

## · 实验研究 ·

# 转化生长因子 $\alpha$ 基因多态性与唇腭裂关联的研究

朱江辉 任爱国 郝玲 裴丽君 张伯兰 周敏霞 孙霞美 姜梅芳 陈海兰 李竹

**【摘要】 目的** 探讨中国部分地区人群非综合征型唇裂伴或不伴腭裂(nsCL/P)与转化生长因子  $\alpha$  基因(TGF $\alpha$ )Taq I 位点多态性之间的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性分析方法,对 149 个 nsCL/P 核心家庭成员 DNA 标本进行 TGF $\alpha$  Taq I 突变位点的基因型检测。利用传递失衡检验和以家庭为基础的关联研究(FBAT)方法,分析 TGF $\alpha$  Taq I 突变与 nsCL/P 发生之间的关系。**结果** 未发现 TGF $\alpha$  Taq I 突变的致病 C2 等位基因在 nsCL/P 核心家庭成员中存在传递不平衡( $P>0.05$ );采用 FBAT 分析,未发现 C2 等位基因及 C2C1 基因型与 nsCL/P 发病危险之间关联有统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** TGF $\alpha$  Taq I 突变可能不是中国部分地区人群 nsCL/P 发生的易感基因。

**【关键词】** 唇腭裂;转化生长因子  $\alpha$ ; 病例父母亲对照研究

**Study on the association between transforming growth factor  $\alpha$  gene Taq I variant and cleft lip with or without cleft palate** ZHU Jiang-hui<sup>\*</sup>, REN Ai-guo, HAO Ling, PEI Li-jun, ZHANG Bo-lan, ZHOU Min-Xia, SUN Xia-mei, JIANG Mei-fang, CHEN Hai-lan, LI Zhu.<sup>\*</sup>Institute of Reproductive and Child Health, National Reference Laboratory on Reproductive Health Research Ministry of Health, Peking University, Beijing 100083, China

**【Abstract】 Objective** To study the association between transforming growth factor  $\alpha$  gene(TGF $\alpha$ ) Taq I variant and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (nsCL/P) in Chinese population. **Methods** TGF $\alpha$  Taq I variant was detected using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for DNA samples of the 149 triads with nsCL/P affected child. We performed the Transmission/disequilibrium test and the family-based association study(FBAT) to identify the associations between this variant and risk of nsCL/P. **Results** Significant distortion of C2 allele at TGF $\alpha$  Taq I locus in nsCL/P groups ( $P>0.05$ ) was not found. In the family-based association test, C2 allele and offspring C2C1 genotype was not found to be significantly associated with an increase risk of nsCL/P ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Our findings did not suggest an association between offspring TGF $\alpha$  Taq I variant and the increased risk of nsCL/P in Chinese population.

**【Key words】** Cleft lips with or without cleft palate; Transforming growth factor  $\alpha$ ; Case-parent study

非综合征型唇裂伴或不伴腭裂(nsCL/P)是口腔颌面部常见的一类出生缺陷。我国是世界上 nsCL/P 的高发国家之一,预防唇腭裂,尤其是 nsCL/P 的发生,对于我国减少出生缺陷,提高人口素质有着非常重要的意义。nsCL/P 病因复杂,遗传因素在其发生中起着重要的作用。国外研究发现,转化生长因子  $\alpha$  (TGF $\alpha$ )、转化生长因子  $\beta$  3

(TGF $\beta$ 3)、MSX1 等基因的突变可能会增加人群唇腭裂发生的危险性<sup>[1,9]</sup>。特别是 TGF $\alpha$ ,是国内外 nsCL/P 易感基因研究中的热点,但是不同的研究结果不尽相同。本研究采用核心家庭病例父母亲对照研究的方法,检验 TGF $\alpha$  Taq I 突变与中国部分地区人群 nsCL/P 发生危险之间是否存在关联,为寻找 nsCL/P 的遗传易感性标记提供流行病学证据。

## 对象与方法

1. 标本来源与研究对象的确定:本研究是《国家重点基础研究项目——建设有中国特色的生殖健康生物信息库》研究的一部分。出生缺陷病例来自于一个包括南北五个省的出生缺陷监测系统。出生

基金项目:国家重点基础研究专项基金资助项目(G1999055905)

作者单位:100083 北京大学生育健康研究所(朱江辉、任爱国、郝玲、裴丽君、李竹);河北省香河县妇幼保健所(张伯兰);江苏省锡山区妇幼保健所(周敏霞);浙江省海宁市妇幼保健所(孙霞美);江苏省苏州市妇幼保健所(姜梅芳);浙江省舟山市妇幼保健所(陈海兰)

缺陷的诊断,由 3 名儿科医生根据监测报告和照片进行。本研究的对象是 1993-2004 年间在监测系统内发现的非综合征型唇裂和唇裂合并腭裂病例。经书面知情同意后,采集标本并进行问卷调查。共募集到 nsCL/P 病例核心家庭 149 个,其中 CL 核心家庭 60 个,CLP 核心家庭 89 个;病例父亲 135 例,病例母亲 142 例。有 76 个核心家庭采集口腔粘膜脱落细胞标本,73 个核心家庭采集静脉血标本。全部病例中,男婴 86 例,女婴 63 例。本研究已经得到北京大学医学部医学伦理委员会批准。

2. 主要材料: Wizard Genomic DNA Purification Kit 购自美国 Promega 公司; TaqDNA 酶和 dNTPs 购自华美生物公司; Taq I 内切酶购自上海生工生物技术公司。

3. DNA 模板的制备: 静脉血 DNA 的提取按照试剂盒说明操作; 口腔黏膜脱落细胞 DNA 的提取参考文献[10]。

4. PCR 扩增、酶切及聚丙烯酰胺凝胶电泳:  $TGF\alpha$  基因引物序列为: 上游: 5'-TCA CTT CCC CTT TTT CAT CTG T-3'; 下游: 5'-CGA GGA GGC TCT GAG GTG-3'。PCR 反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物纯化后,限制性内切酶 Taq I 酶切,12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

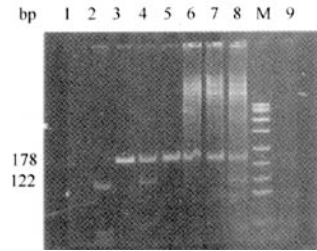
5. 统计学分析: 应用 SPSS 10.0 软件分析核心家庭  $TGF\alpha$  Taq I 突变位点基因型的分布; 应用 STATA 7.0 软件进行 nsCL/P 核心家庭成员  $TGF\alpha$  Taq I 突变位点 C2 等位基因传递失衡检验(TDT); 采用以家庭为基础的关联检验方法(FBAT),应用统计软件 fbat 1.41,在不同的遗传模型下,对  $TGF\alpha$  Taq I 突变位点与 nsCL/P 表型之间的关联进行线性回归模型检验。其无效假设是:  $TGF\alpha$  Taq I 突变位点与 nsCL/P 致病基因之间不存在连锁或关联。

### 结 果

1. PCR 扩增产物和多态性分析:  $TGF\alpha$  基因扩增产物长度为 178 bp,  $TGF\alpha$  基因 Taq I 位点多态性表现为 C1C1 纯合子(178 bp 一条)、C1C2 杂合子(178 bp, 122 bp 和 52 bp)和 C2C2 纯合子(122 bp 和 52 bp)(图 1)。

2. nsCL/P 病例及其父母在  $TGF\alpha$ -Taq I 突变位点基因型的频率:  $TGF\alpha$  Taq I 的突变率极低,病例及其父母 C2 等位基因的频率分别是 7.82% 和

7.94%。但不同畸形的病例和父母的基因型分布未偏离 Hardy-Weinberg(H-W)平衡( $P > 0.05$ )(表 1)。



1: 空白对照; 2: C2C2 纯合子; 3、5~7: C1C1 纯合子; 4、8: C1C2 杂合子; M: Marker

图 1  $TGF\alpha$  Taq I 突变位点酶切产物电泳结果

3. nsCL/P 核心家庭成员  $TGF\alpha$ -Taq I 突变位点 C2 等位基因 TDT 结果: 结果见表 2。未发现在 CL、CLP 和 CL/P 核心家庭中,  $TGF\alpha$  Taq I 位点为杂合子的父母亲更多的将 C2 等位基因传递给病例( $P > 0.05$ )。

表 1 nsCL/P 病例及其父母在  $TGF\alpha$ -Taq I 突变位点基因型的频率

$TGF\alpha$ -Taq I	子代*			父母亲#		
	CL	CLP	CL/P	CL	CLP	CL/P
C2C2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.8)	1(0.6)	2(0.7)
C2C1	10(16.7)	13(14.9)	23(15.6)	16(14.2)	24(14.6)	40(14.4)
C1C1	50(83.3)	74(85.1)	124(84.4)	96(75.0)	139(74.8)	235(74.9)
$\chi^2_{H-W}$ 值	0.044	0.034	1.095	0.026	0.001	0.011
P 值	0.841	0.862	0.215	0.868	1.000	0.920

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%); \* 子代 C2 等位基因频率为 7.82%; # 父母亲 C2 等位基因频率为 7.94%

表 2 nsCL/P 核心家庭成员  $TGF\alpha$ -Taq I 突变位点 C2 等位基因传递失衡检验(TDT)

传递	无 传 递					
	CL*		CLP#		CL/P $\Delta$	
	C2	C1	C2	C1	C2	C1
C2	1	7	1	10	2	17
C1	9	96	11	139	20	235
	10	103	12	149	22	252

\*  $\chi^2 = 0.060, P = 0.803, OR = 0.78, 95\% CI: 0.26 \sim 2.27$ ; #  $\chi^2 = 0.001, P = 1.000, OR = 0.91, 95\% CI: 0.36 \sim 2.30$ ;  $\Delta \chi^2 = 0.110, P = 0.742, OR = 0.85, 95\% CI: 0.43 \sim 1.69$

4. nsCL/P 的 FBAT 分析结果: 在显性、隐性、相加和基因型遗传模型分析中, 均未发现 C2 等位基因与 CL、CLP 和 CL/P 发病风险之间存在统计学显著性关联( $P > 0.05$ ); 也没有发现子代 C2C1 基因型可以增加其发生 nsCL/P 的危险性( $P > 0.05$ )(表 3)。

表3 nsCL/P 的 FBAT 分析结果

疾病	分析模型	等位基因	等位基因频率	Fam	S	E(S)	Var(S)	Z 值	P 值
CL	加性	C2	0.087	15	7.00	8.00	4.00	-0.50	0.617
		C1	0.913	15	23.00	22.00	4.00	0.50	0.617
		C2	0.087	15	7.00	7.75	3.69	-0.39	0.696
	显性	C1	0.913	1	-	-	-	-	-
		C2	0.087	1	-	-	-	-	-
		C1	0.913	15	8.00	7.25	3.69	0.39	0.696
	隐性	C2C2	0.010	1	-	-	-	-	-
		C2C1	0.152	15	7.00	7.50	3.75	-0.26	0.796
		C1C1	0.837	15	8.00	7.25	3.75	0.39	0.696
CLP	加性	C2	0.077	20	10.00	10.00	5.00	0.00	1.000
		C1	0.923	20	30.00	30.00	5.00	0.00	1.000
		C2	0.077	20	10.00	10.00	5.00	0.00	1.000
	显性	C1	0.923	0	-	-	-	-	-
		C2	0.077	0	-	-	-	-	-
		C1	0.923	20	10.00	10.00	5.00	0.00	1.000
	隐性	C2C2	0.006	0	-	-	-	-	-
		C2C1	0.143	20	10.00	10.00	5.00	0.00	1.000
		C1C1	0.851	20	10.00	10.00	5.00	0.00	1.000
CL/P	加性	C2	0.081	35	17.00	18.00	9.00	-0.33	0.739
		C1	0.919	35	53.00	52.00	9.00	0.33	0.739
		C2	0.081	35	17.00	17.75	8.69	-0.25	0.799
	显性	C1	0.919	1	-	-	-	-	-
		C2	0.081	1	-	-	-	-	-
		C1	0.919	35	18.00	17.25	8.69	0.25	0.799
	隐性	C2C2	0.007	1	-	-	-	-	-
		C2C1	0.147	35	17.00	17.50	8.75	-0.169	0.865
		C1C1	0.846	35	18.00	17.25	8.69	0.254	0.799

注:Fam 为有信息的核心家庭数;S 为参与分析的核心家庭得分统计值;E(S) 为统计值 S 的均数;Var(S) 为 S 的方差;Z 值 =  $[S - E(S)] / \sqrt{Var(S)}$ ;当  $P < 0.05$  表明具有统计学意义

### 讨 论

TGF $\alpha$  是人类表皮生长因子家族的重要成员,具有多种生物学活性。近年来的研究发现,TGF $\alpha$  在胚胎发育中有着重要的作用<sup>[11]</sup>,它可以刺激上皮细胞的增生并诱导其分化,而唇腭裂的发生正是由于中间上皮细胞不能正常分化和增生,从而使得发育中的面突不能正常融合。因此围绕着 TGF $\alpha$  基因结构、功能与 nsCL/P 发生之间关联性的研究成为近些年来研究的热点。

1989 年, Ardinger 等<sup>[11]</sup>发现, TGF $\alpha$  Taq I 和 BamH I 位点的突变与 nsCL/P 的发生有关联,提示突变位点或其周围的 DNA 序列可能对 nsCL/P 的发生有所贡献。其后进行了一些以人群为基础的病例对照研究,试图进一步证实 TGF $\alpha$  Taq I 位点突变与 nsCL/P 发生有关,但是结果不尽一致。Hwang 等<sup>[6]</sup>认为 TGF $\alpha$  Taq I 位点突变与 nsCL/P 的发生不存在关联。Schaid, Sommer<sup>[12]</sup>和张文广等<sup>[13]</sup>采用以医院为基础的病例对照分析方法,发现 TGF $\alpha$  Taq I 突变可能与中国部分地区人群 nsCL/P 的

生有关。这些关于 TGF $\alpha$  Taq I 突变与 nsCL/P 发生之间关联性的研究,多采用病例对照研究的方法,这种设计很难保证病例组和对照组来自遗传背景完全相同的人群,可能因为人群分层(病例和对照组遗传背景的差异)而导致虚假的关联结果。

父母病例对照研究是近些年来发展起来的一种新方法,它的研究设计优势在于可以避免由于病例和对照在种族构成上的差异,造成候选基因与疾病之间虚假的关联<sup>[14]</sup>。随着病例父母对照研究设计在 nsCL/P 候选基因研究中的应用,一些研究的结果提示,TGF $\alpha$  Taq I 突变可能不是 nsCL/P 发生的易感基因,如 Jugessur 等<sup>[15]</sup>利用病例父母对照核心家庭的分析方法,分析 TGF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 3 等基因突变与挪威人 nsCL/P 发生之间的关联,结果提示子代 TGF $\alpha$  Taq I 突变并不能使得 nsCL/P 发生的危险度增加。在本研究中,我们采用相同的设计,分析的结果提示 TGF $\alpha$  Taq I 位点突变等位基因 C2 在中国部分地区 nsCL/P 核心家庭成员中,不存在传递不平衡,以家庭为基础的关联研究结果也未发现该突变位点与可能的唇腭裂致病基因之间存在连

锁,由此推测  $TGF\alpha$  Taq I 位点突变可能与中国人群 nsCL/P 的发生无明显关联。

本次研究的结果提示,  $TGF\alpha$  Taq I 突变可能不是中国部分地区人群 nsCL/P 发生的危险因素。由于  $TGF\alpha$  位点的突变率较低,本研 究所得到的  $TGF\alpha$  Taq I 突变与 nsCL/P 之间的阴性结果的把握度并不高(45%),但是本次研究结果的  $P$  值都较大,并没有获得阳性结果的明显趋势,因此结论相对可靠。

### 参 考 文 献

- 1 Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, et al. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet*, 1989, 45: 348-353.
- 2 Chenevix TG, Jones K, Green AC, et al. Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet*, 1992, 51: 1377-1385.
- 3 Holder SE, Vintiner GM, Farren B, et al. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*, 1992, 29: 390-392.
- 4 Sassani R, Bartlett SP, Feng H, et al. Association between alleles of the transforming growth factor-alpha locus and the occurrence of cleft lip. *Am J Med Genet*, 1993, 45: 565-569.
- 5 Stoll C, Qian JF, Feingold J, et al. Genetic variation in transforming growth factor alpha: possible association of BamH I polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate. *Hum Genet*, 1993, 92: 81-82.
- 6 Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, et al. Association study of transforming growth factor alpha ( TGF alpha ) Taq I polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth

- defects. *Am J Epidemiol*, 1995, 141: 629-636.
- 7 Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, et al. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet*, 1996, 58: 551-561.
- 8 Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, et al. Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet*, 1997, 73: 337-344.
- 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. *N Engl J Med*, 2004, 351: 769-780.
- 10 King IB, Satia-Abouta J, Thornquist MD, et al. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11: 1130-1133.
- 11 Dixon MJ, Ferguson MW. The effects of epidermal growth factor, transforming growth factors alpha and beta and platelet-derived growth factor on murine palatal shelves in organ culture. *Arch Oral Biol*, 1992, 37: 395-410.
- 12 Schaid DJ, Sommer SS. Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *Am J Hum Genet*, 1994, 55: 402-409.
- 13 张文广, 罗少军, 汤少明, 等.  $TGF\alpha$  基因 Taq I RFLPs 与中国人非综合征性唇腭裂关系的研究. *中国整形外科杂志*, 2004, 20: 190-193.
- 14 苍松, 焦晓辉, 王丽, 等. 中国人非综合征性唇腭裂与  $TGF\alpha$  基因 Taq I 多态性研究. *哈尔滨医科大学学报*, 2002, 36: 369-371.
- 15 Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, et al. Variants of developmental genes (TGFA, TGFEB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol*, 2003, 24: 230-239.

(收稿日期:2005-05-30)

(本文编辑:孙强正)

## · 消息 ·

### 本刊 2006 年征订启事

《中华流行病学杂志》是由中华医学会主办的流行病学及其相关学科的高级专业学术期刊、国内预防医学和基础医学核心期刊、国家科技部中国科技论文统计源期刊,并被美国国立图书馆医学文献联机数据库收录。读者对象为预防医学、临床医学、基础医学及流行病学科研与教学工作者。征稿内容:重点或新发传染病现场调查与控制;慢性非传染病的病因学及流行病学调查(含社区人群调查)、干预与评价;环境污染与健康;食品安全与食源性疾病;流动人口与疾病;行为心理障碍与疾病;分子流行病学、基因学与疾病控制;我国西部地区重点疾病的调查与控制等。本刊设有述评、重点原著、疫情监测、现场调查、实验研究、临床流行病学、疾病控制、基础理论与方法、国家重点课题总结、文献综述、问题与探讨等重点栏目。

2004 年中国科学技术信息所出版的《2003 年中国科技论文统计与分析报告》1189 种统计源期刊中本刊影响因子排名第 30 名(1.293),总被引频次第 54 名(1400)。

本刊每期 80 页,全年出版 12 期,每期定价 9 元(含邮费),全年 108 元,由全国各地邮局统一订阅,邮发代号:2-73。本刊编辑部常年办理邮购。地址:北京昌平流字五号《中华流行病学杂志》编辑部,邮编:102206,电话(传真):010-61739449, Email:lxbonly@public3.bta.net.cn 欢迎广大读者踊跃投稿,积极订阅。

本刊编辑部