

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.03.037

PKD1 基因与抑癌基因 P53 多态性与非综合征性唇腭裂的关联研究*

孟祥彪 刘廷廷 刘晓彤 陈春羽 回翔 姜宇欣 焦晓辉 吕克文 宋涛[△]

(哈尔滨医科大学口腔医院口腔颌面外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨多囊性肾病基因 1 (polystic kidney disease, PKD1) 多态位点 rs8049367 与抑癌基因 P53 (anti-oncogene P53) 多态位点 rs4791774 单核苷酸多态性与中国北方人群非综合征性唇腭裂 (NSCL/P) 的相关性。**方法:**运用聚合酶链式反应 - 连接酶检测反应 (PCR-LDR) 的检测方法, 对 602 例 NSCL/P 患者和 510 例对照人群的 PKD1 基因的 rs8049367 位点和抑癌基因 P53 的 rs4791774 位点进行基因分型。利用 SPSS12.0 软件分析 PKD1 基因, 抑癌基因 P53 多态性与 NSCL/P 的相关性。**结果:** rs8049367 位点和 rs4791774 位点基因型及基因频率在两组的分布中差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论:** PKD1 基因的 rs8049367 位点和抑癌基因 P53 的 rs4791774 位点单核苷酸多态性可能与中国北方人群非综合征性唇腭裂的发生无相关性。

关键词: PKD1 基因; 抑癌基因 P53; 基因多态性; 非综合征性唇腭裂; 相关性

中图分类号: R782.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)03-556-04

Association between Pkd1, Anti-oncogene p53 Gene Polymorphism and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate*

MENG Xiang-biao, LIU Ting-ting, LIU Xiao-tong, CHEN Chun-yu,

HUI Xiang, JIANG Yu-xin, JIAO Xiao-hui, LV Ke-wen, SONG Tao[△]

(Department of Stomatology, The first Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the association between two single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs8049367 of pkd1 gene, rs4791774 of anti-oncogene p53 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) in the northern Chinese population. **Methods:** Multiple PCR and multiple ligase detection reaction were used to analyze SNP rs8049367 of pkd1, SNP rs4791774 of anti-oncogene p53 in 602 NSCL/P patients and 510 healthy individuals, SPSS12.0 program was used to perform χ^2 test for the associations. **Results:** There were no significant differences in either genotypic or allelic distribution of rs8049367, rs4791774 between the patients and the controls ($P>0.05$). **Conclusion:** The SNP of rs8049367 in pkd1 and SNP of rs4791774 in anti-oncogene p53 may be not associated with NSCL/P in the northern Chinese population.

Key words: Polystic kidney disease; Anti-oncogene p53; Genetic polymorphism; Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate; Correlation

Chinese Library Classification (CLC): R782.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)03-556-04

前言

唇腭裂是颌面外科最常见的畸形之一, 世界范围内发病率为 0.5%~2%^[1], 中国发病率约为 1.82%^[2]。尽管以外科手术为主的多学科序列治疗取得了长足发展, 但术后疤痕、语音问题依然困扰着患者及其家庭, 给他们带来了严重的精神与压力, 影响了我国人口出生素质。众所周知, 非综合征性唇腭裂 (NSCL/P) 患者约占整个唇腭裂患者的 70%, 具有明显的遗传异质性^[3], 其病因复杂, 是由多个致病基因与环境风险因子交互作用的结果^[5,6]。

PKD1 rs8049367 是染色体 CREBBP 与 ADCY9 之间的位点^[3]。有报道发现 CREBBP 基因可以通过和蛋白 P300 联合作

用激活胚胎发育^[7]。研究表明, CREBBP-ADCY9 基因序列的缺失和鲁斌斯坦 - 泰必氏综合征之间有着因果关系^[8-13], 鲁斌斯坦 - 泰必氏综合征的特点是有独特的面部特征, 其中就包括唇裂和腭裂^[4]。有学者在研究正常牙髓干细胞和 NSCL/P 患者的牙髓干细胞中, 发现 NSCL/P 患者的牙髓干细胞中 ADCY9 不同于正常组, 从而推测 ADCY9 可能是 NSCL/P 的潜在敏感性基因^[7]。

抑癌基因 P53 rs4791774 位于人类 17 号染色体上。有一些研究发现大量的 NSCL/P 患者的语言能力有所下降^[15]。之前就有一些观察暗示 NSCL/P 与发育性阅读障碍可能有共同的潜在病因^[6]。最近, Wang 等人^[17]对 NSCL/P 基因多态性与我国学龄期儿童发育性阅读障碍的关系中, 发现与正常对照组相比, 在发育性阅读障碍的患者中 rs4791774 的等位基因 G 有更多

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (#1551183)

作者简介: 孟祥彪 (1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事口腔颌面外科的临床工作,

电话: 15546659561, E-mail: 1287054064@qq.com

[△] 通讯作者: 宋涛, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 唇腭裂的遗传学病因, E-mail: 13796660786@163.com

(收稿日期: 2018-03-27 接受日期: 2018-04-23)

的表达。综合以上以上因素,我们旨在探讨中国北方人群 PKD1 基因 rs8049367, 抑癌基因 P53 rs4791774 多态位点与 NSCL/P 之间的关联性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

此次研究经哈尔滨医科大学附属第一医院伦理委员会审查批准,取样前与实验对象和家属沟通并签订知情同意书。实验所需样本均来自于 2010 年 10 月至 2015 年 11 月就诊于哈尔滨医科大学附属口腔医院及附属第二医院的唇腭裂患者。纳入标准为患者双亲必须是患儿生物学父母,有两名主治或以上医师确定患者均不伴有其他系统器官的先天性畸形。健康对照组来自于 2010 年 10 月至 2015 年 11 月期间来哈尔滨医科大学附属第一医院体检的 510 名健康人,在征得患者或其家属的同意后,收集空腹静脉血 2 mL,EDTA 抗凝后放于 -80 °C 的冰箱待用。

1.2 实验方法

取冻存的外周静脉血 2 mL 备用,解冻后利用 AxyPrep-250 全血基因组 DNA 试剂盒进行 DNA 的提取。DNA 的浓度用 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测。rs8049367、rs4791774 位点用(PCR-LDR)检测,首先利用 PCR 技术扩增获取包含待检基因的特异 DNA 片段,再对 DNA 片段 LDR。LDR 反应体系为 10 μ L,包括 1 \times Buffer 1 μ L,TapDNA 链接酶 0.05 μ L (2 U),Probemix (each) 1 μ L (2 pmol/ μ L),ddH₂O 4 μ L,PCR 产物 4 μ L;LDR 步骤分为:95 °C 变性 2 min;94 °C 变性 15 s,50 °C 退火延伸 25 s,分为 40 个循环。把 LDR 底物与带有荧光标记的标准分子量充分混合后放到 3730 测序仪上进行检测,利用 GeneMapper 软件分析数据并进行基因分型。

1.3 数据分析

运用 Hardy-Weinberg 平衡定律检测基因的遗传平衡情况,运用 χ^2 检测等位基因及基因频率分布的差异是否显著。同时进行相关比值比(odds ratios,OR)与 95%置信区域的相关分析。利用 SPSS12.0 软件分析 PKD1 基因、抑癌基因 P53 多态位点和 NSCL/P 的相关性。 $P < 0.05$ 具有统计学差异。连锁不平衡程度用 r^2 和 D' 判定, r^2 和 D' 值都大于 0.8 表明两个位点间有显著的连锁不平衡。

2 结果

2.1 遗传平衡分析

Hardy-Weinberg 平衡定律判定病例组与对照组,分析表明所选的两个基因型在病例组与对照组中均符合遗传平衡条件($P > 0.05$),表明所选样本具有群体代表性。

2.2 rs8049367、rs4791774 位点的基因型及等位基因频率的比较

rs8049367、rs4791774 位点的基因型及基因频率在实验组与病例组中分析发现都无统计学意义(P 值分别为 0.175、0.214)。同时两位点的 OR 值和 95%置信区间也都包括 1,表明这两个等位基因并不能显著增加或减少唇腭裂的发生频率。进一步对 rs8049367 位点基因型 CC、CT、TT 和 rs4791774 位点基因型 AA、AG、GG 分布进行比较,结果显示都无明显差别($P > 0.05$)两位点等位基因频率亦无明显差别(表 1、表 2)。

2.3 连锁不平衡分析

进一步对 PKD1 基因与抑癌基因 P53 单核苷酸多态性的连锁不平衡进行分析,结果显示其未存在显著的连锁不平衡($r^2 < 0.8, D' < 0.8$)(表 3)。

表 1 rs8049367 位点基因型与基因频率分布

Table 1 Frequencies of rs8049370 genotypes and alleles distribution in different groups

SNPs	Genotype/allele	Contro(%)	Cases(%)	OR(95%CI)	P value
rs8049367				0.89(0.75, 1.05)	0.175
	CC	205(40.2)	263(43.7)	1	—
	CT	226(44.3)	259(43.0)	0.89(0.69, 1.15)	0.386
	TT	79(15.5)	80(13.3)	0.79(0.55, 1.13)	0.198
	C	636(62.4)	785(65.2)		
	T	384(37.6)	419(34.8)		

表 2 rs4791774 位点基因型与基因频率分布

Table 2 Frequencies of rs4791774 genotypes and alleles distribution in different groups

SNPs	Genotype/allele	Control(%)	Cases(%)	OR(95%CI)	P value
rs4791774				1.14(0.93, 1.40)	0.214
	AA	334(65.5)	370(61.5)	1	—
	AG	153(30.0)	203(33.7)	1.20(0.93, 1.55)	0.168
	GG	23(4.5)	29(4.8)	1.14(0.65, 2.01)	0.654
	A	821(80.5)	943(78.3)		
	G	199(19.5)	261(21.7)		

表 3 rs8049367、rs4791774 位点连锁不平衡分析

Table 3 Linkage disequilibrium analysis of rs8049367 and rs4791774

SNPs	rs8049367	rs4791774
rs8049367		0.001
rs4791774	0.082	

Note: The date above the diagonal is D'. The date below the diagonal is r²; SNPS: Single nucleotide polymorphisms.

3 讨论

唇腭裂作为常见的先天性畸形之一,根据是否伴有其它先天性畸形,分为综合征性唇腭裂(syndromic cleft lip with or without cleft palate, SCL/P)和非综合征性唇腭裂(non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P)。研究表明 SCL/P 为单基因遗传性疾病,但 NSCL/P 的病因较为复杂。国内外研究表明 NSCL/P 并不符合孟德尔遗传定律,表明 NSCL/P 的发生受遗传因素和环境因素共同影响。截止目前,国外陆续发现了十几个与 NSCL/P 的发生相关的基因。二十一世纪初期,人类基因组测序不断完善,NSCL/P 遗传病因学研究的热点与方向逐渐转到了基因的筛查与定位。

PKD1 基因位于 16p13.3 染色体 CREBBP 基因上游 50 kb 和 ADCY9 基因下游的 32 kb 处,长约 52 kb,包括 46 个外显子,基因结构较为庞大,其可控制合成一种蛋白质(polycystin-1, PC1),这种蛋白可能参与介导细胞与细胞或细胞基质间的作用,加速细胞生长与分化,并保持细胞极性^[18,19]。Sun 等人^[7]对中国不同地域的 NSCL/P 病例的研究证明 PDK1 基因 rs8049367 与 NSCL/P 有显著的关联性(OR=0.74, P=8.98× 10⁻¹²)。Wang 等人^[17]研究 NSCL/P 与中国学龄儿童发育性阅读障碍之间的关系亦发现 rs8049367 位点多态性与发育性阅读障碍之间有很强的相关性,同时有人研究发现发育性阅读障碍和 NSCL/P 有共享的潜在病因^[16],从侧面验证了 rs8049367 与 NSCL/P 之间具有相关性。

抑癌基因 P53 是目前研究最多的肿瘤抑制基因之一,编码 P53 蛋白。P53 蛋白分为 2 个亚型,其中野生型 P53 蛋白可以校正 DNA 保持正常、引导程序性细胞死亡,而突变型 P53 能抑制凋亡。动物模型研究发现抑癌基因 P53 的缺失可以引发小鼠胚胎畸形,例如 P53^{-/-} 小鼠在胚胎期容易出现神经管畸形,具体表型为露脑畸形或颅面畸形^[20]。另外抑癌基因 P53 rs4791774 与 rs4791331 有很强的相关性,而 rs4791331 是 Beaty 等人在亚洲人群中确认的与 NSCL/P 有相关性的基因位点^[21]。

PKD1 基因与抑癌基因 P53 已被广泛研究,它们参与并影响人体多种疾病的发生,但其对颌面部发育的影响研究较少。本研究首次探讨 PKD1 基因 rs8049367、抑癌基因 P53 rs4791774 位点与中国北方人群 NSCL/P 发生的关联性,中国北方人群目前相对稳定、且 NSCL/P 的发病率较高,适宜作为研究对象。利用 Hardy-Weinberg 平衡定律分析病例组与对照组(P 值分别为 0.203、0.205;0.865、0.312),表明所选取的样本具有一定的群体代表性。进一步对这两个位点的基因型以及各基因频率在实验组与对照组中的分析都没有统计学意义(P 值分别为 0.175、0.214)。表明 PKD1 基因 rs8049367、抑癌基因 P53 rs4791774 位点与中国北方人群的 NSCL/P 的发生可能没

有相关性,本次研究有望对中国北方人群中有 NSCL/P 的家族提供较为科学的遗传咨询,消除他们的部分疑虑。对于本次研究结果与之前 Sun 等人^[7]结论不一致,可能是由于 P53 基因本身无明显突变位点,指导合成的 P53 蛋白,在正常组织中表达量很低,在受到 DNA 损伤等刺激时,P53 蛋白表达量升高,可导致 P53 依赖性凋亡的发生,这一特性使得该基因易受外界环境影响。另外样本量大小及研究方法的不同可能会导致结果误差。在连锁不平衡分析中亦发现其未存在显著的连锁不平衡,说明所选的两个位点是相对独立遗传的。

对于本实验与之前国内外研究结果不一致可能是由于唇腭裂的发生存在着种族和地域性差异^[22]。基因在不同地域、不同人群或种族的差异性,可能会使 NSCL/P 的易感基因不同。由于我国种族较多,地域辽阔,大量的研究表明对于复杂疾病遗传与环境的关联性研究,需要将中国人群分为南北方分开研究^[23]。目前我国北方人群虽较为稳定,但由于特殊的历史国情原因,中间有过几次大规模的人口迁入,种群及民族构成都发生了较大改变,不同的生活习惯也相互影响,这些因素共同造就了我国北方人群独有的基因构成。另外每个易感基因及其所编码的蛋白与控制颌面部分化发育的机制目前还没有定论,各基因之间协同作用时,是否以某个基因为主导,需要等待后续研究。本实验虽然对实验样本的筛选条件做了一定限制,但仅从两个遗传基因入手研究,无法对妇女妊娠早期的周围环境例如是否吸烟喝酒、是否有被动吸烟史、是否受过病毒感染等等进行统一平衡考量,因此不能全面反映 NSCL/P 的病因学^[24-26]。样本量的因素,由于样本收集时间及收集地点相对固定,样本量相对较少,本研究与先前国内外研究结果不一致可能是样本量不足引起的,我们认为在扩大样本量、增大样本的收集范围后,可能会得到有意义的结果。

另外我们所有样本均来自于医院,可能存在选择偏移。在后续的研究中还应一并收集患者父亲及母亲的外周静脉血进行对比研究。在样本量足够的情况下可进一步把 NSCL/P 患者分为唇裂、腭裂、唇腭裂患者三组进行分析研究。总之应尽可能考虑妊娠期环境因素、亲子代基因及家族基因的相互协同作用。

参考文献(References)

- [1] Sousa SB, Pina R, Ramos L, et al. Tetra-amelia and lung hypo/aplasia syndrome: new case report and review [J]. American journal of medical genetics. Part A, 2008, 146A(21): 2799-2803
- [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 research. Part A, Clinical and molecular teratology, 2010, 88(1): 41-47
- [3] 黄永清. 中国人群非综合征型唇腭裂易感基因的研究进展[J]. 中华口腔医学杂志, 2017, 52(4): 223-228

- [4] Srisomboon J, Kietpeerakool C, Suprasert P, et al. Survival and prognostic factors comparing stage IB 1 versus stage IB 2 cervical cancer treated with primary radical hysterectomy [J]. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 2011, 12(7): 1753-1756
- [5] 张芳真, 郑苍尚, 邓永强. 1320 例唇腭裂患者临床统计分析[J]. *口腔医学研究*, 2008, 24(1): 82-84
- [6] Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate [J]. *Clinical genetics*, 2002, 61(4): 248-256
- [7] Yimin Sun, Yongqing Huang, Aihua Yin, et al. Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus for cleft lip with or without a cleft palate[J]. *Nature Communication*, 2015, 6(2): 1-7
- [8] Lai AH, Brett MS, Chin WH, et al. A submicroscopic deletion involving part of the CREBBP gene detected by array-CGH in a patient with Rubinstein-Taybi syndrome[J]. *Gene*, 2012, 499(1): 182-185
- [9] Mattina T, Palumbo O, Stallone R, et al. Interstitial 16p133 microduplication: case report and critical review of genotype-phenotype correlation[J]. *European journal of medical genetics*, 2012, 55(12): 747-752
- [10] Tajir M, Fergelot P, Lancelot G, et al. Germline mosaicism in Rubinstein-Taybi syndrome[J]. *Gene*, 2013, 518(2): 476-478
- [11] Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP [J]. *Nature*, 1995, 376(6538): 348-351
- [12] Van Belzen M, Bartsch O, Lacombe D, et al. Rubinstein-Taybi syndrome (CREBBP, EP300)[J]. *European journal of human genetics* : *EJHG*, 2011, 19(1): preceding 118-120
- [13] Kim SR, Kim HJ, Kim YJ, et al. Cryptic microdeletion of the CREBBP gene from t (1;16) (p362;p133) as a novel genetic defect causing Rubinstein-Taybi syndrome [J]. *Annals of clinical and laboratory science*, 2013, 43(4): 450-456
- [14] Hennekam RC. Oral aspects of Rubinstein-Taybi syndrome [J]. *American journal of medical genetics. Supplement*, 1990, 6: 42-47
- [15] Richman LC, Eliason MJ. Reading disability in children with clefts [J]. *The Cleft palate journal*, 1988, 25(1): 21-25
- [16] Richman LC. Do the reading disabilities of children with cleft fit into current models of developmental dyslexia [J]. *The Cleft palate-craniofacial journal: official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 2003, 40(2): 154-157
- [17] Wang B, Zhou Y, Leng S, et al. Genetic polymorphism of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate is associated with developmental dyslexia in Chinese school-aged populations [J]. *Journal of human genetics*, 2017, 62(2): 265-268
- [18] Ding L, Zhang S, Qiu W, et al. Novel mutations of PKD1 gene in Chinese patients with autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(1): 75-80
- [19] 张殿勇, 张树忠, 汤兵, 等. 利用 PCR-SSCP 技术检测中国汉族人 PKD2 基因的突变[J]. *第二军医大学学报*, 2002, (4): 413-416
- [20] Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, et al. A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly[J]. *Nature genetics*, 1995, 10(2): 175-180
- [21] Beaty TH, Taub MA, Scott AF, et al. Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study[J]. *Human genetics*, 2013, 132(7): 771-781
- [22] Xu S, Yin X, Li S, et al. Genomic dissection of population substructure of Han Chinese and its implication in association studies [J]. *American journal of human genetics*, 2009, 85(6): 762-774
- [23] Jin L. Natives or immigrants: modern human origin in east Asia[J]. *Nature reviews. Genetics*, 2000, 1(2): 126-133
- [24] Leite IC. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil [J]. *Brazilian oral research*, 2009, 23(1): 31-37
- [25] Beaty TH, Ruczinski I, Murray JC, et al. Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate[J]. *Genetic epidemiology*, 2011, 35(6): 469-478
- [26] Jia ZL, Shi B, Chen CH, et al. Maternal malnutrition, environmental exposure during pregnancy and the risk of non-syndromic orofacial clefts[J]. *Oral diseases*, 2011, 17(6): 584-589

(上接第 505 页)

- [24] Chen G, Ping L, Zhou S, et al. Early prediction of death in acute hypertensive intracerebral hemorrhage [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2016, 11(1): 83
- [25] Li Q, Zhang G, Huang Y J, et al. Blend Sign on Computed Tomography: Novel and Reliable Predictor for Early Hematoma Growth in Patients With Intracerebral Hemorrhage [J]. *Stroke*, 2015, 46(8): 2119
- [26] Turner R D, Vargas J, Turk A S, et al. Novel Device and Technique for Minimally Invasive Intracerebral Hematoma Evacuation in the Same Setting of a Ruptured Intracranial Aneurysm: Combined Treatment in the Neurointerventional Angiography Suite [J]. *Neurosurgery*, 2015, 11 Suppl 2(Issue): 43
- [27] Mori R, Yuki I, Kajiwara I, et al. Hybrid Operating Room for Combined Neuroendovascular and Endoscopic Treatment of Ruptured Cerebral Aneurysms with Intraventricular Hemorrhage [J]. *World Neurosurgery*, 2016, 89(727): e9-727.e12
- [28] Yang G, Shao G. Clinical effect of minimally invasive intracranial hematoma in treating hypertensive cerebral hemorrhage [J]. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2016, 32(3): 677
- [29] Nong S D, Lu M X, Li T Y, et al. Effect of minimally invasive intracranial hematoma drainage on inflammatory factors, serum ferritin and serum P substance in patients with hypertensive cerebral hemorrhage [J]. *Journal of Hainan Medical University*, 2017, 23(1): 113-116