

中国人群 Hedgehog 通路基因与非综合征型唇腭裂的亲源效应

李文咏¹, 王梦莹¹, 周 仁¹, 王斯悦¹, 郑鸿尘¹, 朱洪平², 周治波², 吴 涛^{1,3,Δ}, 王 红¹, 石 冰⁴

(1. 北京大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 北京 100191; 2. 北京大学口腔医学院·口腔医院, 口腔颌面外科 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; 3. 卫生部生育健康重点实验室, 北京 100191; 4. 四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科, 口腔疾病研究国家重点实验室, 成都 610041)

[摘要] **目的:** 探索非综合征型唇腭裂 (non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P) 这一类常见出生缺陷的可能致病机制, 在 Hedgehog (HH) 通路基因中 (*PTCH1*、*PTCH2*、*SHH*、*SMO*) 探索基因多态性对 NSCL/P 的关联关系以及亲源效应 (parent-of-origin effects, PoO) 对 NSCL/P 发病风险的影响。 **方法:** 纳入 806 个中国非综合征型唇腭裂核心家系, 对 HH 通路基因 (*PTCH1*、*PTCH2*、*SHH*、*SMO*) 的 83 个单核苷酸多态性位点 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 进行传递不平衡检验 (transmission disequilibrium test, TDT), 并采用对数线性模型进行亲源效应分析。家系样本来自“唇腭裂基因和交互作用的国际合作研究”项目。采用 Plink 进行 TDT 检验; 通过 R 软件中的 Haplin v6.2.1 软件包开展亲源效应分析。采用 Bonferroni 法进行多重检验校正。 **结果:** 经过质量控制, 共纳入 65 个 SNPs 进行分析, Bonferroni 显著性水平为 7.7×10^{-4} (0.05/65)。未校正 *P* 值前, 关联分析发现 rs4448343 与 NSCL/P 存在关联 ($P = 0.023$), 6 个单体型 (rs10512249-rs4448343、rs1461208-rs7786445、rs10512249-rs4448343、rs16909865-rs10512249-rs4448343、rs1461208-rs7786445-rs12698335、rs288756-rs288758-rs1151790) 与 NSCL/P 存在关联 ($P < 0.05$); 6 个单体型 (rs288765-rs1233563、rs12537550-rs11765352、rs872723-rs288765-rs1233563、rs288765-rs1233563-rs288756、rs6459952-rs12537550-rs11765352、rs12537550-rs11765352-rs6971211) 具有潜在的 PoO 效应 ($P < 0.05$)。以上结果经过多重检验校正, 均无统计学意义 ($P > 7.7 \times 10^{-4}$)。 **结论:** 未发现 HH 通路基因多态性与 NSCL/P 的关联, 未发现 HH 通路基因通过 PoO 效应影响 NSCL/P 发病风险。

[关键词] 亲源效应; 非综合征型唇腭裂; HH 通路基因

[中图分类号] R394 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2020)05-0809-06

doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2020.05.003

Exploring parent-of-origin effects for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on *PTCH1*, *PTCH2*, *SHH*, *SMO* genes in Chinese case-parent trios

LI Wen-yong¹, WANG Meng-ying¹, ZHOU Ren¹, WANG Si-yue¹, ZHENG Hong-chen¹, ZHU Hong-ping², ZHOU Zhi-bo², WU Tao^{1,3}, WANG Hong¹, SHI Bing⁴

(1. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, 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; 3. Key Laboratory of Reproductive Health, Ministry of Health, Beijing 100191, China; 4. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, State Key Laboratory of Oral Disease, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT Objective: Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) is a common birth defect, affecting 1.4 per 1 000 live births, and multiple genetic and environmental risk factors influencing its risk. All the known genetic risk factors accounted for a small proportion of the heritability. Several authors have suggested parent-of-origin effects (PoO) may play an important role in the etiology of this complex and heterogeneous malformation. To clarify the genetic association between *PTCH1*, *PTCH2*, *SHH* and *SMO* in hedgehog (HH) pathway and NSCL/P, as well as testing for potential PoO effects in Chinese case-parent trios. **Methods:** We tested for transmission disequilibrium tests (TDT) and PoO effects using 83 common single nucleotide polymorphic (SNP) markers of HH pathway genes

基金项目: 国家自然科学基金(81102178, 81573225)、北京市自然科学基金(7172115)和北京大学医学交叉研究基金(BMU2017MX018) Supported by the National Natural Science Foundation of China (81102178, 81573225), Beijing Municipal Natural Science Foundation (7172115), and Peking University Health Science Center Interdisciplinary Research Fund (BMU2017MX018)

Δ Corresponding author's e-mail, twu@bjmu.edu.cn

网络出版时间:2019-6-3 9:48:58 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20190530.1035.002.html>

from 806 NSCL/P case-parent trios. These trios were drawn from an international consortium established for a genome-wide association studies (GWAS) of non-syndromic oral clefts of multiple ethnicities. DNA samples were collected from each trio. Single marker and haplotype based analysis were performed both in TDT tests and PoO effects. SNPs were excluded if they (i) had a call rate of $< 95\%$, (ii) had a minor allele frequency (MAF) of < 0.05 , (iii) had Mendelian errors over all trios of $> 5\%$, (iv) had a genotype distribution in the parents that deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P < 0.0001$). The process was done using Plink (version 1.07, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/data.shtml>). TDT test was performed in Plink v1.07. A log-linear model was used to explore PoO effects using Haplin v6.2.1 as implemented in R package v3.4.2. Significance level was assessed using the Bonferroni correction. **Results:** A total of 18 SNPs were dropped due to low MAF, thus leaving 65 SNPs available for the analysis. Thus the Bonferroni threshold was 7.7×10^{-4} ($0.05/65$). Nominal significant association with NSCL/P was found at a SNP (rs4448343 in *PTCH1*, $P = 0.023$) and six haplotypes (rs10512249-rs4448343, rs1461208-rs7786445, rs10512249-rs4448343, rs16909865-rs10512249-rs4448343, rs1461208-rs7786445-rs12698335, and rs288756-rs288758-rs1151790, $P < 0.05$). A total of six haplotypes (rs288765-rs1233563, rs12537550-rs11765352, rs872723-rs288765-rs1233563, rs288765-rs1233563-rs288756, rs6459952-rs12537550-rs11765352, and rs12537550-rs11765352-rs6971211) showed PoO effect ($P < 0.05$). None of the results remained significant after the Bonferroni correction ($P > 7.7 \times 10^{-4}$). **Conclusion:** Neither significant association between SNPs within HH pathway and the risk of NSCL/P nor PoO effects was seen in this study.

KEY WORDS Parent-of-origin effects; Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate; Hedgehog pathway

非综合征型唇腭裂(non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P)是由于胚胎发育过程中颌腭组织发育不全或发育受阻而引起的一组颌面部先天性畸形,中国唇腭裂患病率约为每1 000活产儿1.4人^[1]。唇腭裂按解剖学结构可分为单纯唇裂(cleft lip, CL)、单纯腭裂(cleft palate, CP)、唇裂合并腭裂(cleft lip and palate, CLP)。由于单纯唇裂和唇裂合并腭裂具有相似的胚胎起源和流行病学特征,因此CL和CLP通常被合并为唇裂合并或不合并腭裂(cleft lip with or without cleft palate, CL/P)一类^[2-3]。CL/P和CP通常被认为是两种不同类型的缺陷,因为它们胚胎起源不同^[4];患病率不同,CL/P患病率高于CP,并且CP患者中女性约为男性的两倍,而CL/P患者男性则是女性的两倍^[5]。NSCL/P是多个遗传因素和环境因素共同作用的复杂疾病,全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)是研究复杂疾病致病基因的高效定位方法。2009年Grant等^[6]通过GWAS研究发现8q24与NSCL/P相关,由此开始了探索非综合征型唇腭裂遗传危险因素的GWAS研究时代。GWAS研究不仅验证了既往发现的候选基因,还发现了新的易感基因或区域^[7],有研究者发现大部分常见变异组合起来仅能增加较小程度的疾病风险,解释了少部分的遗传度^[8],并且这些GWAS研究主要探索患儿易感基因对于疾病风险的影响。因此,探索罕见遗传变异的致病效应、遗传因素的交互作用、遗传-环境交互作用、亲源效应、表观遗传等是当前研究热点。亲源效应(parent-of-origin effects, PoO)是指亲本来源染色体上的等位基因出现差异表达,即

两个亲本等位基因中一方表达,另一方沉默,表现为依靠单亲传递某些遗传学性状的现象^[9]。大部分已知的具有亲源效应的基因与胚胎发育密切相关,而非综合征型唇腭裂是由于胚胎发育过程中颌腭组织发育不全或发育受阻引起的出生缺陷。因此探索PoO与NSCL/P发病的关联,或可进一步揭开NSCL/P的病因。

Hedgehog(HH)通路在胚胎时期的细胞分化、组织发育及器官形成中发挥重要的作用,尤其与颌面部形态形成密切相关。HH通路基因主要包括分泌型糖蛋白配体基因*SHH*、跨膜蛋白受体基因*PTCH1*、*PTCH2*,跨膜蛋白基因*SMO*及其下游靶基因。当*SHH*存在时,解除*PTCH*对*SMO*的抑制,从而*SMO*发挥细胞内信号传导和激活下游靶基因的作用。HH通路基因关系见图1(来源于KEGG PATHWAY Database, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。Yu等^[10]在中国人群进行的GWAS研究发现,*PTCH1*基因的rs10512248位点与NSCLP密切相关。目前的研究主要涉及HH通路单个基因多态性与NSCL/P的关联,因此本研究旨在806个中国NSCL/P核心家庭中探索HH通路基因是否通过亲源效应影响NSCL/P的发病风险。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为806个中国NSCL/P核心家系,通过“唇腭裂基因和交互作用的国际合作研究”项目于2003年至2007年在中国台湾、山东、湖北、四川4

个地区募集,合计 2 418 人。806 个家系的地区来源、性别分布见表 1。该项目的研究设计、样本收集、环境暴露信息参见 Beaty 等^[11]的研究,该研究开始前均已获得合作组各单位的伦理委员会批准,患儿唇腭裂病理类型由临床遗传学家或经验丰富的医师确定,确保纳入患儿均为 NSCL/P 类型,纳入家系的父母均签署知情同意书,通过静脉血、唾液或漱口水等生物标本提取 DNA。

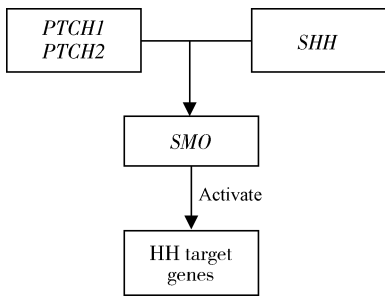


图 1 HH 通路基因分布情况

Figure 1 The hedgehog pathway genes

表 1 806 个中国 NSCL/P 核心家系分布情况

Table 1 The distribution of 806 NSCL/P case-parent trios in China

Site	Male	Female	Total
Taiwan	139	94	233
Shandong	193	81	274
Hubei	132	55	187
Sichuan	75	37	112
Total	539	267	806

NSCL/P, non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.

1.2 基因型测定和数据质量控制

美国约翰霍普金斯大学遗传病研究中心利用 Illumina 公司 Human610-Quad v. 1_B 芯片完成基因型测定,纳入的位点经过统一的标准进行数据质量控制,排除位点的标准为:(1)基因型缺失率 > 5%; (2)弱势等位基因频率(minor allele frequency, MAF) < 5%; (3)父母偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态($P < 0.0001$); (4)孟德尔遗传错误率 > 5%。原始研究纳入 4 个基因共 83 个位点,经过数据质量控制,因 MAF 删除掉 18 个位点,故研究纳入 65 个位点。该筛选过程通过 Plink (版本号 1.07, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/data.shtml>) 软件完成。

1.3 统计学分析

1.3.1 关联分析 采用传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT)探索基因位点与疾病的关联关系。其无效假设为杂合子父母传递任一等

位基因给子代的概率为 50%,拒绝无效假设提示该遗传标记位点与潜在致病位点存在连锁并处于连锁不平衡状态。TDT 也可用于检测单体型与疾病间的关联。单体型(haplotype)是位于一条染色体特定区域的一组相互关联、倾向于整体遗传给后代的单核苷酸多态性的组合。单体型通过滑窗法构建,分别以 2 个、3 个 SNPs 作为一个单体型进行 TDT 检验。采用 Plink v1.07 进行关联分析。

1.3.2 亲源效应分析 采用构建对数线性模型的方法分析 PoO 效应^[12],计算 PoO 效应时,通过最大似然估计方法,比较患儿易感位点来自母亲的相对危险度 RR_m 与来自父亲的相对危险度 RR_f :

$$RRR = RR_m / RR_f \quad \text{公式 1}$$

若 $RRR = 1$,说明不存在 PoO 效应^[13-14]。Haplin 应用 EM(expectation maximization)算法,通过最大似然估计确定目标等位基因的父母来源。探索 PoO 效应采用两种策略:(1)单个位点分析;(2)单体型分析:通过滑窗法构建,分别以 2 个、3 个 SNPs 作为一个单体型检验 PoO 效应。研究的显著性水平为 7.7×10^{-4} 。相关分析采用统计软件 R 3.4.2 中的 Haplin v6.2.1 程序包^[12]。本研究的统计学分析部分采用 Bonferroni 法校正多重检验问题,显著性水平设为 $0.05/65 = 7.7 \times 10^{-4}$ 。

2 结果

2.1 关联分析

纳入 65 个 SNPs 进行 TDT 检验,结果发现 rs4448343 与 NSCL/P 的关联有意义($P < 0.05$),经过多重检验校正,该关联无统计学意义($P > 7.7 \times 10^{-4}$)。

进行单体型与 NSCL/P 的关联研究发现,以 2 个 SNPs 为一个单体型,共得到 196 种单体型,其中 3 个单体型 TDT 检验 $P < 0.05$;以 3 个 SNPs 为一个单体型,得到单体型 269 种,其中 3 个单体型 TDT 检验 $P < 0.05$ 。进行 Bonferroni 校正后,所有单体型与 NSCL/P 的关联均无统计学意义。表 2 列出了 $P < 0.05$ 的 SNP 位点和单体型。

2.2 PoO 效应

单个 SNP 位点的 PoO 效应分析中未发现任何 SNP 具有潜在的亲源效应。表 3 显示了单体型 PoO 分析结果中 RRR 的 P 值小于 0.05 的单体型。单体型分析中,6 个单体型 PoO 检验 $P < 0.05$:以 2 个 SNPs 为一个单体型,2 个单体型 $P < 0.05$ (rs288765-rs1233563 和 rs12537550-rs11765352);以 3 个 SNPs 为一个单体型,4 个单体型 $P < 0.05$

(rs872723-rs288765-rs1233563、rs288765-rs1233563-rs288756、rs6459952-rs12537550-rs11765352、rs12537550-

rs11765352-rs6971211)。经过多重检验校正,所有结果均无统计学意义。

表 2 806 个中国 NSCL/P 核心家系传递不平衡检验结果

Table 2 The selected single SNP and haplotype association results with nominal significance based on TDT in 806 Chinese case-parents trios

Type	Gene	Haplotype	SNP ID	P value
SNP	<i>PTCHI</i>	-	rs4448343	0.023
Haplotype	<i>PTCHI</i>	AG	rs10512249-rs4448343	0.025
Haplotype	<i>SHH</i>	GC	rs1461208-rs7786445	0.026
Haplotype	<i>PTCHI</i>	GA	rs10512249-rs4448343	0.031
Haplotype	<i>PTCHI</i>	CGA	rs16909865-rs10512249-rs4448343	0.036
Haplotype	<i>SHH</i>	GCG	rs1461208-rs7786445-rs12698335	0.036
Haplotype	<i>SHH</i>	GGC	rs288756-rs288758-rs1151790	0.047

SNP, single nucleotide polymorphism; TDT, transmission disequilibrium test.

表 3 806 个中国 NSCL/P 核心家系 PoO 效应结果

Table 3 The results of PoO effects in 806 Chinese case-parents trios

Gene	SNP ID	RR_m	RR_m	RR_f	RR_f P value	RRR	RRR
		(95% CI)	P value	(95% CI)		(95% CI)	P value
<i>SHH</i>	rs288765-rs1233563	0.43 (0.15 - 1.29)	0.134	1.04 (0.41 - 2.75)	0.919	0.41 (0.20 - 0.86)	0.018
<i>SHH</i>	rs12537550-rs11765352	1.22 (0.87 - 1.71)	0.239	0.90 (0.64 - 0.24)	0.518	1.36 (1.01 - 1.82)	0.036
<i>SHH</i>	rs872723-rs288765-rs1233563	0.54 (0.23 - 1.29)	0.161	1.33 (0.66 - 2.69)	0.427	0.41 (0.20 - 0.86)	0.017
<i>SHH</i>	rs288765-rs1233563-rs288756	0.58 (0.28 - 1.20)	0.153	1.29 (0.72 - 2.31)	0.386	0.45 (0.21 - 0.95)	0.035
<i>SHH</i>	rs6459952-rs12537550-rs11765352	1.16 (0.84 - 1.61)	0.366	0.81 (0.59 - 1.11)	0.192	1.44 (1.06 - 1.95)	0.021
<i>SHH</i>	rs12537550-rs11765352-rs6971211	1.13 (0.83 - 1.56)	0.433	0.81 (0.59 - 1.11)	0.180	1.40 (1.04 - 1.90)	0.025

SNP, single nucleotide polymorphism; TDT, transmission disequilibrium test; RRR, ratio of relative risks; PoO, parent-of-origin effects.

3 讨论

本研究选择 HH 通路的 4 个基因 (*PTCHI*、*PTCH2*、*SHH*、*SMO*) 在 806 个中国人群 NSCL/P 核心家系中,针对单个 SNP 和单体型分别进行关联分析以及 PoO 效应探索。HH 信号通路与胚胎发育密切相关,尤其在颌面部形态形成中发挥重要作用^[15],其中 *Ptch1* 蛋白在 HH 通路中具有重要功能,当 *Hh* 蛋白未与 *Ptch1* 结合时,HH 通路受到抑制;当两者结合后,解除对 *Smo* 的抑制,HH 通路激活,开始转录活动^[16]。唇腭裂发病受遗传因素影响,其发病呈现家族聚集性。传统双生子研究和家系研究均表明遗传因素在其发病中有重要的作用^[17]。双生子研究发现同卵双胞胎的患病一致率远远高于异卵双胞

胎,CL/P 分别为 50% 和 8%,CP 则分别为 33% 和 7%^[18]。近年来开展的 GWAS 发现了多个致病基因或候选基因^[6, 10-11, 19-20]。本研究纳入的 4 个基因中,既往研究发现 *PTCHI* 基因突变导致基底细胞癌综合征 (basal cell nevus syndrome, BCNS, OMIM 109400), 该病属于孟德尔遗传病,病人可伴有唇腭裂、眼畸形等出生缺陷^[21]。动物研究发现 *PTCHI* 基因缺失会导致鼠颌面部缺陷,包括腭发育不全、继发腭裂^[22]。Yu 等^[10] 在中国人群进行的 GWAS (genome-wide association studies) 研究发现,*PTCHI* 基因的 rs10512248 位点与 NSCLP 密切相关。Xiao 等^[23] 利用 NSCL/P 的目标区域测序数据探索可能存在的基因-基因交互作用,研究发现 rs3761910 (*ARHGAP29*) 与 rs2149722 (*PTCHI*) 交互作用在亚

洲人群中达到显著水平。研究者在巴西人群中发现 *SHH* 基因是 *NSCLP* 的遗传危险因素^[24]。现有研究发现 *SMO* 与多种癌症相关。目前研究尚未发现 *SMO* 与唇腭裂的发生相关。当人群中 *NSCLP* 的患病率为 0.12% 时,本研究纳入 806 个核心家系有 80% 的把握度,可以发现单个位点与 *NSCLP* 的真实关联(双侧检验 $\alpha = 0.05$, $MAF = 0.2$, $RR > 1.3$)。本研究未能发现 *HH* 通路相关基因与 *NSCLP* 的关联,未来可通过扩大样本量进一步的探索。

PoO 效应被认为是遗传因素可能的其他生物学机制之一,已有一些研究探索 PoO 效应在 *NSCLP* 发病中的作用。2005 年,研究者发现子代胱硫醚 β -合酶基因(*CBS*)的 c.844ins68 位点来自母亲时,与该位点遗传自父亲相比,子代 *NSCLP* 的发病风险增加 18.7 倍^[25]。2008 年 Reutter 等^[26]利用 204 个中欧 *NSCLP* 核心家系探索 *TGFB3* 在 *NSCLP* 发病风险中的作用。研究发现子代的 rs2300607 来自母亲与来自父亲相比,其发病风险降低($I_M = 0.38$, $95\% CI 0.17 \sim 0.86$)($I_M = 1$ 表示不存在亲源效应)。Sull 等^[27-29]纳入 297 个核心家系的样本,分别探索 *Runt* 相关转录因子 2 基因(*runt-related transcription factor 2 gene, RUNX2*)、转录生长因子 α 基因(*transforming growth factor alpha, TGFA*)、配对框转录因子基因(*paired box transcript factor genes, PAX3, PAX6, PAX7, PAX9*)的 PoO 效应,发现 *RUNX2* 的 3 个 SNPs、*TGFA* 的两个 SNPs、*PAX7* 的两个 SNPs 与 *PAX3* 的 4 个 SNPs 结果具有统计学意义。2010 年, Suazo 等^[30]通过 150 个智利 *NSCLP* 核心家系探索 *MSX1* 可能的 PoO 效应在唇腭裂发病中的作用,发现 rs12532 位点的 A 等位基因来自父亲时子代患病风险增加 2.08 倍($95\% CI: 1.10 \sim 4.02$),*MSX1* 通过基因印迹影响 *NSCLP* 的发病风险。Shi 等^[31]纳入 2 000 多个非综合征型唇腭裂核心家系探索亲源效应,研究没有发现达到 GWAS 显著水平的 SNP 位点。Garg 等^[32]在 2 500 个核心家系探索 PoO 效应,研究提示 PoO 效应与唇腭裂病因相关。目前,探索 *HH* 通路基因相关亲源效应对 *NSCLP* 发病风险影响的研究较罕见。本研究没有发现 *HH* 通路基因与 *NSCLP* 的关联,可能的原因是位点数目多,使得检验次数增加,SNP 位点间具有相关性,而 Bonferroni 校正法较为保守。本研究发现 *SHH* 基因可通过单体型表现出 PoO 效应,但经多重检验校正后没有统计学意义。

本研究采用核心家系设计,核心家系包括患儿及其父母,亦可称为病例-双亲(case-parent trios)设

计,采用该设计类型可探索亲源效应,这一优势是普通病例对照研究所不具备的。由于需要招募患儿父母为研究对象,更适用于探索复杂疾病特别是生命早期的疾病比如 *NSCLP* 的病因,这种设计还可以控制人群分层造成的混杂。本研究采用单位点以及单体型进行 TDT 检验和探索 PoO 效应,相对于单位点分析,单体型会产生更多杂合的个体,从而提供更多的信息并增加把握度^[33]。本研究虽未发现具有 PoO 效应的基因,但未来可在特定环境因素暴露条件下或者在更大样本量的人群中进行进一步探索。本研究采用了中国人群 *NSCLP* 的 GWAS 数据,值得注意的是 GWAS 研究只关注 $MAF > 0.01$ 的常见遗传变异位点,因此今后可在中国唇腭裂人群中进行测序研究,探索罕见遗传变异及其他遗传变异不同作用方式对发病风险的影响,为 *NSCLP* 的发病机制研究提供更多的线索。

综上所述,本研究利用来自“唇腭裂基因和交互作用的国际合作研究”项目在中国地区募集的 806 个 *NSCLP* 核心家系数据,从单位点以及单体型进行 TDT 检验和 PoO 效应探索,深入探索 *HH* 通路相关基因在中国人群 *NSCLP* 发生风险中的作用,经过 Bonferroni 多重检验校正后,未能发现达到统计学显著性水平的结果。本研究未能在研究人群中发现显著的亲源效应,但不能据此认为 PoO 效应对 *NSCLP* 发病没有影响。与患儿基因主效应相比,PoO 效应属于更高阶的效应,因此需要更大的样本量,本研究的样本量可能不足以发现 PoO 效应;相关基因也可能在特定环境因素下才表现出 PoO 效应,或者 PoO 与环境因素交互作用影响子代发病风险。未来可采取扩大样本量、综合分析 PoO 与环境因素的作用来进一步探索 PoO 效应在发病中的作用。

参考文献

- [1] Wang M, Yuan Y, Wang Z, et al. Prevalence of orofacial clefts among live births in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Birth Defects Res*, 2017, 109(13): 1011-1019.
- [2] Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, et al. Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects [J]. *Am J Epidemiol*, 2005, 162(5): 448-453.
- [3] Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2013, 163c(4): 246-258.
- [4] Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(5): 1152-1166.
- [5] Mossey PA, Little J, Munger RG, et al. Cleft lip and palate [J]. *Lancet*, 2009, 374(9703): 1773-1785.
- [6] Grant SF, Wang K, Zhang H, et al. A genome-wide association

- study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24 [J]. *J Pediatr*, 2009, 155(6): 909–913.
- [7] Beaty TH, Marazita ML, Leslie EJ. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts; today's challenges and tomorrow's opportunities [J]. *F1000Res*, 2016, 5: 2800.
- [8] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases [J]. *Nature*, 2009, 461(7265): 747–753.
- [9] Guilmatre A, Sharp AJ. Parent of origin effects [J]. *Clin Genet*, 2012, 81(3): 201–209.
- [10] Yu Y, Zuo X, He M, et al. Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14364.
- [11] 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.
- [12] Gjessing HK, Lie RT. Case-parent triads: estimating single- and double-dose effects of fetal and maternal disease gene haplotypes [J]. *Ann Hum Genet*, 2006, 70(Pt 3): 382–396.
- [13] Gjerdevik M, Haaland OA, Romanowska J, et al. Parent-of-origin-environment interactions in case-parent triads with or without independent controls [J]. *Ann Hum Genet*, 2018, 82(2): 60–73.
- [14] 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.
- [15] Briscoe J, Theron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(7): 416–429.
- [16] Taipale J, Cooper MK, Maiti T, et al. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened [J]. *Nature*, 2002, 418(6900): 892–897.
- [17] Wantia N, Rettinger G. The current understanding of cleft lip malformations [J]. *Facial Plast Surg*, 2002, 18(3): 147–153.
- [18] Grosen D, Bille C, Petersen I, et al. Risk of oral clefts in twins [J]. *Epidemiology*, 2011, 22(3): 313–319.
- [19] Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(1): 24–26.
- [20] Sun Y, Huang Y, Yin A, et al. Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus for cleft lip with or without a cleft palate [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6414.
- [21] Lo Muzio L. Nevroid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome) [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2008, 3(1): 32.
- [22] Metzis V, Courtney AD, Kerr MC, et al. Patched1 is required in neural crest cells for the prevention of orofacial clefts [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(24): 5026–5035.
- [23] Xiao Y, Taub MA, Ruczinski I, et al. Evidence for SNP-SNP interaction identified through targeted sequencing of cleft case-parent trios [J]. *Genet Epidemiol*, 2017, 41(3): 244–250.
- [24] de Araujo TK, Secolin R, Felix TM, et al. A multicentric association study between 39 genes and nonsyndromic cleft lip and palate in a Brazilian population [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2016, 44(1): 16–20.
- [25] Rubini M, Brusati R, Garattini G, et al. Cystathionine beta-synthase c. 844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate [J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 136a(4): 368–372.
- [26] Reutter H, Birnbaum S, Mende M, et al. TGFB3 displays parent-of-origin effects among central Europeans with nonsyndromic cleft lip and palate [J]. *J Hum Genet*, 2008, 53(7): 656–661.
- [27] Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, et al. Differential parental transmission of markers in RUNX2 among cleft case-parent trios from four populations [J]. *Genet Epidemiol*, 2008, 32(6): 505–512.
- [28] Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, et al. Maternal transmission effects of the PAX genes among cleft case-parent trios from four populations [J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(6): 831–839.
- [29] Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, et al. Evidence that TGFA influences risk to cleft lip with/without cleft palate through unconventional genetic mechanisms [J]. *Hum Genet*, 2009, 126(3): 385–394.
- [30] Suazo J, Santos JL, Jara L, et al. Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate [J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152a(8): 2011–2016.
- [31] Shi M, Murray JC, Marazita ML, et al. Genome wide study of maternal and parent-of-origin effects on the etiology of orofacial clefts [J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158a(4): 784–794.
- [32] Garg P, Ludwig KU, Bohmer AC, et al. Genome-wide analysis of parent-of-origin effects in non-syndromic orofacial clefts [J]. *Eur J Hum Genet*, 2014, 22(6): 822–830.
- [33] Morris RW, Kaplan NL. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles [J]. *Genet Epidemiol*, 2002, 23(3): 221–233.

(2018-04-26 收稿)

(本文编辑:王 蕾)