

بررسی رابطه موتاسیون در ژن $TGF\beta 3$ با شکاف لب و کام در جمعیت ایرانی

دکتر آریتا تهرانچی*، دکتر بهرام کاظمی**، دکتر مسعود سیفی***، دکتر الهه محبوب****

چکیده

سابقه و هدف: شکاف لب و کام یکی از نواقص شایع مادرزادی است که عوارض فردی، اجتماعی و اقتصادی بسیاری به دنبال دارد. ژن‌های متعددی در زمینه‌سازی این بیماری درگیر شناخته شده‌اند که یکی از مطرح‌ترین آنها $TGF\beta 3$ می‌باشد. مواد و روشها: در مطالعه مورد-شاهدی حاضر، DNA از خون محیطی ۴۰ فرد مبتلا به شکاف لب با یا بدون شکاف کام و ۵۰ فرد سالم از طبقه اجتماعی مشابه استخراج گردید. $Genotyping$ نمونه PCR شده در محل آگزون ۳ ژن $TGF\beta 3$ با استفاده از روش DNA Restriction Digestion و به وسیله آنزیم‌های $HaeIII$ و $HinfI$ انجام شد. یافته‌ها: الکتروفورز محصول PCR هضم شده نمونه‌ها تنها یک واریانت نادر را در یکی از افراد مبتلا نشان داد و سایر موارد مشابه هم بودند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، پلی مورفیسمی برای ژن $TGF\beta 3$ یافت نگردید. در نژاد ایرانی ارتباطی بین پلی مورفیسم این ژن و ناهنجاری شکاف لب و کام وجود ندارد.

کلید واژگان: شکاف کام و لب، رابطه، ژن $TGF\beta 3$

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۸/۲۱

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۹/۶/۳

تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۹/۶/۲۱

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹، ۱۶۴-۱۶۰

مقدمه

شکاف لب و کام یکی از نواقص شایع مادرزادی است که با درصد شیوع متفاوتی در جوامع مختلف بروز می‌نماید. میزان آن در ایران حدود ۱/۱۱۶۳ تولد تخمین زده شده است (۱). این نقص به صورت سندرمیک و غیرسندرمیک بروز کرده، از لحاظ شناسایی عوامل ایجاد کننده بسیار پیچیده است. عوامل ژنتیکی و محیطی متعددی در بوجود آمدن آن تاثیرگذار می‌باشند. این ناهنجاری عوارض فردی و اجتماعی متعدد و درازمدتی را در پی دارد. مبتلایان با احتساب وقت و هزینه بالا، دوره طولانی از عمرشان را باید صرف درمان‌های جراحی-تغذیه‌ای، دندان-فکی، گفتار درمانی، پزشکی-دارویی و سایکولوژیک ناشی از این ناهنجاری‌ها نمایند. بنابراین انگیزه کافی برای جستجوی عوامل زمینه‌ساز فراهم می‌گردد.

کام در پستانداران از زوائد ماگزیلاری قوس اول برانشیال به نام تاچه‌ها که به صورت عمودی در هر طرف زبان در حال تکامل هستند، تشکیل می‌شود، ولی همراه با رشد مندیل، زبان پایین آمده، تاچه‌ها به اندازه کافی رشد می‌کنند تا به هم رسیده، شروع به اتصال به هم نمایند. در حین اتصال، اپی‌تلیوم طرفین (Epithelial seam)، دچار Migration Apoptosis و Transformation شده، به یک دست شدن مزانشیمال منجر می‌گردد. بنابراین، تشکیل کام پدیده‌ای پیچیده بوده، عوامل زمینه‌ساز زیادی که شایع‌ترین آنها دیر شدن روند افقی شدن تاچه‌ها و رشد ناکافی تاچه‌ها می‌باشد، می‌توانند باعث بوجود آمدن آن شوند (۲). $TGF\beta 3$ در حد بسیار زیادی توسط سلول‌های Medial Edge Epithelium (MEE) جوندگان بارز می‌گردد. موش‌های فاقد $TGF\beta 3$ ، عدم چسبندگی تاچه‌های کامی در حد کافی را نشان می‌دهند که به شکاف کام منجر می‌گردد. تجربیات، اهمیت $TGF\beta 3$ را در عمل تکامل نشان می‌دهند که

*دانشیار گروه ارتودنسی، دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات علوم دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

**استاد گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی و مولکولی و سلولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

***نویسنده مسئول: استاد گروه ارتودنسی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. E-mail: mseifi@dent.sbm.ac.ir

****ارتودنتیست.

Tgf5'-GGT ACT CAC TCC TTT CTC TG3'
TgfR5-CAC CTA CCT CTT CTC AAC Ag3'
که براساس اگزون ۳ ژن TGFβ3 (شماره دستیابی در بانک ژن AY 208161) طراحی و سنتز شدند، ۱۶۵ bp را آمپلی فای می کردند.
واکنش PCR
واکنش PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر با مقادیر زیر در لوله های مخصوص PCR تهیه شد.

نام ماده	مقدار(حجم)	غلظت نهایی
Taq DNA polymerase	0.25 μL	1.25 unit
dNTP 10 mM	0.5 μL	0.1 mM
Primer (F & R) DNA	2 μL	20 pmol each
10X PCR Buffer	5 μL	1 μg (20 ng/ μL)
50mM MgCl ₂	5 μL	1X
ddH ₂ O	1.5 μL	1.5 mM
	35.75 μL	

مخلوط واکنش را مختصری سانتریفیوژ کرده تا مواد در پایین لوله جمع شوند. سپس با برنامه زیر PCR انجام می شد. واکنش به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه قرار گرفت. دمای آنیلینگ ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه دمای Extension ۷۲ درجه و مدت آن نیز ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. این سیکل ها ۳۰ مرتبه تکرار شدند. لازم به ذکر است که قبل از شروع سیکل های PCR واکنش مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه قرار گرفت (Predenaturation) تا کل DNA موجود در آن دناتوره شود و بعد از اتمام PCR نیز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه قرار می گرفت (postextension) تا واکنش فرصت یابد و رشته های DNA که Extension آنها ناقص است کامل شوند. محصول PCR روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شد و نوار DNA مربوطه با دستگاه UVtransilluminator مشاهده گردید.

انجام RFLP: آنزیم های Hinf I و Hea III روی محصول PCR اثر داده شدند و واکنش روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شدند. از الگوی الکتروفورزی محصول PCR بعد از تأثیر آنزیم، عکس تهیه شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها، از آنالیز chi-square استفاده شد.

یافته ها

واکنش PCR بر روی DNA ۷۲ نمونه با موفقیت انجام شد و آنزیم های Hinf I و Hea III روی محصول PCR آنها اثر

احتمالاً از طریق القا بوجود آمده Filopodia در MEE می باشد (۳).

در موش های ZTGFβ3 توزیع نامنظم β-catenin در سیتوپلاسم در مقایسه با توزیع منظم و محیطی یافت شده در جنین موش های سالم دیده می شود (۴). MEE intercalation در موش های ZTGFβ3 رخ نمی دهد، ولی با اضافه کردن TGFβ3 به صورت اگزوژن می توان این موش ها را از دچار شدن به این نقص نجات داد (۵).

چندین مطالعه با روش Case-Control (۱۶-۶) وجود رابطه بین TGFβ3 و CL/P را رد می کنند و یا رابطه مثبتی را با شکاف کام بدون اثر متقابل بین این ژن ها و محیط (۱۰) مطرح می سازند.

مطالعات Linkage Disequilibrium (LD) نیز رابطه مثبت حائز اهمیت و یا ضعیفی را بین CL/P و TGFβ3 مطرح می سازند (۱۴-۵).

مواد و روشها

مطالعه مورد-شاهدی حاضر با روش نمونه گیری غیراحتمالی (آسان) انجام شد. تعداد ۴۰ فرد مبتلا به شکاف لب با یا بدون شکاف کام غیرسندرمیک از مراجعین بخش ارتودنسی دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی، بیماران بیمارستان حضرت فاطمه (س) و بیماران بیمارستان طالقانی و ۵۰ فرد گروه کنترل از طبقه اجتماعی مشابه انتخاب شدند.

استخراج DNA: مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده، ۵mM Tris، ۱۰mM Sucrose، ۱۵۰mM Triton x-۱۰۰، ۱M MgCl₂ را به نیم سی سی خون اضافه کرده و بعد از سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، مایع فوقانی خالی شده، دوباره رسوب حاصل را با نیم سی سی بافر لیز کننده، سوسپانسیون نموده، مانند مرحله قبل سانتریفیوژ گردید. این فرآیند چندین بار تکرار شد تا رسوب پایین لوله سفید گردد. سپس، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به آن اضافه کرده، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفته، بعد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. در این مرحله پروتئین ها دناتوره شده، با سانتریفیوژ کردن ته نشین می شدند. مایع فوقانی را به لوله جدید منتقل کرده، در یخچال قرار داده و برای انجام واکنش PCR استفاده گردید. پرایمرهای:

مارکرهایی که در محدوده Hardy-Weinberg equilibrium نیستند، بایستی توسط مطالعات Population-based یا Family-based تایید شود.

برخی از مولفان، همسان‌سازی نژادی گروه بیمار و کنترل یا استفاده از روش Genotyped unlinked marker loci در بیماران و گروه کنترل را به عنوان راهی برای کنترل اثر Population Stratification در مطالعات Association پیشنهاد کرده‌اند. همچنین، می‌توان از روش‌های مطالعاتی Family-Based association نظیر Patient-Parent به عنوان راهی برای اجتناب از False-positive association ناشی از Population Stratification استفاده کرد.

TGFβ3 یک کاندید بسیار قوی برای شکاف لب و کام در انسان است که این یافته‌ها براساس Mouse Model (۱۸،۱۷) و Linkage Disequilibrium (۱۹، ۲۰) می‌باشد. مطالعات مربوط به این ژن در جمعیت‌های مختلف متفاوت است. در جمعیت نروژ، شواهد کمی از همراهی ژن TGFβ3 و بیماری شکاف لب با یا بدون شکاف کام دیده می‌شود. قوی‌ترین Association مربوط به ۱/۷ Fold risk با دو کپی از CA Variant TGFβ3 بود (۶). برای ژن TGFβ3 در این جمعیت آلل‌های (bp 254,248) پیدا شد. در جمعیت فنلاند Association قوی بین ژن TGFβ3 و بیماری شکاف لب و کام دیده نشد (۶).

در جمعیت فیلیپین با وجود پیدا شدن یک آلل جدید علاوه بر دو آلل قبلی موجود در جمعیت‌های اروپای شمالی، رابطه‌ای بین ژن TGFβ3 و شکاف لب و کام دیده نشد (۱۳). در این جمعیت ۳ آلل برای ژن CA TGFβ3 پیدا شد -168-180 bp (166).

مطالعه Tanabe (۲۰۰۰) در کشور ژاپن، تعداد ۲ آلل برای ژن CA TGFβ3 در کشور ژاپن را نشان داد (۱۰). آنالیز Chi-square ژن TGFβ3 بین گروه کنترل و مبتلا هیچ تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نداد (۹).

در جمعیت دانمارک برای TGFβ3 X5.1 دو آلل و برای TGFβ3 سه آلل پیدا شد (۱۱) و رابطه‌ای بین انواع TGFβ3 و شکاف لب و کام دیده نشد. افرادی که ژنوتایپ آنها حداقل دارای یک کپی از آلل ۲ از CA TGFβ3 بود، نیز رابطه‌ای بین TGFβ3 و شکاف‌های دهانی صورتی نشان دادند، این مطالعه اولین مطالعه‌ای است که بین شکاف کام تنها و این مارکر خاص از TGFβ3 رابطه نشان می‌دهد (۱۴).

داده شد. پس از الکتروفورز نمونه‌های هضم شده با آنزیم Hinf I تنها یک پلی‌مورفیسم نادر در نمونه یکی از مبتلایان دیده شد. از آنالیز آنزیم Hea III روی محصول PCR هیچ واریانتهی دیده نشد.

بدین ترتیب در این مطالعه برای ژن TGFβ3، به جز یک عدد واریانت نادر، پلی‌مورفیسمی مشاهده نشد و در نتیجه در این نمونه‌ها ارتباط بین TGFβ3 و بیماری شکاف لب و کام وجود ندارد.

بحث

در مطالعات Association، تفاوت حائز اهمیت بین فرکانس آللی مارکر در گروه بیمار و کنترل می‌تواند نشانگر LD بین مارکر و جایگاه احتمالی بوجود آورنده بیماری باشد. از آنجا که LD تنها در یک فاصله کوچک یافت می‌شود، Close Linkage بین مارکر و جایگاه بیماری در صورت پیدا شدن Statistical association مطرح می‌گردد. با این وجود اثر مخدوش کننده Population Stratification در ارزیابی Genotype-phenotype association به طور وسیع مطرح شده است. به دلیل اثر این عامل، False-Positive association ممکن است به دلیل Population structure دیده شود. میزان Bias ناشی از این عامل به ساختار جمعیتی اختصاصی جامعه مورد مطالعه، میزان تفاوت فرکانس آللی مارکر و شیوع بیماری بستگی دارد.

جمعیت ایرانی مخلوطی از نژادهای مختلف می‌باشد که دارای درصد وقوع شکاف لب و کام به میزان نسبتاً بالایی است. نمونه‌ها و گروه کنترل در این مطالعه از طبقه پایین و متوسط اجتماع انتخاب شدند که اثر Population Structure را کم می‌کند. فرض رایج در آنالیزهای آماری روش‌های شمارش آللی این است که هر دو ژن در هر ژنوتایپ غیروابسته هستند (حداقل زمانی که هیچ ارتباطی وجود ندارد).

خارج شدن از محدوده Hardy-Weinberg equilibrium در جمعیت، باعث بالا رفتن شانس Association به صورت false-positive یا false-negative با استفاده از Biallele marker می‌گردد. بخصوص، میزان False-positive هنگامی که ژنوتایپ‌های هموزیگوت برای آلل High-risk احتمالی در کل جمعیت از میزان پیش‌بینی شده توسط قانون Hardy-Weinberg شایع‌تر باشد، بالا می‌رود. از این نقطه نظر، Genotype-disease association با استفاده از

در مطالعه انجام شده در جمعیت Maryland در آمریکا (۲۱) بر روی ژن TGFβ3، شواهدی از Linkage و Disequilibrium با استفاده از چندین تست آماری دیده شد. شواهد کمی از Heterogeneity در نقش TGFβ3 بین انواع مختلف شکافهای دهانی دیده می‌شود. در جمعیتی از East Coast، هم شکاف لب با یا بدون شکاف کام و هم شکاف کام تنها با مارکری بسیار نزدیک به TGFβ3 همراه بودند، ولی شکاف لب تنها، associate نبود (۲۱).

در جمعیت آمریکای جنوبی تحت تست LRT، موارد شکاف کام به تنهایی، Transmission Distortion حائز اهمیتی، با آلل ۲۵۴bp از TGFβ3 5'UTR.1 نشان داد (۱۲).

در مطالعه حاضر در جمعیت ایران هیچ پلی‌مورفیسم آلی برای ژن TGFβ3 یافت نگردید. در نتیجه، به نظر می‌رسد ارتباطی بین این ژن و بیماری شکاف لب و کام در جمعیت ایرانی وجود ندارد.

سپاسگزاری

این مطالعه، طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد که قسمتی از آن برگرفته از رساله تخصصی خانم دکتر الهه محبوب، دستیار بخش ارتودنسی است. بدینوسیله مراتب تقدیر خود را از حمایت‌های مادی و معنوی دانشکده دندانپزشکی و معاونت پژوهشی ابراز می‌داریم.

References

1. Yassaei S, Mehrgerdy Z, Zareshahi G: Prevalence of cleft lip and palate in births from 2003-2006 in Iran. *Community Dent Health* 2010;27:118-121.
2. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sengupta A, Brown N, Sandy JR: Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *J R Coll Surg Edinb* 2000;45:351-358.
3. Choi KY, Kim HJ, Cho BC, Kim IS, Ryoo HM: A TGF-beta-induced gene, betaig-h3, is crucial for the apoptotic disappearance of the medial edge epithelium in palate fusion. *J Cell Biochem* 2009;107:818-825.
4. Martinez-Alvarez C, Bonelli R, Tudela C, Gato A, Mena J, O'Kane S, et al: Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion. *Int J Dev Biol* 2000;44:331-335.
5. Tudela C, Formoso MA, Martinez T, Perez R, Aparicio M, Maestro C, et al: TGF-beta3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *Int J Dev Biol* 2002;46:333-336.
6. Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, de Assis NA, Diaz-Lacava A, et al: IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci* 2009;117:766-769.
7. Rullo R, Gombos F, Ferraraccio F, Farina A, Morano D, Festa VM, et al: TGFbeta3 expression in non-syndromic orofacial clefts. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:1759-1764.

قابل توجه است که Romitti و همکاران (۱۹۹۹) نیز تعداد سه آلل برای TGFβ3-CA و دو آلل برای TGFβ3 X5.1 و TGFβ3 5'UTR.1 پیدا کردند (۸). ایشان، همچنین، بین TGFβ3 CA و شکافهای دهانی صورتی نیز رابطه مشاهده نمودند. ولی در نتایج آنها، واریاسیون ژنتیکی در این مارکر با ریسک شکاف لب با یا بدون شکاف کام همراه می‌باشد ولی ریسک در حضور آلل شماره ۳ افزایش پیدا می‌کند.

در جمعیتی دیگر تعداد ۳ آلل برای TGFβ3 CA و ۲ آلل برای TGFβ3 5'UTR.1 و TGFβ3 X5.1 پیدا شد. همچنین، LD قابل توجهی بین شکاف لب و کام و TGFβ3 پیدا شد که احتمال دخالت این ژن را پاتوژنز شکاف کام مطرح می‌کند. در این مطالعه انواع TGFβ3 5'UTR.1, X5.1, CA در بررسی Case-control هیچ ارتباطی را با انواع شکاف نشان ندادند. ولی در بررسی TDT، TGFβ3 5'UTR.1 و TGFβ3 X5.1 با شکاف لب با یا بدون شکاف کام ارتباط نشان دادند (۱۵).

همچنین، در بررسی موتاسیون‌ها در بیماران شکاف کام تنها و در یک شجره از بیماران شکاف لب و کام، هیچ موتاسیون شایعی در نواحی Coding این ژن مشاهده نشد. با این وجود، ژن چندین واریاسیون نادر از ژن TGFβ3 پیدا شد که ممکن است فعالیت نرمال آنها را تغییر دهد (۲).

8. Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC: Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 1999;59:39-50.
9. Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M: Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clin Sci (Lond)* 2000;99:105-111.
10. Koillinen H, Ollikainen V, Rautio J, Hukki J, Kere J: Linkage and linkage disequilibrium searched for between non-syndromic cleft palate and four candidate loci. *J Med Genet* 2003;40:464-468.
11. Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, et al: Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol* 2003;24:230-239.
12. Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC: MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 2003;82:289-292.
13. Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Schearer H, Shiang R, et al: Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 1997;34:1-6.
14. Mitchell LE, Murray JC, O'Brien S, Christensen K: Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. *Am J Epidemiol* 2001;153:1007-1015.
15. Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, et al: Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 1998;63:557-568.
16. Stott-Miller M, Heike CL, Kratz M, Starr JR: Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case-control study and Monte Carlo-based bias analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2010;24:502-512.
17. Muraoka N, Shum L, Fukumoto S, Nomura T, Ohishi M, Nonaka K: Transforming growth factor-beta3 promotes mesenchymal cell proliferation and angiogenesis mediated by the enhancement of cyclin D1, Flk-1, and CD31 gene expression during CL/Fr mouse lip fusion. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73:956-965.
18. Jin JZ, Li Q, Higashi Y, Darling DS, Ding J: Analysis of *Zfhx1a* mutant mice reveals palatal shelf contact-independent medial edge epithelial differentiation during palate fusion. *Cell Tissue Res* 2008;333:29-38.
19. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, et al: Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 1995;11:409-414.
20. Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, et al: Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 1997;73:337-344.
21. Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS, Liang KY, et al: A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol* 2001;11:434-442.