

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2020.01.008

· 防治实践 ·

# Van der Woude 综合征家系先天缺牙患者 MSX1 基因突变的检测

杜新雅<sup>1</sup>, 李晓宇<sup>1</sup>, 谢春<sup>1</sup>, 武斌<sup>1</sup>, 宋光保<sup>2</sup>, 杜野<sup>1</sup>

1. 深圳市龙华区人民医院口腔科, 广东 深圳(518000); 2. 南方医科大学口腔医院特诊中心, 广东 广州(510280)

**【摘要】** 目的 探讨 MSX1 基因与 Van der Woude 综合征(VWS)家系中缺牙的关系。方法 从 VWS 家系 9 中伴发缺牙患者 2 人及家系正常成员 2 人、60 个牙列完整的健康者共 64 人的静脉血中提取 DNA, 设计 MSX1 基因引物, 采用 PCR 方法扩增 MSX1 基因外显子 1、2 的编码区, 而后对外显子 1、2 的 PCR 纯化产物测序, 进行序列比对分析。结果 VWS 家系 9 两个缺牙患者 MSX1 基因中有 *ivs2 + 68 C>T* 多态; 伴 IRF6 基因突变的 VWS 患者缺牙较多。结论 VWS 家系 9 中先天缺牙患者的牙先天缺失与 MSX1 基因的 *ivs2 + 68 C>T* 多态可能相关。

**【关键词】** Van der Woude 综合征; 先天缺牙; 下唇瘘; 唇裂; 腭裂; MSX1;

致病基因; 基因多态性; 基因突变

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2020)01-0047-05



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

**【引用著录格式】** 杜新雅, 李晓宇, 谢春, 等. Van der Woude 综合征家系先天缺牙患者 MSX1 基因突变的检测[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(1): 47-52.

**Detection of MSX1 gene mutations in patients with congenital tooth loss in Van der Woude syndrome** DU Xinya<sup>1</sup>, LI Xiaoyu<sup>1</sup>, XIE Chun<sup>1</sup>, WU Bin<sup>1</sup>, SONG Guangbao<sup>2</sup>, DU Ye<sup>1</sup>. 1. Department of Stomatology, the People's Hospital of Longhua, Shenzhen 518000, China; 2. Department for VIP, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: SONG Guangbao, Email: songgb@21cn.com, Tel: 86-20-84427054

**【Abstract】** **Objective** To explore the relationship between MSX1 gene detection and tooth loss in a Van der Woude syndrome (VWS) family. **Methods** DNA was extracted from the venous blood of 2 patients with dental hypodontia in the 9th family of Van der Woude syndrome (VWS) families and 62 controls with complete dentition. Primers were designed for the MSX1 gene. The coding regions of exons 1 and 2 of the MSX1 gene were amplified by PCR. The purified products of exons 1 and 2 of the MSX1 gene were sequenced and analyzed by sequence alignment. **Results** The *ivs2+68 C>T* polymorphism in the MSX1 gene was found in the VWS9 members with tooth loss, and the VWS patients with IRF6 gene mutations had increased tooth loss. **Conclusion** Congenital tooth loss in the patients with congenital missing teeth in VWS family 9 may be related to the *ivs2 + 68 C>T* polymorphism of the MSX1 gene.

**【Key words】** Van der Woude syndrome; congenital missing teeth; lower lip fistula; cleft lip; cleft palate; MSX1; pathogenic gene; gene polymorphism; genetic mutations

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(1): 47-52.**

Van der Woude 综合征 (Van der Woude sy-

**【收稿日期】** 2019-01-07; **【修回日期】** 2019-08-22

**【基金项目】** 广东省自然科学基金项目(2019A515011714); 深圳市科技计划项目(JCYJ20180228164057158)

**【作者简介】** 杜新雅, 副主任医师, 博士, Email: 5759924@qq.com

**【通信作者】** 宋光保, 主任医师, 博士, Email: songgb@21cn.com, Tel: 86-20-84427054

drome, VWS) 是一种常染色体显性遗传病, 发病率为 1 ~ 3/30 000, 遗传外显率为 80% ~ 94%<sup>[1]</sup>, 特征是家族性下唇瘘伴唇裂或腭裂, 部分患者伴有缺牙。本系列前期研究收集到 14 个 VWS 家系, 37 例 VWS 患者, 致病基因为 IRF6 基因<sup>[2]</sup>; 在家系 9 中, VWS 先证者伴先天缺牙, 先证者父亲未有唇腭裂或者下唇瘘, 表现为先天缺牙。先天性缺牙是人

类常见的发育异常疾病之一,其发病率1.6%~20%<sup>[3]</sup>。其中缺失6颗和6颗以上牙齿(不包括第三磨牙)称为多数牙缺失(oligodontia);缺失6个以下牙齿的称为少数牙缺失(hypodontia)。临床表现为散发性或家族性。遗传和环境因素都可以导致先天性缺牙的发生,但是遗传因素更为关键<sup>[3]</sup>,遗传学和分子生物学研究进展表明,有超过300个基因参与牙齿发育的不同阶段。目前研究发现的与人类先天性缺牙相关的基因有WNT10A<sup>[4]</sup>,WNT10B<sup>[5]</sup>,AXIN2<sup>[6]</sup>,PAX9<sup>[7-8]</sup>,MSX1<sup>[9-10]</sup>等。上述研究显示多数牙先天缺失与PAX9、AXIN2密切相关<sup>[11]</sup>,而少数牙先天缺失主要与MSX1基因突变或缺失有关<sup>[12]</sup>。然而,上述基因突变在患者中的检出率不高,这与非综合征型先天缺牙可能是由多基因多因素共同调节控制有关<sup>[3]</sup>,有一些基因的单核苷酸多态性与先天性牙缺失的研究,涉及到MSX1<sup>[13]</sup>、AXIN2<sup>[14]</sup>等基因。本研究对VWS9家系中2名先天性牙齿缺失患者缺牙数分别为2颗、5颗,诊断为少数牙先天缺失;据此笔者进行了MSX1基因的检测,了解该家系少数牙先天缺失可能的致病基因。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

为VWS系列研究中的家系9,先证者为深圳市龙华区人民医院住院唇腭裂病例中发现的,先证者表现为唇腭裂伴下唇瘘,先天缺牙。笔者对每个家系成员进行了表型调查,对于2名有缺失牙的成员行全景断层摄片以明确缺牙情况。所有家系成员的临床表型由2名有经验的口腔医师独立检查确诊。同时将家系中其他2名健康成员和随机选取的60名体检者作为健康对照组(所有血液样本提供者均填写知情同意书),本研究通过了深圳市龙华区人民医院伦理委员会批准。

### 1.2 临床及遗传学资料分析

按照受累个体的临床表型进行登记总结,并绘制完整的系谱图,明确可能的遗传方式。系谱图如图1。对先证者及其父母进行口内、口外及全身系统检查后,拍摄全颌曲面断层片、采集上下颌印模,制取模型。

### 1.3 MSX1基因检测

1.3.1 引物设计与合成 根据GenBank人类基因组MSX1基因序列设计。MSX1基因由2个外显子,引物序列位于外显子相邻的内含子区。为避

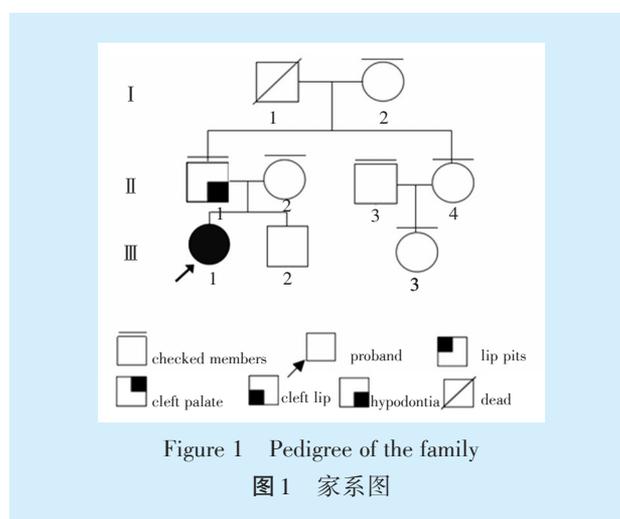


Figure 1 Pedigree of the family

图1 家系图

免PCR扩增过程中出现错配,每个外显子设计2对引物。引物序列、扩增片段长度见表1。引物由Takara公司合成。

1.3.2 序列分析 应用测序引物对家系中所有成员的PCR产物在ABIPRISM377自动测序仪上(Takara)进行正反向测序,将测序结果在DNASTAR软件中进行编辑和比较,并应用在线软件Blastn与GenBank人类基因组MSX1基因序列进行对比分析。

## 2 结果

### 2.1 临床表型分析

先证者(Ⅲ:1),女,15岁,身高1.54米,体重41 kg,智力正常,左侧完全型唇腭裂,齿槽突裂,下唇瘘;无汗腺、毛发、指甲等其它外胚层异常。口内及全颌曲面断层片检查显示先天性缺失牙为:右侧下颌恒侧切牙、尖牙、第二前磨牙、第二磨牙、上颌左侧恒侧切牙缺失。滞留乳牙为下颌右侧第二前磨牙(图2a~2c)。先证者父亲(Ⅱ:1),男,38岁。身高1.73米,体重66 kg。智力正常,无汗腺、毛发、指甲等其它外胚层异常。口内及全颌曲面断层片检查显示先天性缺失牙为:两颗下颌侧切牙(图2d、2e)。先证者的母亲和兄弟表型正常,直系三代亲属未有类似畸形。

### 2.2 PCR扩增

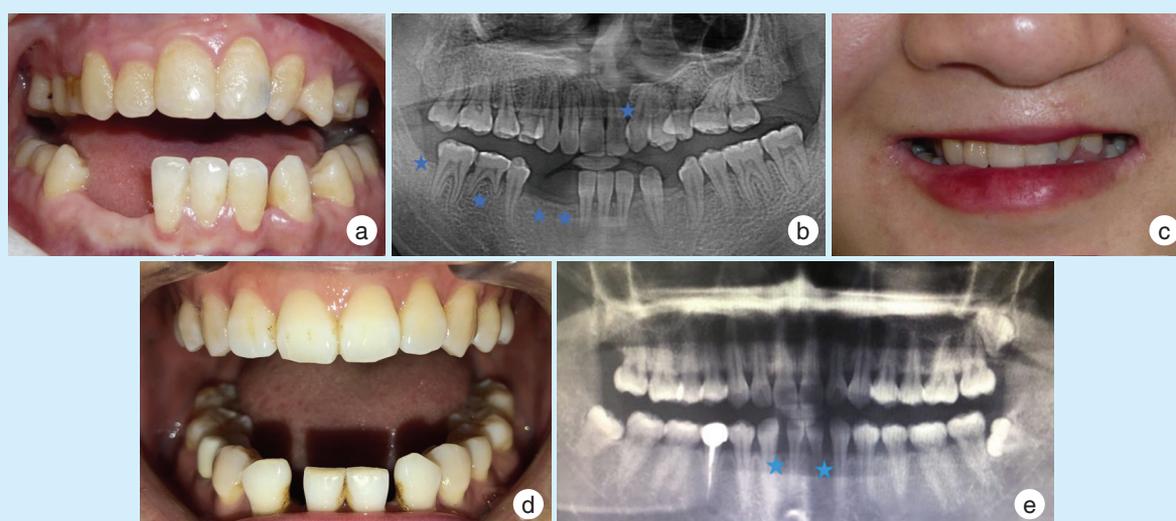
以基因组DNA为模板,以MSX11aF/MSX11aR、MSX11bF/MSX11bR、MSX12aF/MSX12aR、MSX12bF/MSX12bR为引物的PCR扩增产物5 μL经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,在约277 bp、287 bp、333 bp、419 bp处出现清晰的阳性扩增带,与预期结果一致(图3)。

### 2.3 PCR扩增产物的序列测定

PCR扩增产物DNA序列结果显示,患者Ⅱ:1

表1 MSX1 基因第1~2外显子引物序列及扩增片段长度  
Table 1 MSX1 primer sequences and amplified fragment length

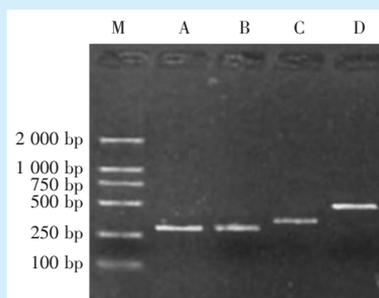
Exon	Primer	Primer sequence	Amplification length
exons 1	MSX11aF	5'CCCGGAGCCCATGCCCGGGGCT 3'	287 bp
	MSX11aR	5'GACCACAGGAAGCCGGGGCCAA3'	
exons 1	MSX11bF	5'CCAAGGAGAGCGCCCTGGCGCCCT3'	277 bp
	MSX11bR	5'TCCCTCTGCGCCTGGGTTCTGGCT3'	
exons2	MSX12aF	5'AGGCACTTGGCGGCACTCA3'	333 bp
	MSX12aR	5'CTTGTAGTCTCTTTGCCTTGG3'	
exons2	MSX12bF	5'CGCCAAGGCAAAGAGACTACAAG3'	419 bp
	MSx12bR	5'CACTTTTTGGCAGGGATCAGACTTC3'	



a: patient III : 1 dentition photo; b: patient III : 1 panoramic radiograph shows 22, 42, 43, 45, and 47 missing; asterisks indicate missing teeth; c: patient III : 1, the lip photo shows the left cleft lip after reconstruction and lower lip fistula resection; d: II : 1 dentition photo; e: II : 1, the panoramic radiograph shows 32 and 42 missing; asterisks indicate missing teeth

Figure 2 Dentition photo, panoramic radiograph and facial photo of the patient III : 1 and II : 1

图2 患者 III : 1 和患者 II : 1 临床照片和全景片



The band of ABCD was the amplification product of MSX1, which was 277 bp, 287 bp, 333 bp, 419 bp

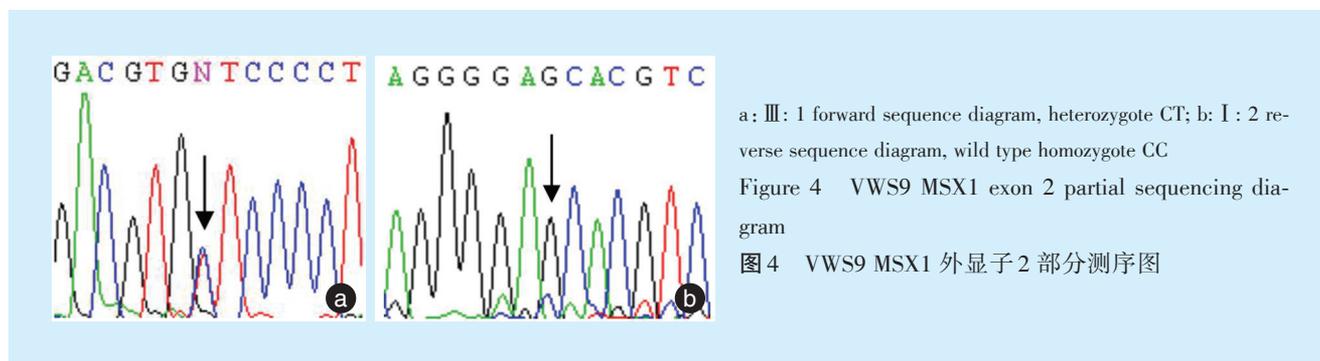
Figure 3 PCR amplification of complete exon of MSX1 gene

图3 MSX1 基因完整外显子的PCR扩增

和 III : 1 的 MSX1 第二外显子出现双峰(图4), *ivs2 + 68C > T, rs1095*。其余序列与人类基因组结果相同。数据库检索发现为单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)。该变异在数据库中显示检出率为0.02021, 检出频率较低, 在对照组中没有检出。

### 3 讨论

此家系是研究 VWS 家系时 9 号家系; 在家系 9 中, 有 2 个有口腔表型的成员, II : 1 仅下颌恒侧切牙缺失 2 颗, III : 1 的下颌右侧侧切牙、尖牙、第二前磨牙、第二磨牙(恒牙)和左上侧切牙共 5 颗牙缺失, 伴有左侧完全型唇腭裂, 齿槽突裂和下唇痿。而在 VWS 致病基因 IRF6 基因测序中, 未发现患者



II: 1 有突变, 而患者 III: 1 有突变: CC5.6GT (Ala2Gly); 据此排除患者 II: 1 为 VWS 患者, 其表型为另外一种遗传性疾病的表现: 先天性少数牙缺失。虽然国际上报道的 VWS 患者缺牙比例较高, 但在本系列研究所有 37 例 VWS 患者中, 除 III: 1, 仅有一个缺牙患者 (VWS4 II: 7, 左上颌侧切牙缺失), 先天缺牙的患病率仅与正常人群的几率相当, 推测可能先天缺牙在我国并不是 VWS 综合症的表型。据此推断 VWS9 中 II: 1 和 III: 1 出现的先天缺牙为非综合征性先天缺牙, 此家系同时也是一个非综合征性先天缺牙家系; 由于缺牙数少于 6 颗, 诊断为非综合征性少数牙先天缺失。非综合征性少数牙先天缺失与 MSX1 基因突变或缺失有关。本研究对 VWS9 家系患者检测出 MSX1 *ivs2* + 68C>T 变异, 检索发现为多态。其他正常人员未见此多态。

基因同源异型盒基因 (Homeobox genes) 为细胞核内转录因子家族, 编码在胚胎发育过程中发挥重要作用的转录调节蛋白, 调节颅面及肢体形态发育。MSX1 为其主要成员之一, 在多种组织中的表达, 主要集中于发育的早期阶段, 与组织、器官空间位置的确定和形态形成密切相关; 人类 MSX1 基因位于第 4 对染色体 4p16.3 ~ 16.1, 由 2 个外显子, 编码 297 个氨基酸, 在人类, MSX1 基因突变可引起: 先天缺牙、非综合征性唇腭裂等遗传性疾病, 主要表现为恒牙列先天性发育不全、唇腭裂、趾尖发育不全。多项研究表明, 牙发育相关基因的 SNP 可能与先天性牙缺失有关<sup>[13, 15-16]</sup>。本研究发现两例患者 MSX1 基因中的 *ivs2* + 68C > T 多态, 在正常对照组未筛查到; 仅在两例患者中发现; 患者的表型可能与此多态相关。为什么多态性位点能够引起与突变相似的表现, 分析原因如下: 基因多态性可以使基因的转录水平或活性增强或降低、改变遗传密码、启动子的突变及非转录

区的突变、导致蛋白质肽链中的片段缺失等。

不同基因突变引起不同的牙齿缺失类型一直是一个感兴趣的话题; 将牙缺失分为下前牙缺失和非下前牙缺失<sup>[13]</sup>。患者 II: 1 为两颗下中切牙缺失, III: 1 的下颌右侧侧切牙、尖牙、第二前磨牙、第二磨牙和左上侧切牙缺失, 缺牙较多, 两个患者检测到的遗传背景的区别在于 III: 1 是 VWS 患者, 已检测到 IRF6 基因突变 CC5.6GT (Ala2Gly); IRF6 基因在角质细胞的迁移、上皮细胞的分化以及调控颅面部发育方面发挥着重要作用; 对于患者 III: 1 的症状, 唇腭裂、下唇痿、牙缺失; 唇腭裂、下唇痿主要是由于 IRF6 基因突变; 其中缺失牙也不排除与 IRF6 基因突变有关, 唇腭裂患者的非间隙区缺牙<sup>[17]</sup>发病率高; MSX1 多态可能对此患者缺牙有协同作用。家系中两个患者表型不同, 第二个解释则是环境因素。人体是一个复杂的开放系统, 当一个人接触了有害因素后, 其不同的细胞、组织和器官都可能影响基因的表达。因此, 牙齿的发育异常可以同时反映出环境和全身系统的不协调。许多环境因素如放射线、化疗药物都可以影响牙齿的发育<sup>[18]</sup>。通过以上可以解释为什么基因的多态位点可以表现出明显的牙齿缺失, 但缺失的牙位、数量不同。

考虑到人类牙齿发育调控的复杂性, 因此, 患者的遗传病因不一定仅是这个 MSX1 的多态, 可能存在其他目前未知的新变异, 也在患者牙齿和面部发育异常中起到了辅助作用。由于本研究仅研究了一个最可能的先天缺牙致病基因 MSX1; 随着技术的发展, 可考虑使用全外显子测序技术<sup>[19]</sup>, 对其他可能的涉及到面部及牙齿发育的基因进行检测。必要时做基因功能研究。

#### 参考文献

- [1] Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate[J].

- Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2013, 163(4): 246-258.
- [2] 杜新雅, 李晓宇, 武斌, 等. 干扰素调节因子6基因致病的Van der Woude综合征的家系调查和遗传特点分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2018, 36(6): 623-627.
- Du XY, Li XY, Wu B, et al. Clinical and genetic features of Chinese kindreds with Van der Woude syndrome caused by interferon regulatory factor 6 mutation[J]. West Chin J Stomatol, 2018, 36(6): 623-627.
- [3] Yin W, Bian Z. The gene network underlying hypodontia[J]. J Dent Res, 2015, 94(7): 878-885.
- [4] Grejtakova D, Gabrikova - Dojcakova D, Boronova I, et al. WNT10A variants in relation to nonsyndromic hypodontia in eastern Slovak population[J]. J Genet, 2018, 97(5): 1169-1177.
- [5] Kantaputra P, Hutsadaloi A, Kaewgahya A, et al. WNT10B mutations associated with isolated dental anomalies[J]. Clin Genet, 2018, 93(5): 992-999.
- [6] Wong S, Liu H, Bai B, et al. Novel missense mutations in the AXIN2 gene associated with non-syndromic oligodontia[J]. Oral Biol, 2014, 59(3): 349-353.
- [7] Zhang TT, Zhao XX, Hou FF, et al. A novel PAX9 mutation found in a Chinese patient with hypodontia *via* whole exome sequencing [J]. Oral Dis, 2019, 25(1): 234-241.
- [8] Bonczek O, Balcar VJ, Šerý O. PAX9 gene mutations and tooth agenesis: a review[J]. Clin Genet, 2017, 92(5): 467-476.
- [9] Wong S, Liu H, Han D, et al. A novel non-stop mutation in MSX1 causing autosomal dominant non-syndromic oligodontia[J]. Mutagenesis, 2014, 29(5): 319-323.
- [10] Zamil NM, Yussof NM, Ardini YD, et al. Identification of MSX1 mutation in Malaysian hypodontia family[J]. Arch Oral Biol, 2017, 53(8): 183-185.
- [11] Liu HC, Ding TT, Zhan Y, et al. A novel axin2 missense mutation is associated with non-syndromic oligodontia[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138221.
- [12] Nurul HF, Yunita D, Zarina Z, et al. A review on non-syndromic tooth agenesis associated with PAX9 mutations[J]. Japanese Dental Science Review, 2018, 54(1): 30-36.
- [13] Zhang W, Qu HC, Zhang Y. Association of MSX1 and TGF-beta 1 genetic polymorphisms with hypodontia: meta-analysis[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(4): 10007-10016.
- [14] 秦晗, 徐宏志, 龚永庆. 单纯性多数牙缺失家系的AXIN2基因突变分析[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(12): 706-710.
- Qin H, Xu HZ, Gong YQ. Analysis of AXIN2 gene mutations in a family with isolated oligodontia[J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2016, 24(12): 706-710.
- [15] Frazier-Bowers S, Torain M, Wright J. 51 variations in MSX1 and PAX9 are associated with human tooth agenesis[J]. J Investig Med, 2015, 53(2): 395-396.
- [16] Liu H, Zhang J, Song S, et al. A case-control study of the association between tooth-development gene polymorphisms and non-syndromic hypodontia in the Chinese Han population[J]. Eur J Oral Sci, 2012, 120(5): 378-385.
- [17] 代佳琪, 王虎, 刘莉, 等. 单侧完全性唇腭裂患者上颌恒前牙发育异常的CBCT研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2017, 33(1): 24-26.
- Dai JQ, Wang H, Liu L, et al. A study of anterior maxillary dental anomalies in individuals with unilateral cleft lip and palate by CBCT[J]. J Clin Stomatol, 2017, 33(1): 24-26.
- [18] Townsend G, Bockmann M, Hughes T. Genetic, environmental and epigenetic influences on variation in human tooth number, size and shape[J]. Odontology, 2012, 100(1): 1-9.
- [19] 王皓, 刘洋, 刘浩辰, 等. 先天性缺牙患者中BMP2基因突变检测及功能分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2019, 51(1): 9-15.
- Wang H, Liu Y, Liu HC, et al. Detection and functional analysis of BMP2 gene mutation in patients with tooth agenesis[J]. Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2019, 51(1): 9-15.

(编辑 张琳, 曾曙光)



官网



公众号