

非综合征型唇腭裂的基因研究历史回顾和研究现状

陈 森 李养群 杨 喆 王维新 马 宁 刘启宇

摘 要 唇腭裂(cleft lip and palate, CLP)是一种常见的先天性畸形,在不同地区和不同人种间发生率有一定差异性。其发病原因仍然不明确。目前观点认为环境因素和基因的共同作用是导致其发病主要机制。本文从环境因素、唇腭裂的家族聚集性和致病基因、具体的基因定位和未来的研究方向4个方面总结了唇腭裂发病原因的历史和最新进展。

关键词 唇裂 腭裂 基因 研究进展

中图分类号 R62 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.044

唇腭裂(cleft lip and palate, CLP)是一种常见的先天性畸形,在不同地区和不同人种间发生率有一定差异性,大约为0.03%~0.24%^[1]。唇腭裂包括唇裂伴或不伴腭裂(cleft lip with or without cleft palate, CL/P)以及单纯腭裂(cleft palate only, CPO),也可以依据是否伴有其他畸形,分为可划分为综合征型唇腭裂(syndromic cleft lip with or without cleft palate, SCL/P)及非综合征型唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P),其中NSCL/P占70%左右。NSCL/P的致病因素的研究已经有多年的历史,目前的主流观点认为,其发病是环境因素和基因因素相互作用的结果。本文旨在回顾和NSCL/P发病因素有关的重要研究,并且总结最新的研究进展。

一、环境因素

母亲在孕期主动吸烟是已经确认的高危因素之一。目前研究估计,如果进行彻底的戒烟,那么大概会有6.1%的唇腭裂是可以避免的^[2]。被动吸烟(二手烟)也同样是高危因素之一,转化生长因子 α (transforming growth factor - α , TGF α)与吸烟的交互作用对于NSCL/P的发生有影响^[3,4]。除了TGF - α 以外其他的许多基因也被认为和吸烟有交互作用,但是尚未达成一致意见,例如TGF - β 、骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)等^[5,6]。

尽管对于孕期饮酒是否会促进唇腭裂的发病尚未达成统一意见,但是在短期内大量摄入酒精会使患病风险升高^[7]。但具体机制也不明确。这可能与

Msx1(MSH Homeobox 1, Msx1)基因也存在一定的交互^[8]。但是研究者尚未达成一致。

环境因素除了直接作用于孕妇和患儿,也同样和基因共同影响胎儿发育。尽管部分观点尚未获得广泛的认可,大量研究者依旧认为吸烟、饮酒、维生素摄入都是与基因易感性密切相关。从目前的研究看来,基因和环境之间的相互作用非常重要,但是获得具有意义和可重复的统计学数据却非常困难^[9]。

二、唇腭裂的家族聚集性和致病基因

唇腭裂表现了明显的家族聚集性,表明其具有特定的致病基因。从18世纪开始,就有研究者关注唇腭裂的遗传性,但是迄今为止仍然没有发现确切的发病基因。一般而言,患者近亲的发生概率明显升高。Grosen等^[10]调查了1952~2005年间6776例患儿和54229名亲属,最终认为CL/P患者第1代亲属患病率最高,但是到了第2代亲属(兄弟,叔伯、祖父母)明显下降,而到了第3代亲属则与普通人群相似。

尽管唇腭裂的发病风险具有明确的家族聚集性,但是却没有符合孟德尔的遗传规律。从20世纪初开始,逐渐有研究者利用分离分析(segregation analysis)探索NSCL/P家族基因遗传规律。到了20世纪70年代混合模型(mixed model)被提出,混合模型的优点是同时考虑到传统孟德尔遗传规律中的主要基因和具有遗传性的非独立基因。但是这一方法很难获得一个具有可重复性的确切结果。大量的研究还是表明在遗传方面最适合的研究模型是多因素阈值模型(multifactorial threshold model, MF/T)。但是, MF/T无法推测外显率,并且通过其他模型也可以获得相似的结果。所以,目前仍然没有得到一个适用于所有家庭的方法。这也从一个侧面表明,多个基因可能共同影响了唇腭裂患者的发病。

作者单位:100144 北京,中国医学科学院整形外科医院整形外科

通讯作者:李养群,教授,博士生导师,电子信箱:liyqun - doctor

@126.com

三、唇腭裂的基因定位

基因学的发展为探索非典型的遗传规律提供了更多机会。连锁分析(linkage analysis)和相关分析(association analysis)是最常用的工具。这两者都可以用于发现特定的遗传标记、特定基因和探知突变基因,是从基因组层面探索唇腭裂发病的良好工具,多种基因被发现,染色体1q32附近的干扰素调节转录因子6(interferon regulatory transcription factor 6, IRF6)是最重要的发现。

相比与连锁分析方法,相关分析的统计原理更加简单,获得的数据更有普遍意义。在过去的25~30年里,许多研究者利用相关分析,采用病例对照或者核心家系(患者和父母)的研究方法,检测了大量候选基因,但是结果并不是总能保持一致。原因可能是样本量不足,设计偏倚和基因多样性等。通过对候选基因的测序发现,一些罕见的基因突变可能会修复协同基因的功能,这也可能是研究结果不一致的原因之一^[11]。Leslie等^[12]利用这种方法结合全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)、核心家系方法研究检测了13个目标基因,其中2个基因(NOG、NTN1)有统计学意义,而4个基因(BMP4、FGFR2、MSX1、PTCH1)无意义,但是这结果具有争议,和许多研究者的研究结果相互矛盾,需要深入研究。

进入21世纪后,大样本单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和GWAS逐渐普及,并广泛应用于唇腭裂的基因研究,大量的基因被发现和验证,其中最重要的是IRF6、MAFB、VAX1、WNT信号通路、Mx1和BMP信号通路。

1. IRF6: IRF6与NSCL/P发病有关的结果得到了GWAS研究结果的验证,但是由于人群基因的特异性,部分结果难以复制^[13]。IRF6也被证明是P63的作用靶点之一,目前也发现P63可以导致多种以CLP为临床表现的综合征,P63通过增强子的作用促进IRF6的转录,这个过程的任何变异都会促使CL/P的发生^[14,15]。

2. MAFB: 肌腱膜纤维肉瘤癌基因B型同系物基因(v-*maf* musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B, MAFB)基因编码碱性亮氨酸拉链转录因子。在一个亚洲的研究中,MAFB基因和NCL/P发病呈现强烈的相关性,在独立重复样本中,这一结果也被验证有效(欧洲人, $P = 0.0007$;亚洲人, $P = 0.0009$)。在菲律宾人中发现的一个和CL/P有关的错义突变(H131Q)位于保守序列中,这提示一些

MAFB两侧基因区中的转录因子结合位点也可能会影响CL/P发病^[16]。

3. VAX1: 在Beaty等^[16]的研究中,CL/P患者都在10q25染色体附近发现了腹前同源盒(ventral anterior homeobox 1, VAX1)基因的2个SNPs(rs7078160和s4752028)高表达。VAX1编码DNA结合的转录同源盒的调节因子。同时,在如欧洲、中非、东南亚等人种中的研究也表明了VAX1多态性与NSCL/P的关联^[17]。

4. WNT信号通路: 尽管WNT(wingless-type MMTV integration site family)信号通路和NSCL/P之间的关系尚未被GWAS验证,但是研究表明WNT信号通路相关的基因突变与NSCL/P密切相关,Wnt9b基因被认为是NSCL/P的高危基因,在唇部发育形成过程中扮演重要角色^[18]。

但是这些结果在不同人种之间差异很大,这是因为技术本身的局限性,也可能是由于GWAS会忽略部分在发育过程中起到了重要调节功能的调节基因^[19]。

四、后GWAS时代

GWAS后,一些新的技术逐渐成熟,如外显子组测序(exome sequencing)、拷贝数变异(copy number variation, CNV)和全基因组测序研究(whole-genome sequencing studies, WGS),这些技术的成熟有利于更加复杂的实验。2014年Peyrard-Janvid等^[20]对一个Van der Woude综合征的大家族进行了外显子组测序,将GRHL3(grainyhead-like3)基因作为其重要候选基因之一,大约有5%的患病是由于GRHL3引起。Bureau等^[21]通过患者NSCL/P患儿的二级和三级亲属的外显子组测序发现了他们都具有上皮型钙黏素(E-cadherin, CDH1)基因的突变。进一步的研究发现,一些其他少见的突变都是通过作用于CDH1基因发挥作用,因此CDH1基因也已经成为重要的候选基因之一^[22,23]。

在Maarse等^[24]在系统回顾中阐明CNV已经逐渐成为研究NSCL/P的一个重要方法。Younkin等^[25,26]也利用CNV陆续发现了ch7p14.1、ADAM3A、MGAM和ADAM5A等具有研究潜力的基因。

唇腭裂的基因研究迅速发展,目前已经可以使用标准化工具研究复杂的遗传规律。可以确定的是,唇腭裂的发病有明确的基因基础,但是肯定涉及非常多的基因,并且与环境因素密切相关。近几年,无论是技术水平还是统计方法均快速发展,但是在病因不一

致性的研究方面总是力不从心,特别是对一些少见畸形更是如此。目前的技术已经可以做到完整的基因组测序,但是,详细恰当的设计和有效的分析仍然是最重要的。

唇腭裂基因方面最大的挑战在于没有一个有效方法去处理庞大而复杂的数据。尽管可以对患者的家族进行追踪、绘制遗传图并进行基因测序,但是如何处理、分析、解释获得的生物信息却非常困难。特别是一对特定的夫妻可能在多个基因位点上存在多个变异,如何将获得的基因信息转化为有效的临床工具极其困难,具体的预防和和治疗的时机也很难把握。

参考文献

- Mai CT, Cassell CH, Meyer RE, *et al.* Birth defects data from population - based birth defects surveillance programs in the United States, 2007 to 2011: highlighting orofacial clefts[J]. *Birth Defects Res*, 2014, 100(11): 895 - 904
- Xuan Z, Zhongpeng Y, Yanjun G, *et al.* Maternal active smoking and risk of oral clefts: a Meta - analysis[J]. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2016, 122(6): 680 - 690
- Kummet CM, Moreno LM, Wilcox AJ, *et al.* Passive smoke exposure as a risk factor for oral clefts - a large international population - based Study[J]. *Am J Epidemiol*, 2016, 183(9): 834 - 841
- Yan C, Deng - Qi H, Li - Ya C, *et al.* Transforming growth factor alpha Taq I polymorphisms and nonsyndromic cleft lip and/or palate risk: a Meta - analysis[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2018, 55(6): 814 - 820
- Raju GT, Lakkakula BS, Murthy J, *et al.* Transmission analysis of TGFBI gene polymorphisms in non - syndromic cleft lip with or without cleft palate[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2017, 100(6): 14 - 17
- Saket M, Saliminejad K, Kamali K, *et al.* BMP2 and BMP4 variations and risk of non - syndromic cleft lip and palate[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 72(8): 134 - 137
- DeRoo LA, Wilcox AJ, Lie RT, *et al.* Maternal alcohol binge - drinking in the first trimester and the risk of orofacial clefts in offspring: a large population - based pooling study[J]. *Eur J Epidemiol*, Springer Netherlands, 2016, 31(10): 1021 - 1034
- Gu M, Zhang Y, Liu H, *et al.* MSH homeobox 1 polymorphisms and the risk of non - syndromic orofacial clefts: a meta - analysis[J]. *Eur J Oral Sci*, 2018, 126(3): 180 - 185
- Aschard H. A perspective on interaction effects in genetic association studies[J]. *Genet Epidemiol*, 2016, 40(8): 678 - 688
- Grosen D, Chevrier C, Skytthe A, *et al.* A cohort study of recurrence patterns among more than 54,000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance [J]. *J Med Genet*, 2010, 47(3): 162 - 168
- Gowans LJ, Adeyemo WL, Eshete M, *et al.* Association studies and direct DNA sequencing implicate genetic susceptibility loci in the etiology of nonsyndromic orofacial clefts in sub - saharan African populations[J]. *J Dent Res*, 2016, 95(11): 1245 - 1256
- Leslie EJ, Taub MA, Liu H, *et al.* Identification of functional vari-

ants for cleft lip with or without cleft palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by targeted sequencing of GWAS loci[J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 96(3): 397 - 411

- 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(16): 6414
- Pratsou P, Defty CL, Ozoemena L, *et al.* Limited ectrodactyly, ectodermal dysplasia and cleft lip - palate syndrome with a p63 mutation, associated with linear and whorled naevoid hypermelanosis[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2014, 39(2): 266 - 268
- Ferstl P, Wohlfart S, Schneider H. Sweating ability of patients with p63 - associated syndromes[J]. *Eur J Pediatr*, Springer Berlin Heidelberg, 2018, 39(7): 375 - 377
- 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
- Figueiredo JC, Ly S, Raimondi H, *et al.* Genetic risk factors for orofacial clefts in Central Africans and Southeast Asians[J]. *Am J Med Genet*, 2014, 164A(10): 2572 - 2580
- Juriloff DM, Harris MJ, Mager DL, *et al.* Epigenetic mechanism causes Wnt9b deficiency and nonsyndromic cleft lip and palate in the A/WySn mouse strain[J]. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*, Wiley - Blackwell, 2014, 100(10): 772 - 788
- Uslu VV, Petretich M, Ruf S, *et al.* Long - range enhancers regulating Myc expression are required for normal facial morphogenesis[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(7): 753 - 758
- Peyrard - Janvid M, Leslie EJ, Kousa YA, *et al.* Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude Syndrome and disrupt oral periderm development[J]. *Am J Human Genet*, 2014, 94(1): 23 - 32
- Bureau A, Parker MM, Ruczinski I, *et al.* Whole exome sequencing of distant relatives in multiplex families implicates rare variants in candidate genes for oral clefts[J]. *Genetics*, 2014, 197(3): 1039 - 1044
- Brito LA, Yamamoto GL, Melo S, *et al.* Rare variants in the epithelial cadherin gene underlying the genetic etiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(11): 1029 - 1033
- Ittiwut R, Ittiwut C, Siriwan P, *et al.* Variants of the CDH1 (E - Cadherin) gene associated with oral clefts in the Thai population[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(7): 406 - 409
- Maarse W, Rozendaal AM, Pajkrt E, *et al.* A systematic review of associated structural and chromosomal defects in oral clefts: when is prenatal genetic analysis indicated? [J]. *J Med Genet*, 2012, 49(8): 490 - 498
- Younkin SG, Scharpf RB, Schwender H, *et al.* A genome - wide study of de novo deletions identifies a candidate locus for non - syndromic isolated cleft lip/palate risk[J]. *BMC Genet*, 2014, 15(1): 24
- Younkin SG, Scharpf RB, Schwender H, *et al.* A genome - wide study of inherited deletions identified two regions associated with nonsyndromic isolated oral clefts[J]. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*, 2015, 103(4): 276 - 283

(收稿日期:2018 - 09 - 13)

(修回日期:2018 - 09 - 29)