



林久祥, 博士、资深教授、主任医师, 北京大学口腔医学院颌面生长发育研究中心主任,《中华口腔正畸学杂志》总编辑, Tweed 中国中心主席; 是我国培养的口腔正畸专业第一位博士, 1991 年破格晋升教授、主任医师双职称, 同年成为我国正畸界唯一获得国家教育委员会和国务院学位委员会授予的“做出突出贡献的中国博士学位获得者”, 1992 年获政府特殊津贴, 1993 年取得博士生导师资格, 1998 年被评为卫生部有突出贡献的中青年专家。曾任中华医学会正畸专业委员会主任委员; 在国内外正畸界首次提出了“健康矫治(正畸)理念”, 并研发出适宜实施该理念的传动矫正器及技术, 后者 2008 年被卫生部评为“十年百项”适宜推广技术, 与恒牙期骨性Ⅲ类牙颌畸形非手术矫治的突破一起, 于 2012 年获中华医学科技奖二等奖、北京市科技成果二等奖, 并于 2014 年在卫生部 24 项只选 2 项的竞争中, 胜出上报申请国家发明奖; 2018 年 12 月由 Tweed 中国中心授予“终身成就奖”。目前主要研究方向为非综合征型唇腭裂相关基础研究、传动矫正技术及健康矫治研究以及口腔颌面生长发育研究。



陈峰, 北京大学口腔医学院副研究员、博士生导师。负责北京大学口腔医学院中心实验室微生物平台, 是中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会委员、口腔科研管理分会青年委员。担任 *Ebiomedicine* 等多家杂志审稿专家, 近五年作为通信作者在 *Journal of Dental Research*、*Journal of Bone and Mineral Research*、*Oral Oncology*、*Frontiers in Microbiology*、*Protein & Cell* 等期刊发表 SCI 论文 50 余篇。主持国家自然科学基金面上项目在在的各级科研项目 4 项, 参与获得北京市科学技术三等奖 1 项。2018 年与北京大学基础医学院吴聪颖研究员联合申请获批北京大学医学交叉研究种子基金-中央高校基本科研业务费 (*ECM29* 基因突变在非综合征型唇腭裂发病中的作用与机制研究)。目前主要研究方向为颌面发育缺陷疾病(唇腭裂)的分子机制和口腔微生态(微生物宏基因组学与唾液蛋白组学)。

中国唇腭裂患者 Sonic hedgehog 信号通路相关单核苷酸多态性的分析

张杰锐^{1*}, 宋凤岐^{1*}, 周绍楠¹, 郑 晖¹, 彭丽颖¹, 张 倩², 赵望泓³, 张韬文⁴, 李巍然¹, 周治波⁵, 林久祥^{1△}, 陈 峰^{2△}

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院, 正畸科 国家口腔疾病临床医学研究中心 口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室 口腔数字医学北京市重点实验室, 北京 100081; 2. 北京大学口腔医学院·口腔医院中心实验室, 北京 100081; 3. 南方医科大学南方医院口腔科, 广州 510000; 4. 烟台市口腔医院口腔正畸科, 山东烟台 264000; 5. 北京大学口腔医学院·口腔医院口腔颌面外科, 北京 100081)

基金项目: 北大医学交叉研究种子基金(BMU2018MX017)-中央高校基本科研业务费、北大医学青年科技创新培育基金(BMU2018PY025)-中央高校基本科研业务费、国家自然科学基金(81870747, 81860194) Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities: Peking University Medicine Seed Fund for Interdisciplinary Research (BMU2018MX017), the Fundamental Research Funds for the Central Universities: Peking University Medicine Fund of Fostering Young Scholars' Scientific & Technological Innovation (BMU2018PY025), and the National Natural Science Foundation(81870747, 81860194)

△ Corresponding author's e-mail, jxlin@pku.edu.cn, chenfeng2011@hsc.pku.edu.cn

These author's contributed equally to this work

网络出版时间:2019-5-10 14:18:33 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20190509.1006.006.html>

[摘要] 目的:探讨 Sonic hedgehog (Shh) 信号通路相关的单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 与非综合征型唇腭裂 (non-syndromic cleft lip and/or palate, NSCL/P) 之间的关联,并对唇腭裂疾病的致病风险因素进行探索。**方法:**收集 197 个个体的外周血 (NSCL/P 患者 100 例,健康对照 97 例),基于国际人类基因组单体型图计划中中国北京汉族人口数据,使用 Haploview 软件进行单倍体型分析和标签 SNP 选择。针对 Shh 信号通路中的 4 个候选基因 *SHH*、*PTCHI*、*SMO* 和 *GLI2* 共选择了 27 个 SNP。使用 Sequenom 质谱技术检测 27 个 SNP 在 4 个 Shh 信号通路中候选基因的基因型,并进行分析。**结果:**所选择的 SNP 基本涵盖了候选基因的潜在功能性 SNP,其最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 0.05; *GLI2* 73.5%, *PTCHI* 91.0%, *SMO* 100.0%, *SHH* 75.0%。发现位于 *SMO* 基因的 SNP (rs12674259) 和位于 *PTCHI* 基因的 SNP (rs2066836) 的基因型频率在 NSCL/P 病例组和对照组之间的差异有统计学意义。同时在 4 个候选基因所在的 3 条染色体 (第 2、7、9 号染色体) 中均发现了连锁不平衡,但在连锁不平衡单倍体型分析中,病例组和对照组之间的差异无统计学意义。**结论:**提示 Shh 信号通路参与 NSCL/P 的发生,其信号通路中关键基因的某些特殊 SNP 位点与唇腭裂相关,为 NSCL/P 的病因研究提供了新的探索方向,可能为 NSCL/P 的早期筛查与风险预测提供帮助。

[关键词] 非综合征型唇腭裂;Sonic hedgehog;单核苷酸多态性;质谱检测

[中图分类号] R393 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2019)03-0556-08

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2019.03.027

Analysis of single-nucleotide polymorphism of Sonic hedgehog signaling pathway in non-syndromic cleft lip and/or palate in the Chinese population

ZHANG Jie-ni^{1*}, SONG Feng-qi^{1*}, ZHOU Shao-nan¹, ZHENG Hui¹, PENG Li-ying¹, ZHANG Qian², ZHAO Wang-hong³, ZHANG Tao-wen⁴, LI Wei-ran¹, ZHOU Zhi-bo⁵, LIN Jiu-xiang^{1△}, CHEN Feng^{2△}

(1. Department of Orthodontics, Peking University School and Hospital of Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Laboratory for Digital and Material Technology of Stomatology & Beijing Key Laboratory of Digital Stomatology, Beijing 100081, China; 2. Department of Center Laboratory, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China; 3. Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510000, China; 4. Department of Orthodontics, Yantai Stomatological Hospital, Yantai 264000, Shandong, China; 5. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship between Sonic hedgehog (Shh) associated single-nucleotide polymorphism (SNP) and non-syndromic cleft lip and/or palate (NSCL/P), and to explore the risk factors of cleft lip and/or palate. Many studies suggest that the pathogenesis of NSCL/P could be related to genes that control early development, in which the Shh signaling pathway plays an important role. **Methods:** Peripheral blood was collected from 197 individuals (100 patients with NSCL/P and 97 healthy controls). Haploview software was used for haplotype analysis and Tag SNP were selected, based on the population data of Han Chinese in Beijing of the international human genome haplotype mapping project. A total of 27 SNP were selected for the 4 candidate genes of *SHH*, *PTCHI*, *SMO* and *GLI2* in the Shh signaling pathway. The genotypes of 27 SNP were detected and analyzed by Sequenom mass spectrometry. The data were analyzed by chi-squared test and an unconditional Logistic regression model. **Results:** The selected SNP basically covered the potential functional SNP of the target genes, and its minimum allele frequency (MAF) was > 0.05; *GLI2* 73.5%, *PTCHI* 91.0%, *SMO* 100.0%, and *SHH* 75.0%. It was found that the genotype frequency of SNP (rs12674259) located in *SMO* gene and SNP (rs2066836) located in *PTCHI* gene were significantly different between the NSCL/P group and the control group. Linkage disequilibrium was also found on 3 chromosomes (chromosomes 2, 7 and 9) where the 4 candidate genes were located. However, in the analysis of linkage imbalance haplotype, there was no significant difference between the disease group and the control group. **Conclusion:** In China, NSCL/P is the most common congenital disease in orofacial region. However, as it is a multigenic disease and could be affected by multiple factors, such as the external environment, the etiology of NSCL/P has not been clearly defined. This study indicates that Shh signaling pathway is involved in the occurrence of NSCL/P, and some special SNP of key genes in this pathway are related to cleft lip and/or palate, which provides a new direction for the etiology research of NSCL/P and may provide help for the early screening and risk prediction of NSCL/P.

KEY WORDS Non-syndromic cleft lip and/or palate; Sonic hedgehog; Single-nucleotide polymorphism; Sequenom massarray

唇腭裂是人类最常见的先天性发育畸形之一,同时也是口腔颌面部最常见的发育畸形,不仅影响患儿容貌,也会对患儿的发音、咀嚼和吞咽等

产生不良影响。临床上根据是否伴有其他系统畸形或先天发育异常将其分为综合征型唇腭裂和非综合征型唇腭裂 (non-syndromic cleft lip and/or

palate, NSCL/P)。NSCL/P 在国内活产儿中的发病率大约为 1.62%^[1], 高于西方国家 1.42% 的发病率^[2]。

从病因学角度来看, NSCL/P 受多基因影响且与环境因素有关^[3]。通常认为影响胚胎发育, 调控颌面部或腭板相关细胞的增殖、分化、凋亡的基因与唇腭裂的相关性更高。研究证实多个基因与唇腭裂相关^[4-5], 不同的信号通路均参与调控唇腭部的发育^[6], 然而具体调控机制目前尚无定论。迄今为止与胚胎早期发育相关的多个基因和信号通路已被证实在 NSCL/P 的发生中发挥作用, 我们此前的研究显示血清中 RBP4 表达水平的下降和维生素 A 缺乏与新生儿的唇腭裂有关^[7]。

在众多信号通路中, Sonic hedgehog (Shh) 信号通路在生长发育尤其是胚胎早期发育过程中扮演着重要角色^[8-9]。Shh 信号通路影响脊椎动物早期发育阶段的细胞行为^[10]、胚胎分化、组织发育和器官形成^[8]。在早期胚胎发育过程中, Shh 首先出现在中胚层^[11], 人或鼠的 Shh 信号通路变异会导致神经板形成异常^[12-13]。Shh 信号通路包括分泌蛋白 Hedgehog (HH), 跨膜蛋白受体 Patched-1 (PTCH1), 跨膜蛋白 Smoothed (SMO) 以及下游的转录因子 GLI1、GLI2、GLI3^[14]。在致病基因的相关研究中, 单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 是最常见的基因影响疾病发生发展的方式之一^[15]。此外标签 SNP 在研究中日益广泛的应用使得 SNP 的检测更加高效, 成本更低^[16]。本研究采取基于 SNP 分析的方法检测 Shh 信号通路在 NSCL/P 和健康人群之间的差异, 以期找到其与 NSCL/P 的关联。

1 资料与方法

1.1 病例收集与对照

病例收集自全国多中心的口腔医院 (包括重庆、甘肃、山东)。病例组为 100 例均已经过完善的临床检查并确诊为 NSCL/P 的患者, 无其他出生缺陷。对照组为 97 例未患 NSCL/P 也无其它出生缺陷的健康人群。本研究获得北京大学口腔医院生物医学伦理委员会审查批准 (批件号: PKUSSIRB-201520012), 由纳入本研究的未成年对象的监护人签署知情同意书。

1.2 选择标签 SNP

基于国际人类基因组单体型图计划中中国北京汉族人口数据, 使用 Haploview 软件 (ver. 4.2, Mark Daly 博士实验室, 美国) 进行单倍体型分析和标签

SNP 选择。针对 Shh 信号通路中的 4 个候选基因 *SHH*、*PTCHI*、*SMO* 和 *GLI2* 共设计了 27 个 SNP。所选择的 SNP 基本涵盖了候选基因的潜在功能性 SNP, 其最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 0.05; *GLI2* 73.5%, *PTCHI* 91.0%, *SMO* 100.0%, *SHH* 75.0%。

1.3 基因型检测

使用基因组 DNA 提取试剂盒 (天根公司, 北京) 从外周血样中提取基因组 DNA。采用 MassARRAY 分子量阵列技术进行多重引物和 PCR 设计, 并结合基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 的 Sequenom 质谱检测技术 (Sequenom 公司, 美国)^[17], 检测 27 个 SNP 位点在 4 个候选基因的基因型。所有基因型检测结果经过重复验证以保证结果的准确性, 一致性达到 95%。

1.4 统计学分析

计数资料 (等位基因、基因型分布频率等) 采用成组设计四格表资料的卡方检验进行比较。计算每个 SNP 在病例组和对照组中出现的比值比 (odds ratio, OR) 和 95% 置信区间 (confidence interval, CI) 表示关联强度。对基因型频率与唇腭裂的相关性进行多重检验, 包括 Logistic 线性回归模型^[18], 同时使用 Bonferroni 校正以降低假阳性率。病例组和对照组中每个 SNP 都通过基因型分布频率的卡方检验进行哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 分析。并使用软件 Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>; ^[19]) 进行连锁不平衡统计。

2 结果

2.1 SNP 等位基因及基因型频率在病例组和对照组之间的比较分析

27 个 SNP 中, 检出率超过 90% 的有 25 个, 另外两个位于 *GLI2* 的 rs4848122 和 rs17390009 的检出率分别为 76.6% 和 78.2% 被剔除。27 个 SNP 的 MAF 如表 1 所示, 所有 SNP 的 HWE 检验分析数据见表 2 ($P > 0.01$)。我们使用卡方检验 (表 3) 和 Logistic 回归分析 (表 4) 对等位基因进行统计, 得出疾病组与对照组的差异无统计学意义。然而对基因型的病例对照分析则显示 rs12674259 (*SMO*) 和 rs2066836 (*PTCHI*) 的基因型频率在病例组和对照组之间的差异有统计学意义 (表 5), 这两个位点的分布频率和质谱峰值如图 1 所示。

表 1 27 个 SNP 的最小等位基因频率

Table 1 Minor allele frequencies of SNP in samples

CHR	SNP	A1	A2	MAF	MAF(NCBI)
2	rs17390009	G	C	0.033	0.1451
2	rs7604538	T	C	0.431	0.4153
2	rs735557	A	G	0.329	0.4226
2	rs4848122	T	C	0.393	0.2962
2	rs7582470	A	G	0.467	0.495
2	rs1992900	C	T	0.407	0.3709
2	rs895479	G	A	0.235	0.2166
2	rs4848124	C	T	0.256	0.4776
2	rs277555	C	T	0.254	0.3475
2	rs277536	A	G	0.342	0.435
2	rs1187935	C	A	0.260	0.4666
2	rs3738880	A	C	0.490	0.4396
7	rs2718107	A	C	0.418	0.4318
7	rs4731562	A	G	0.338	0.3347
7	rs2566871	T	C	0.447	0.4588
7	rs12674259	T	G	0.160	0.0426
7	rs9607	A	G	0.244	0.266
7	rs4728160	G	C	0.235	0.2468
7	rs1233560	C	T	0.239	0.4629
7	rs208684	C	A	0.236	0.2683
9	rs16909859	A	G	0.178	0.1479
9	rs357564	G	A	0.414	0.3814
9	rs2236407	G	A	0.343	0.3832
9	rs2066836	T	C	0.090	0.1094
9	rs2277184	G	A	0.150	0.0865
9	rs2297088	A	G	0.360	0.4098
9	rs2282041	G	A	0.113	0.1163

CHR, chromosome; SNP, single-nucleotide polymorphism; A1, minor allele; A2, major allele; NCBI, National Coalition Building Institute; MAF, minor allele frequency.

2.2 候选基因的连锁不平衡分析

在 4 个候选基因所位于的 3 条目标染色体(第 2、7、9 号染色体)中均发现了连锁不平衡(图 2)。在连锁不平衡单倍体型分析中,病例组和对照组之间的差异无统计学意义。

2.3 rs12674259 和 rs2066836 的位点功能预测

本研究显示 rs12674259 和 rs2066836 位点频率在病例组和对照组中的差异具有统计学意义。rs2066836 位点位于 *PTCH1* 基因的外显子区,针对

该 SNP 位点进行的预测分析表明,其多态性可能会影响基因外显子区剪接位点的功能,进而改变剪接与转录过程。

表 2 27 个 SNP 的哈迪-温伯格平衡检验结果

Table 2 Tests of HWE for all SNP

CHR	SNP	A1	A2	GENO(A1A1/A1A2/A2A2)	P
2	rs17390009	G	C	0/4/67	1.000
2	rs7604538	T	C	19/46/31	0.836
2	rs735557	A	G	11/42/42	1.000
2	rs4848122	T	C	13/40/32	1.000
2	rs7582470	A	G	23/40/34	0.104
2	rs1992900	C	T	14/48/33	0.674
2	rs895479	G	A	3/39/55	0.266
2	rs4848124	C	T	3/39/53	0.261
2	rs277555	C	T	4/40/52	0.414
2	rs277536	A	G	13/39/42	0.493
2	rs1187935	C	A	7/31/48	0.577
2	rs3738880	A	C	21/52/23	0.540
7	rs2718107	A	C	22/38/35	0.093
7	rs4731562	A	G	8/43/43	0.638
7	rs2566871	T	C	24/41/32	0.154
7	rs12674259	T	G	4/19/77	0.062
7	rs9607	A	G	5/37/52	0.786
7	rs4728160	G	C	3/37/55	0.385
7	rs1233560	C	T	1/40/56	0.038
7	rs208684	C	A	4/33/58	1.000
9	rs16909859	A	G	5/22/73	0.069
9	rs357564	G	A	21/39/33	0.204
9	rs2236407	G	A	12/42/43	0.821
9	rs2066836	T	C	0/15/75	1.000
9	rs2277184	G	A	2/20/75	0.632
9	rs2297088	A	G	13/42/42	0.657
9	rs2282041	G	A	1/22/74	1.000

CHR, chromosome; SNP, single-nucleotide polymorphism; A1, minor allele; A2, major allele; GENO, genotype.

与 *PTCH1* 类似,SMO 也是 Shh 信号通路中的一个跨膜蛋白受体,rs12674259 定位在内含子区,该位点可能是 MIT/TFE3 转录因子的结合位点,其多态性可能会通过转录因子结合位点的改变而影响基因转录。

表 3 对照组和病例组的 SNP 卡方检验

Table 3 Chi-squared analysis of allele in controls and NSCL/P patients

SNP	A1	A2	CHISQ	P	OR	SE	95% CI
rs17390009	G	C	0.605	0.437	1.736	0.718	0.425 - 7.086
rs7604538	T	C	0.044	0.833	0.956	0.214	0.629 - 1.454
rs735557	A	G	0.138	0.710	0.919	0.227	0.589 - 1.434
rs4848122	T	C	0.869	0.351	1.256	0.245	0.777 - 2.031
rs7582470	A	G	0.062	0.804	1.054	0.213	0.695 - 1.599
rs1992900	C	T	0.337	0.561	1.134	0.217	0.742 - 1.735
rs895479	G	A	0.088	0.767	0.930	0.247	0.573 - 1.507
rs4848124	C	T	1.851	0.174	1.402	0.249	0.861 - 2.283
rs277555	C	T	0.375	0.540	1.162	0.246	0.718 - 1.882
rs277536	A	G	0.000	0.989	1.003	0.225	0.646 - 1.559
rs1187935	C	A	0.001	0.974	0.992	0.253	0.604 - 1.628
rs3738880	A	C	0.000	1.000	1.000	0.211	0.661 - 1.512
rs2718107	A	C	0.347	0.556	0.881	0.215	0.578 - 1.343
rs4731562	A	G	1.596	0.207	1.336	0.229	0.852 - 2.093
rs2566871	T	C	0.304	0.581	0.890	0.212	0.587 - 1.348
rs12674259	T	G	1.527	0.217	0.698	0.292	0.393 - 1.237
rs9607	A	G	0.450	0.503	0.846	0.250	0.519 - 1.380
rs4728160	G	C	0.001	0.973	0.992	0.250	0.607 - 1.619
rs1233560	C	T	1.640	0.200	1.380	0.252	0.842 - 2.261
rs208684	C	A	0.790	0.374	1.248	0.250	0.765 - 2.035
rs16909859	A	G	1.489	0.222	0.714	0.277	0.415 - 1.228
rs357564	G	A	0.479	0.489	0.860	0.218	0.561 - 1.318
rs2236407	G	A	0.002	0.965	1.010	0.221	0.655 - 1.558
rs2066836	T	C	0.310	0.578	1.239	0.386	0.581 - 2.642
rs2277184	G	A	2.396	0.122	1.588	0.300	0.881 - 2.859
rs2297088	A	G	0.114	0.736	1.077	0.219	0.701 - 1.653
rs2282041	G	A	1.227	0.268	0.686	0.342	0.351 - 1.340

SNP, single-nucleotide polymorphism; A1, minor allele; A2, major allele; SE, standard error; CHISQ, chi-square test.

3 讨论

此前有研究显示综合征型唇腭裂与单个基因突变有关,其中包括组成 Shh 信号通路的 *GLI2*、*GLI3*、*PTCHI* 和 *SHH*,所以我们选择覆盖这 4 个候选基因的标签 SNP 进行检测,以探究在中国人群中 Shh 信号通路是否也与 NSCL/P 相关。本研究中我们分析了 Shh 信号通路中 4 个基因的 27 个 SNP 位点,并发现了 *PTCHI* 的 SNP 位点 rs2066836 和 *SMO* 的 SNP 位点 rs12674259 与唇腭裂相关。

PTCHI 是颅颌面发育的重要调控因子,其单倍剂量不足可能会引发成釉细胞瘤^[20]。另外,*PTCHI* 突变可以导致唇腭裂的发生^[21]。此前有研究显示位于 *PTCHI* 的 SNP 位点 rs2066836 与一个爱尔兰人群中唇腭裂的发生相关^[22]。本研究表明这一位点与中国人群中唇腭裂发病相关。我们对该 SNP 位点进行功能预测,发现它是外显子区的多态性,可能会影响外显子区剪接位点的增加或缺失,改变剪接与转录过程,进而影响基因表达水平。

表4 病例组和对对照组的 Logistic 回归分析
Table 4 Logistic tests of association in controls and NSCL/P patients

CHR	SNP	A1	A2	OR	SE	95% CI	P
2	rs17390009	G	C	2.173	0.746	0.503 – 9.380	0.298
2	rs17390009	G	C	2.173	0.746	0.503 – 9.380	0.298
2	rs7604538	T	C	0.960	0.212	0.634 – 1.453	0.846
2	rs735557	A	G	0.902	0.224	0.582 – 1.398	0.644
2	rs4848122	T	C	1.266	0.243	0.787 – 2.037	0.331
2	rs7582470	A	G	1.041	0.202	0.701 – 1.545	0.843
2	rs1992900	C	T	1.146	0.230	0.731 – 1.796	0.553
2	rs895479	G	A	0.947	0.259	0.570 – 1.573	0.834
2	rs4848124	C	T	1.387	0.261	0.832 – 2.312	0.209
2	rs277555	C	T	1.125	0.254	0.684 – 1.850	0.644
2	rs277536	A	G	0.974	0.227	0.625 – 1.518	0.907
2	rs1187935	C	A	0.975	0.247	0.601 – 1.583	0.920
2	rs3738880	A	C	1.004	0.209	0.666 – 1.513	0.986
7	rs2718107	A	C	0.882	0.209	0.586 – 1.329	0.549
7	rs4731562	A	G	1.374	0.245	0.850 – 2.221	0.195
7	rs2566871	T	C	0.888	0.207	0.592 – 1.333	0.567
7	rs12674259	T	G	0.696	0.298	0.388 – 1.249	0.225
7	rs9607	A	G	0.861	0.253	0.525 – 1.413	0.553
7	rs4728160	G	C	1.003	0.255	0.608 – 1.653	0.991
7	rs1233560	C	T	1.450	0.271	0.852 – 2.466	0.171
7	rs208684	C	A	1.206	0.247	0.744 – 1.955	0.447
9	rs16909859	A	G	0.752	0.251	0.460 – 1.231	0.257
9	rs357564	G	A	0.871	0.207	0.581 – 1.308	0.507
9	rs2236407	G	A	0.981	0.227	0.629 – 1.529	0.931
9	rs2066836	T	C	1.224	0.358	0.607 – 2.467	0.572
9	rs2277184	G	A	1.475	0.297	0.825 – 2.637	0.190
9	rs2297088	A	G	1.043	0.215	0.684 – 1.589	0.846
9	rs2282041	G	A	0.666	0.346	0.338 – 1.313	0.241

CHR, chromosome; SNP, single-nucleotide polymorphism; A1, minor allele; A2, major allele; SE, standard error.

表5 病例组与对照组的统计关联
Table 5 Association statistics of the NSCL/P and control panels

SNP	Genotype	Control	NSCL/P	OR (95% CI)	P (OR)	P (Logistic)	P (Bonferroni)	P (HWE)
rs12674259	G/G	77 (77%)	61 (62.9%)	1				
	G/T	19 (19%)	36 (37.1%)	0.42 (0.22 – 0.81)	0.0017	0.0016	0.043	0.062
	T/T	4 (4%)	0 (0%)	NA (0.00 – NA)				
rs2066836	C/C	75 (85.2%)	75 (83.3%)	1				
	T/C	9 (10.2%)	15 (16.7%)	0.62 (0.25 – 1.52)	0.030	0.043	0.750	1.000
	T/T	4 (4.5%)	0 (0%)	NA (0.00 – NA)				

SNP, single-nucleotide polymorphism; NSCL/P, non-syndromic cleft lip and/or palate; P (Logistic), adjusted with gender; P (Bonferroni), adjusted P value by Bonferroni correction; P (HWE), adjusted P value by HWE test; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

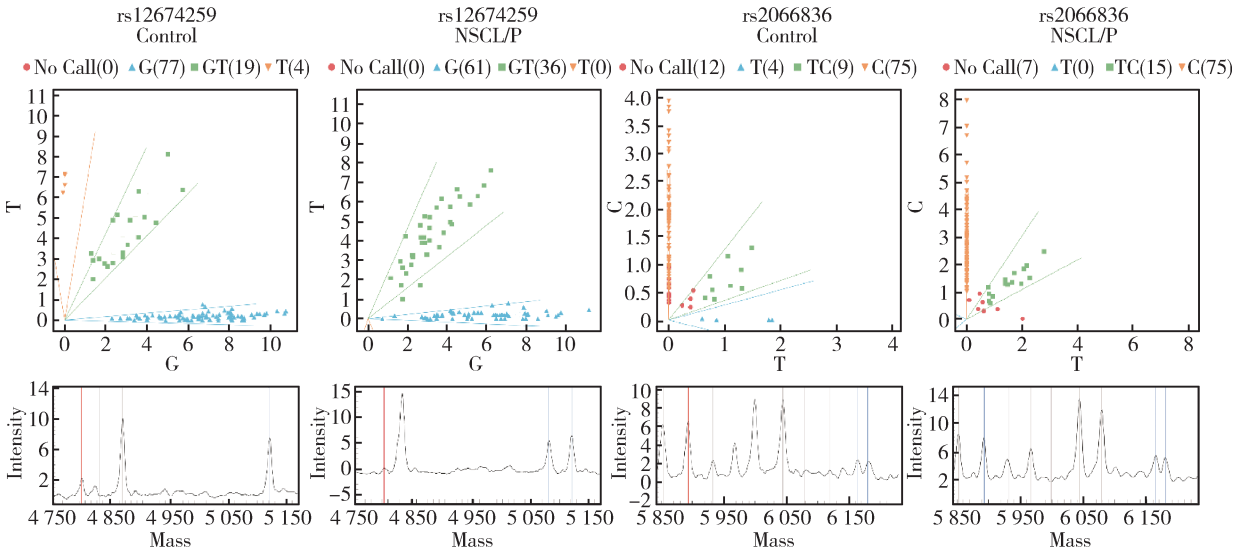


图 1 rs2066836 和 rs12674259 的 Sequenom 质谱测序结果
 Figure 1 Distribution frequency and multiplex polymerase chain reaction

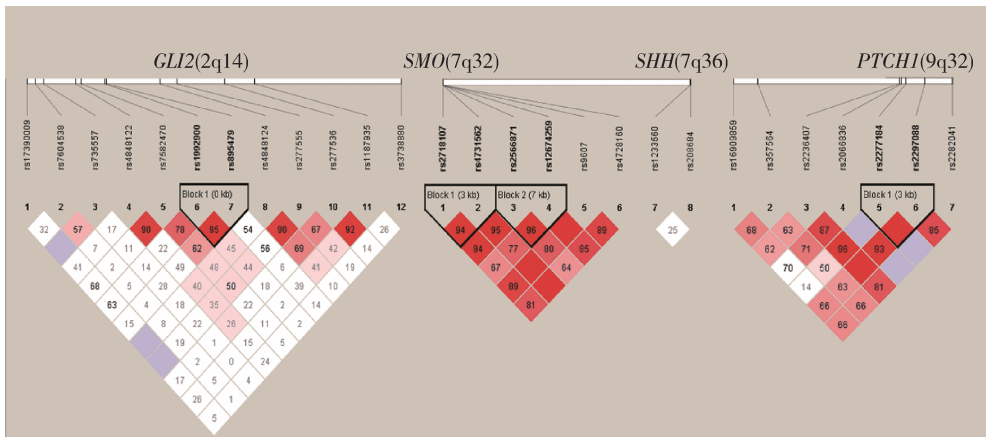


图 2 4 个候选基因 *GLI2*(2q14)、*SMO*(7q32)、*SHH*(7q36) 和 *PTCH1*(9q22) 的连锁不平衡分析
 Figure 2 Linkage disequilibrium blocks in the *GLI2*(2q14), *SMO*(7q32), *SHH*(7q36) and *PTCH1*(9q22)

与 *PTCH1* 类似, *SMO* 也是 Shh 信号通路中的一个跨膜蛋白受体, *SMO* 缺乏可能引起软骨丧失和颅骨发育缺陷^[23-24]。此前未见 rs12674259 的相关报道, 它定位在内含子区, 可能是转录因子结合位点, 该位点的多态性可能导致转录因子结合位点的改变而影响基因转录。

此前有研究认为位于 2 号染色体上的基因 *GLI2* 与唇腭裂发生有关^[15], 然而本次研究没有发现二者的相关性, 其中一个原因可能是样本量不足, 人群差异也可能导致研究结果不一致, 此前还没有在中国人中的相关研究; 另一个原因可能是 SNP 的选择方法不一样, 我们希望用标签 SNP 最大限度反映所有 SNP, 这种方法实用且经济, 但与传统方法相比可能会丢失部分信息。本研究中用来检测基因型的 Sequenom 质谱分析法是一种性价比较高的 SNP

检测方法, 适用于样本量较大的病例对照研究, 近年来越来越多的用于多基因疾病与 SNP 相关性的研究中^[25-26]。

综上, 本研究强调了整个 Shh 信号通路与唇腭裂的相关性研究, 分析关键基因对疾病的贡献度和它们之间的关联, 发现了中国人人群中 *PTCH1* 和 *SMO* 的两个 SNP 位点与唇腭裂的关联, 表明 Shh 信号通路与唇腭裂的发生相关^[27-29], 可以从新的角度帮助阐明唇腭裂发病机制, 然而其具体作用机制目前还不清楚, 需要未来设计实验进一步探究。

参考文献

[1] Mossey PA, Little J, Munger RG, et al. Cleft lip and palate[J]. Lancet, 2009, 374(9703): 1773-1785.
 [2] Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, et al. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences[J]. Nat Rev

- Genet, 2011, 12(3): 167-178.
- [3] Lidral AC, Murray JC. Genetic approaches to identify disease genes for birth defects with cleft lip/palate as a model[J]. Birth Defects Res B, 2004, 70(12): 893-901.
- [4] Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease[J]. Am J Hum Genet, 2003, 71(6): 1369-1385.
- [5] Ludwig KU, Mangold E, Herms S, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci[J]. Nat Genet, 2012, 44(9): 968-971.
- [6] Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate[J]. Clin Plast Surg, 2004, 31(2): 125-140.
- [7] Zhang J, Zhou S, Zhang Q, et al. Proteomic analysis of RBP4/vitamin A in children with cleft lip and/or palate[J]. J Dent Res, 2014, 93(6): 547-552.
- [8] Hu D, Helms JA. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis[J]. Development, 1999, 126(21): 4873-4884.
- [9] Vieira AR, Castilla EE, Ming JE, et al. Mutational analysis of the Sonic hedgehog gene in 220 newborns with oral clefts in a South American (ECLAMC) population[J]. Am J Med Genet, 2002, 108(1): 12-15.
- [10] Han J, Mayo J, Xu X, et al. Indirect modulation of Shh signaling by Dlx5 affects the oral-nasal patterning of palate and rescues cleft palate in *Msx1*-null mice[J]. Development, 2009, 136(24): 4225-4233.
- [11] Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S, et al. Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube[J]. Development, 1995, 121(12): 3923-3933.
- [12] Belloni E, Muenke M, Roessler E, et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly[J]. Nat Genet, 1996, 14(3): 353-356.
- [13] Chiang C, Litingtung Y, Lee E, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function[J]. Nature, 1996, 383(6599): 407-413.
- [14] Rahnama F, Shimokawa T, Lauth M, et al. Inhibition of *GLII* gene activation by *Patched1*[J]. Biochem J, 2006, 394(Pt 1): 19-26.
- [15] Beaty TH, Fallin MD, Hetmanski JB, et al. Haplotype diversity in 11 candidate genes across four populations[J]. Genetics, 2005, 171(1): 259-267.
- [16] Xing J, Witherspoon DJ, Watkins WS, et al. HapMap tag SNP transferability in multiple populations: general guidelines[J]. Genomics, 2008, 92(1): 41-51.
- [17] Jiang L, Zhang C, Li Y, et al. A non-synonymous polymorphism Thr15Met in the *EpCAM* gene is associated with an increased risk of breast cancer in Chinese population[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(2): 487-495.
- [18] Ong KL, Li M, Tso AK, et al. Association of genetic variants in the adiponectin gene with adiponectin level and hypertension in Hong Kong Chinese[J]. Eur J Endocrinol, 2010, 163(2): 251-257.
- [19] Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps[J]. Bioinformatics, 2005, 21(2): 263-265.
- [20] Farias LC, Gomes CC, Brito JA, et al. Loss of heterozygosity of the *PTCH* gene in ameloblastoma[J]. Hum Pathol, 2012, 43(8): 1229-1233.
- [21] Cohen MM. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. [J]. Birth Defects Res, 2006, 76(9): 658-673.
- [22] Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, et al. Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population[J]. Birth Defects Res, 2010, 88(2): 84-93.
- [23] Brand M, Heisenberg CP, Warga RM, et al. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis[J]. Development, 1996, 123(6): 129-142.
- [24] Eberhart JK, Swartz ME, Crump JG, et al. Early hedgehog signaling from neural to oral epithelium organizes anterior craniofacial development[J]. Development, 2006, 133(6): 1069-1077.
- [25] Yahya MJ, Ismail PB, Nordin NB, et al. CNDP1, NOS3, and MnSOD polymorphisms as risk factors for diabetic nephropathy among type 2 diabetic patients in Malaysia[J]. J Nutr Metab, 2019(3): 1-13.
- [26] Zhuo M, Zhuang X, Tang W, et al. The impact of IL-16 3' UTR polymorphism rs859 on lung carcinoma susceptibility among Chinese han individuals[J]. Biomed Res Int, 2018, 12(24): 1-10.
- [27] Beaty TH, Hetmanski JB, Fallin MD, et al. Analysis of candidate genes on chromosome 2 in oral cleft case-parent trios from three populations[J]. Hum Genet, 2006, 120(4): 501-518.
- [28] Levi B, James AW, Nelson ER, et al. Role of Indian hedgehog signaling in palatal osteogenesis[J]. Plast Reconstr Surg, 2011, 127(3): 1182-1190.
- [29] Helms JA, Kim CH, Hu D, et al. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid[J]. Dev Biol, 1997, 187(1): 1-35.

(2019-03-20 收稿)

(本文编辑:刘淑萍)