

Association of a single nucleotide polymorphism in 8q24 rs1530300 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Guangdong

广东人群8q24 rs1530300单核苷酸多态性与非综合征性唇腭裂的相关性研究

马 靖¹, 许铭炎^{2,*}, 刘庭英¹,
傅玉才¹, 邓小玲³

MA Jing¹, XU Ming-yan^{2,*}, LIU Ting-ying¹,
FU Yu-cai¹, DENG Xiao-ling³

(1. Laboratory of Cellular Senescence, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong; 2. Xiamen Dental Hospital, Xiamen 361003, Fujian; 3. Department of Basic Medical Science, Xiamen University Medical College, Xiamen 361000, Fujian, China)

(1. 汕头大学医学院细胞衰老实验室, 广东汕头 515041; 2. 厦门市口腔医院, 福建 厦门 361003; 3. 厦门大学医学院基础医学部, 福建 厦门 361000)

【摘要】目的: 探讨8q24 rs1530300单核苷酸多态性(SNP)与广东籍汉族人群非综合征性唇腭裂(NSCL/P)的相关性。**方法:** 收集广东籍NSCL/P患儿168名及健康对照者127名的外周血, 提取基因组DNA, 应用高分辨率熔解曲线(HRM)技术检测rs1530300位点基因多态性, 采用卡方检验进行病例组及其父母与正常对照组基因型、等位基因频率的比较分析和传递不平衡(TDT)分析。**结果:** 成功建立8q24 rs1530300位点基因多态性检测方法。病例组及正常对照组8q24 rs1530300位点基因型频率分布均符合Hardy-Weinberg平衡。病例组及其父母的rs1530300位点基因型和等位基因的分布频率与正常对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$), 等位基因也不存在传递不平衡($P > 0.05$)。**结论:** 8q24 rs1530300位点多态性与中国广东人群NSCL/P无明显相关性。

【关键词】 非综合征性唇腭裂; 单核苷酸多态性; 8q24 rs1530300; 高分辨率熔解

中图分类号: R394.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-616X(2014)02-0131-05 doi:10.3969/j.issn.1004-616x.2014.02.011

【ABSTRACT】 OBJECTIVE: To explore the association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) and genetic polymorphism of 8q24 rs1530300 in Chinese Han population located in Guangdong province. **METHODS:** Blood samples from 168 NSCL/P patients and 127 unrelated healthy individuals of the Chinese Guangdong population were collected. DNA was extracted and high resolution melting (HRM) was used to identify single nucleotide polymorphism of rs1530300 in all samples. Chi square test was used to analyze the genotype and allele distribution between case group, father group, mother group and control group. Transmission-disequilibrium test was also carried out. **RESULTS:** The method for genotyping 8q24 rs1530300 was set up. The genotypic distribution of rs1530300 in case and control group did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium. There were no significant differences in the frequency distributions of both genotypes and alleles when case group, or father group, or mother group was compared with control group at the rs1530300 ($P > 0.05$). We found no evidence of allele transmission-disequilibrium at rs1530300 in cleft case-parent trios ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** In our study, the genetic polymorphism of 8q24 rs1530300 was not associated

收稿日期: 2013-10-23; 修订日期: 2014-01-14

基金项目: “重生行动—全国贫困家庭唇腭裂儿童手术康复计划”项目

作者简介: 马 靖(1987-), 女, 内蒙古赤峰市人, 硕士研究生, 研究方向: 基因转录调控与表观遗传学。

*通信作者: 许铭炎, Tel: 0592-2669535; E-mail: mingyan_xu@qq.com

CARCINOGENESIS, TERATOGENESIS & MUTAGENESIS

1 3 1

with the development of NSCL/P in Chinese Han population located in Guangdong province.

【KEY WORDS】 nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate; single nucleotide polymorphism; 8q24 rs1530300; high resolution melting

非综合征性唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P)是一种常见的颌面部先天性畸形,患病率在1/2 000~1/500^[1]。不同人群NSCL/P患病率存在着差异,亚洲和美洲人群的患病率明显高于非洲人群,我国属于唇腭裂高发区,患病率达1.65%^[2]。NSCL/P的发病因素较为复杂,涉及遗传、环境因素以及二者的交互作用,与多个基因有关,是一种多基因遗传病。相关易感基因国内外学者已经做了大量研究,包括 *PVRL1*^[3], *TGF-beta3*^[4], *MSX1*^[5], *TBX22*^[6], *FGFs*^[7], *PDGF-C*^[8]和 *IRF6*^[9]等。

有关对8q24与NSCL/P的发病是否相关尚未得到一致的结果。研究发现8q24的两个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点 rs987525和 rs1530300在欧洲人群、墨西哥裔美国人群、爱沙尼亚人群和洪都拉斯人群中^[10-15]与NSCL/P的发病密切相关。Hikida等^[16]通过对日本人群的全基因组扫描未发现8q24的rs987525和rs1530300与NSCL/P的发病存在相关性。我们课题组前期研究^[17]也发现在中国广东籍汉族人群中8q24 rs987525与NSCL/P发生没有关联,但8q24 rs1530300在中国广东籍汉族人群中是否与NSCL/P具有相关性尚未见报道。因此,本研究选取了8q24 rs1530300多态位点,探讨其与广东籍汉族人群中NSCL/P的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究于2009年3-10月间收集广东籍NSCL/P患儿168例,均已排除了综合征性唇腭裂,如Van Der Woude 综合征、Meckel综合征、歌舞伎面谱综合征、腭心面综合征。正常对照者为127名来自汕头大学医学院的教职工和学生,排除家族性唇腭裂遗传史(表1)。所有研究对象均为广东省籍汉族人,且均签署了知情同意书,采集5 mL外周血,EDTA抗凝。本研究得到汕头大学医学院伦理委员会批准。

1.2 DNA提取

按DP318-血液基因组提取试剂盒(天根生化科技公司)说明书提取外周血白细胞基因组DNA。

1.3 SNP位点的检测

采用高分辨率熔解(high resolution melting, HRM)

表1 病例组与对照组的基本资料

分组	例数 (百分率)	单纯腭裂 (百分率)	唇裂伴或不伴腭裂 (百分率)	对照组 (百分率)
性别				
男	110(65.5%)	13(48.1%)	97(68.8%)	85(65.4%)
女	58(34.5%)	14(51.9%)	44(31.2%)	44(34.6%)
唇腭裂分型				
右侧唇腭裂	44(26.2%)	-	44(31.2%)	-
左侧唇腭裂	60(35.7%)	-	60(42.6%)	-
双侧唇腭裂	37(22.0%)	-	37(26.2%)	-
合计	168	27	141	127

技术扩增基因组DNA片段并进行基因分型,其正向引物为5'-AGGAGGAGGAATTATATGGTCTAG-3',反向引物为5'-CAGGCTCAAGATACAAACAGG-3'。其中,PCR总反应体系为20 μL,包含基因组DNA 5 ng(2 μL), dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, 10×PCR缓冲液 2 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 2 μL, 正向与反向引物(10 μmol/L)各0.5 μL, Faststart TaqDNA合成酶(5 U/μL) 0.2 μL, 20×EVA-green 1 μL, ddH₂O 11.3 μL。PCR反应采用两步法,预变性:95℃、5 min, 95℃、30 s, 51℃、30 s, 72℃、30 s, 共50个循环,保温72℃、10 min,最后4℃保存。扩增循环结束后,对PCR产物以0.5℃/s做45~95℃的熔解曲线分析,获得高分辨熔解曲线分析结果,从而判定样品的SNP类型,并用DNA测序结果来验证HRM检测结果的准确性。

1.4 统计分析

利用卡方检验对病例组和对照组基因型进行Hardy-Weinberg平衡检验及患者及其父母等位基因和基因型与对照组的比较分析。对双亲中含有杂合子的核心家庭SNP位点进行等位基因传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT)分析。

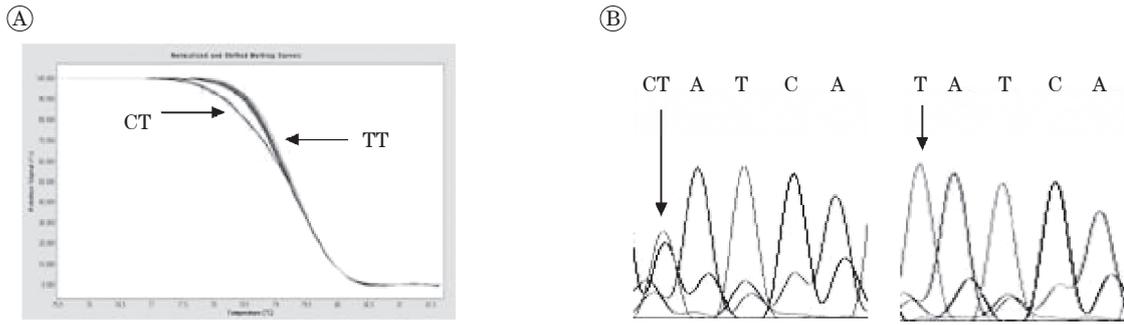
2 结果

2.1 运用HRM进行基因分型

通过对收集的样品进行HRM分型,所有样品能够很明显地分为2种基因分型图(图1A),对这两种类型基因分型图的PCR产物进行测序鉴定,结果发现TT野生型和CT杂合型2种基因型,见图1B。

2.2 基因型分布的Hardy-Weinberg平衡检验

病例组和对照组人群的基因型经Pearson χ^2 检验,均符合Hardy-Weinberg平衡检验,如表2。因此,可确



A: HRM基因分型熔解曲线图; B: 样品PCR产物测序图.

图1 HRM基因分型结果

认样本具有群体代表性。

表2 基因型频率分布与Hardy-Weinberg平衡检验

组别	基因型	频数	频率	χ^2 值	P值
病例组	TT	156	0.93	0.23	0.63
	CT	12	0.07		
对照组	TT	120	0.94	0.1	0.75
	CT	7	0.06		

2.3 病例组及其父母与对照组基因型的比较分析

患者及其父母与对照组基因型的分布及比较, 如表3所示。在rs1530300位点, 唇裂或伴有腭裂的患者、单纯腭裂患者及其父母和对照组比较基因型分布差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

表3 rs1530300位点基因型在患者组、双亲组及对照组的分布和比较

基因型	患有唇腭裂的家庭成员					对照组 ($n=127$)
	所有患者($n=168$)	唇裂或伴有腭裂($n=141$)	腭裂($n=27$)	父亲($n=167$)	母亲($n=157$)	
TT	156(92.9%)	129(91.5%)	27(100%)	158(94.6%)	144(91.7%)	120(94.5%)
CT	12(7.1%)	12(8.5%)	0(0)	9(5.4%)	13(8.3%)	7(5.5%)
CC	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
$\chi^2(P)$	0.32 (0.57)	0.91(0.34)	1.56 (0.21)	0.00 (0.96)	0.82 (0.37)	-
OR (95%CI)						
CT vs TT	1.3(0.5~3.5)	1.6(0.6~4.2)	0	1.0(0.4~2.7)	1.5(0.6~4.0)	-
CC vs TT	0	0	0	0	0	-
CT+CC vs TT	1.3(0.5~3.5)	1.6(0.6~4.2)	0.3(0.0~5.3)	1.0(0.4~2.7)	1.5(0.6~4.0)	-

2.4 病例组及其父母与对照组等位基因频率比较分析

患者及其父母与对照组等位基因频率的分布及比较, 如表4所示。在rs1530300位点, 唇裂或伴有腭裂

的患者、单纯腭裂患者及其父母和对照组等位基因频率的比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

表4 rs1530300位点等位基因在患者组、双亲组及对照组的分布和比较

等位基因	患有唇腭裂的家庭成员					对照组 ($n=127$)
	所有患者($n=168$)	唇裂或伴有腭裂($n=141$)	腭裂($n=27$)	父亲($n=167$)	母亲($n=157$)	
T	324(96.4%)	270(95.7%)	54(100%)	325(97.3%)	301(95.9%)	247(97.2%)
C	12(3.6%)	12(4.3%)	0(0)	9(2.7%)	13(4.1%)	7(2.8%)
$\chi^2(P)$	0.3(0.58)	0.88(0.35)	1.52(0.22)	0.00(0.96)	0.79(0.37)	-

2.5 TDT检验

对含有杂合子信息双亲的核心家庭共18例进行TDT分析, 结果如表5所示。在rs1530300位点, C等位基因在唇腭裂患者中不存在传递($P=0.51$), 故差异无统计学意义($P>0.05$)。

表5 rs1530300位点传递不平衡检验

等位基因	传递	无传递	χ^2	P
C	10	8	0.44	0.51
T	8	10		



3 讨论

本研究首先对病例组和对照组人群基因型分布进行 Hardy-Weinberg 检验, 结果并未偏离 Hardy-Weinberg 定律 ($P > 0.05$)。这一结果提示, 本次研究所收集的样本具有一定的代表性。进一步比较病例组及其父母组与对照组之间基因型和等位基因频率的分布, 结果发现病例组和病例父母组与对照组之间基因型和等位基因频率的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。最后对含有杂合子信息双亲的核心家庭进行 TDT 分析, 发现 rs1530300 位点 C 等位基因在唇腭裂患者中不存在传递 ($P = 0.51$)。

本文首先应用病例组及其父母与正常对照组基因型、等位基因频率进行比较分析, 该研究设计虽然有其优点, 但容易引起群体分层的问题。TDT 分析的优点是消除了患者群体和对照群体遗传背景差异造成的影响, 进而消除群体分层引起的误差。本研究正是同时运用了病例组及其父母与正常对照组的比较分析和 TDT 分析, 使得本研究得出的相关性结果具有较强的可靠性。

基于定量 PCR 方法具有技术简便的特点, 能够对已知 SNP 位点进行区分, 但由于只适用于少量样本检测的原因, 检测大样本量的 SNP 位点时有一定的限制, 而高通量罗氏 Light Cycler™ 480 的 HRM 技术弥补了这个不足, 本研究正是利用高通量的 HRM 技术对 8q24 rs1530300 位点进行快速、准确地基因分型。

本研究通过对广东籍汉族人群 NSCL/P 患者 168 例及正常对照者 127 例进行病例组及其父母与正常对照组的比较分析和 TDT 检验, 未发现 8q24 rs1530300 位点的多态性与 NSCL/P 具有相关性, 与其他人群的研究报道不一致^[14-15], 可能是由于种族背景不同引起的。我们课题组^[17]在先前的研究中也表明, 在中国广东籍汉族人群中 8q24 rs987525 与 NSCL/P 发生没有相关性。我们还发现, 中国广东籍汉族人群中 8q24 rs987525 位点等位基因 A 的频率是 6.5%, 而在欧洲和墨西哥美国人中等位基因 A 的分布分别是 20%~30% 和 12%^[10-12]。本次研究发现, 病例组和病例父母组与对照组中 8q24 rs1530300 位点等位基因和基因型的分布相似, 且等位基因 C 的频率都较低 (<5%)。而在已报道^[10-11]的对欧洲人群 8q24 rs1530300 位点的研究中发现, 等位基因 C 的频率约是 30%。鉴于我们所研究的这两个位点的等位基因频率都较低, 因此, 8q24 中的这两个多态位点可能不是中国广东籍汉族人群 NSCL/P 发生的遗传易感因素。

总之, 本研究通过对广东人群 NSCL/P 和正常健康

对照者进行 8q24 rs1530300 位点的基因多态性检测, 并未发现 8q24 rs1530300 位点的多态性与 NSCL/P 相关, 提示 8q24 rs1530300 位点的多态性可能不参与广东汉族人群唇腭裂的发生。

参考文献

- [1] Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, et al. Epidemiology of cleft palate alone and cleft palate with accompanying defects[J]. *Eur J Epidemiol*, 2007, 22(6): 389-395.
- [2] Dai L, Zhu J, Mao M, et al. Time trends in oral clefts in Chinese newborns: data from the Chinese National Birth Defects Monitoring Network[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2010, 88(1): 41-47.
- [3] Sözen MA, Suzuki K, Tolarova MM, et al. Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela[J]. *Nat Genet*, 2001, 29(2): 141-142.
- [4] Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, et al. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America[J]. *J Dent Res*, 2003, 82(4): 289-292.
- [5] van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, et al. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 342-343.
- [6] Braybrook C, Doudney K, Marçano AC, et al. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia[J]. *Nat Genet*, 2001, 29(2): 179-183.
- [7] Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases[J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143A(24): 3228-3234.
- [8] Choi SJ, Marazita ML, Hart PS, et al. The PDGF-C regulatory region SNP rs28999109 decreases promoter transcriptional activity and is associated with CL/P[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(6): 774-784.
- [9] Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8): 769-780.
- [10] Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24[J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(4): 473-477.
- [11] 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, 141(4): 473-477.
- [12] Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, et al.

(下转第139页)

参考文献

- [1] 蒋林玲, 李宝林. 菁染料的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6829-6831.
- [2] 刘艳霞, 张象涵, 王兰英, 等. 菁染料在生物医学中的应用研究进展[J]. 化学试剂, 2010, 32(1): 37-42.
- [3] Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella /mammalian microsome reverse mutation assay[J]. Mutat Res, 1999, 439 (1): 37-47.
- [4] 沈建中. 动物毒理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002, 12: 227-234.
- [5] 王丽平, 江善祥. 硫酸粘杆菌素的急性毒性及对小鼠骨髓细胞的微核效应[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(1): 8-10.
- [6] 李建科. 食品毒理学[M]. 北京: 中国计量出版社, 2011, 8: 133.
- [7] 王心如. 毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006, 2: 62.
- [8] Soto CM, Vora GJ, Lebedev N, et al. Fluorescent signal amplification of carbocyanine dyes using engineered viral nanoparticles[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(15): 5184-5189.
- [9] Park J, Lee HJ, Cho MH, et al. Development of a cy5-labeled glucose bioprobe and its application in bioimaging and screening for anticancer agents[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46(12): 2018-2022.
- [10] Tan WB, Huang N, Zhang Y. Ultrafine biocompatible chitosan nanoparticles encapsulating multi-coloured quantum dots for bioapplications[J]. J Colloid Interface Sci, 2007, 310(2): 464-470.
- [11] Hilal H, Taylor JA. Cyanine dyes for the detection of double stranded DNA[J]. Biochem Biophys Methods, 2008, 70 (6): 1104-1108.
- [12] Kovalska VB, Tokar VP, Losytskyy MY, et al. Studies of monomeric and homodimeric oxazolo [4, 5-b] pyridinium cyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids visualization [J]. Biochem Biophys Methods, 2006, 68 (3): 155-165.
- [13] Bruce A. Cyanine dye-DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation [J]. Topics in Current Chem, 2005, 253(6): 55-76.
- [14] Fechter EJ, Olenyuk B, Dervan PB. Sequence-specific fluorescence detection of DNA by polyamide-thiazole or ane conjugates[J]. Am Chem Soc, 2005, 127 (47): 16685-16691.
- [15] Bethge L, Venkatrao D, Seit JO. New cyanine dyes as base surrogates in PNA: forced intercalation probes (FIT-probes) for homogeneous SNP detection[J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16 (1) : 114-125.
- [16] Gomezzens A, Aguilar-caballo MP. Long wave length fluorophores: new trends in their analytical use[J]. Trends Anal Chem, 2004, 23 (2) : 127-136.
- [17] Chipon B, Clave G, Bouteiller C, et al. Synthesis and post-synthetic derivatization of a cyanine-based amino acid. Application to the preparation of a novel water-soluble NIR dye [J]. Tetrahedron Lett, 2006, 47 (47) : 8279-8284.
- [18] 卢静, 关爽, 刘静波. 杜香熊果酸提取物的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(13): 250-252.
- [19] 张凤清. 复方紫草抗氧化剂的毒性初步评价[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 380-382.
- [20] 张凤清, 张东生, 周雅茹. 沙棘果皮渣黄酮毒理学初步评价 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(09): 424-425.
- [21] Verschaeve L. Genotoxicity studies in groundwater surface waters and contaminated soil[J]. Sci World J, 2002, 2(8): 1247-1253.

(上接第134页)

- Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010, 88(7): 535-537.
- [13] Blanton SH, Burt A, Stal S, et al. Family-based study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010, 88(4): 256-259.
- [14] Nikopousios T, Ambrozaityte L, Ludwig KU, et al. Replication of novel susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24 in Estonian and Lithuanian patients[J]. Am J Med Genet A, 2009, 149A(11): 2551-2553.
- [15] Lennon CJ, Birkeland AC, Nunez JA, et al. Association of candidate genes with nonsyndromic clefts in Honduran and Colombian populations[J]. The Laryngoscope, 2012, 122(9): 2082-2087.
- [16] Hikida M, Tsuda M, Watanabe A, et al. No evidence of association between 8q24 and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without palate in Japanese population[J]. Cleft Palate-Cran J, 2012, 49(6): 714-717.
- [17] Xu MY, Deng XL, Tata LJ, et al. Case-control and family-based association studies of novel susceptibility locus 8q24 in non-syndromic orofacial cleft in a southern Han Chinese population located in Guangdong province[J]. DNA Cell Biol, 2012, 31(5): 700-705.

