDM16基因rs7525173位点和rs2493264位点的SNP与唇腭裂的发生具有关联性, 这可能是由于rs7525173位点和rs2493264位点在汉族人群的最小等位基因频率较小, 需更大样本量才能得到更确切的结果。也可能是rs7525173位点和rs2493264位点均位于PRDM16基因的内含子区段, 没有直接参与PRDM16蛋白质的编码和合成。

环境及环境与遗传的交互作用在唇腭裂的发生中发挥着极其重要的作用。本研究证明孕期母亲吸烟、母亲被动吸烟及母亲饮酒与唇腭裂发生密切相关, 分别比对照组患病风险增加了8.776、2.780和2.985倍。这与大多数学者<sup>[21-22]</sup>的研究结果相一致, 因此母亲在孕期需要避免吸烟及被动吸烟, 尽量在空气流动度高的环境下活动, 勿摄取酒精及含酒精的饮料。本研究未发现父亲吸烟饮酒与子代唇腭裂发生存在显著的相关性, 目前国内外关于父亲吸烟及饮酒与唇腭裂发生相关性的研究也较少, 舒申友等<sup>[23]</sup>对广东地区105例唇腭裂患儿和110例正常儿童家属进行流行病学调查发现, 父亲吸烟对唇腭裂发生的影响与对照组相比无统计学意义。Mirilas等<sup>[21]</sup>报道父亲在母亲孕前和孕期吸烟, 其子代发生唇腭裂的概率是对照组的1.00~1.26倍。目前由于研究和样本量均较少, 对于母亲孕期父亲吸烟饮酒与唇腭裂发生的相关性还需进一步验证。

总之, 本研究证实了PRDM16基因rs2236518 SNP位点变异与单纯性腭裂强相关, 孕期母亲吸烟、被动吸烟和饮酒也是子代患NSCL/P的危险因素。

### [参考文献]

[1] Shkoukani MA, Chen M, Vong A. Cleft lip—a comprehensive review[J]. Front Pediatr, 2013, 1: 53.  
[2] Forrester MB, Merz RD. Descriptive epidemiology of oral clefts in a multiethnic population, Hawaii, 1986—2000[J].

- Cleft Palate Craniofac J, 2004, 41(6): 622-628.
- [3] 王翰章. 发展我国特色的唇腭裂治疗方法[J]. 口腔颌面外科杂志, 2008, 18(1): 1-5.
- Wang HZ. Development in Chinese way of treatment to cleft lip and palate[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2008, 18(1): 1-5.
- [4] Boehringer S, van der Lijn F, Liu F, et al. Genetic determination of human facial morphology: links between cleft-lips and normal variation[J]. Eur J Hum Genet, 2011, 19(11): 1192-1197.
- [5] Edwards M, Roddick L, Scott R. Autosomal dominant non-syndromic cleft lip and palate linked to chromosome 4[J]. Am J Hum Genet Suppl, 2003, 73: 672.
- [6] Levinson DF, Levinson MD, Segurado R, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part I: Methods and power analysis[J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(1): 17-33.
- [7] Field LL, Ray AK, Cooper ME, et al. Genome scan for loci involved in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in families from West Bengal, India[J]. Am J Med Genet A, 2004, 130A(3): 265-271.
- [8] Marazita ML, Field LL, Cooper ME, et al. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(2): 349-364.
- [9] Marazita ML, Field LL, Tunçbilek G, et al. Genome-scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate in consanguineous families from Turkey[J]. Am J Med Genet A, 2004, 126A(2): 111-122.
- [10] Neiswanger K, Ford MD, Cooper ME, et al. Genome scan of cleft lip with or without cleft palate (CL/P). II. Broadening the phenotype to include velopharyngeal incompetence (VPI) [J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(Suppl): 493.
- [11] Moreno LM, Arcos-Burgos M, Marazita ML, et al. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio[J]. Am J Med Genet A, 2004, 125A(2): 135-144.
- [12] Bjork BC, Turbe-Doan A, Prysak M, et al. PRDM16 is required for normal palatogenesis in mice[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(5): 774-789.
- [13] Warner DR, Mukhopadhyay P, Webb CL, et al. Chromatin immunoprecipitation-promoter microarray identification of genes regulated by PRDM16 in murine embryonic palate mesenchymal cells[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2012, 237(4): 387-394.
- [14] Hackshaw A, Rodeck C, Boniface S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls[J]. Hum Reprod Update, 2011, 17(5): 589-604.
- [15] Marshall EG, Harris G, Wartenberg D. Oral cleft defects and maternal exposure to ambient air pollutants in New Jersey[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010, 88(4): 205-215.
- [16] Wyszynski DF, Wu T. Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting[J]. Cleft Palate Craniofac J, 2002, 39(2): 188-192.
- [17] Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM. Syndromes of the head and neck[M]. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- [18] Warner DR, Horn KH, Mudd L, et al. A novel Smad binding protein expressed in murine embryonic orofacial tissue[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(6): 814-820.
- [19] Warner DR, Wells JP, Greene RM, et al. Gene expression changes in the secondary palate and mandible of PRDM16 (-/-) mice[J]. Cell Tissue Res, 2013, 351(3): 445-452.
- [20] Bjork BC, Vieira AR, Faust S, et al. Phenotypic, genetic, and developmental characterization of CPO1, a recessive ENU-induced mouse model of cleft palate[M]. Woodbury, NY: Mouse Molecular Genetics Cold Spring Harbor Press, 2006: 27.
- [21] Mirilas P, Mentessidou A, Kontis E, et al. Parental exposures and risk of nonsyndromic orofacial clefts in offspring: a case-control study in Greece[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2011, 75(5): 695-699.
- [22] Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, et al. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects[J]. Teratology, 1996, 54(1): 27-33.
- [23] 舒申友, 唐世杰, 吴燊荣, 等. 广东人群非综合征型唇腭裂发病危险因素研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(8): 962-966.
- Shu SY, Tang SJ, Wu SR, et al. Risk factors for nonsyndromic cleft lip and palate in Guangdong population[J]. Chin J Repar Construct Surg, 2010, 24(8): 962-966.

( 本文采编 石冰 )