

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001737

基因芯片筛选非综合征型唇腭裂差异表达基因的初步研究

李俊旬, 邱 林, 王选琴, 田晓菲, 傅跃先, 刘 燕, 肖 军, 李天武

(重庆医科大学附属儿童医院整形外科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、重庆市儿科学重点实验室、
重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:利用全基因组表达谱芯片技术,分析非综合征型唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without palate, NSCL/P)患儿与正常儿童基因表达的差异,筛选出非综合征型唇腭裂相关基因。**方法:**采用离心柱法分别提取正常儿童和 NSCL/P 患儿腭部组织各 3 例的总 RNA,经纯化后逆转录为 cDNA,利用荧光染料(Cy3)标记 aaUTP,转录合成标记的 cRNA,经纯化及质检后与 Agilent 4 × 44 k 人类全基因组表达谱芯片杂交,扫描荧光信号图像,对芯片原始数据进行归一化处理,利用倍数差异和 *t* 检验筛选差异表达基因,采用上海博豪生物在线分析系统进行基因的功能注释和关联分析,明确差异基因的生物学功能,选取特定的差异表达基因,应用实时荧光 PCR 技术验证芯片结果的可靠性。**结果:**筛选出差异基因共 254 个,其中表达上调的有 151 个,表达下调的有 103 个。选取 5 条差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证,ADH1C($t=5.132, P=0.000$)、RDH10($t=2.960, P=0.039$)、HIST1H2BD($t=4.446, P=0.001$) 3 条基因表达下调, KAT2B($t=-4.945, P=0.000$)、FOSB($t=-3.666, P=0.005$) 2 条基因表达上调,差异有统计学意义,且与芯片结果表达趋势一致。**结论:**NSCL/P 患儿基因表达与正常儿童存在明显差异,分析这些差异基因,有助于阐明 NSCL/P 的发病机制,为疾病的预防提供理论依据。

【关键词】非综合征型唇腭裂;基因芯片;差异表达基因**【中图分类号】**R726.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-10-20

A pilot study of differential genes in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate(NSCL/P) by expression microarray

Li Jiaoxun, Qiu Lin, Wang Xuanqin, Tian Xiaofei, Fu Yuexian, Liu Yan, Xiao Jun, Li Tianwu

(Department of Burn Plastic Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University;

Children's Development and Disorders Key Laboratory of Ministry of Education; International and National

Science and Technology Cooperation Base of Children Development and Critical Disorders;

Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】Objective: To analyze the differentially expressed genes between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate(NSCL/P) patients and healthy control using gene expression microarray technology and to screen NSCL/P related genes. **Methods:** Total RNA was extracted from 3 NSCL/P patients and 3 controls by centrifugal column method. The RNA was purified and qualitatively qualified, then reverse transcribed into cDNA. The cDNA was transcribed into cRNA; fluorescence dye Cy3 was used to label the cRNA. The labeled cRNA was used to hybrid with the Agilent 4 × 44 k human genome-wide expression of the gene chip; the fluorescence signal was scanned by the computer and the original data were normalized. The differential expression genes was screened by *t*-test and fold difference. The gene functional annotation and correlation analysis were carried out by the online analysis system of Shanghai Biohao biology to clarify the biological functions of the different genes. The specific differential expression genes were selected and the reliability of the chip results was verified by real-time PCR. **Results:** Totally 254 differentially expressed genes were screened out, among which 151 had up-regulated expression and 103 had down-regulated expression. Five differential expression genes were selected for real-time PCR. ADH1C($t=5.132, P=0.000$), RDH10($t=2.960, P=0.039$), HIST1H2BD($t=4.446, P=0.001$) had down-regulated expression, KAT2B($t=-4.945, P=0.000$), FOSB($t=-3.666, P=0.005$) had up-regulated expression. The results showed that three genes had down-regulated expression and two genes had up-regulated expression, which was consistent with the result of chip ex-

pression. **Conclusion:** There are significant differences in gene expression between normal children and children with NSCL/P. Analyzing these differentially expressed genes may help clarify the pathogenesis of NSCL/P and provide a theoretical basis for disease prevention.

【Key words】nonsyndromic cleft lip with or without palate; gene chip; differentially expressed genes

作者介绍:李俊旬, Email: lijiaoxun1@163.com,

研究方向:非综合征型唇腭裂的发病机制研究。

通信作者:邱 林, Email: qiulin118@126.com。**基金项目:**重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:cstc2013jcyjA

10018);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:kj130331)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.1550.038.html

(2018-05-25)

非综合征型唇腭裂(nonsyndromic cleft lip with or without palate, NSCL/P)是新生儿常见的畸形之一,包括唇裂、唇裂合并腭裂、单纯性腭裂。NSCL/P 在中国人群中的发病率为 1.42 /1 000^[1]。NSCL/P 病因复杂,由环境和遗传因素共同作用引起,大多数学者认为遗传因素占主导地位^[2]。目前,MSX1、IRF6、TGF- β 3、TBX1 和 p63 等基因已通过小鼠基因敲除实验证实与唇腭裂相关^[3]。Beaty 等^[4]在欧洲和东南亚人群中发现 ABCA4、MAFB 等基因与该病有关。近来,CHN2、CDH19、TCEB3 和 KIF7 也被列入候选基因^[5-6]。但目前发现的易感基因并不能很好地解释 NSCL/P 发生的遗传风险,故继续探索其他候选基因对寻找 NSCL/P 的病因十分重要。表达谱基因芯片技术近年来发展相当迅速,可同时检测不同基因的表达水平,从整体上全面了解整个基因组中各基因表达的变化,因此本研究利用 Agilent 全基因组表达谱芯片,研究 NSCL/P 患儿与正常儿童的基因表达差异,以便进一步阐明与 NSCL/P 形成有关的易感基因及其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 标本来源

标本总数为 21 例,其中病例组 13 例,对照组 8 例,病例组和对照组各 3 例用于芯片实验,其余用于 RT-PCR 验证芯片结果时备用。病例组样本来源于重庆医科大学附属儿童医院整形外科 NSCL/P 手术患儿,年龄 2 个月至 14 岁,其中男性 8 例,女性 5 例,所有病例组患儿均不伴其他畸形,排除如范德伍子综合征(Van der Woude syndrome)、Meckle 综合征等综合征型唇腭裂。正常对照组样本来源于本院瘢痕等平诊非畸形患儿,年龄 6 个月至 12 岁,其中男性 5 例,女性 3 例,正常对照组中的患儿非 NSCL/P 患者,且其家族中无 NSCL/P 患者及其他畸形。2 组患儿均为西南地区汉族人,自身及其家族均无其他遗传性疾病。按无菌原则手术操作下取材,术中留取新鲜组织标本,立即液氮冻存备用。该研究标本取得的程序符合中华伦理学委员会制定的标准,且已获得各研究对象监护人的知情同意。

1.2 基因芯片

由上海伯豪生物技术有限公司提供 Agilent 人全基因组表达谱芯片 Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray (4×44 k),该芯片汇总了目前所了解的人类全基因组序列信息,代表超过 41 000 个人类基因和转录本。Agilent 人全基因组表达谱芯片基于非接触式喷点的寡核苷酸原位合成技术,每个碱基的合成都由质量控制系统进行实时监测,以消除碱

基样点丢失及偏离现象,合成探针长达 60-mer,达到检测灵敏度与特异性的最佳平衡。芯片之间或产品批次之间具有极高的重现性,平均变异系数(variable coefficient, CV)<10%。

1.3 实验方法

1.3.1 样品总 RNA 提取 将样本组织与液氮充分研磨混匀,采用 TAKARA RNAiso Plus#9109 并且根据生产厂商提供的标准操作流程分别提取 NSCLP 患儿和正常患儿腭部组织各 3 例的总 RNA,抽提所得总 RNA 经 NanoDrop ND-2000 分光光度计及 Agilent Bioanalyzer 2100 电泳质检合格后使用 RNeasy mini kit 进行纯化。

1.3.2 cRNA 的合成和标记 总 RNA 纯化后,利用一步法合成 cDNA 第一链和第二链,以 cDNA 为模板,体外合成 cRNA,经纯化及浓度测定后,用单色 Cy3-dCTP 荧光素标记,再进行纯化。

1.3.3 cRNA 样品片段化和芯片杂交 将标记的 cRNA 样品置于片段化液中,在 60 °C 温浴 30 min 进行片段化。然后按照 Agilent 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒,于 65 °C、10 r/min 条件下在滚动杂交炉中杂交 17 h 后在洗缸中洗片(37 °C),洗片所用的试剂为 Gene Expression Wash Buffer Kit。

1.3.4 芯片扫描 完成杂交的芯片采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描,分辨率为 5 μ m,扫描仪自动以 100%和 10%PMT 各扫描 1 次,2 次结果 Agilent 软件可自动合并。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因 在筛选出的差异基因中,选取荧光信号值较高、差异倍数较大且与本病可能相关的 5 条基因进行验证。目的基因及内参 β -actin 引物由上海生物工程技术公司设计和合成,根据 NCBI Nucleotide、Primer-BLAST 比对特异性,引物序列见表 1。参照试剂盒(北京百泰克公司,RP1202)说明提取各样本组织总 RNA,质检合格后参照试剂盒(日本 Takara 公司,RR047A)说明书逆转录合成 cDNA。PCR 反应体系共 10 μ L:SYBR-Green 5 μ L,上下游引物各 0.4 μ L,cDNA 0.8 μ L,无 RNase 水 3.4 μ L。PCR 反应条件:95 °C 变性 30 s,95 °C、5 s,最适温度 30 s,40 个循环。扩增结束后,95 °C、5 s,60 °C、1 min 后逐步升温至 95 °C 进行融解曲线分析,确定扩增产物的特异性。50 °C、30 s 冷却。根据各样品目的基因与内参基因 *cq* 比值计算相对表达量。

1.4 数据处理

对芯片原始数据用 Feature Extraction software 10.7 读取后采用 Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理,所用的算法为 Quantile。采用 Fold-change(FC)法及 *t* 检验统计学方法对差异基因进行筛选。挑选条件如下:FC $\leq$ 0.5 或者 FC $\geq$ 2,*t* 检验的检验水准 α =0.05。将筛选得到的不同组间的差异基因,通过聚类热图的方法进行直观的展示,利用筛选差异倍数(FC 值)以及 *t* 检验得到的 *P* 值 2 个因素共同绘制火山图,用于显示 2 组样品的显著性差异,再对筛选出的差异基因进行 GO 及 KEGG 分析(芯片实验由上海伯豪生物技术有限公司完成)。

2 结果

2.1 总 RNA 质量检测

分别提取对照组和病例组样本的 RNA 各 3 例,编号为 A1、A2、A3、B1、B2、B3,对每个样本的 RNA 用 NanoDrop ND-2000 分光光度计、Agilent Bioanalyzer 2100 进行质检,电泳结果如图 1 所示,各样本 RNA 的浓度、总量及紫外分光光度计测定的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值见表 2。合格样品要求 RNA 完整性计数 (RIN) ≥ 7.0 , rRNA28S/18S ≥ 0.7 ,样品总量一般需要每个

样本纯化前至少 2 μg 。检测结果显示,抽提的各样本总 RNA 的纯度及完整性较好,总量足,符合 Agilent 表达谱芯片实验的要求。

2.2 基因芯片及数据分析结果

芯片实验筛选出表达差异大于 2 倍的基因共 254 个,其中表达上调的有 151 个,表达下调的有 103 个。火山图结果如图 2 所示。聚类分析热图结果如图 3 所示。两组样本间基因表达差异较大。表 3、表 4 列出了部分差异显倍数较大的基因。由此可见,非综合征型唇腭裂患儿和正常对照的基因表达存在较大差异。

表 1 实时荧光定量 PCR 验证基因的引物序列

基因名称	前引物(5'→3')	后引物(5'→3')
ADH1C	ATGGAGGTGTGGATTTTTCG	GTGCGTCCAGTCAGTAGCAG
RDH10	CTCTGCCTCCAGTTTCAAG	TGGAGACCATCCTGACCAAC
HIST1H2BD	TCAGAAGAAGGACGGGAAGA	CCATTGCCTTGAAGAGATG
KAT2B	CATAACCCCTAAATCCATCA	AGTTGGGAATGGCAGATGTC
FOSB	AGCCGTTGAATTGGAAGTCTG	CAGAGGGAGAGAGACCATCG

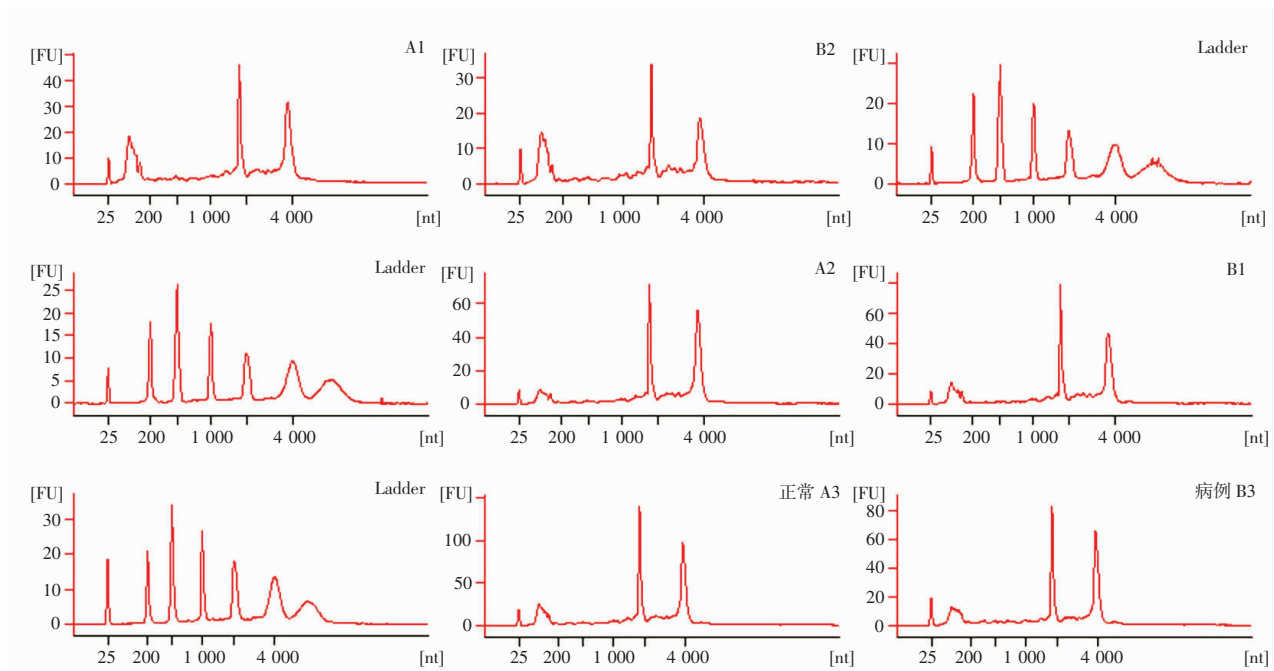
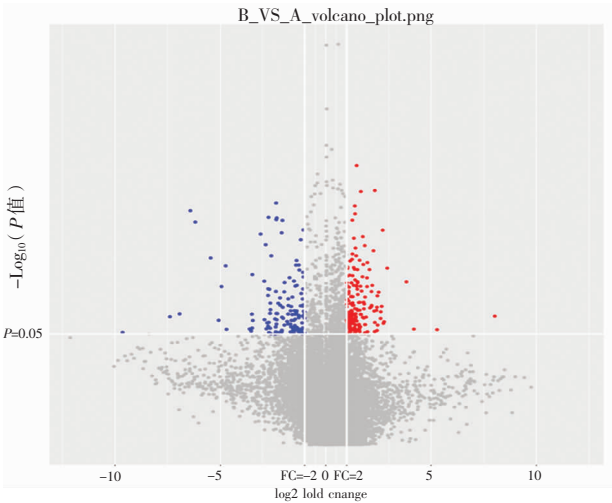


图 1 RNA 电泳图

表 2 各样本 RNA 质检结果

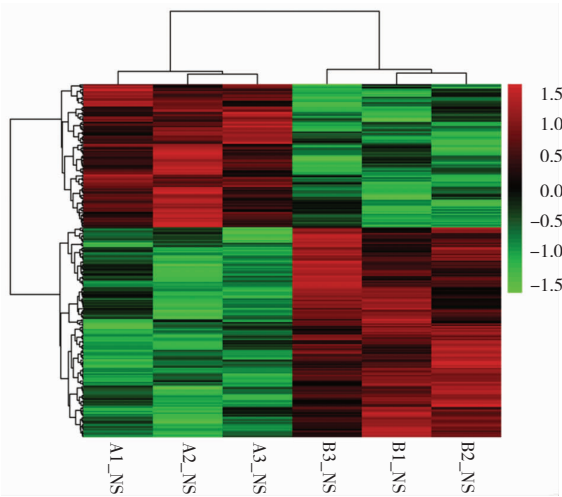
样本实验室名称	浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	体积(μL)	总量(μg)	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	RIN	28S/18S	结果
A1	0.269	100	26.85	2.00	7.8	1.4	合格
A2	0.887	25	22.17	2.02	8.6	1.4	合格
A3	0.522	200	104.40	1.98	8.4	1.1	合格
B1	0.686	25	17.16	2.03	8.5	1.1	合格
B2	0.183	50	9.13	1.95	7.7	1.2	合格
B3	0.386	50	19.30	1.94	8.3	1.2	合格

注: RIN, 即 RNA integrity number, 是 RNA 完整性的检测指标, 从 0~10, 分值越高, RNA 的完整性越好



X轴: $\log_2(FC)$; Y轴: $-\log_{10}(P \text{ 值})$; X轴平行线: $P=0.05$; Y轴平行线: $FC=2$; 红色区域: $P<0.05$ 且 $FC \geq 2$ 的差异基因; 蓝色区域: $P<0.05$ 且 $FC \leq 0.5$ 的差异基因

图 2 2 组样本差异表达基因火山图



Heat map 中横坐标是样本名称,纵坐标是探针号。右侧的图标表示色阶,数字为 Z-score。每一个矩形对应一种样本表达值。黑色代表 0,表示基因表达水平没有变化,红色代表表达水平升高,绿色代表表达水平降低;颜色的亮度代表基因表达水平升高或降低的程度

图 3 6 个样本差异基因聚类分析热图

表 3 上调表达基因中差异倍数较大的基因

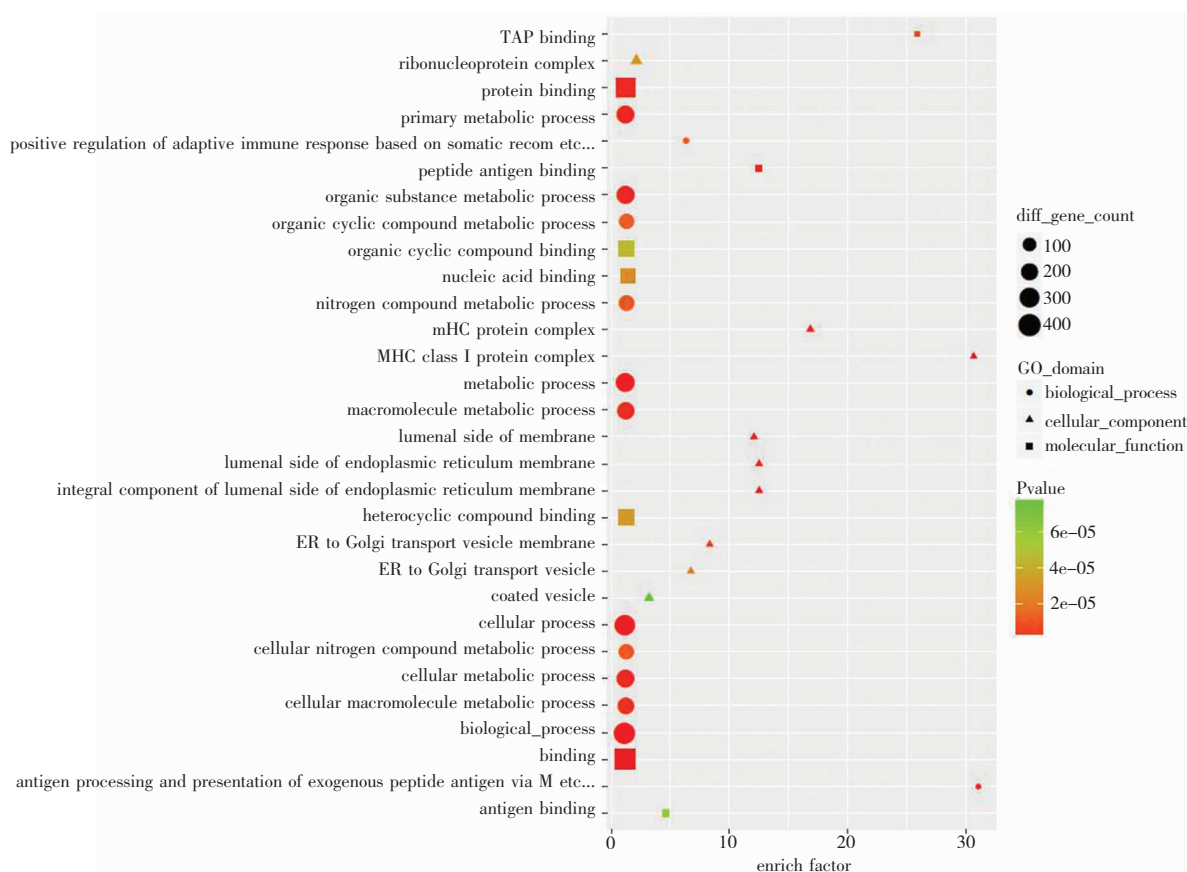
基因名称	Genbank 收录号	病例组荧光信号值	对照组荧光信号值	t 值	P 值
FOSB	NM_006732	12.61 ± 2.02	7.35 ± 2.37	2.921	0.045
MYOC	NM_000261	10.74 ± 1.13	6.96 ± 0.97	4.408	0.012
CIART	NM_144697	6.62 ± 1.14	3.98 ± 0.67	3.456	0.036
CPNE4	NM_130808	5.54 ± 1.07	2.97 ± 0.46	3.822	0.038
ZNF683	NM_173574	6.82 ± 0.93	4.30 ± 0.56	4.009	0.024
HLA-DPB1	NM_002121	13.16 ± 0.92	10.70 ± 0.44	4.180	0.027
FCER1A	NM_002001	8.70 ± 1.00	6.27 ± 0.58	3.611	0.033
GRM8	NM_000845	4.61 ± 1.03	2.31 ± 0.66	3.255	0.039
RTN1	NM_021136	6.20 ± 0.74	3.74 ± 0.80	3.899	0.018
ARSF	NM_004042	7.18 ± 0.88	4.83 ± 0.66	3.678	0.024

注:荧光信号值为基因芯片荧光信号原始表达值取 2 为底的对数后得到的数值

表 4 下调表达基因中差异倍数较大的基因

基因名称	Genbank 收录号	病例组荧光信号值	对照组荧光信号值	t 值	P 值
DEFA3	NM_005217	6.08 ± 1.78	14.54 ± 3.94	-3.389	0.048
HBG1	NM_000559	8.40 ± 2.52	15.25 ± 2.52	-3.251	0.031
OLFM4	NM_006418	3.31 ± 1.01	9.70 ± 1.09	-7.433	0.002
CAMP	NM_004345	5.19 ± 0.91	11.51 ± 0.39	-11.088	0.002
HTN3	NM_000200	1.79 ± 1.36	7.35 ± 1.22	-5.273	0.006
RNASE2	NM_002934	1.99 ± 1.23	6.61 ± 1.95	-3.541	0.035
SLC01B3	NM_019844	1.52 ± 0.96	6.17 ± 1.46	-4.613	0.014
GDF15	NM_004864	8.02 ± 0.93	12.06 ± 1.85	-3.389	0.044
DMRT3	NM_021240	2.85 ± 1.35	6.31 ± 1.54	-2.931	0.044
CFAP43	NM_025145	2.36 ± 1.27	5.70 ± 1.48	-2.962	0.043

注:荧光信号值为基因芯片荧光信号原始表达值取 2 为底的对数后得到的数值



图中取得 term/GO 是按照 enrich factor 的值从大到小降序排列,取前 30 个结果, enrich_factor 定义= (某个 term 中的差异基因数目/总的差异基因数目)/(数据库 term 中总的基因数目/数据库中总的基因数目),该值越大,则富集度越高

图 4 GO 富集图

2.4 差异基因的 GO 富集分析结果

通过对筛选出来的差异表达基因进行 GO 功能分析,可知差异表达的基因主要涉及蛋白结合、细胞物质代谢、膜腔内侧的构成、基于体细胞重组免疫受体的适应性免疫应答的正调节等。根据 enrich factor 值的大小,按降序排列作图,取前 30 个结果,如图 4 所示。

2.5 差异基因的 KEGG pathway 富集分析结果

将筛选出的差异基因进行 KEGG pathway 分析,结果显示差异基因主要涉及细胞吞噬、细胞粘附、酒精中毒等。部分结果如图 5 所示。

2.6 qRT-PCR 验证结果

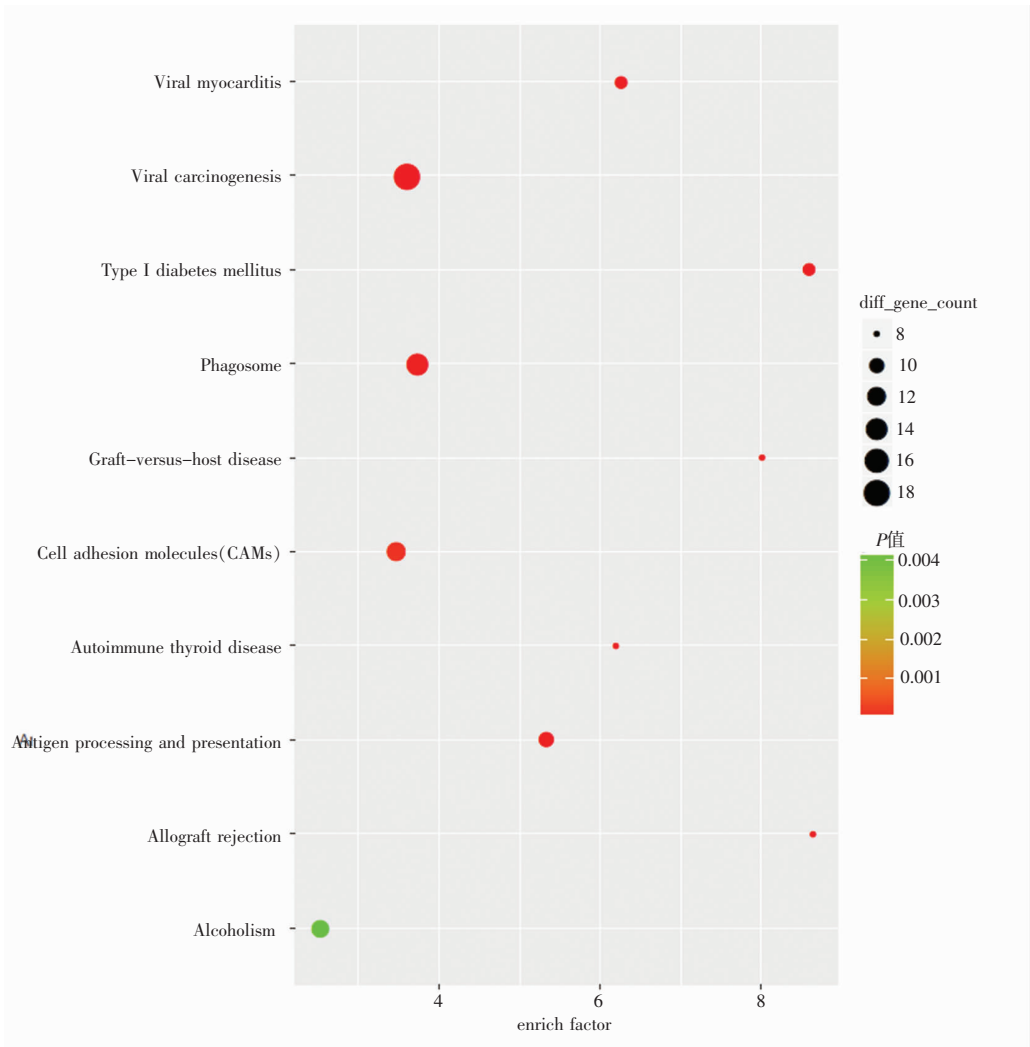
对 5 条目的基因进行验证,结果显示 KAT2B、FOSB 基因表达上调,ADH1C、RDH10、HIST1H2BD 基因表达下调。5 条基因表达上调或下调的变化趋势与基因芯片检测结果基本一致,提示该芯片结果可靠,结果见表 5。

3 讨论

非综合征型唇腭裂的发生是一个多因素多基因参与的复杂过程,是由一组基因的异常及其相互

作用决定的,因此要了解该过程基因的变化需要同时观察整个基因组基因表达的动态变化。基因表达谱芯片技术可同时检测同一组织或不同组织在不同生理和病理条件下成千上万个基因的表达水平,本实验利用 Agilent 人类全基因表达谱芯片发现 NSCL/P 患儿与正常对照儿童基因表达存在明显差异,共筛选出差异表达基因 254 个,其中表达上调的有 151 个,表达下调的有 103 个。32 个 GO 条目,10 条信号通路,为进一步研究基因功能学及 NSCL/P 发病机制提供了新的方向和基础。

孕期酒精的摄入与胎儿患唇腭裂的风险之间的关系已有许多学者进行过研究,但结果却不尽相同。Campos Neves^[7]、Bell^[8]等学者认为,早孕期母亲饮酒与胎儿唇腭裂的发生没有显著关联。Zeng^[9]、Jugessur 和 Murray^[10]学者的研究表明孕早期产妇饮酒是胎儿患唇腭裂的危险因素。ADH1C 基因编码 I 类醇脱氢酶的 γ 亚基,该酶在乙醇的分解代谢中起主要作用。此外 ADH1C 可通过氧化视黄醇来调



图中取得 term/pathway 是按照 enrich factor 的值从大到小降序排列,取前 10 个结果

图 5 Pathway 富集图

表 5 RT-PCR 验证各基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

基因	对照组	病例组	t 值	P 值
ADH1C	0.797 ± 0.348	0.151 ± 0.150	5.132	0.000
RDH10	0.525 ± 0.269	0.164 ± 0.066	2.960	0.039
HIST1H2BD	1.136 ± 0.327	0.603 ± 0.147	4.446	0.001
KAT2B	0.070 ± 0.009	1.013 ± 0.418	-4.945	0.000
FOSB	0.022 ± 0.015	0.620 ± 0.516	-3.666	0.005

节视黄酸的合成,而视黄酸是胚胎早期形成及正常发育所必需的^[11]。芯片结果显示 ADH1C 基因表达下调,ADH1C 在 NSCL/P 患儿中表达较正常组低,提示患儿对酒精的代谢能力较对照组低,这一结果证实了酒精在唇腭裂发生中作用的证据。

本研究发现 FOSB 在病例组中存在明显高表达。FOSB 是 FOS 家族中的一员,其编码的蛋白质可和 JUN 家族的蛋白质形成二聚体,从而形成转录因

子复合物 AP-1^[12],在调控细胞的增殖、侵袭和转移中起着重要作用。目前对于该基因的研究多集中于肿瘤,在唇腭裂的研究中尚未见报道。Tang 等^[13]在研究 FOSB 与胃癌的关系中发现,FOSB 高表达会抑制低分化胃癌细胞株增殖和迁移,而敲除 FOSB 则可促进中等分化细胞株增殖和迁移。Ting 等^[14]发现 FOSB 过表达可促进三阴性乳腺癌细胞死亡。Nowicki-Osuch 等^[15]发现在肺腺癌中,FOSB 表达量

降低,而癌细胞是细胞异常增殖的结果,故推测 FOSB 过度表达可抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。腭部形成时,腭胚间充质(embryonic palatal mesenchyme, EPM)细胞对维持腭器官的正常发育起着重要作用,EMP 细胞增殖受到抑制则可产生腭裂^[16-17]。本实验中发现 FOSB 在病例组中高表达,推测高表达的 FOSB 可能通过抑制 EPM 的增殖从而导致腭裂发生,具体机制尚需进一步试验研究。

KAT2B 也称 PCAF,其编码的蛋白质是组蛋白乙酰转移酶中的一员,可通过乙酰化赖氨酸来调控组蛋白^[18]。该基因过表达可影响细胞周期,抑制细胞凋亡^[19]。继发腭的形成包括腭突的垂直生长、上抬、接触、融合,任何过程中断都会形成腭裂。当两侧腭突在舌部上方中线接触时,腭突上皮(medial edge epithelium, MEE)细胞形成腭中缝(medial edge seam, MES),而后 MES 由两层逐渐变为一层,最终消失,腭突融合形成。如果 MES 未消失,则可形成腭裂^[20-21]。KAT2B 在唇腭裂的研究中也未见报道。本芯片结果显示, KAT2B 在 NSCL/P 病例组中表达量高于对照组,推测可能由于其影响了 MEE 细胞凋亡,从而导致腭裂发生。

本研究通过基因芯片试验筛选出 NSCL/P 相关的差异表达基因谱,包括已发现的易感基因如 ADH1C 以及新发现的易感基因 FOSB、KAT2B 等。在此基础上,将针对新发现的易感基因 FOSB、KAT2B 等进行功能学研究,以明确相关基因在疾病发生发展中的作用,为进一步阐明 NSCL/P 的发病机制提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, et al. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans[J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(2): 557-568.
- [3] Singh VP, Roy DK, Suwal P, et al. Techniques for genetic analysis of non syndromal cleft lip/palate: a review[J]. Am J Biomed Sci, 2012, 4(3): 178-183.
- [4] 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]. Hum Genet, 2013, 132(7): 771-781.
- [5] Szczałuba K, Nowakowska BA, Sobecka K, et al. High-resolution array comparative genomic hybridization utility in polish newborns with isolated cleft lip and palate[J]. Neonatology, 2015, 107(3): 173-178.
- [6] Simioni M, Araujo TK, Monlleo IL, et al. Investigation of genetic factors underlying typical orofacial clefts: mutational screening and copy number variation[J]. J Hum Genet, 2015, 60(1): 17-25.
- [7] Campos Neves AT, Volpato LE, Espinosa MM, et al. Environmental factors related to the occurrence of oral clefts in a Brazilian subpopulation[J]. Niger Med J, 2016, 57(3): 167-172.
- [8] Bell JC, Raynes-Greenow C, Turner RM, et al. Maternal alcohol consumption during pregnancy and the risk of orofacial clefts in infants: a systematic review and meta-analysis[J]. Paediatr Perinat Epidemiol, 2014, 28(4): 322-332.
- [9] Zeng N, Wu J, Zhu WC, et al. Evaluation of the association of polymorphisms in EYA1, environmental factors, and non-syndromic orofacial clefts in Western Han Chinese[J]. J Oral Pathol Med, 2015, 44(10): 864-869.
- [10] Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait[J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(3): 270-278.
- [11] Chevrier C, Perret C, Bahuau M, et al. Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of non-syndromic oral clefts: an evaluation of the contribution of child and maternal genotypes[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005, 73(2): 114-122.
- [12] Shahzad MM, Arevalo JM, Armaiz-Pena GN, et al. Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis[J]. J Biol Chem, 2010, 285(46): 35462-35470.
- [13] Tang C, Jiang Y, Shao W, et al. Abnormal expression of FOSB correlates with tumor progression and poor survival in patients with gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2016, 49(4): 1489-1496.
- [14] Ting CH, Chen YC, Wu CJ, et al. Targeting FOSB with a cationic antimicrobial peptide, TP4, for treatment of triple-negative breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 40329-40347.
- [15] Nowicki-Osuch K, Li Y, Challinor M, et al. E1NCR1 is an EGF inducible lincRNA overexpressed in lung adenocarcinomas[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181902.
- [16] Furukawa S, Usuda K, Abe M, et al. Histopathological findings of cleft palate in rat embryos induced by triamcinolone acetonide[J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(4): 397-402.
- [17] 傅豫川, 黄洪章. 在胚胎发育期腭突中嵴上皮细胞和腭间充质细胞与腭裂畸形[J]. 国外医学(口腔医学分册), 1996, 23(4): 222-226.
- [18] Shi S, Lin J, Cai Y, et al. Dimeric structure of p300/CBP associated factor[J]. BMC Struct Biol, 2014, 14: 2.
- [19] Hirano G, Izumi H, Kidani A, et al. Enhanced expression of PCAF endows apoptosis resistance in cisplatin-resistant cells[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(6): 864-872.
- [20] Zhang Y, Dong S, Wang W, et al. Activation of Notch1 inhibits medial edge epithelium apoptosis in all-trans retinoic acid-induced cleft palate in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(3): 322-328.
- [21] Bush JO, Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development[J]. Development, 2012, 139(2): 231-243.

(责任编辑: 冉明会)