抗肌萎缩蛋白基因多态性与非综合征型唇腭裂的关联研究

巴文琦 张思荻 林岩松 尤玥 贾思璇 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 口腔疾病国家临床医学研究中心
四川大学华西口腔医院唇腭裂外科，成都 610041

[摘要] **目的** 非综合征型唇腭裂（NSCL/P）是一种常见的出生缺陷，受遗传和环境因素的共同影响，其中遗传因素起主要作用。本研究旨在探讨抗肌萎缩蛋白（DMD）基因与中国西部汉族人群NSCL/P的关联性。**方法** 选取DMD基因上的4个标签单核苷酸多态性（SNP），在1 780例NSCL/P患者和1 823例正常对照中进行了等位基因和基因型关联分析。**结果** 与对照组相比，其中3个SNP（rs5971698、rs5928208和rs5972815）与NSCL/P或其亚型存在显著关联。等位基因关联分析显示：rs5971698与NSCL/P、单侧唇裂伴或不伴腭裂（UCL/P）、左侧唇裂伴或不伴腭裂（LCL/P）、单侧唇裂合并腭裂（UCLP）、左侧唇裂合并腭裂（LCLP）、单侧唇裂（UCL）、左侧单纯唇裂（LCL）均存在关联（P<0.05）；rs5928208与非综合征型唇裂伴腭裂（NSCLP）、双侧唇裂伴或不伴腭裂（BCL/P）、LCL/P、双侧唇裂合并腭裂（BCLP）、LCL相关（P<0.05）；rs5972815则与UCLP、UCL、右侧单纯唇裂（RCL）存在关联（P<0.05），呈现明显的单侧性偏差。基因型分析进一步验证了这些关联性。功能预测表明，rs5928208和rs5972815位点的不同等位基因可能影响转录因子结合能力。**结论** 本研究发现DMD基因上的SNP位点与中国西部汉族人群NSCL/P存在关联，为NSCL/P不同亚型存在差异遗传易感位点提供了新的证据。

[关键词] 抗肌萎缩蛋白基因； 非综合征型唇腭裂； 关联分析； 功能注释
[中图分类号] R782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2025215

本文链接 开放科学标识码

Association analysis between dystrophin gene polymorphism and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate

Ba Wenqi, Zhang Sidi, Lin Yansong, You Yue, Jia Sixuan, 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, 81600849); Natural Science Foundation of Sichuan Province (2024NSFSC0649); Interdisciplinary Research Project of West China Hospital of Stomatology, Sichuan University (RD-03-202301)

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

[Abstract] **Objective** Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) is a common birth defect influenced by genetic and environmental factors, with genetic factors playing a major role. This study aims to investigate the association between the dystrophin (DMD) gene and NSCL/P in a Chinese Han population. **Methods** Four tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the DMD gene were selected and allelic and genotype-based association analyses were performed on 1 780 patients

[收稿日期] 2025-05-20
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目（82170919，81600849）；四川省科技厅自然科学基金面上项目（2024NSFSC0649）；四川大学华西口腔医院交叉项目（RD-03-202301）
[第一作者] 巴文琦，硕士，E-mail：15500779093@163.com
[通信作者] 贾仲林，副教授，博士，E-mail：zhonglinjia@scu.edu.cn

with NSCL/P and 1 823 normal controls. **Results** Comparison with the controls showed that patients with NSCL/P presented three SNPs (rs5971698, rs5928208, and rs5972815) with significant associations with NSCL/P or its subphenotypes. Allelic association analysis revealed that rs5971698 was associated with NSCL/P, unilateral cleft lip with or without cleft palate (UCL/P), left cleft lip with or without cleft palate (LCL/P), unilateral cleft lip and cleft palate (UCLP), left cleft lip and cleft palate (LCLP), unilateral cleft lip (UCL), and left cleft lip only (LCL) (P<0.05); rs5928208 was associated with non-syndromic cleft lip and cleft palate (NSCLP), bilateral cleft lip with or without cleft palate (BCL/P), LCL/P, bilateral cleft lip and cleft palate (BCLP), and LCL (P<0.05); and rs5972815 was associated with UCLP, UCL, and right cleft lip only (RCL)(P<0.05), exhibiting significant laterality bias. Genotype analysis further confirmed these associations. Functional predictions suggested that different alleles at rs5928208 and rs5972815 may influence transcription factor binding affinity. **Conclusion** This study identified associations between SNPs in the DMD gene and NSCL/P in a Western Chinese Han population, providing new evidence for distinct genetic susceptibility loci among NSCL/P subtypes.

[Key words] dystrophin gene; non-syndromic cleft lip with or without cleft palate; association analysis; functional annotation

唇腭裂（cleft lip with or without cleft palate，CL/P）是最常见的颅面部先天性畸形，全球发病率约为1.2‰，其发生率在不同地区和人群中存在差异[1-2]。根据是否伴随其他身体部位的先天性畸形，CL/P可分为综合征型唇腭裂（syndromic cleft lip with or without cleft palate，SCL/P）和非综合征型唇腭裂（non-syndromic cleft lip with or without cleft palate，NSCL/P），其中NSCL/P约占CL/P总病例的70%。根据裂隙所累及的颅面部结构，NSCL/P可进一步分为2种亚型，非综合征型唇裂伴腭裂（non-syndromic cleft lip and cleft palate，NSCLP）和非综合征型单纯唇裂（non-syndromic cleft lip only，NSCLO）[3-4]。CL/P患者从出生到成年需要接受包括外科、正畸、语音治疗等多学科协作的序列治疗，同时因患者颌面部发育异常导致的美观、语言和咀嚼等功能障碍，不仅影响其社会适应能力，还可能引发心理问题，从而对生活质量造成长期负面影响[5-6]。因此，明确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。

NSCL/P发病因素复杂，受遗传和环境因素的共同影响，其中遗传因素起主导作用[7-8]。既往研究[9-11]表明，NSCLP和NSCLO既存在独特的遗传易感基因，也存在部分共有的易感位点。近年来，研究发现干扰素调节因子6（interferon regulatory factor 6，IRF6）[12-13]、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）[14]、成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）[15]、蓝绶带蛋白1（cordon-bleu-like 1，COBLL1）[16]、轴突生长诱向因子1（netrin-1，NTN1）[17]等多个基因与NSCL/P的发病机制密切相关。全基因组关联研究（genome wide association study，GWAS）通过大规模人群样本筛查，显著提升了多基因遗传病易感位点的检测效能。该技术凭借其高通量、高灵敏度及广覆盖度的特点，为疾病相关遗传变异及基因组风险区域的精确定位提供了重要研究手段[18]。GWAS已在特定人群中鉴定出50余个与NSCL/P相关的独立位点，但在其他人群中进行验证也非常重要[19-21]。

抗肌萎缩蛋白（dystrophin，DMD）基因最初在南美洲、亚洲及巴塔哥尼亚人群的GWAS研究中被报道[22]。该基因是杜氏肌营养不良症的致病基因，其编码的DMD蛋白对维持肌细胞膜完整性至关重要，该蛋白缺失会增加肌细胞易损性[23-24]。此外，DMD基因敲除小鼠除表现出经典的肌肉病变外，部分个体还呈现出颅面发育异常。这提示DMD基因可能通过调控胚胎期细胞骨架重组和细胞间黏附等过程，影响唇腭部的正常发育[25]。DMD基因是人类基因组中最大的基因，其跨度为2.5 Mb，占人类基因组的0.1%。尽管该基因包含79个外显子，但其99%的序列为内含子，这种巨大的内含子结构可能是其高变异率的原因之一[26-27]。此外，研究[28]发现DMD基因可能是欧洲人群中影响唇裂和腭裂的关键基因。

考虑到遗传背景的差异可能导致疾病易感基因及其效应大小的变化，且目前尚无研究表明DMD基因单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs）位点与中国汉族人群NSCL/P发生有相关性。因此本研究选取DMD基因上4个标签SNP位点rs6631759、rs5971698、rs5928208、

rs5972815，并在中国西部汉族人群中进行与NSCL/P的关联分析，旨在探究DMD基因是否与中国汉族人群NSCL/P的发病相关，这对于全面理解NSCL/P的遗传病因具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本研究共纳入1 780例NSCL/P患者及1 823例正常对照者。NSCL/P患者中包括959例NSCLP和821例NSCLO患者。NSCLP患者可进一步分为双侧唇裂合并腭裂（bilateral cleft lip and cleft palate，BCLP）、左侧唇裂合并腭裂（left cleft lip and cleft palate，LCLP）、右侧唇裂合并腭裂（right cleft lip and cleft palate，RCLP），分别为237、448、274例。NSCLO患者也可进一步分为双侧单纯唇裂（bilateral cleft lip only，BCL）、左侧单纯唇裂（left cleft lip only，LCL）、右侧单纯唇裂（right cleft lip only，RCL），分别为88、480、253例。此外，NSCL/P还可根据涉及颅面部侧别的情况分为双侧唇裂伴或不伴腭裂（bilateral cleft lip with or without cleft palate，BCL/P）、左侧唇裂伴或不伴腭裂（left cleft lip with or without cleft palate，LCL/P）、右侧唇裂伴或不伴腭裂（right cleft lip with or without cleft palate，RCL/P），这3种亚型的病例数分别为325、928、527例。

所有病例均来源于四川大学华西口腔医院唇腭裂外科。经排除合并其他部位先天性发育异常者，所有受试者均通过本人或监护人确认属于西部汉族人群。正常对照者的样本来自四川大学华西第二医院招募的新生儿脐带血。在患者招募过程中，通过详细询问家族史并记录至少3代家族成员的民族归属及出生地信息，确保研究对象符合西部汉族人群的定义。同时使用标准化问卷收集人口统计学和家族史信息，以排除潜在的混合人群样本。本研究中西部汉族人群具体定义为：1）本人及父母双方均为汉族；2）本人及父母双方均出生并长期居住在中国西部地区（包括四川、重庆、陕西、甘肃、青海、宁夏、新疆、西藏、云南、贵州）；3）家族三代以内无与其他民族通婚史。纳入标准：1）符合上述西部汉族人群定义；2）经临床确诊为NSCL/P；3）对照组为健康新生儿，无任何先天性畸形。排除标准：1）患者伴有其他先天性畸形或属于综合征型唇腭裂；2）父母一方或双方为非汉族；3）父母一方或双方为非西部地区出生或长期居住；4）三代以内有与其他民族通婚史；5）不愿参与研究或无法提供完整的家族史信息者。

本研究方案及知情同意书经四川大学华西口腔医院伦理委员会审批通过（批号：WCHSIRB-D-2021-169）。所有受试者或其监护人在入组前均已阅读并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

采用静脉采血法获取所有受试者血样，通过盐析法提取基因组DNA后置于Tris-EDTA缓冲液中保存。使用NanoPhotometer®分光光度计（IMPLEN公司，美国）检测DNA纯度与浓度（OD260/OD280）。

1.2.2 基因型分型

从HapMap计划中筛选出4个位于DMD基因上的标签SNP，其次要等位基因频率（minor allele frequency，MAF）在中国汉族人群中>0.15，分别为：rs6631759、rs5971698、rs5928208和rs5972815（表1）。所有标签SNP均采用SNPscan技术（基因科技公司，http://www.geneskybiotech.com）完成基因分型。

表 1 DMD基因上4个SNP位点的MAF

Tab 1 MAF of four SNPs on DMD

SNP	碱基对位置（hg19）	功能区间	次要等位基因	主要等位基因	MAF		
					NSCL/P	NSCLO	NSCLP
rs6631759	33239353	Intron	T	C	0.472 6	0.468 3	0.474 1
rs5971698	33245234	Intron	A	G	0.426 9	0.428 6	0.421 3
rs5928208	33253904	Intron	A	G	0.372 0	0.368 3	0.365 5
rs5972815	33333885	Intron	C	T	0.365 2	0.372 8	0.368 6

1.3 数据分析

4个标签SNP在所有样本中的基因分型检出率均>98%。质量控制步骤如下：1）随机抽取1%样本进行重复性分析；2）设置阴性对照；3）DNA

样本浓度>50 μg/mL、OD260/OD280比值1.8~2.0且OD260/OD230>2.0为合格样本。随后采用PLINK软件（http://zzz.bwh.harvard.edu/plink）进行等位基因及基因型关联分析，以探究DMD基因SNP位点与NSCL/P及其亚型的关联性。在关联分析中，首先将NSCL/P、NSCLP和NSCLO分别与对照组进行比较。随后，为了探索DMD基因多态性与NSCL/P不同亚型的关联特征，根据裂隙的类型将样本进一步细分为多个亚型组并分别将各亚型组与对照组进行比较分析，以揭示可能存在的亚型特异性遗传关联。

1.4　生物信息学功能预测

利用HaploReg[29]和3DSNP[30-31]数据库对相关SNP位点进行潜在生物学功能预测。HaploReg数据库是一种用于注释非编码SNP的在线工具。3DSNP（https://omic.tech/3dsnpv2/）是一个通过SNP与基因及其相关SNP的相互作用来注释非编码区SNP调节功能的数据库。3DSNP的数据来源于Hi-C数据、多种染色质特征及多种细胞类型的单细胞ATAC测序数据，使研究人员能够更深入地了解非编码区SNP的调节作用，包括3D相互作用基因、增强子状态、启动子状态、转录因子结合位点、序列基序的改变及保守性。通过3DSNP平台，获得目标SNP可能参与的染色质调控元件的相关信息。

2　结果

2.1　关联分析

4个标签SNP分布于DMD基因的不同功能区域，rs6631759位于第一内含子近启动子区，具有增强子特征；rs5971698位于第44内含子，可能影响基因剪接；rs5928208位于第56内含子的甲基化敏感区，而rs5972815位于第67内含子的增强子区域。这些位点与染色质可及性、转录因子结合、远距离染色质环形成等功能相关，可能通过调控DMD基因表达等作用，影响NSCL/P的发生风险。rs6631759、rs5971698、rs5928208和rs5972815均通过质控并纳入后续关联分析。

首先对各表型组与对照组进行了比较分析。在加性模型下，rs5971698与NSCL/P存在关联（*P*=0.046，OR=0.83，95%CI：0.69~1.00），rs5928208与NSCLP相关（*P*=0.027，OR=0.79，95%CI：0.65~0.97），但未发现与NSCLO相关的SNP（图1）。

为了进一步探索亚型特异性关联及避免亚型混合稀释统计效能，进一步将研究对象按裂隙类型进行亚型分析，将各亚型组分别与对照组进行比较。结果显示，rs5971698与以下亚型显著相关：单侧唇裂伴或不伴腭裂（unilateral cleft lip with or without cleft palate，UCL/P）（*P*=0.027，OR=0.74，95%CI：0.57~0.97），LCL/P（*P*=0.009 6，OR=0.77，95%CI：0.63~0.94），单侧唇裂合并腭裂（unilateral cleft lip and cleft palate，UCLP）（*P*=0.028，OR=0.71，95%CI：0.52~0.96），LCLP（*P*=0.03，OR=0.77，95%CI：0.61~0.97），单侧唇裂（unilateral cleft lip，UCL）（*P*=0.041，OR=0.80，95%CI：0.65~0.99），LCL（*P*=0.021，OR=0.76，95%CI：0.61~0.96）。rs5928208与以下亚型相关：BCL/P（*P*=0.011，OR=0.71，95%CI：0.54~0.92），LCL/P（*P*=0.014，OR=0.77，95%CI：0.63~0.95），BCLP（*P*=0.026，OR=0.71，95%CI：0.52~0.96），LCL（*P*=0.021，OR=0.76，95%CI：0.60~0.96）。此外，rs5972815与以下亚型相关：UCLP（*P*=0.03，OR=0.74，95%CI：0.56~0.97），UCL（*P*=0.039，OR=0.80，95%CI：0.65~0.99），RCL（*P*=0.022，OR=0.72，95%CI：0.54~0.95）。值得注意的是，rs5971698特异性与左侧裂相关亚型显著相关，而rs5972815则偏重与右侧裂相关亚型相关（图1、表2）。

在基因型模型下，与对照组比较时，发现rs5971698、rs5928208和rs5972815与NSCL/P、NSCLP、RCL/P、LCL/P存在关联（*P*<0.05）。此外，rs5971698和rs5972815与RCLP相关（*P*<0.05）；rs5971698和rs5972815与LCLP相关（*P*<0.05）；rs5928208和rs5972815与UCL相关（*P*<0.05）；rs5972815与RCL相关（*P*<0.05）（图2、表3）。基因型分析结果进一步证实了上述3个SNP在不同侧别唇腭裂亚型中表现出的差异化关联模式。

2.2　SNP功能注释分析

在3个显著标签SNP（rs5971698、rs5928208和rs5972815）中，有2个被预测具有改变转录因子结合能力的作用（表4）。rs5928208的不同等位基因可改变转录因子CCNT2、RXRA、SETDB1、YY1和ZBTB7A的结合能力；rs5972815的不同等位基因则可能影响转录因子Foxp1和SRF的结合能力。

3　讨论

在本研究中，通过选择4个标签SNP以实现对

DMD基因的最大覆盖范围，以研究DMD基因与NSCL/P及其亚型的关联性。等位基因与基因型关联分析结果显示，与对照组相比，2个SNP分别与NSCL/P（rs5971698）或NSCLP（rs5928208）相关，但均未发现与NSCLO的关联。在对样本进行更精细的亚型分类以进一步探索亚型特异性关联，将各亚型组分别与对照组进行比较，发现rs59716-98与以下亚型显著相关：UCL/P（*P*=0.027，OR=0.74，95%CI：0.57~0.97），LCL/P（*P*=0.009 6，OR=0.77，95%CI：0.63~0.94），UCLP（*P*=0.028，OR=0.71，95%CI：0.52~0.96），LCLP（*P*=0.03，OR=0.77，95%CI：0.61~0.97），UCL（*P*=0.041，OR=0.80，95%CI：0.65~0.99），LCL（*P*=0.021，OR=0.76，95%CI：0.61~0.96）。rs5928208与以下亚型相关：BCL/P（*P*=0.011，OR=0.71，95%CI：0.54~0.92），LCL/P（*P*=0.014，OR=0.77，95%CI：0.63~0.95），BCLP（*P*=0.026，OR=0.71，95%CI：0.52~0.96），LCL（*P*=0.021，OR=0.76，95%CI：0.60~0.96）。此外，rs5972815与以下亚型相关：UCLP（*P*=0.03，OR=0.74，95%CI：0.56~0.97），UCL（*P*=0.039，OR=0.80，95%CI：0.65~0.99），RCL（*P*=0.022，OR=0.72，95%CI：0.54~0.95）。值得注意的是，rs5971698特异性与左侧裂相关亚型显著相关，而rs5972815则偏重与右侧裂相关亚型相关，且其在亚型组中的*P*值均低于主表型组的NSCL/P、NSCLP和NSCLO，这表明主表型组的显著信号是由亚型组驱动的。值得注意的是，这3个关联SNP均表现出明显的偏侧性特征。该结果不仅进一步证实了NSCL/P存在差异化的遗传病因学机制，也与既往文献表明DMD基因与NSCL/P存在关联相一致，且DMD基因变异携带者子代发生NSCL/P的风险显著增高。

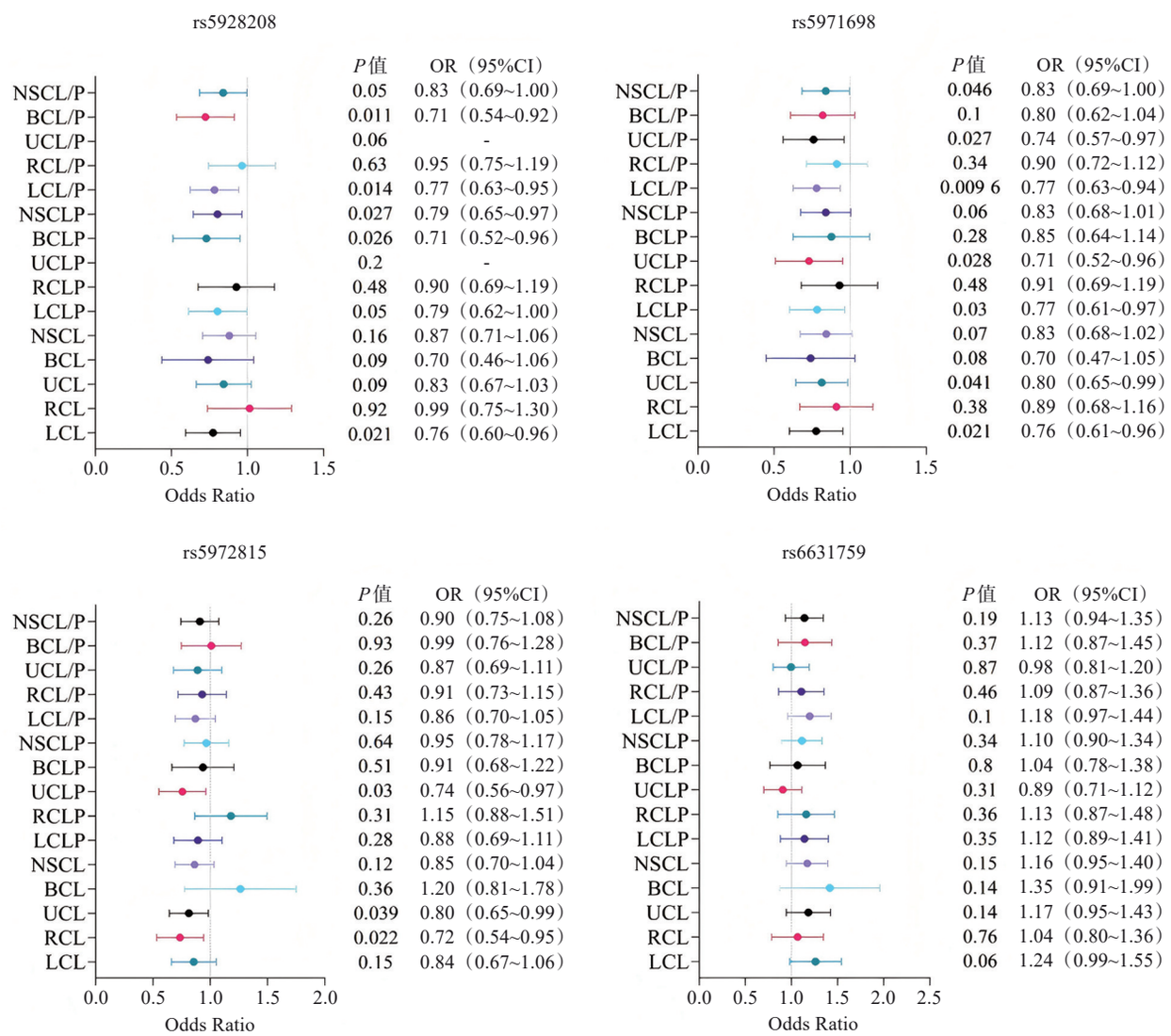


图 1　等位基因关联分析结果

Fig 1　Results of allelic association analysis

表 2　基于裂类型的等位基因关联分析结果

Tab 2　Results of allelic association by cleft type

表型	SNP	次要等位基因	患病组等位基因频率/%	对照组等位基因频率/%	主要等位基因	卡方检验统计量	*P*值	OR（95%CI）
NSCL/P	rs6631759	T	48.9	45.9	C	1.73	0.19	1.13（0.94~1.35）
	rs5971698	A	39.7	44.3	G	3.99	0.046	0.83（0.69~1.00）
	rs5928208	A	34.7	39.0	G	3.75	0.05	0.83（0.69~1.00）
	rs5972815	C	36.5	39.0	T	1.26	0.26	0.90（0.75~1.08）
BCL/P	rs6631759	T	48.8	45.9	C	0.79	0.37	1.12（0.87~1.45）
	rs5971698	A	39.0	44.3	G	2.73	0.1	0.80（0.62~1.04）
	rs5928208	A	31.1	39.0	G	6.44	0.011	0.71（0.54~0.92）
	rs5972815	C	38.7	39.0	T	0.01	0.93	0.99（0.76~1.28）
UCL/P	rs6631759	T	42.3	42.8	C	0.03	0.87	0.98（0.81~1.20）
	rs5971698	T	12.7	16.4	C	4.91	0.027	0.74（0.57~0.97）
	rs5928208	A	0.0	0.2	G	3.47	0.06	-
	rs5972815	G	20.1	22.3	C	1.25	0.26	0.87（0.69~1.11）
RCL/P	rs6631759	T	47.9	45.9	C	0.54	0.46	1.09（0.87~1.36）
	rs5971698	A	41.6	44.3	G	0.92	0.34	0.90（0.72~1.12）
	rs5928208	A	37.7	39.0	G	0.23	0.63	0.95（0.75~1.19）
	rs5972815	C	36.9	39.0	T	0.61	0.43	0.91（0.73~1.15）
LCL/P	rs6631759	T	50.0	45.9	C	2.66	0.1	1.18（0.97~1.44）
	rs5971698	A	37.8	44.3	G	6.71	0.009 6	0.77（0.63~0.94）
	rs5928208	A	33.1	39.0	G	6.08	0.014	0.77（0.63~0.95）
	rs5972815	C	35.5	39.0	T	2.12	0.15	0.86（0.70~1.05）
NSCLP	rs6631759	T	48.3	45.9	C	0.92	0.34	1.10（0.90~1.34）
	rs5971698	A	39.6	44.3	G	3.48	0.06	0.83（0.68~1.01）
	rs5928208	A	33.7	39.0	G	4.87	0.027	0.79（0.65~0.97）
	rs5972815	C	37.9	39.0	T	0.22	0.64	0.95（0.78~1.17）
BCLP	rs6631759	T	46.8	45.9	C	0.07	0.8	1.04（0.78~1.38）
	rs5971698	A	40.4	44.3	G	1.17	0.28	0.85（0.64~1.14）
	rs5928208	A	31.2	39.0	G	4.97	0.026	0.71（0.52~0.96）
	rs5972815	C	36.7	39.0	T	0.43	0.51	0.91（0.68~1.22）
UCLP	rs6631759	T	39.9	42.8	C	1.02	0.31	0.89（0.71~1.12）
	rs5971698	T	12.2	16.4	C	4.84	0.028	0.71（0.52~0.96）
	rs5928208	A	0.0	0.2	G	1.66	0.2	-
	rs5972815	G	17.5	22.3	C	4.7	0.03	0.74（0.56~0.97）
RCLP	rs6631759	T	49.0	45.9	C	0.84	0.36	1.13（0.87~1.48）
	rs5971698	A	41.8	44.3	G	0.51	0.48	0.91（0.69~1.19）
	rs5928208	A	36.7	39.0	G	0.5	0.48	0.90（0.69~1.19）
	rs5972815	C	42.4	39.0	T	1.02	0.31	1.15（0.88~1.51）
LCLP	rs6631759	T	48.6	45.9	C	0.87	0.35	1.12（0.89~1.41）
	rs5971698	A	37.9	44.3	G	4.72	0.03	0.77（0.61~0.97）
	rs5928208	A	33.5	39.0	G	3.77	0.05	0.79（0.62~1.00）
	rs5972815	C	35.9	39.0	T	1.16	0.28	0.88（0.69~1.11）
NSCL	rs6631759	T	49.5	45.9	C	2.09	0.15	1.16（0.95~1.40）
	rs5971698	A	39.8	44.3	G	3.28	0.07	0.83（0.68~1.02）
	rs5928208	A	35.7	39.0	G	1.94	0.16	0.87（0.71~1.06）
	rs5972815	C	35.3	39.0	T	2.42	0.12	0.85（0.70~1.04）
BCL	rs6631759	T	53.3	45.9	C	2.21	0.14	1.35（0.91~1.99）

续表2

表型	SNP	次要等位基因	患病组等位基因频率/%	对照组等位基因频率/%	主要等位基因	卡方检验统计量	*P*值	OR（95%CI）
	rs5971698	A	35.8	44.3	G	2.98	0.08	0.70（0.47~1.05）
	rs5928208	A	30.9	39.0	G	2.84	0.09	0.70（0.46~1.06）
	rs5972815	C	43.4	39.0	T	0.82	0.36	1.20（0.81~1.78）
UCL	rs6631759	T	49.7	45.9	C	2.15	0.14	1.17（0.95~1.43）
	rs5971698	A	39.0	44.3	G	4.19	0.041	0.80（0.65~0.99）
	rs5928208	A	34.8	39.0	G	2.83	0.09	0.83（0.67~1.03）
	rs5972815	C	33.8	39.0	T	4.28	0.039	0.80（0.65~0.99）
RCL	rs6631759	T	46.9	45.9	C	0.09	0.76	1.04（0.80~1.36）
	rs5971698	A	41.3	44.3	G	0.77	0.38	0.89（0.68~1.16）
	rs5928208	A	38.7	39.0	G	0.01	0.92	0.99（0.75~1.30）
	rs5972815	C	31.6	39.0	T	5.28	0.022	0.72（0.54~0.95）
LCL	rs6631759	T	51.2	45.9	C	3.49	0.06	1.24（0.99~1.55）
	rs5971698	A	37.8	44.3	G	5.36	0.021	0.76（0.61~0.96）
	rs5928208	A	32.7	39.0	G	5.36	0.021	0.76（0.60~0.96）
	rs5972815	C	35.1	39.0	T	2.06	0.15	0.84（0.67~1.06）

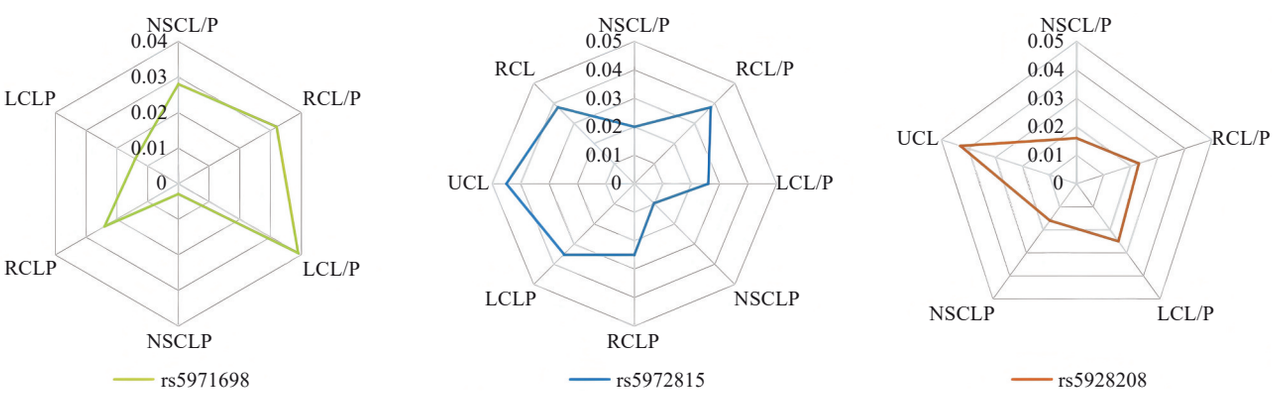


图 2　基因型关联分析结果

Fig 2　Results of genotype association analysis

表 3　NSCL/P亚型的基因型关联分析

Tab 3　Genotypic association analysis of NSCL/P subtypes

表型	SNP	次要等位基因	主要等位基因	患病组	对照组	CHISQ	*P*值
NSCL/P	rs6631759	T	C	197/301/222	58/121/73	3.22	0.2
	rs5971698	A	G	138/286/289	46/124/81	7.17	0.028
	rs5928208	A	G	105/288/326	32/127/93	8.23	0.016
	rs5972815	C	T	126/269/325	40/119/93	7.78	0.02
BCL/P	rs6631759	T	C	23/41/29	58/121/73	0.42	0.81
	rs5971698	A	G	18/38/36	46/124/81	1.92	0.38
	rs5928208	A	G	10/39/44	32/127/93	3.08	0.21
	rs5972815	C	T	16/47/30	40/119/93	0.64	0.73
UCL/P	rs6631759	T	C	98/268/165	47/122/83	0.34	0.85
	rs5971698	T	C	14/166/351	11/66/175	3.37	0.19
	rs5928208	A	G	0/0/531	0/1/251	-	-
	rs5972815	G	C	29/201/301	19/84/149	2.34	0.31
RCL/P	rs6631759	T	C	52/74/65	58/121/73	3.79	0.15
	rs5971698	A	G	40/70/79	46/124/81	6.88	0.032

续表3

表型	SNP	次要等位基因	主要等位基因	患病组	对照组	CHISQ	*P*值
	rs5928208	A	G	35/72/84	32/127/93	7.54	0.023
	rs5972815	C	T	32/68/91	40/119/93	6.54	0.038
LCL/P	rs6631759	T	C	100/145/95	58/121/73	3.2	0.2
	rs5971698	A	G	58/137/143	46/124/81	6.48	0.039
	rs5928208	A	G	42/136/162	32/127/93	7.41	0.025
	rs5972815	C	T	58/124/158	40/119/93	7.32	0.026
NSCLP	rs6631759	T	C	83/113/100	58/121/73	5.42	0.07
	rs5971698	A	G	61/102/127	46/124/81	11.67	0.002 9
	rs5928208	A	G	43/113/139	32/127/93	8.22	0.016
	rs5972815	C	T	61/102/133	40/119/93	9.28	0.009 7
BCLP	rs6631759	T	C	11/26/21	58/121/73	1.26	0.53
	rs5971698	A	G	13/23/21	46/124/81	1.58	0.45
	rs5928208	A	G	7/23/28	32/127/93	2.7	0.26
	rs5972815	C	T	12/24/22	40/119/93	1.01	0.6
UCLP	rs6631759	T	C	33/112/79	47/122/83	1.33	0.51
	rs5971698	T	C	7/71/146	11/66/175	2.05	0.36
	rs5928208	A	G	0/0/224	0/1/251	-	-
	rs5972815	G	C	7/81/136	19/84/149	4.56	0.1
RCLP	rs6631759	T	C	27/26/30	58/121/73	7.24	0.027
	rs5971698	A	G	19/26/36	46/124/81	7.46	0.024
	rs5928208	A	G	16/31/36	32/127/93	4.82	0.09
	rs5972815	C	T	21/26/36	40/119/93	7.37	0.025
LCLP	rs6631759	T	C	43/54/44	58/121/73	4.04	0.13
	rs5971698	A	G	26/49/64	46/124/81	8.61	0.014
	rs5928208	A	G	19/54/68	32/127/93	5.75	0.06
	rs5972815	C	T	25/48/68	40/119/93	6.71	0.035
NSCL	rs6631759	T	C	114/188/122	58/121/73	1.4	0.5
	rs5971698	A	G	77/184/162	46/124/81	2.79	0.25
	rs5928208	A	G	62/175/187	32/127/93	5.34	0.07
	rs5972815	C	T	65/167/192	40/119/93	4.96	0.08
BCL	rs6631759	T	C	12/15/8	58/121/73	2.18	0.34
	rs5971698	A	G	5/15/15	46/124/81	1.58	0.45
	rs5928208	A	G	3/16/16	32/127/93	-	-
	rs5972815	C	T	4/23/8	40/119/93	-	-
UCL	rs6631759	T	C	82/139/86	58/121/73	1.02	0.6
	rs5971698	A	G	53/132/122	46/124/81	3.44	0.18
	rs5928208	A	G	42/123/142	32/127/93	6.28	0.043
	rs5972815	C	T	44/118/145	40/119/93	6.21	0.045
RCL	rs6631759	T	C	25/48/35	58/121/73	0.5	0.78
	rs5971698	A	G	21/44/43	46/124/81	2.51	0.29
	rs5928208	A	G	19/41/48	32/127/93	4.88	0.09
	rs5972815	C	T	11/42/55	40/119/93	6.52	0.038
LCL	rs6631759	T	C	57/91/51	58/121/73	1.96	0.38
	rs5971698	A	G	32/88/79	46/124/81	2.68	0.26
	rs5928208	A	G	23/82/94	32/127/93	5.01	0.08
	rs5972815	C	T	33/76/90	40/119/93	4.03	0.13

注：患病组和对照组中的3组数字分别为次要等位基因纯合子数、杂合子数、主要等位基因纯合子数。

表 4 调控基序预测结果

Tab 4 Regulatory motif altered

SNP	位置权重矩阵ID	Strand	参考等位基因	突变等位基因	匹配序列
rs5928208	CCNT2_disc1	−	11.1	11.6	STGBDNNNNDSWGATAAVVVN
	RXRA_disc5	−	13	1	CGCCYTCT
	SETDB1_disc1	−	8.3	1.7	RRACTACMWYTYCCRKVRDKCHNYG
	YY1_known4	+	12.9	1	CSGCCATCT
	ZBTB7A_disc1	−	10.6	−1.3	MGCGCCCCCT
rs5972815	Foxp1	−	−26.8	−16	AWAMWMRMMAAYAYAAATAA
	SRF_disc1	+	17.1	5.1	CCWWATWWGG
	SRF_known1	+	17.1	14	BBCCAWATAWGGVV
	SRF_known2	−	0.8	−11	MNBWCCWTATAWGGKCAT
	SRF_known3	−	14.5	10.1	HWCCWWWWWWGGNA
	SRF_known4	−	13	1.1	CCWTATAWGGKC
	SRF_known5	−	17.5	10.2	HVKBKCCWTWTWTGG
	SRF_known6	+	18.1	14.8	VDSKCCWTAWWWGGH

注：RXRA为视黄酸X受体α（retinoid X receptor alpha）；SETDB1为SET结构域分叉1（SET domain bifurcated 1）；Foxp1为叉头框蛋白P1（forkhead box protein P1）；SRF为血清反应因子（serum response factor）。Strand表示该基序在参考基因组序列上的匹配方向，“+”表示基序与参考序列方向一致，“−”表示基序与参考序列互补、反向。

此外，左侧与右侧NSCL/P的发病率存在显著差异[32]，这一现象在更具体的亚型的左、右侧之间也是如此[33]。目前其确切病因尚未明确，但有假说认为这种发病率方向上的不对称性可能与神经发育的偏侧性相关。因此，推测本研究中观察到的差异可能是由DMD基因变异所调控的发育偏侧性所致。然而受限于实验条件，未能通过进一步实验全面探究DMD基因在唇腭裂畸形发生过程中的作用机制。未来仍需更多研究来阐明DMD基因变异如何影响唇腭裂畸形的形成。

功能预测分析显示，rs5928208和rs5972815位点的不同等位基因可能影响多个转录因子的结合能力。这些转录因子中，部分已被报道与NSCL/P相关。研究[34]发现，RXRA在唇裂患者和非唇裂对照者的角质形成细胞中均呈现表达下调。此外，有研究[35]通过全反式维甲酸模拟环境因素诱导出腭裂胎鼠模型。SETDB1可通过表观遗传修饰影响配对盒基因9（paired box 9，PAX9）的表达，而PAX9已被证实是NSCL/P的重要致病基因，其缺失可能通过降低骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）信号的传导，从而影响小鼠腭部发育[35]。此外，有研究[36]表明，NSCP与Foxp1附近的一个鳃弓增强子存在显著关联。SRF是调节即刻早期基因和细胞骨架重塑基因的主要转录因子，细胞骨架重塑对于神经嵴细胞迁移和上皮细胞形态转变至关重要[37]。因此，尽管这些SNP均位于DMD基因的内含子区域，但它们仍可能通过改变调控基序的关联性，在NSCL/P的发病机制中发挥潜在功能。

综上所述，本研究证实DMD基因变异不仅可导致杜氏肌营养不良症，还与NSCL/P存在关联，这一发现或可部分解释NSCL/P发病率的偏侧性特征。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

[1] Babai A, Irving M. Orofacial clefts: genetics of cleft lip and palate[J]. Genes (Basel), 2023, 14(8): 1603.

[2] Kantar RS, Hamdan US, Muller JN, et al. Global prevalence and burden of orofacial clefts: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. J Craniofac Surg, 2023, 34(7): 2012-2015.

[3] Nasreddine G, El Hajj J, Ghassibe-Sabbagh M. Orofacial clefts embryology, classification, epidemiology, and genetics[J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2021, 787: 108373.

[4] Robinson K, Curtis SW, Leslie EJ. The heterogeneous genetic architectures of orofacial clefts[J]. Trends Genet, 2024, 40(5): 410-421.

[5] Sato Y, Yoshioka E, Saijo Y, et al. Associated congenital anomalies and syndromes of 248 infants with orofacial clefts born between 2011 and 2014 in the Japan environment and children’s study[J]. Congenit Anom (Kyoto),

2023, 63(1): 9-15.

[6] Xia W, Du M, Wu M, et al. Patient-reported outcomes measure for patients with cleft palate[J]. Front Public Health, 2024, 12: 1469455.

[7] Li X, Tian Y, Qiu L, et al. Expression quantitative trait locus study of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate GWAS variants in lip tissues[J]. Cells, 2022, 11(20): 3281.

[8] Lou S, Yang J, Zhu GR, et al. Integrative multi-omics analysis identifies genetic variants contributing to non-syndromic cleft lip with or without cleft palate[J]. Chin J Dent Res, 2024, 27(1): 65-73.

[9] Cui X, Zhu G, Han M, et al. Genetic variants in BCL-2 family genes influence the risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate[J]. Birth Defects Res, 2024, 116(1): e2288.

[10] You Y, Shi J, Shi B, et al. Target sequencing reveals the association between variants in VAX1 and NSCL/P in Chinese population[J]. Oral Dis, 2023, 29(5): 2130-2138.

[11] Bartusel M, Kim SX, Rehimi R, et al. A non-syndromic orofacial cleft risk locus links tRNA splicing defects to neural crest cell pathologies[J]. Am J Hum Genet, 2025, 112(5): 1097-1116.

[12] Phan HDB, Phuong LH, Dang TN, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IRF6 gene with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Kinh Vietnamese patients[J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(2): 1469-1476.

[13] Zawiślak A, Woźniak K, Kawala B, et al. IRF6 and FGF1 polymorphisms in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Polish population[J]. Open Med (Wars), 2023, 18(1): 20230677.

[14] Won HJ, Kim JW, Won HS, et al. Gene regulatory networks and signaling pathways in palatogenesis and cleft palate: a comprehensive review[J]. Cells, 2023, 12(15): 1954.

[15] Pilmane M, Jain N, Vitenberga-Verza Z. Expression analysis of FGF/FGFR and FOX family proteins in mucosal tissue obtained from orofacial cleft-affected children[J]. Biology (Basel), 2021, 10(5): 423.

[16] Lansdon LA, Dickinson A, Arlis S, et al. Genome-wide analysis of copy-number variation in humans with cleft lip and/or cleft palate identifies COBLL1, RIC1, and ARHGEF38 as clefting genes[J]. Am J Hum Genet, 2023, 110(1): 71-91.

[17] Tao HX, Yang YX, Shi B, et al. Identification of putative regulatory single-nucleotide variants in NTN1 gene associated with NSCL/P[J]. J Hum Genet, 2023, 68(7): 491-497.

[18] Gisladottir RS. Advancing GWAS of human communication[J]. Trends Genet, 2025, 41(8): 643-646.

[19] Yang J, Yu X, Zhu G, et al. Integrating GWAS and eQTL to predict genes and pathways for non-syndromic cleft lip with or without palate[J]. Oral Dis, 2021, 27(7): 1747-1754.

[20] Dąbrowska J, Biedziak B, Bogdanowicz A, et al. Identification of novel risk variants of non-syndromic cleft palate by targeted gene panel sequencing[J]. J Clin Med, 2023, 12(5): 2051.

[21] Dąbrowska J, Biedziak B, Szponar-Żurowska A, et al. Identification of novel susceptibility genes for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate using NGS-based multigene panel testing[J]. Mol Genet Genomics, 2022, 297(5): 1315-1327.

[22] Fonseca RF, de Carvalho FM, Poletta FA, et al. Family-based genome-wide association study in Patagonia confirms the association of the DMD locus and cleft lip and palate[J]. Eur J Oral Sci, 2015, 123(5): 381-384.

[23] Barrett P, Louie KW, Dupont JB, et al. Uncovering the embryonic origins of Duchenne muscular dystrophy[J]. WIREs Mech Dis, 2024, 16(6): e1653.

[24] Hurley-Novatny A, Chang D, Murakami K, et al. Poor bone health in Duchenne muscular dystrophy: a multifactorial problem beyond corticosteroids and loss of ambulation[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2024, 15: 1398050.

[25] Gao X, Cui Y, Zhang G, et al. Targeting EP2 receptor improves muscle and bone health in dystrophin$^{-/-}$utrophin$^{-/-}$ double-knockout Mice[J]. Cells, 2025, 14(2): 116.

[26] D'Amario D, Gowran A, Canonico F, et al. Dystrophin cardiomyopathies: clinical management, molecular pathogenesis and evolution towards precision medicine[J]. J Clin Med, 2018, 7(9): 291.

[27] Hanson B, Wood MJA, Roberts TC. Molecular correction of Duchenne muscular dystrophy by splice modulation and gene editing[J]. RNA Biol, 2021, 18(7): 1048-1062.

[28] Skare Ø, Lie RT, Haaland ØA, et al. Analysis of parent-

of-origin effects on the X chromosome in Asian and European Orofacial Cleft Triads Identifies Associations with DMD, FGF13, EGFL6, and additional loci at Xp22.2 [J]. Front Genet, 2018, 9: 25.

[29] Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D877-D881.

[30] Lu Y, Quan C, Chen H, et al. 3DSNP: a database for linking human noncoding SNPs to their three-dimensional interacting genes[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (D1): D643-D649.

[31] Quan C, Ping J, Lu H, et al. 3DSNP 2.0: update and expansion of the noncoding genomic variant annotation database[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1): D950-D955.

[32] Fell M, Bradley D, Chadha A, et al. Sidedness in unilateral orofacial clefts: a systematic scoping review[J]. Cleft Palate Craniofac J, 2025, 62(5): 730-743.

[33] Gallagher ER, Siebold B, Collett BR, et al. Associations between laterality of orofacial clefts and medical and academic outcomes[J]. Am J Med Genet A, 2018, 176 (2): 267-276.

[34] Mammadova A, Ackermans MM, Bloemen M, et al. Effects of retinoic acid on proliferation and gene expression of cleft and non-cleft palatal keratinocytes[J]. Eur J Orthod, 2014, 36(6): 727-34.

[35] Zhu Y, Zhang Y, Jiang Y, et al. Retinoic acid upregulates METTL14 expression and the m6A modification level to inhibit the proliferation of embryonic palate mesenchymal cells in cleft palate mice[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(8): 4538.

[36] Kano S, Higashihori N, Thiha P, et al. The role of the histone methyltransferase SET domain bifurcated 1 during palatal development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 598: 74-80.

[37] Ahn H, Yu J, Ryu K, et al. Single-molecule analysis reveals that IPMK enhances the DNA-binding activity of the transcription factor SRF[J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(1): gkae1281.

（本文编辑　杜冰）