

一个先天缺牙家系的基因突变及病例对照研究

王璟^{1,2} 陈静^{2,3} 沈韵¹ 吴松涛² 黄稔欢² 王飞宇² 赖文莉²

摘要 目的 探讨非综合征型多数牙先天缺失患者的人类成对盒基因 9 (PAX9)、同源盒基因 1 (MSX1)、中轴抑制蛋白 2 (AXIN2) 突变位点,为该疾病的病因学研究提供依据。方法 对该例患者及其家庭成员进行全身系统检查、口腔专科检查(含拍摄曲面断层片)及家系调查;抽取外周静脉血,提取基因组 DNA,采用聚合酶链式反应(PCR)扩增 PAX9 基因的外显子 1、2、3、4,MSX1 基因外显子 1、2 及 AXIN2 基因外显子 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11,通过对分段 PCR 纯化产物进行测序,并结合系谱图进行基因突变分析。同时,通过病例-对照实验(先天缺牙组 50 例,健康对照组 100 例)对突变位点 AXIN2G1807C 与先天缺牙的相关性进行分析。结果 先证者的祖母和外祖父为兄妹关系。口内检查以及曲面断层片发现先证者为无牙牙合,仅见左侧下颌升支处有一阻生牙影像,其余家庭成员牙齿数目发育正常。均未合并其他组织器官的先天发育异常。先证者及部分表型正常者分别发现 3 个已知突变位点,分别为 AXIN2 外显子 6 第 1 365 位 A 变为 G (rs9915936),外显子 7 第 1 807 位 G 变为 C (rs145353986) 以及外显子 8 第 2 062 位 C 变为 T (p.Leu688Leu)。PAX9、MSX1 未见异常。病例组和对照组间 AXIN2G1807C 的基因频率和基因型频率差异无统计学意义。结论 AXIN2c. 2062C > T 突变可能是导致中国人群非综合征型多数牙缺失的危险因素之一。AXIN2c. 1807G > C 与此类疾病之间不存在明显的相关性。

关键词 非综合征型先天缺牙;成对盒基因 9;肌节同源盒基因 1;中轴抑制蛋白 2

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0070-05

先天缺牙是临床常见的发育异常性疾病之一,目前病因尚不明确。多数研究^[1-4]认为先天缺牙是由遗传和环境等多因素共同作用所致,其中遗传因素起主导作用。现阶段先天性缺牙的遗传学研究大

多集中于对候选基因的突变筛选,成对盒基因 (paired box 9, PAX9)、肌节同源盒基因 (muscle segment homeobox gene 1, MSX1)、中轴抑制蛋白 (axis inhibition protein 2, AXIN2) 是目前较为公认的与先天缺牙有关的候选基因^[5]。基因型-表型遗传分析认为,MSX1 基因突变造成了大多数前磨牙和第三磨牙的先天缺失,而 PAX9 基因突变主要影响磨牙的发育^[5-7]。为了探讨中国先天缺牙患者表型与基因型的关系,现对一个特殊的先天缺牙家系进行了临床及 MSX1、PAX9 和 AXIN2 基因突变分析,并通过病例-对照实验进一步验证已发现的相关位点。

1 材料与方法

1.1 病例资料及背景调查 该研究由四川大学华西口腔医院伦理委员会批准(2009022)。所有志愿者均为汉族人,来自中国成都及其周边地区,充分了解本研究内容并签署知情同意书。先证者及其家庭成员调查:先证者(IV-2)因全口牙齿缺失于四川大学华西口腔医院就诊。通过多次家访求证,收集先证者及其家系成员的详细资料并绘制系谱图。对先证者及其家庭成员进行详细全身系统检查、口腔专科检查并记录相关病史,包括头发、指甲、皮肤、汗腺等外胚叶来源组织的检查以及口腔曲面断层片检查。病例-对照试验:征集 2009 年 10 月~2011 年 11 月于四川大学华西口腔医院就诊患者及健康志愿者,共纳入单纯性牙缺失患者 50 例和健康志愿者 100 例,对其进行全面的口腔专科检查,包括拍摄口腔曲面断层片。同时,对其进行详细的全身系统检查,包括头发、指甲、皮肤、汗腺等外胚叶来源组织的检查,并记录相关病史。

1.2 基因筛查

1.2.1 样本采集及 DNA 提取 分别抽取志愿者外周静脉血各 5 ml,加入 1 ml ACD(1.32% 柠檬酸钠,0.48% 柠檬酸,1.47% 葡萄糖)抗凝,采用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.2.2 引物设计与合成 根据 MSX1、PAX9 和 AXIN2 在 NCBI GenBank 中的全序列设计引物,分别扩增 PAX9 基因第 1~4 外显子^[8]、MSX1 基因第 1、2 外显子^[8]以及 AXIN2 基因第 2~11 外显子^[8],

2014-09-18 接收

基金项目:上海市卫生局科研项目(编号:20124Y049)

作者单位:¹同济大学附属第十人民医院口腔科,上海 200072

²口腔疾病研究国家重点实验室四川大学华西口腔医院,成都 610041

³口腔生物医学及转化医学实验室同济大学附属口腔医院正畸科,上海 200072

作者简介:王璟,女,主治医师;

赖文莉,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wendlilai@scu.edu.cn

引物均由上海生工生物工程有限公司采用 Oligo Primer Analysis Software 合成。

1.2.3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增目的片段 反应总体积为 50 μl , 其中加入 10 \times 反应缓冲液 (MgCl₂ 浓度为 2 mmol/L) 5 μl 、基因组 DNA 约 3 μl 、TaqDNA 聚合酶 (TaKaRa Biotechnology, Dalian China) 2.5 U, 使 dNTP 终浓度达到 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 上下游引物的终浓度均达到 0.3 mol/ μl 。循环参数设置为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。全部 PCR 产物均经过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测确认。

1.2.4 PCR 产物纯化及 DNA 测序 电泳分离 PCR 产物, 切取 DNA 条带, 使条带的相对分子量为预期大小, 采用胶回收试剂盒回收该条带, 除去 PCR 引物、酶及其他杂质, 得到纯化的 PCR 产物。利用 BigDye 四色荧光测序反应试剂盒 (BigDye Terminator Kit), 以所得的纯化 PCR 产物为模板在 9600 型 PCR 仪上进行测序反应, 反应参数为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 120 s, 96 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 120 s, 25 个循环。反应结束后, 采用 ABI PRISM 310 型全自动 DNA 测序仪进行序列测定, 其测序结果采用 DNASTAR 软件进行编辑、比较。

1.2.5 突变分析和蛋白预测 在 NCBI GenBank 上将所得的测序结果与人类基因组 PAX9、MSX1、AXIN2 基因序列进行同源序列比较, 并参照系谱图进行基因突变分析 (GenBank accession: PAX9, NC_000014.837126773 - 37147012; MSX1, NG_008121.1; AXIN2, NG_012142.1)。三维蛋白结构预测模型预测 AXIN2G1807C 所引起的蛋白构象的改变。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验分析 AXIN2G1807C 突变位点基因频率和基因型在病例组和对照组之间的差异 (SPSS 17.0, IBM, New York, NY, USA)。

2 结果

2.1 临床诊断结果 先证者家族中无先天缺牙病史及结肠癌史, 其祖母及外祖父为兄妹关系, 见图 1 A。口内检查及曲面断层片结果显示: 先证者 (IV-2) 为无牙颌, 仅见左侧下颌升支处有一阻生牙, 患者口内及 X-RAY 影像见图 1B、1C。追问病史, 患儿家长述乳牙期存在相同部位牙缺失, 既往无外伤及疾病史, 有近亲婚配史, 无遗传史。其余家庭成员牙齿数目发育正常, 无类似病史。均未合并口面裂、皮

肤及其附属组织、毛发等其他组织器官的先天发育异常。

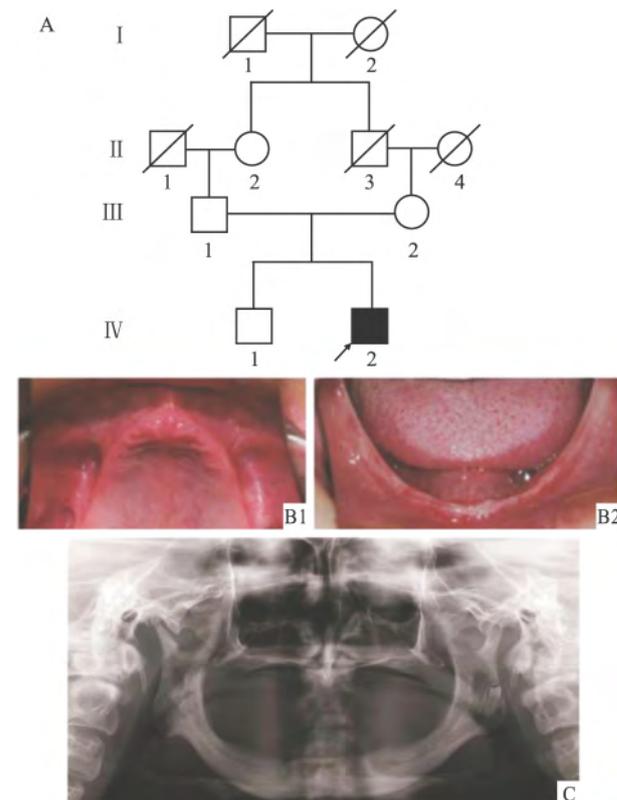


图1 先证者家系系谱图及口内牙列像

A: 先证者 (IV-2) 家系系谱图; B1: 先证者 (IV-2) 口内上颌牙列像; B2: 先证者 (IV-2) 口内下颌牙列像; C: 先证者 (IV-2) 曲面断层片; \square : 先证者

2.2 基因筛查及蛋白预测结果 先证者 (IV-2) 及部分表型正常者分别发现 3 个已知突变位点, 分别为 AXIN2 外显子 6 第 1 365 位 A 变为 G (rs9915936), 见图 2。外显子 7 第 1 807 位 G 变为 C (rs145353986), 见图 3、4。外显子 8 第 2 062 位 C 变为 T (p. Leu688Leu), 见图 5。PAX9、MSX1 未见异常。通过蛋白结构预测发现, 外显子 7 第 1 807 位 G 变为 C (rs145353986) 后所对应的蛋白结构相较于正常蛋白结构存在差异, 见图 6。

2.3 AXIN2G1807C 与先天缺牙的相关性分析 AXIN2G1807C 基因频率在两组之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.107, P = 0.743$)。同时, AXIN2G1807C 基因型频率在两组之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.571, P = 0.804$)。

3 讨论

在 AXIN2 测序结果中, 本研究检测到先证者

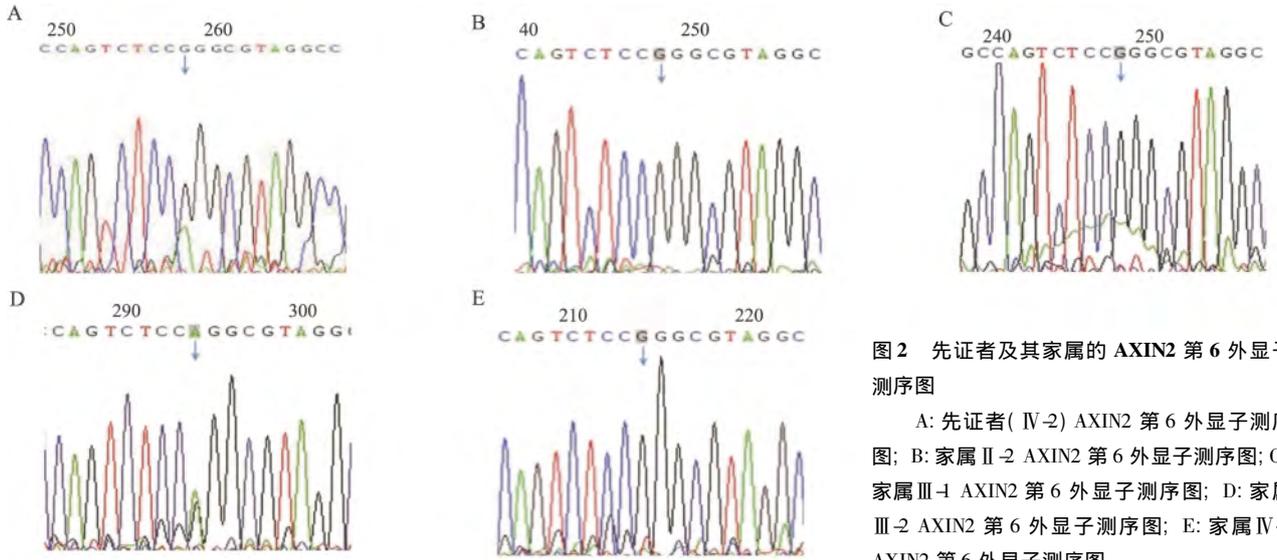


图2 先证者及其家属的 AXIN2 第 6 外显子测序图

A: 先证者(IV-2) AXIN2 第 6 外显子测序图; B: 家属 II-2 AXIN2 第 6 外显子测序图; C: 家属 III-1 AXIN2 第 6 外显子测序图; D: 家属 III-2 AXIN2 第 6 外显子测序图; E: 家属 IV-1 AXIN2 第 6 外显子测序图

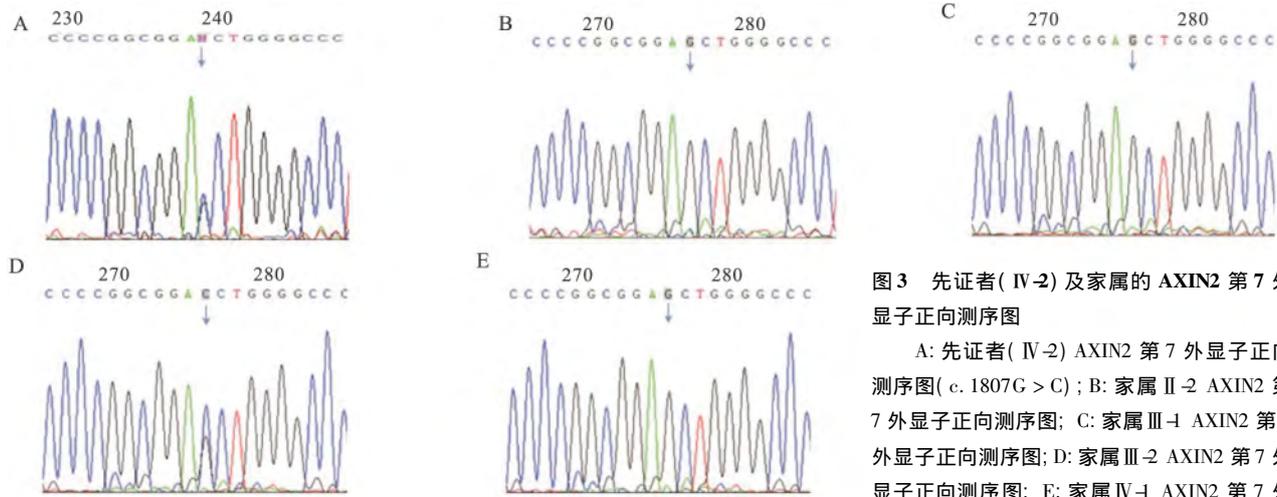


图3 先证者(IV-2) 及家属的 AXIN2 第 7 外显子正向测序图

A: 先证者(IV-2) AXIN2 第 7 外显子正向测序图(c. 1807G > C); B: 家属 II-2 AXIN2 第 7 外显子正向测序图; C: 家属 III-1 AXIN2 第 7 外显子正向测序图; D: 家属 III-2 AXIN2 第 7 外显子正向测序图; E: 家属 IV-1 AXIN2 第 7 外显子正向测序图

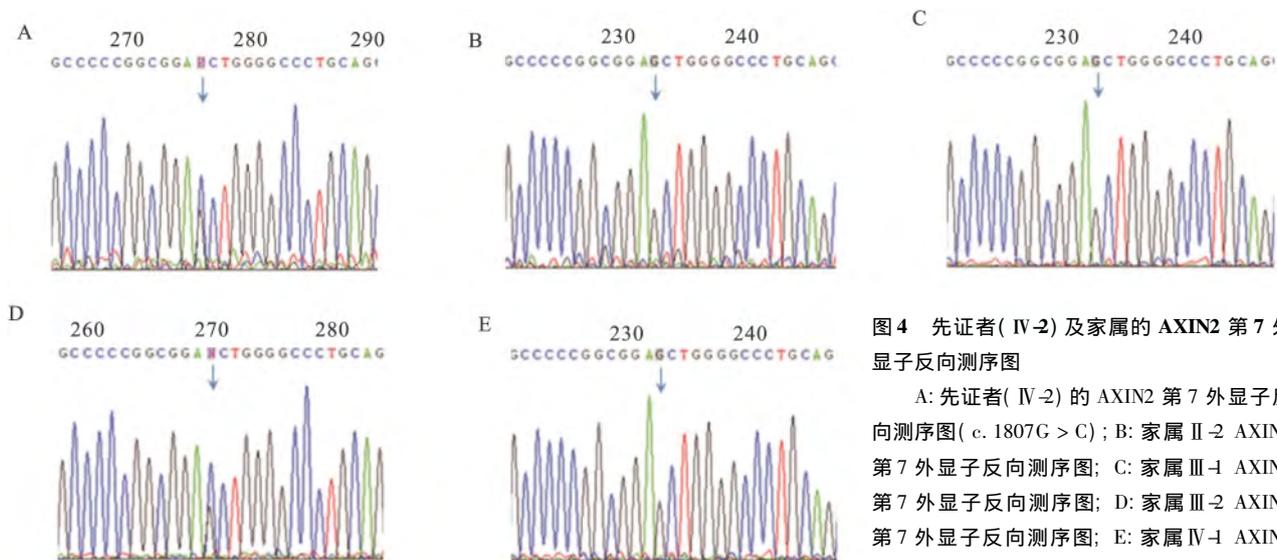


图4 先证者(IV-2) 及家属的 AXIN2 第 7 外显子反向测序图

A: 先证者(IV-2) 的 AXIN2 第 7 外显子反向测序图(c. 1807G > C); B: 家属 II-2 AXIN2 第 7 外显子反向测序图; C: 家属 III-1 AXIN2 第 7 外显子反向测序图; D: 家属 III-2 AXIN2 第 7 外显子反向测序图; E: 家属 IV-1 AXIN2 第 7 外显子反向测序图

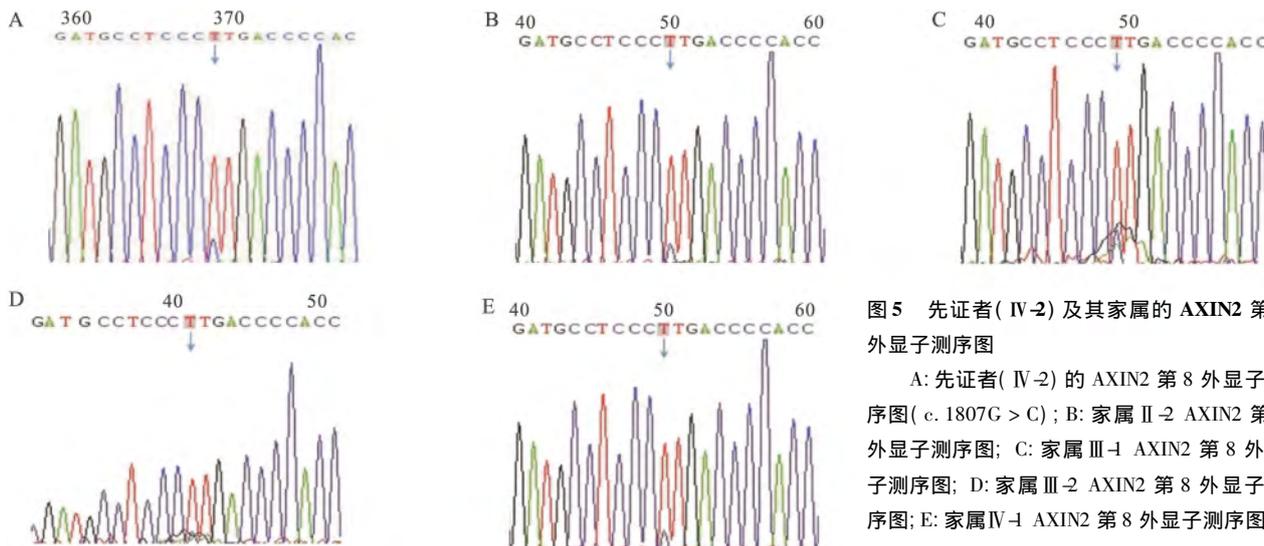


图5 先证者(IV-2)及其家属的AXIN2第8外显子测序图

A: 先证者(IV-2)的AXIN2第8外显子测序图(c.1807G>C); B: 家属II-2 AXIN2第8外显子测序图; C: 家属III-4 AXIN2第8外显子测序图; D: 家属III-2 AXIN2第8外显子测序图; E: 家属IV-1 AXIN2第8外显子测序图

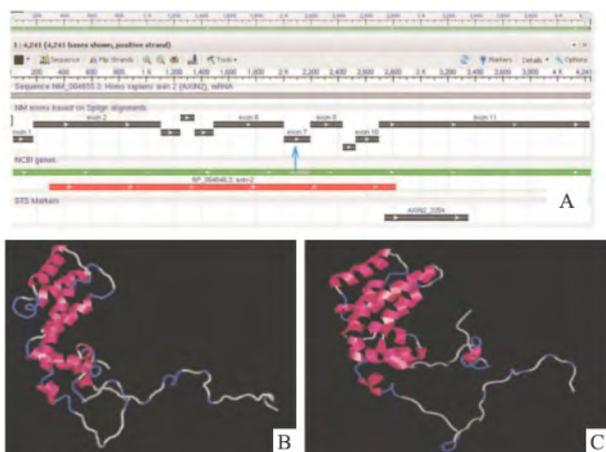


图6 AXIN2基因结构及相应蛋白的三维模拟

A: AXIN2基因结构,箭头所指处为c.1807G>C变异位点处; B: 正常AXIN2基因翻译产生蛋白结构的三维模拟; C: c.1807G>C位点变异后的蛋白结构的三维模拟

(IV-2)存在3个已知突变,分别为外显子6第1365位A变为G(rs9915936),外显子7第1807位G变为C(rs145353986),外显子8第2062位C变为T(p.Leu688Leu)。

作为Wnt信号转导通路的负反馈调节因子,AXIN2调控胚胎的发育和组织的形成。前期有关牙发育的分子研究^[9]证实在牙发育过程中有大量的Wnt基因的表达,其表达的变化与否影响牙的发育。AXIN2c.1365A>G(rs9915936)分布于正常人群中,与多数牙缺失的相关性不大。Mostowska et al^[10]研究发现AXIN2c.2062C>T突变增加了牙缺失的风险,与本研究结果一致,由此可以推测AXIN2c.2062C>T突变可能是导致先证者(IV-2)多数牙缺失的危险因素之一。AXIN2基因外显子7上的杂合突变,即第1807位核苷酸由G变为C,属于错

义突变类型,相应的第603位氨基酸由丙氨酸变为脯氨酸。碱基的替代发生在编码区,有可能引起相应蛋白的变化,从而引起牙发育的异常。通过蛋白结构预测发现,碱基异常改变后所对应的蛋白结构相较于正常蛋白结构存在差异。AXIN2基因外显子7是目前该基因突变的研究热点之一^[11],但有关AXIN2G1807C突变位点的报道较少。在本研究中,表型正常者III-2也检出这一基因突变。因此,先证者(IV-2)多数牙先天缺失是否与AXIN2基因的这一突变位点有关,还是与其他基因共同起作用有关,有待于深入研究。本研究通过进一步的病例-对照研究证实该突变位点与非综合征型多数牙先天缺失之间不存在明显的相关关系,为研究AXIN2基因突变与此类疾病之间的关系提供了一个新的依据。

目前,非综合征型先天缺牙的病因和发病机制尚不清楚,大多数学者认为该疾病是遗传和环境共同作用的一种多因素疾病,具有其复杂性^[11]。迄今为止,对于引起同一基因型而表型不同的原因尚不明确,基因型和表型之间是否确实存在剂量关系仍然存在争议。本研究结果显示AXIN2c.2062C>T突变可能是导致先证者(IV-2)多数牙缺失的危险因素之一,证实AXIN2c.1807G>C与非综合征型多数牙先天缺失之间不存在明显的相关关系。由于多个基因突变可引起先天缺牙,每个基因具有多种突变形式,且存在遗传异质性,采用候选基因筛选突变所得的阳性率并不高,因而需要收集更多的先天性缺牙家系对该病的病因学进行探索以及提供足够的样本量和参照已建立的数据库进行相关性分析。

参考文献

[1] Zeng L, Fagotto F, Zhang T, et al. The mouse Fused locus en-

- codes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation [J]. *Cell*, 1997, 90(1): 181–92.
- [2] Callahan N, Modesto A, Meira R, et al. Axis inhibition protein2 (AXIN2) polymorphisms and tooth agenesis [J]. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(1): 45–9.
- [3] Burzynski N J, Escobar V H. Classification and genetics of numeric anomalies of dentition [J]. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 1983, 19(1): 95–106.
- [4] Graber L W. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns [J]. *J Am Dent Assoc*, 1978, 96(2): 266–75.
- [5] Nieminen P. Genetic basis of tooth agenesis [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2009, 312(B): 320–42.
- [6] Miletich I, Sharpe P T. Normal and abnormal dental development [J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(1): 69–73.
- [7] Das P, Stochton D W, Bauer C, et al. Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia [J]. *Hum Genet*, 2002, 110(4): 371–6.
- [8] Wang J, Jian F, Chen J, et al. Sequence analysis of PAX9, MSX1 and AXIN2 genes in a Chinese oligodontia family [J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(10): 1027–34.
- [9] Zhang Y D, Chen Z, Song Y Q, et al. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells [J]. *Cell Res*, 2005, 15(5): 301–16.
- [10] Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski P P. Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis [J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(3): 262–6.
- [11] Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2000, 117(6): 650–6.

Gene mutations in a Chinese family associated with oligodontia: A case-control study

Wang Jing^{1,2}, Chen Jing^{2,3}, Shen Yun¹, et al

¹Dept of Stomatology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072;

²State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041;

³Laboratory of Oral Biomedical Science and Translational Medicine, Dept of Orthodontics, School of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072

Abstract Objective To investigate the mutation characteristics of paired box homeotic gene 9 (PAX9), muscle segment homeobox gene 1 (MSX1) and Axis inhibition protein 2 (AXIN2) of patients with congenital oligodontia so as to understand the etiology and mechanism. **Methods** The proband and his family members from an ethnic Han family underwent complete physical and oral examinations (including panoramic radiograph) and received retrospective review. Blood samples were collected and polymerase chain reaction (PCR) was taken. Mutation analysis was employed in exon1 2 3 4 of PAX9, exon1 2 of MSX1 and exon 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 of AXIN2 coding regions. A case-control study on 50 subjects with sporadic tooth agenesis (cases) and 100 healthy controls was performed, which genotyped a novel AXIN2 gene polymorphism (G1807C). **Results** The patrilineal grandmother and the maternal grandfather of the proband were found siblings. The proband lacked all teeth except an impacted tooth in the left angulus mandibulae. Other family members maintained normal dentitions. No abnormalities were revealed by clinical examination of the family members, including orofacial cleft, ectodermal abnormalities of hair, skin and sweat glands. Three known AXIN2 gene variants, c. 1365A > G (rs9915936), c. 1807G > C (rs145353986) and c. 2062C > T (p. Leu688Leu) were identified in the proband and some of the family members. No mutation was found in PAX9 and MSX1. No significant difference was found in the allele and genotype frequencies of the novel variant between the subjects and controls. **Conclusion** Our findings may imply that the AXIN2 c. 2062C > T is a risk factor for congenital oligodontia in the Chinese population and there is no significant association between c. 1807G > C and congenital oligodontia.

Key words non-syndromic congenital missing teeth; paired box homeotic gene 9; muscle segment homeobox gene 1; axis inhibition protein 2