

· 基础研究 ·

叉头盒 E1 基因与中国汉族人群非综合征型唇腭裂的关联研究

贾思璇 张思荻 尤玥 孙嘉琳 段世均 石冰 贾仲林

口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心
四川大学华西口腔医院唇腭裂外科, 成都 610041

[摘要] **目的** 探究叉头盒 E1 (FOXE1) 基因所在单倍型区域 hg19 chr9:100560865-100660865 附近的单核苷酸多态性 (SNPs) 位点与中国西部汉族人群非综合征型唇腭裂 (NSCL/P) 发生的相关性。**方法** 第一阶段纳入 159 名 NSCL/P 患者, 采用目标区域捕获测序的方法, 拟筛查 FOXE1 基因所在单倍型区域附近与 NSCL/P 发生相关的 SNPs 位点。第二阶段, 选择 21 个常见 SNPs 位点, 在 1 000 名非综合征型单纯唇裂 (NSCLO) 患者, 1 000 名非综合征型单纯腭裂 (NSCPO) 患者和 1 000 名正常对照样本中进行验证。使用 PLINK 软件对研究人群进行哈迪-温伯格平衡 (HWE) 分析, 对常见变异进行关联分析, 对罕见变异进行基因负荷分析并使用 Mutation Taster 等软件对非同义突变的 SNPs 进行功能预测。**结果** 第一阶段, 共筛选出 126 个变异位点, 包括 76 个 SNPs 变异位点和 50 个插入/缺失。纳入的所有 SNPs 在研究人群中遵循 HWE。对筛选出的罕见变异进行有害性预测和基因负荷分析, 差异均无统计学意义; 对常见变异的关联分析表明, FOXE1 基因的 rs13292899 位点与 NSCL/P 发生显著相关 ($P=1.85E-27$), 并且该位点与 NSCLO ($P=6.41E-23$)、NSCLP ($P=2.36E-15$) 发生也有相关性。随后在验证阶段, 发现 rs79268293 ($P=0.013$, $P=0.022$)、rs10983951 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$)、rs117227387 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$)、rs3758250 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$) 和 rs116899397 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$), 这 5 个 SNPs 位点与 NSCLO 和 NSCPO 均有显著关联性; 另外, rs13292899 ($P=0.008 5$)、rs74606599 ($P=0.008 3$)、rs143226042 ($P=0.008 3$) 和 rs117236550 ($P=0.01$), 这 4 个 SNPs 位点与 NSCLO 发生相关; rs12343182 ($P=0.008 7$)、rs10119760 ($P=0.012$)、rs10113907 ($P=0.012$) 和 rs13299924 ($P=0.012$), 这 4 个 SNPs 位点与 NSCPO 发生相关。**结论** 本研究在 FOXE1 基因上发现了一个新的易感 SNPs 位点 rs13292899 与 NSCL/P 及 NSCLO 发生密切相关, 以及其他 13 个 SNPs 位点与 NSCLO 或 NSCPO 发生相关。

[关键词] 非综合征型唇腭裂; 叉头盒 E1 基因; 目标区域捕获测序; 单核苷酸多态性; 关联分析

[中图分类号] Q786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2024110



本文链接 开放科学标识码

Association analysis between forkhead box E1 gene and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Han Chinese population

Jia Sixuan, Zhang Sidi, You Yue, Sun Jialin, Duan Shijun, Shi Bing, Jia Zhonglin

State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Cleft Lip and Palate Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82170919); Research and Develop Program of West China Hospital of Stomatology, Sichuan University (RD-03-202301); Natural Science Foundation of Sichuan

[收稿日期] 2024-03-29; **[修回日期]** 2024-10-23

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (82170919); 四川大学华西口腔医院交叉项目 (RD-03-202301); 四川省科技厅自然科学基金面上项目 (2024NSFSC0649)

[第一作者] 贾思璇, 硕士, E-mail: 1241774453@qq.com

[通信作者] 贾仲林, 副教授, 博士, E-mail: zhonglinjia@scu.edu.cn

Province Science and Technology (2024NSFSC0649)

Correspondence: Jia Zhonglin, E-mail: zhonglinjia@scu.edu.cn

[Abstract] Objective This study aims to explore the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) loci near the haplotype region hg19 chr9:100560865-100660865 of the forkhead box E1 (FOXE1) gene and the occurrence of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) in western Han Chinese population. **Methods** In the first stage, our study recruited 159 NSCL/P patients and performed targeted region sequencing to screen SNPs loci near the haplotype region of the FOXE1 gene associated with NSCL/P. In the second stage, we selected 21 common SNPs and re-enrolled 1 000 non-syndromic cleft lip only (NSCLO) patients, 1 000 non-syndromic cleft palate only (NSCPO) patients, and 1 000 normal controls to verify the association. PLINK software was used to perform Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test. Association analysis for common variants, gene burden analysis for rare mutations, and function prediction of SNPs with non-synonymous mutations were performed using Mutation Taster and other software programs. **Results** In the first stage, 126 variants, including 76 single nucleotide variants and 50 insertion-deletions were identified. All the included SNPs confirmed to HWE, and the results of gene burden analysis and prediction of functional harmfulness for rare variants were not statistically significant. Association analysis showed that rs13292899 of the FOXE1 gene was significantly associated with NSCL/P ($P=1.85E-27$) and was also correlated with NSCLO ($P=6.41E-23$) and non-syndromic cleft lip with cleft palate (NSCLP) ($P=2.36E-15$) subtypes. In the validation phase, rs79268293 ($P=0.013$, $P=0.022$), rs10983951 ($P=0.009$ 2, $P=0.007$ 6), rs117227387 ($P=0.009$ 2, $P=0.007$ 6), rs3758250 ($P=0.009$ 2, $P=0.007$ 6), and rs116899397 ($P=0.009$ 2, $P=0.007$ 6) were significantly associated with NSCLO and NSCPO; rs13292899 ($P=0.008$ 5), rs74606599 ($P=0.008$ 3), rs143226042 ($P=0.008$ 3), and rs117236550 ($P=0.01$) were associated with the occurrence of NSCLO; and rs12343182 ($P=0.008$ 7), rs10119760 ($P=0.012$), rs10113907 ($P=0.012$), and rs13299924 ($P=0.012$) were associated with the occurrence of NSCPO. **Conclusion** This study found a new susceptible SNP rs13292899 of the FOXE1 gene that is closely associated with NSCL/P and NSCLO subtype and 13 other SNPs associated with NSCLO or NSCPO.

[Key words] non-syndromic cleft lip with or without cleft palate; forkhead box E1 gene; target region sequencing; single nucleotide polymorphisms; association analysis

唇腭裂 (cleft lip with or without palate, CL/P) 是由于胚胎发育过程中面部各胚突联合或融合失败出现唇部、鼻部、腭部裂开, 是一类常见的先天出生缺陷^[1]。其流行病学特征已在欧洲、北美、亚洲等人群进行了广泛的研究, 并且在不同国家、地区和种族间其发病率差异存在统计学意义, 其中我国 CL/P 的发病率约为 1.8%^[2-5]。约 70% 的 CL/P 患者不合并颅面部及身体其他部位畸形, 称为非综合征型唇腭裂 (non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P), 是一种协同环境因素共同致病的多基因遗传病^[2-5]。NSCL/P 患者从出生到成年期间需要接受多学科综合序列治疗, 并且美观、功能等方面的缺陷将影响患者的生活质量和身心健康^[4-6]。因此, 研究 NSCL/P 发病机制, 通过有效的产前科普、咨询、遗传筛查等来降低 NSCL/P 的发病率是必要的。

目前的研究尚不能完全解释 NSCL/P 的发病机制, 尤其是在遗传因素方面。全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 基于大

样本人群筛查疾病的易感基因, 提高了对这一类多基因遗传病突变的检测能力。GWAS 具有高效率、敏感性和广泛性等优势, 为研究人员定位和筛选疾病的易感基因和染色体区域提供了有效的指导^[7]。研究至今, NSCL/P 的易感基因位点和染色体区域不断被发现和验证^[4-16]。Grosen 等^[17]认为 NSCL/P 和非综合征型单纯腭裂 (non-syndromic cleft palate only, NSCPO) 具有很高的遗传性, 其遗传力都在 90% 以上; 另外 NSCL/P 的阳性家族史也是其发病的高危风险因素; 其余为有害环境因素或两者协同作用的结果。研究^[18]证实环境因素, 如孕期吸烟、饮酒、服用药物、叶酸缺乏、流产史、病毒感染、接触有毒物质等因素均可增加 NSCL/P 的发生风险, 而叶酸等维生素的补充、适龄生育、高等教育背景等是 NSCL/P 发生的保护因素。

Marazita 等^[19]发现叉头盒 E1 (forkhead box E1, FOXE1) 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与 NSCL/P 发病密切相关, 为探索 NSCL/P 发病机制提供了新思路。FOXE1

基因，又名甲状腺转录因子-2 (thyroid transcription factor 2, TTF-2)，位于9号染色体长臂22区，包括一个DNA结合叉头结构域，其唯一的外显子编码367种特殊氨基酸，并翻译成50多种功能蛋白，参与组织特异性转录过程，在真核生物中调节多种组织和器官的生长发育^[20-24]。研究^[20,23-24]发现FOXE1基因与多种先天出生缺陷发生密切相关，如甲状腺发育不全、头发生长异常、唇腭裂等。2009年Moreno等^[25]研究表明FOXE1基因与NSCL/P及其NSCPO亚型发生显著相关。随后，在不同人群中陆续报道了FOXE1基因或其附近的位点与NSCL/P发生的相关性^[26-28]，但是部分研究结果不一致，需要进一步的验证。

目前尚无研究^[29]表明FOXE1基因SNPs位点与中国西部汉族人群NSCL/P发生有相关性。因此，本研究基于人类基因组单体型计划数据库中的中国北京汉族人群和日本东京人群(CHB/JPT)的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)结构，选择了FOXE1基因的单倍型区域hg19 chr9:1005608-65-100660865进行目标区域捕获测序，筛查更多易感SNPs位点。本研究将检出率在95%以上的变异点，按照其最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)，分为常见变异(MAF≥0.01)和罕见变异(MAF<0.01)两类，使用PLINK软件对纳入的SNPs位点在研究人群中进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检验，并且对常见变异进行关联分析，对罕见变异进行基因负荷分析并预测其有害性。后期纳入1 000名非综合征型单纯唇裂(non-syndromic cleft lip only, NSCLO)患者、1 000名NSCPO患者和1 000名正常对照(验证样本的基因型数据从2019年GWAS中提取^[30])，验证FOXE1基因常见变异与NSCL/P发生的关联。

1 材料和方法

1.1 研究对象

第一阶段纳入来自四川大学华西口腔医院唇腭裂外科病房2016年2月—2018年12月期间就诊的患者，共159例NSCL/P患者，其中79例NSCLO患者和80例非综合征型唇裂伴腭裂(non-syndromic cleft lip with cleft palate, NSCLP)患者(表1)。NSCL/P均来自中国西部地区汉族人群，符合NSCL/P诊断标准，并纳入来源于诺禾致源数据库的542名正常人的全基因组测序数据作为对照。第二

阶段纳入1 000名NSCLO、1 000名NSCPO和1 000名正常对照的基因型数据进行验证(验证样本的基因型数据从2019年GWAS中提取^[30]) (表1)。

表 1 NSCL/P 基本信息

Tab 1 NSCL/P basic information

研究阶段	表型	男性	女性	性别不详	总计
目标区域测序	NSCLO	46	33	0	79
	NSCLP	56	21	3	80
验证(来自2019年GWAS中的基因型数据 ^[30])	NSCLO	560	397	43	1 000
	NSCPO	419	580	1	1 000
	正常对照	390	610	0	1 000

该研究经四川大学华西口腔医院伦理委员会批准，所有研究对象在签署知情同意后，由护士抽取外周静脉血2~5 mL，以EDTA-Na2抗凝管收集血液，转移至实验室，放置于-20℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 全基因组DNA提取

采用盐析法提取基因组DNA，检测DNA样本纯度与浓度(纯度OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.8~2.0之间，并且标准实验浓度为20~100 ng/μL为合格)均符合质量要求，并通过琼脂糖凝胶电泳检测为合格样本，方可纳入研究使用。

1.2.2 目标区域捕获测序

基于人类基因组单体型计划HapMap数据库中的中国北京汉族和日本东京人群(CHB/JPT)的LD结构，选择了位于hg19 chr9:100560865-100660865位置的FOXE1基因的单倍型区域(图1)拟进行目标区域捕获测序。按照测得的样本浓度，抽取含1.0 μg DNA样本的TE buffer，使用Agilent SureSelect Target Enrichment System探针试剂盒富集并有效捕获DNA样本目标序列。目标序列的测序则由Illumina HiSeq 4000平台完成，测序模式为双末端150 bp测序。

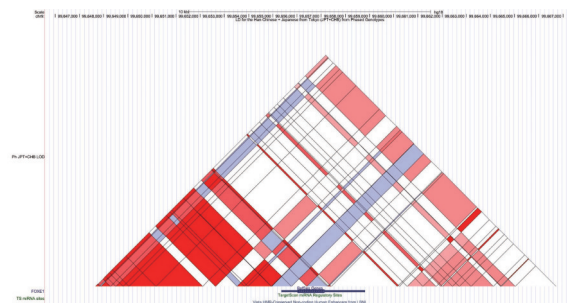


图 1 FOXE1 基因目标区域捕获测序

Fig 1 Targeted region sequencing of FOXE1

1.2.3 生物学信息分析

目标区域捕获测序分析的对照组来源于诺禾

致源基因公司 (<http://www.novogene.com>) 提供的542名中国汉族正常人的全基因组测序数据。测序数据由Burrows-Wheeler Aligner (BWA) 软件与参考基因组 (GRCh37/hg19) 进行比对, 即可得到BAM格式的原始比对结果, 即清样数据。基于获得的双端测序数据质量控制过滤得到的数据进行生物信息学分析。通过与大量数据库, 如外显子组整合联合数据库 (exome aggregation consortium, ExAC)、寡核苷酸多态性数据库 (single nucleotide polymorphism database, dbSNP)、CADD数据库、千人基因组数据库 (1000 genome)、人类基因突变数据库 (human gene mutation database, HGMD) 等进行比对, 最终获得了包括突变位点位置、突变类型等相关信息。此外, 对于位于外显子区域的变异, 通过与相关的基因转录注释数据库对比, 即可确定突变引起的核酸改变。本研究使用Mutation Taster、PolyPhen-2、SIFT、CADD等软件对非同义突变的SNPs进行了功能预测, 以初步判断突变的有害性。

1.2.4 常见SNPs位点的基因型测定

对目标区域捕获测序的关联分析阶段所发现的常见SNPs位点 ($P < 0.05$), 总共选择21个SNPs位点纳入后续的验证性研究 (样本基因型数据来自2019年GWAS中^[30])。

1.3 数据分析

1.3.1 HWE分析

使用PLINK软件对研究人群进行HWE检验, 如果符合HWE, 可证明该研究样本具有群体代表性, 可以用来反映群体的可信性较高。

1.3.2 关联分析和基因负荷分析

基于以下标准来筛选罕见变异: 在1000 Genome数据库、诺禾致源中国北京汉族人群和中国南方汉族人群 (CHB & CHS) 数据库中MAF小于0.01的变异, 或者在基因组突变频率数据库 (gnomAD) 中MAF小于0.001的变异。对选出的罕见变异, 使用PLINK Fisher精确检验进行基因负荷分析; 使用PolyPhen-2、SIFT、Mutation Taster、CADD软件来预测非同义突变是否为有害突变。使用PLINK软件对常见变异进行关联分析, 通过非条件logistic回归分析计算比值比 (odds ratio, OR) 和95%置信区间 (confidence intervals, CI), 以评估纳入研究的SNPs位点与NSCL/P及其亚型发生风险之间的相关性。第一阶段, 多重校正后 $P < 3.97E-04$ 差异具有统计学意义; 第二阶段, 多重校正后 $P < 0.025$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 测序结果和HWE分析

本研究共筛选出126个变异位点, 包括76个SNPs变异位点和50个插入/缺失。其基因型频率在研究人群中测量值和期望值差异无统计学意义 (标准: HWE值 >0.001), 结果遵循HWE, 说明选取的研究样本具有较好的群体代表性。只有通过质量控制 (HWE值 >0.001 并且与1000个基因组的CHB数据一致) 的SNPs位点才被纳入后续的关联分析。

2.2 关联分析

2.2.1 第一阶段

关联分析研究结果表明: NSCLO组与对照组相比较: 位点rs13292899差异有统计学意义 ($P = 6.41E-23$), 其余SNPs位点差异无统计学意义, 说明rs13292899与NSCLO的发生具有相关性 (图2、表2); NSCLP组与对照组相比较: rs13292899差异有统计学意义 ($P = 2.36E-15$), 其余SNPs位点差异无统计学意义, 说明rs13292899与NSCLP的发生有相关性 (表2、图3); NSCL/P组与对照组相比较: rs13292899差异有统计学意义 ($P = 1.85E-27$), 其余SNPs位点差异无统计学意义, 说明位点rs13292899与NSCL/P的发生有相关性 (表2、图4)。所以第一阶段的关联分析, 发现rs13292899位点与NSCL/P、NSCLO和NSCLP亚型发生均有相关性, 差异有统计学意义。

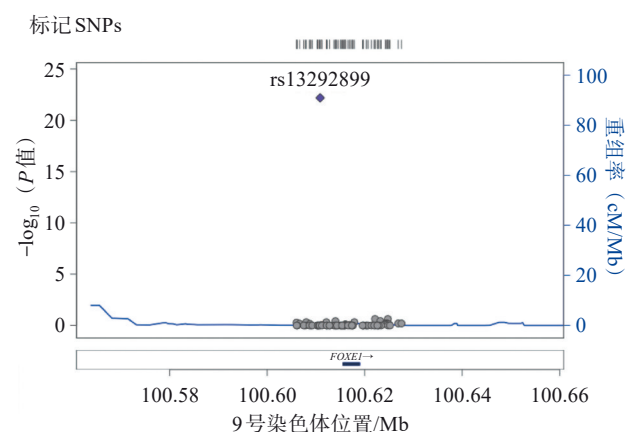


图2 NSCLO组中FOXE1基因SNPs位点关联连锁区域LD图谱

Fig 2 LD plot of the SNPs at FOXE1 for NSCLO

2.2.2 基因负荷分析

对罕见变异进行了基因负荷分析, 结果显示差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 没有发现与NSCL/P具有相关性的罕见变异位点, 并且在非同义突变

功能预测中没有发现有害突变。

表 2 关联分析后 P 值小于 0.50 的 SNPs 位点
Tab 2 Association analysis results of SNPs (P<0.50)

表型	SNP	位置	Ref	Alt	AF/%	患者		对照		P 值	OR (95%CI)
						Alt	Ref	Alt	Ref		
NSCLO	rs13292899	100610865	G	T	15.19	24	134	0	1 084	6.41E-23	-
	rs874004	100622118	C	G	84.81	134	24	874	210	0.23	1.34 (0.85~2.13)
	rs10113907	100624748	C	G	84.81	134	24	875	209	0.23	1.33 (0.84~2.11)
	rs117236550	100623216	C	T	7.59	12	146	62	1 022	0.37	1.36 (0.71~2.58)
	rs3758250	100614001	C	T	7.59	12	146	64	1 020	0.38	1.31 (0.69~2.49)
	rs10983951	100608012	G	A	7.59	12	146	65	1 019	0.48	1.29 (0.68~2.44)
	rs117227387	100612135	A	T	7.59	12	146	65	1 019	0.48	1.29 (0.68~2.44)
	rs116899397	100617879	T	C	7.59	12	146	65	1 019	0.48	1.29 (0.68~2.44)
NSCLP	rs79268293	100606701	A	G	6.88	11	149	40	1 042	0.083	1.92 (0.97~3.83)
	rs4743136	100608059	C	G	6.88	11	149	47	1 037	0.16	1.63 (0.83~3.21)
	rs74396330	100608239	T	C	6.88	11	149	40	1 044	0.083	1.93 (0.97~3.84)
	100608456	100608456	C	G	6.88	11	149	47	1 037	0.16	1.63 (0.83~3.21)
	rs10759960	100608745	A	G	91.88	147	13	1 030	54	0.13	0.59 (0.32~1.11)
	rs115269261	100610146	G	T	6.88	11	149	40	1 044	0.083	1.93 (0.97~3.84)
	rs13292899	100610865	G	T	10.12	16	142	0	1 084	2.36E-15	-
	rs72753507	100613836	T	C	6.88	11	149	47	1 037	0.16	1.63 (0.83~3.21)
	rs111846096	100614331	C	G	6.88	11	149	40	1 042	0.083	1.92 (0.97~3.83)
	rs74606599	100614651	G	T	6.88	11	149	40	1 044	0.083	1.93 (0.97~3.84)
	rs72753509	100615000	A	G	6.88	11	149	47	1 037	0.16	1.63 (0.83~3.21)
	rs143226042	100615552	C	A	6.88	11	149	40	1 044	0.083	1.93 (0.97~3.84)
	rs7043516	100617433	A	C	6.88	11	149	40	1 037	0.084	1.91 (0.96~3.81)
	rs41274260	100617949	T	C	6.88	11	149	47	1 044	0.16	1.64 (0.83~3.23)
	rs76305281	100618578	C	T	6.88	11	149	40	1 044	0.083	1.93 (0.97~3.84)
	rs12343182	100624259	G	C	94.38	151	9	999	85	0.42	1.43 (0.70~2.90)
	rs10119760	100624602	G	C	94.38	151	9	999	85	0.42	1.43 (0.70~2.90)
	rs7860144	100626884	A	G	94.38	151	9	999	85	0.42	1.43 (0.70~2.90)
	rs13299924	100627562	C	T	94.38	151	9	999	85	0.42	1.43 (0.70~2.90)
	NSCL/P	rs13292899	100610865	G	T	12.66	40	276	0	1 084	1.85E-27
rs10759960		100608745	G	T	94.02	299	19	1 030	54	0.48	0.84 (0.48~1.41)

注：Ref为参考等位基因；Alt为突变等位基因；AF为等位基因频率。

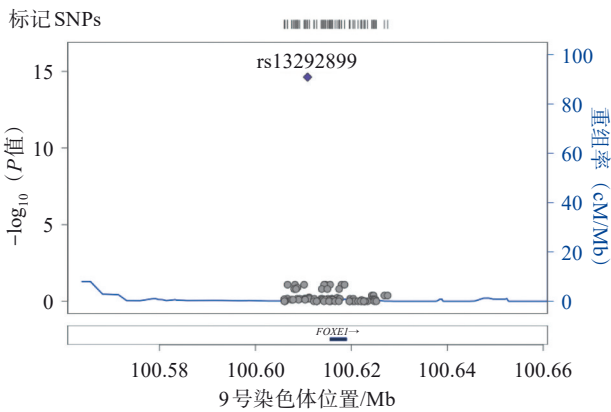


图 3 NSCLP 组中 FOXE1 基因 SNPs 位点关联连锁区域 LD 图谱

Fig 3 LD plot of the SNPs at FOXE1 for NSCLP

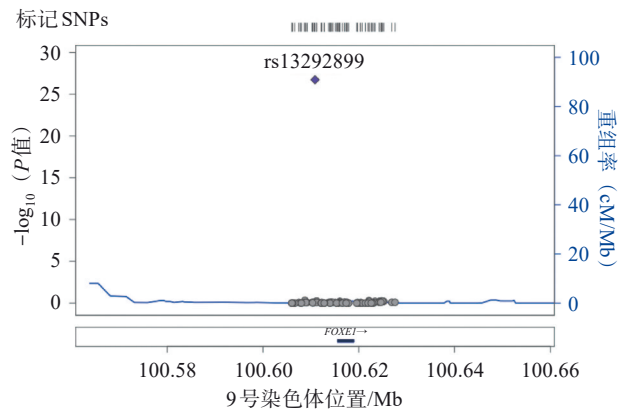


图 4 NSCL/P 组中 FOXE1 基因 SNPs 位点关联连锁区域 LD 图谱

Fig 4 LD plot of the SNPs at FOXE1 for NSCL/P

2.2.3 验证阶段

研究发现, rs79268293 ($P=0.013$, $P=0.022$)、rs10983951 ($P=0.0092$, $P=0.0076$)、rs117227387 ($P=0.0092$, $P=0.0076$)、rs3758250 ($P=0.0092$, $P=0.0076$)和rs116899397 ($P=0.0092$, $P=0.0076$), 这5个SNPs位点与NSCLO和NSCPO均有显著关联性。另外, rs13292899 ($P=0.0085$)、rs746065-

99 ($P=0.0083$)、rs143226042 ($P=0.0083$)和rs117236550 ($P=0.01$), 这4个SNPs位点与NSCLO发生相关。另外, rs12343182 ($P=0.0087$)、rs10119760 ($P=0.012$)、rs10113907 ($P=0.012$)和rs13299924 ($P=0.012$), 这4个SNPs位点仅与NSCPO发生关联(表3)。

表3 SNPs在NSCLO和NSCPO中验证性关联分析结果

Tab 3 The SNPs in NSCLO and NSCPO confirmatory association analysis results

SNP	位置	A1	F_U	NSCLO			NSCPO		
				卡方检验	P值	OR (95%CI)	卡方检验	P值	OR (95%CI)
rs79268293	100606701	A	0.13	4.18	0.013	0.84 (0.72~0.99)	4.66	0.022	0.83 (4.66~0.98)
rs10983951	100608012	A	0.072	5.78	0.0092	0.76 (0.61~0.95)	5.29	0.0076	0.77 (5.29~0.96)
rs4743136	100608059	G	0.056	0.17	0.68	0.95 (0.76~1.2)	0.25	0.62	0.94 (0.25~1.19)
rs12378536	100608456	G	0.056	0.17	0.68	0.95 (0.76~1.2)	0.25	0.62	0.94 (0.25~1.19)
rs10759960	100608745	A	0.052	2.44	0.12	0.82 (0.64~1.05)	5.80E-05	0.99	1 (0~1.27)
rs13292899	100610865	A	0.13	3.81	0.0085	0.85 (0.73~1)	4.99	0.032	0.83 (4.99~0.98)
rs117227387	100612135	T	0.072	5.78	0.0092	0.76 (0.61~0.95)	5.29	0.0076	0.77 (5.29~0.96)
rs72753507	100613836	C	0.056	0.17	0.68	0.95 (0.76~1.2)	0.25	0.62	0.94 (0.25~1.19)
rs3758250	100614001	T	0.072	5.78	0.0092	0.76 (0.61~0.95)	5.29	0.0076	0.77 (5.29~0.96)
rs74606599	100614651	G	0.13	5.01	0.0083	0.83 (0.71~0.98)	3.88	0.035	0.85 (3.88~1)
rs72753509	100615000	G	0.056	0.19	0.66	0.95 (0.75~1.2)	0.19	0.66	0.95 (0.19~1.2)
rs143226042	100615552	A	0.13	5.01	0.0083	0.83 (0.71~0.98)	3.88	0.035	0.85 (3.88~1)
rs7043516	100617433	C	0.056	0.19	0.66	0.95 (0.75~1.2)	0.19	0.66	0.95 (0.19~1.2)
rs116899397	100617879	C	0.072	5.78	0.0092	0.76 (0.61~0.95)	5.29	0.0076	0.77 (5.29~0.96)
rs874004	100622118	C	0.20	3.34	0.068	0.88 (0.77~1.01)	2.83	0.092	0.89 (2.83~1.02)
rs117236550	100623216	T	0.069	4.19	0.01	0.79 (0.64~0.99)	3.79	0.051	0.8 (3.79~1)
rs12343182	100624259	G	0.085	3.42	0.064	0.83 (0.68~1.01)	3.79	0.0087	0.8 (3.79~1)
rs10119760	100624602	G	0.085	3.42	0.064	0.83 (0.68~1.01)	5.06	0.012	0.79 (5.06~0.97)
rs10113907	100624748	C	0.20	3.36	0.067	0.88 (0.77~1.01)	5.06	0.012	0.79 (5.06~0.97)
rs7860144	100626884	A	0.085	3.15	0.076	0.84 (0.69~1.02)	2.67	0.1	0.89 (2.67~1.02)
rs13299924	100627562	C	0.085	3.15	0.076	0.84 (0.69~1.02)	5.06	0.012	0.79 (5.06~0.97)

注: A1为等位基因; F_U为正常组中等位基因频率。

3 讨论

FOXE1基因属于哺乳动物叉头盒(forkhead box, FOX)转录因子家族的一员, 包含一个与胚胎生长发育特异性相关的DNA结合域^[22-24]; 作为一种功能性转录因子, 通过激活其他相关转录因子共同参与真核生物的生长发育^[24]。研究^[25,31-32]指出在小鼠胚胎发育期间, FOXE1基因在甲状腺原基、颅咽部外胚层、前肠内胚层等均能检测到表达。在小鼠胚胎10.5~11.5 d时, FOXE1基因在口咽上皮中有特异表达, 这种转录因子模式在侧鼻突和上颌突融合形成上唇过程中特别重要; 在13.5~15.5 d时, FOXE1基因在继发性腭上皮中也

有差异表达^[25]。FOXE1转录因子可以通过其靶基因msh同源框1(msh homeobox 1, MSX1)和转化生长因子 β 3(transforming growth factor beta 3, TGF β 3)直接参与胚胎的成长发育, 也可以通过其他信号通路间接参与胚胎的生长发育^[33]。以上研究说明FOX-E1基因在胚胎颅面部发育过程中起着极为重要的作用。另外, 也有研究^[32-35]表明FOXE1基因突变可能导致Bamforth Lazarus综合征, 其特征性临床表现以先天性甲状腺功能减退、腭裂表型、毛发异常和后鼻孔闭锁最为显著, 这也提示FOXE1基因参与了胚胎组织分化生长相关的调控通路。

2004年Marazita等^[9]基于NSCL/P大家系全基因组连锁研究发现, 人类基因组9号染色体长臂

22~33 区 (即 FOXE1 基因所在染色体区域) 与 NSCL/P 发生有显著相关性。2014 年 Ludwig 等^[20] 研究证明了 FOXE1 基因是北欧人群 NSCL/P 发病的候选基因。许多研究者^[36-39] 在不同人群中报道了 FOXE1 基因或其附近的位点与 NSCL/P 发生的相关性, 但是部分研究结果存在不一致性, 需要进一步的验证。Lennon 等^[36] 研究指出, FOXE1 基因位点 rs3758249 与哥伦比亚人群 NSCPO 亚型发生显著相关。Nikopensius 等^[37] 报道了 FOXE1 基因 rs7860144 位点与东欧人群 NSCL/P 发生有相关性。Xie 等^[38] 研究证实 FOXE1 基因 rs1867277 位点是 NSCL/P 发生的易感位点。另外, 在 2020 年一项荟萃分析中表明, FOXE1 的 rs4460498 位点与 NSCL/P 发生有相关性; rs4460498 位点的 TT 基因型与 NSCL/P 发生的相关性比 CC、CT 基因型显著; rs10217225 的 TT 基因型与 NSCL/P 发生风险增高有显著相关性^[39]。以上研究表明 FOXE1 基因是 NSCL/P 发生的重要候选基因。

本研究在针对 FOXE1 基因单倍型区域捕获测序中发现, 位点 rs13292899 与 NSCLO ($P=6.41E-23$)、NSCLP ($P=2.36E-15$) 和 NSCL/P ($P=1.85E-27$) 均有相关性。此次研究表明 FOXE1 基因 rs13292899 位点与中国西部汉族人群中 NSCL/P 及其亚型发生有相关性, 即 FOXE1 基因 rs13292899 位点是 NSCL/P 发生的新易感位点。以往研究^[25] 表明, 位于 FOXE1 基因附近 LD 区域内的 rs3758249 和 rs4460498, 这 2 个 SNPs 位点与欧洲人群 NSCL/P 和 NSCPO 发生有显著相关性; 并且这 2 个 SNPs 位点与中欧人群和中美人群 NSCL/P 发生也有密切关系^[39]。此外, Yin 等^[40] 选择了 FOXE1 基因 3 个 SNPs 位点在中国人群 (602 名病例和 605 名对照) 中进行关联研究, 发现 FOXE1 基因的 rs7043516 位点增加了 NSCLO 发生的风险。此外, Lammer 等^[21] 通过对加州人群的病例对照研究指出, FOXE1 基因的多态性增加了包括 NSCLO、NSCPO 和 NSCLP 亚型在内的 NSCL/P 发病的风险。以上研究进一步证实了 FOXE1 基因是 NSCL/P 的易感基因。

第二阶段在 1 000 名 NSCLO、1 000 名 NSCPO 和 1 000 名正常对照样本中进行验证研究 (验证样本的基因型数据从 2019 年 GWAS 中提取^[30]), 发现 rs13292899 位点在 NSCLO 组仍然表现出统计学相关性 ($P=0.008 5$, $OR=0.85$, $95\%CI: 0.73\sim 1$), 而在 NSCPO 组没有统计学差异 ($P=0.032$, $OR=0.83$, $95\%CI: 4.99\sim 0.98$)。笔者得出结论, FOXE1 基因的 rs13292899 位点与 NSCLO 发生有关。由于不同

的胚胎发育机制, 各 SNPs 位点对 NSCL/P 发生的贡献程度不同。猜测 rs13292899 位点对于 NSCLO 的发生贡献大于 NSCPO, 在 NSCLO 发生中显著性更强。另外, 在验证分析中, 也发现 rs79268293 ($P=0.013$, $P=0.022$)、rs10983951 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$)、rs117227387 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$)、rs3758250 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$) 和 rs116899397 ($P=0.009 2$, $P=0.007 6$), 这 5 个 SNPs 位点不仅与 NSCLO 发生相关, 而且与 NSCPO 发生相关。另外, 研究结果也发现 rs13292899 ($P=0.008 5$)、rs74606599 ($P=0.008 3$)、rs143226042 ($P=0.008 3$) 和 rs117236550 ($P=0.01$), 这 4 个 SNPs 位点与 NSCLO 发生相关; rs12343182 ($P=0.008 7$)、rs1011-9760 ($P=0.012$)、rs10113907 ($P=0.012$) 和 rs13-299924 ($P=0.012$) 仅与 NSCPO 发生相关。以上研究结果说明了 FOXE1 基因是 NSCL/P 发生的重要基因, 也表明了不同的 SNPs 位点对于 NSCL/P 各亚型发生的贡献程度有差异, 所以与疾病发生的相关性有明显的差异。同样, 2019 年 Huang 等^[30] 基于中国人群 GWAS 研究指出 NSCL/P 各个亚型的易感基因位点是不同的, 并提出了一个有趣的观点: IRF6 基因在 NSCLO 和 NSCPO 发生中具有相反的作用, 原因是 IRF6 基因的表达量有显著性差异。这一观点与本研究中 NSCL/P 各个亚型的易感基因位点有差异是一致的。

综上所述, 本研究在中国西部汉族人群中通过关联研究的方法, 在 FOXE1 基因上发现了一个新的易感 SNPs 位点 rs13292899 与 NSCL/P 及 NSCLO 亚型发生密切相关, 以及其他 13 个与 NSCLO 或 NSCPO 相关的 SNPs 位点, 补充和完善了中国西部汉族人群唇腭裂易感基因数据库资料, 但是对于发现的新的易感位点的功能有待进一步验证。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Mangold E, Ludwig KU, Nöthen MM. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting[J]. Trends Mol Med, 2011, 17(12): 725-733.
- [2] Mossey PA, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective[J]. Front Oral Biol, 2012, 16: 1-18.
- [3] 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.
- [4] Fan D, Wu S, Liu L, et al. Prevalence of non-syndromic orofacial clefts: based on 15,094,978 Chinese perinatal infants[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(17): 13981-13990.
- [5] Christensen K, Juul K, Herskind AM, et al. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth[J]. *BMJ*, 2004, 328(7453): 1405.
- [6] Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research[J]. *J Dent Res*, 2008, 87(2): 119-125.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Ge X, Hong JW, Shen JY, et al. Investigation of candidate genes of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, using both case-control and family-based association studies[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2019, 98(26): e16170.
- [10] Zhang B, Duan S, Shi J, et al. Family-based study of association between MAFB gene polymorphisms and NS-CL/P among western Han Chinese population[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(8): 1109-1116.
- [11] Zhang BH, Shi JY, Lin YS, et al. VAX1 gene associated non-syndromic cleft lip with or without palate in Western Han Chinese[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 95: 40-43.
- [12] Fontoura C, Silva RM, Granjeiro JM, et al. Association of WNT9B gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in brazilian nuclear families[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2015, 52(1): 44-48.
- [13] Zhang BH, Huang N, Shi JY, et al. Homozygote C/C at rs12543318 was risk factor for non-syndromic cleft lip only from Western Han Chinese population[J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(6): 620-626.
- [14] Hao J, Gao R, Wu W, et al. Association between BMP4 gene polymorphisms and cleft lip with or without cleft palate in a population from South China[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 93: 95-99.
- [15] Cura F, Palmieri A, Girardi A, et al. Possible effect of SNAIL family transcriptional repressor 1 polymorphisms in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate[J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(7): 2535-2541.
- [16] Zhou R, Wang M, Li W, et al. Haplotype and haplotype-environment interaction analysis revealed roles of SPRY2 for NSCL/P among Chinese populations[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(4): 557.
- [17] Grosen D, Bille C, Petersen I, et al. Risk of oral clefts in twins[J]. *Epidemiology*, 2011, 22(3): 313-319.
- [18] Xu DP, Qu WD, Sun C, et al. A study on environmental factors for nonsyndromic cleft lip and/or palate[J]. *J Craniofac Surg*, 2018, 29(2): 364-367.
- [19] Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, et al. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(2): 161-173.
- [20] Ludwig KU, Böhmer AC, Rubini M, et al. Strong association of variants around FOXE1 and orofacial clefting [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(4): 376-381.
- [21] Lammer EJ, Mohammed N, Iovannisci DM, et al. Genetic variation of FOXE1 and risk for orofacial clefts in a California population[J]. *Am J Med Genet A*, 2016, 170(11): 2770-2776.
- [22] Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P. The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(20): 7302-7314.
- [23] Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, et al. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter[J]. *EMBO J*, 1989, 8(9): 2537-2542.
- [24] Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M, et al. Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(2): 576-588.
- [25] Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, et al. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(24): 4879-4896.
- [26] Leslie EJ, Carlson JC, Shaffer JR, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate [J]. *Human Genet*, 2017, 136(3): 275-286.
- [27] Moreno Uribe LM, Fomina T, Munger RG, et al. A population-based study of effects of genetic loci on orofacial clefts[J]. *J Dent Res*, 2017, 96(11): 1322-1329.

- [28] Ray D, Venkataraghavan S, Zhang W, et al. Pleiotropy method reveals genetic overlap between orofacial clefts at multiple novel loci from GWAS of multi-ethnic trios [J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(7): e1009584.
- [29] 尹晓晴. 染色体20q12和FOXE1基因遗传变异与中国人群非综合征型唇腭裂遗传易感性的研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2019.
- Yin XQ. Study on the genetic susceptibility of non-syndromic cleft lip and palate in the Chinese population: variations in chromosome 20q12 and the FOXE1 gene [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2019.
- [30] Huang L, Jia Z, Shi Y, et al. Genetic factors define CPO and CLO subtypes of nonsyndromic orofacial cleft [J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(10): e1008357.
- [31] Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation [J]. *EMBO J*, 1997, 16(11): 3185-3197.
- [32] Dathan N, Parlato R, Rosica A, et al. Distribution of the *tif2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair [J]. *Dev Dyn*, 2002, 224(4): 450-456.
- [33] Venza I, Visalli M, Parrillo L, et al. *MSX1* and *TGF-beta3* are novel target genes functionally regulated by *FOXE1* [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(5): 1016-1025.
- [34] Trueba SS, Augé J, Mattei G, et al. *PAX8*, *TITF1*, and *FOXE1* gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(1): 455-462.
- [35] Imani MM, Safaei M, Lopez-Jornet P, et al. A systematic review and meta-analysis on protective role of forkhead box E1 (*FOXE1*) polymorphisms in susceptibility to non-syndromic cleft lip/palate [J]. *Int Orthod*, 2019, 17(3): 437-445.
- [36] Lennon CJ, Birkeland AC, Nuñez JA, et al. Association of candidate genes with nonsyndromic clefts in Honduran and Colombian populations [J]. *Laryngoscope*, 2012, 122(9): 2082-2087.
- [37] Nikopensius T, Kempa I, Ambrozaitytė L, et al. Variation in *FGF1*, *FOXE1*, and *TIMP2* genes is associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2011, 91(4): 218-225.
- [38] Xie L, Deng Y, Yuan Y, et al. Association of SNP rs1867277 in *FOXE1* gene and cleft lip with or without cleft palate in a Han Chinese population [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2018, 37(2): 89-94.
- [39] Xiao WL, Jia KN, Yu G, et al. Association between forkhead box E1 polymorphisms and risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a meta-analysis [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2020, 23(2): 151-159.
- [40] Yin X, Zhang H, Zhu Z, et al. *FOXE1* polymorphisms and non-syndromic orofacial cleft susceptibility in a Chinese Han population [J]. *Oral Dis*, 2016, 22(4): 274-279.

(本文编辑 杜冰)