

WNT5B 基因与人类神经管畸形(NTDs)的相关性

周翔宇¹ 杨雪艳¹ 聂晨霞³ 陈 瑛² 王红艳¹ 李 红^{2Δ}

(¹ 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室-现代人类学教育部重点实验室 上海 200433;² 苏州市立医院生殖与遗传中心 苏州 215002;³ 长治医学院生物教研室 长治 046000)

【摘要】 目的 探讨 WNT5B 基因序列变异与人类神经管畸形(neural tube defects,NTDs)发生的相关性。**方法** 应用 PCR-Sequencing 和 SNaPshot 技术在 163 例 NTDs 患者和 357 例对照人群中进行 WNT5B 基因突变扫描和关联分析。**结果** 在 NTDs 患者的 WNT5B 基因中共检测到 3 个新发现的序列变异位点:c.-57-123G>A、c.622-38G>A 和 c.622-99C>T。其中,c.-57-123G>A 位点变异在 357 例对照人群中未检测到,其为 NTDs 患者所特有的变异位点。对 rs2270036(c.329-16T>C)、rs6489313(c.329-84G>A)和 rs58317077(c.329-122T>C)这 3 个 SNP 位点的关联分析结果表明:在显性遗传模式下,rs58317077 位点的 C 等位基因与 NTDs 的发生显著相关,携带 C/C 或 C/T 基因型的个体的患病风险是携带 T/T 基因型的个体的 1.62 倍(OR=1.62,95%CI=1.05~2.52,P=0.028);生物信息学预测结果表明:rs58317077 位点的 C 等位基因会改变转录因子 NF-kap 和 MZF1 对该区域的结合。**结论** c.-57-123G>A 和 rs58317077 位点的 C 等位基因是人类 NTDs 发生的遗传性风险因子。

【关键词】 神经管畸形(NTDs); 平面细胞极性信号通路; WNT5B 基因; 变异位点; 突变

【中图分类号】 R 394.3 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2012.01.004

The association between WNT5B gene and human neural tube defects (NTDs)

ZHOU Xiang-yu¹, YANG Xue-yan¹, NIE Chen-xia³, CHEN Ying², WANG Hong-yan¹, LI Hong^{2Δ}

(¹ State Key Laboratory of Genetics-Key Laboratory of Contemporary Anthropology of the Ministry of Education, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;² Center for Reproduction and Genetics, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215002, Jiangsu Province, China;³ Department of Biology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China)

【Abstract】 Objective To explore the association between variants in WNT5B gene and human neural tube defects (NTDs). **Methods** Mutation scanning and case-control study were carried out in 163 NTDs patients and 357 control participants through PCR-sequencing and SNaPshot. **Results** Three new variants,c.-57-123G>A,c.622-38G>A and c.622-99C>T,were identified in WNT5B gene of NTDs patients. Among them,c.-57-123G>A was a disease-specific variant which was not detected in all control participants. Association study on rs2270036,rs6489313 and rs58317077 demonstrated that C allele in rs58317077 was significantly associated with NTDs in dominant mode. Individuals with C/C

上海市自然科学基金面上项目(09ZR1404400);教育部博士点新教师基金(20090071120037)

ΔCorresponding author E-mail:hongli688@gmail.com

and C/T genotype had 1.62-fold risk to be affected by NTDs than those bearing T/T alleles (OR = 1.62, 95% CI: 1.05 – 2.52, $P = 0.028$). Bioinformatics analysis indicated that C allele in rs58317077 would attenuate the binding affinity of transcription factors NF- κ B and MZF1 compared with T allele.

Conclusions C alleles in c. -57-123G>A and rs58317077 are genetic risk factors in human NTDs.

【Key words】 neural tube defects (NTDs); planar cell polarity pathway; WNT5B gene; variant; mutation

* This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai Municipality(09ZR1404400) and Doctoral Fund of Ministry of Education of China(20090071120037).

神经管畸形(neural tube defects, NTDs)是一类常见的严重出生缺陷,由胚胎发育早期神经管不闭合或闭合不全而引起^[1-3],常见表型主要有无脑儿、脑膨出、颅脊柱裂、脊柱裂等^[4-5]。我国山西省是世界上 NTDs 的高发地区,发病率达到 3‰~5‰^[6]。国内外研究已经证实母体孕期补服叶酸能够有效降低 NTDs 发病率^[7],但具体机制尚不清楚。目前已有超过 200 个基因被报道与 NTDs 发病有关^[4],越来越多的动物实验结果表明平面细胞极性(planar cell polarity, PCP)信号通路相关基因与 NTDs 的发生密切相关^[4,8-9]。PCP 信号通路又称非经典 Wnt 信号通路,在胚胎发育早期对汇聚延伸运动进行调控,进而影响到神经管的闭合^[10,11-13]。果蝇等模式生物的研究结果显示,参与 PCP 信号传导与调控的核心基因包括 WNT5/11、FZD3/6、VANGL1/2、DVL1/2/3、PK1/2、SMURF1/2、CELSER1 等^[4,13,9]。

WNT5B(wingless-related MMTV integration site 5B)基因属于 WNT 基因家族,编码产生分泌信号蛋白,这些蛋白在胚胎发育时期参与细胞命运和组织分化类型的调控^[14-15],并被认为是与肿瘤的发生密切相关^[16-18]。WNT5B 蛋白的氨基酸序列高度保守,在人类中其与 WNT5A 蛋白的相似度达到 80%,人类与小鼠的 WNT5B 蛋白序列相似度甚至达到 95%,这些都暗示着 WNT5B 基因在功能上的保守性和重要性。研究人员已在模式生物中证实, WNT5B 基因通过介导 PCP 信号传导来调控原肠胚的形成^[14,19]、间叶细胞的聚集和软骨细胞的分化^[15],这些结果都表明 WNT5B 基因与 PCP 信号的正常传导密切相关。我们实验室的既往研究结果及一些文献报道均表明人类 NTDs 的发生与 PCP 信号通路相关基因变异密切相关^[20-21]。然而, WNT5B 基因与人类 NTDs 的发生是否相关,目前尚无明确报道。为了探究 WNT5B 基因与 NTDs

的相关性,我们对来自山西和苏州的 163 例 NTDs 患儿和 357 例对照人群进行了 WNT5B 基因的外显子序列变异分析和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)关联研究。

材料和方法

研究材料 病例组 163 例 NTDs 胎儿样本采自我国 NTDs 发病率最高的山西省(由北京首都儿科研究所收集)和南方城市苏州市立医院母子健康研究中心,依据 NTDs 表型进行分类(表 1)。对照组 357 例对照样本来自山西省和苏州市,所有正常对照由山西长治医院、苏州市立医院及北京首都儿科研究所进行常规体检后采集,排除 NTDs、先天性心脏病、智力低下、精神分裂症、高血压、糖尿病和癌症等出生缺陷和重大疾病。病例组和对照组的样本采集均获得复旦大学生命科学学院伦理委员会批准,并签署知情同意书。

表 1 NTDs 患儿的样本信息
Tab 1 Case information of NTDs patients

Case information	Shanxi province	Suzhou city
Cases (<i>n</i>)	142	21
Male (%)	46	48
Mean age (weeks)	23.2	25.6
Clinical Diagnosis(<i>n</i>)		
Anencephaly	19	4
Cephalocele	4	4
Iniencephaly	14	1
Craniorachischisis	52	5
Spina bifida	53	7

WNT5B 基因的 PCR 扩增及测序 采用 Exon-resequencing 技术设计 WNT5B 基因编码区(4 个外显子)5'-UTR 和 3'-UTR 序列引物(表 2),然后进行 PCR 扩增。测序反应使用 Bigdye 试剂盒(美国

ABI 公司),用 ABI 3730 测序仪检测,结果用 Seq-man 软件分析。

变异位点的基因分型 应用 SNaPshot 技术对检测到的变异位点和 SNP 位点进行基因分型,SNaPshot 试剂盒来自美国 ABI 公司。SNaPshot 是基于单碱基延伸原理的基因分型技术,针对变异位点设计单碱基延伸引物,每个引物之间相差 5~6 bp,使变异位点在 SNaPshot 分型图中依次排开,用 PeakScan 软件对结果进行分析。如果检测位点为纯合,则只出现 1 个单峰;如果是杂合,则会出现双峰。最后随机挑选 10% 的 SNaPshot 结果进行测序验证(图 1)。

统计学分析 采用 χ^2 检验比较病例组与对照

表 2 WNT5B 基因编码区 PCR 扩增引物序列

Tab 2 Primers for amplification of the WNT5B gene coding region

WNT5B gene coding area	Forward primer	Reverse primer
Exon 1	5'-AGGGTGGGAAGATGAGCAGT-3'	5'-TCCTCAGGGAACCCCTTACAAA-3'
Exon 2	5'-CCTTTGAAGGCCAGCACTCT-3'	5'-GCTTCCTCGTGTGCCTCTCT-3'
Exon 3	5'-CAGCGGCGGAAGTAAAACAG-3'	5'-GTATGCCCATTTGGGAAGTGG-3'
Exon 4	5'-TGAGCACCTGAGCATCTTGG-3'	5'-TCCTTTCCATTTTCATCTTTCCA-3'

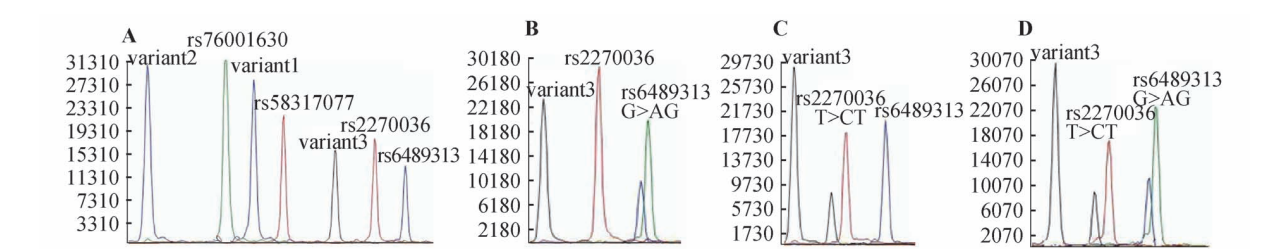


图 1 WNT5B 基因变异位点的 SNaPshot 基因分型图

Fig 1 Genotyping results of variants in WNT5B gene by SNaPshot

A: The genotypes of 7 variants are G/G, A/A, G/G, T/T, C/C, T/T, G/G, respectively (from left to right); B: The genotype of rs6489313 is A/G; C: The genotype of rs2270036 is C/T; D: Both rs6489313 and rs2270036 are heterozygous, and the genotypes are A/G and C/T, respectively. Red peak: T; Green peak: A; Blue peak: G; Black peak: C.

组之间各 SNP 位点的等位基因及基因型频率分布差异,并对所有检测到的 SNP 位点进行哈迪-温伯格平衡检验(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。

分非编码区进行突变分析,共发现 8 个序列变异位点,且均位于 WNT5B 基因的非编码区(图 2、表 3),在编码区域未检测到任何突变位点或 SNP 位点。

结 果

WNT5B 基因在 NTDs 患儿中的测序结果 对 163 例 NTDs 患儿的 WNT5B 基因整个编码区及部

SNaPshot 基因分型结果 对病例组检测到的 8 个遗传变异位点进行基因分型,结果在 357 例对照样本中均未检测到 c. -57-123G>A 位点,表明该位点是一个疾病特有的遗传变异位点(图 3);其他 7 个变异位点在对照组中均检测到。

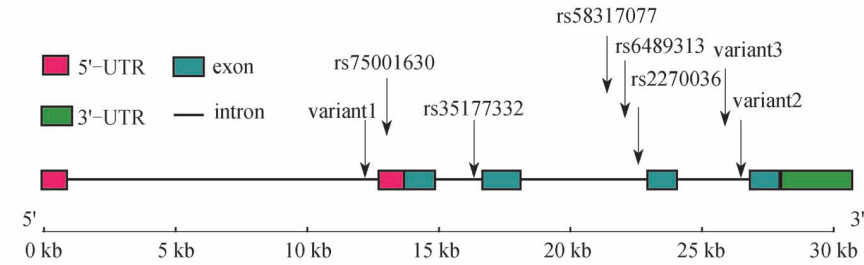


图 2 NTDs 患儿 WNT5B 基因中 8 个序列变异位点所处位置

Fig 2 Locations of 8 variants in WNT5B identified in NTDs patients

表 3 NTDs 患儿 WNT5B 基因中检测到的序列变异位点
Tab 3 WNT5B variants identified in neural tube defects patients

Variant	Location	Genotype			Near Seq (30 bp)	MAF
variant1	Intron-1:c.-57-123G>A	GG (162)	GA (1)	AA(0)	5'-AGTGGGAGGCGGAGGC TGGAAAGAGGCCGA-3'	NA
		0.994	0.006	0.000		
variant2	Intron-4:c.622-38G>A	GG (162)	GA (1)	AA(0)	5'-CCCCAGCCACCCTCTGGGCC TCTTCCACCG-3'	NA
		0.994	0.006	0.000		
variant3	Intron-4:c.622-99C>T	CC(161)	CT(2)	TT(0)	5'-ATTTGAAAAGCTATC TATCCCCTACCCTAC-3'	NA
		0.988	0.012	0.000		
rs75001630	5'-UTR:c.-41A>G	AA(159)	AG(4)	GG(0)	5'-TCTGTTTTTCTCCAGGGAAC CC5'-TACTCTGGA-3'	NA
		0.975	0.025	0.000		
rs35177332	Intron-2:c.81-114G>T	GG(162)	GT(1)	TT(0)	5'-GCACTCTGATTTAC TAATTTTCTTTCCAGG-3'	0.0437
		0.994	0.006	0.000		
rs2270036	Intron-3:c.329-16T>C	TT(16)	TC(53)	CC(94)	5'-GGGAGAGGAGAGCGCA CCCGCTTACCGCCC-3'	0.1979
		0.098	0.325	0.577		
rs6489313	Intron-3:c.329-84G>A	GG(155)	GA(8)	AA(0)	5'-CCCAGGGGTGTCAGCA GAGCCGTGGCGTGC-3'	0.0866
		0.951	0.049	0.000		
rs58317077	Intron-3:c.329-122T>C	TT(34)	CT(79)	CC(50)	5'-TTCCAAGCGTTAGAG CTACGGGAAGCGAAG-3'	0.3124
		0.209	0.485	0.307		

MAF; Minor allele frequency.

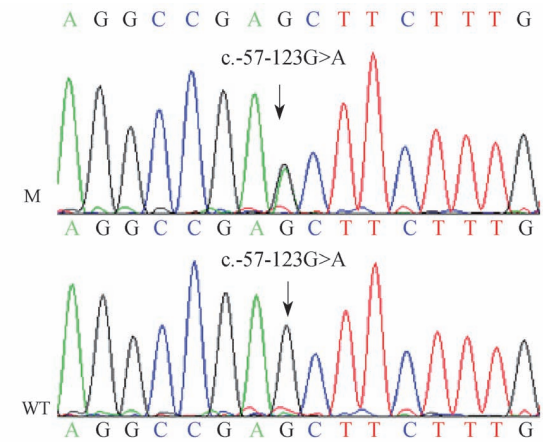


图 3 病例组中发现的突变位点 c.-57-123G>A 的测序图
Fig 3 Sequence data of the mutation c.-57-123G>A in patients
Red peak: T; Green peak: A; Blue peak: G; Black peak: C.

SNP 位点的关联分析 我们选取 3 个 SNP 位点 rs2270036、rs6489313 和 rs58317077 (频率 > 5%) 进行关联研究。连锁不平衡分析的结果表明, 3 个 SNP 位点之间不存在连锁不平衡现象 (rs58317077 vs. rs6489313, $r^2 = 0.0249$; rs58317077 vs. rs2270036, $r^2 = 0.187$), 且 3 个 SNP 位点在对照样本中的基因型分布都符合 HWE (表 4)。病例-对照的关联分析结果显示: 在显性遗传模式下, 病例组和对照组中 rs58317077 位点等位基因 C 的频率分布有显著差异, 其中 C 等位基因与 NTDs 患病风险增加相关 ($P = 0.028$), 携带 C/T 或

C/C 基因型的个体患 NTDs 的风险是携带 T/T 基因型个体的 1.62 倍 ($OR = 1.62, 95\% CI: 1.05 \sim 2.52$)。此外, 我们还发现在共显性遗传模型下, 携带 C/C 基因型的个体患 NTDs 的风险是携带 T/T 基因型个体的 1.87 倍 ($OR = 1.87, 95\% CI: 1.11 \sim 3.15$)。其他两个 SNP 位点 rs6489313 和 rs2270036 在关联研究中无显著差异 ($P > 0.05$, 表 4)。

单倍型分析的结果表明, 3 个 SNP 位点的等位基因以 C-A-C 组合时, 个体患 NTDs 的风险虽然没有增加, 但 P 值有统计学意义 (表 5)。

rs58317077 位点的生物信息学预测 利用在线转录因子预测软件 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 对 rs2270036、rs6489313 和 rs58317077 进行分析, 预测结果表明: 在 rs58317077 位点当等位基因 T 出现时, 转录因子 NF-kap 和 MZF1 与该位点结合; 而当等位基因 C 出现时会导致这种结合力的丧失, 表明该位点可能参与转录因子的调控 (图 4)。

讨 论

WNT 基因家族众多成员中的 WNT5A、WNT5B 和 WNT11 基因在模式生物中已被证实是参与 PCP 信号传导的 3 个成员, 其中 WNT5A 和

表 4 rs2270036,rs6489313 和 rs58317077 在病例组 and 对照组的频率分布
Tab 4 Distribution of rs2270036,rs6489313 and rs58317077 in NTDs patients and controls

SNP	HWP	Model/Genotype	Case (n,%)	Control	OR (95%CI)	P value
rs58317077	0.2	Codominant				0.054
		T/T	34 (20.9%)	107 (30%)	1.00	
		C/T	79 (48.5%)	166 (46.5%)	1.49 (0.94-2.38)	
		C/C	50 (30.7%)	84 (23.5%)	1.87 (1.11-3.15)	
rs58317077		Dominant				0.028
		T/T	34 (20.9%)	107 (30%)	1.00	
		C/T-C/C	129 (79.1%)	250 (70%)	1.62 (1.05-2.52)	
rs58317077		Recessive				0.087
		T/T-C/T	113 (69.3%)	273 (76.5%)	1.00	
		C/C	50 (30.7%)	84 (23.5%)	1.44 (0.95-2.17)	
rs58317077		Overdominant				0.68
		T/T-C/C	84 (51.5%)	191 (53.5%)	1.00	
		C/T	79 (48.5%)	166 (46.5%)	1.08 (0.75-1.57)	
rs6489313	1.0	NA				0.84
		A/A	155 (95.1)	338 (94.7%)	1.00	
		A/G	8 (4.9%)	19 (5.3%)	0.917(0.39-2.13)	
rs2270036	0.32	Codominant				0.56
		C/C	94 (57.7%)	204 (57.1%)	1.00	
		C/T	53 (32.5%)	127 (35.6%)	0.91 (0.61-1.36)	
		T/T	16 (9.8%)	26 (7.3%)	1.34 (0.68-2.61)	
rs2270036		Dominant				0.91
		C/C	94 (57.7%)	204 (57.1%)	1.00	
		C/T-T/T	69 (42.3%)	153 (42.9%)	0.98 (0.67-1.42)	
rs2270036		Recessive				0.33
		C/C-C/T	147 (90.2%)	331 (92.7%)	1.00	
		T/T	16 (9.8%)	26 (7.3%)	1.39 (0.72-2.66)	
rs2270036		Overdominant				0.50
		C/C-T/T	110 (67.5%)	230 (64.4%)	1.00	
		C/T	53 (32.5%)	127 (35.6%)	0.87 (0.59-1.29)	

HWP;Hardy-Weinberg P value in control group;NA;None available.

表 5 rs2270036,rs6489313 和 rs58317077 的单倍型分析结果
Tab 5 Haplotype analysis of rs2270036,rs6489313 and rs58317077

rs58317077	rs6489313	rs2270036	Frequence	OR(95%CI)	P value
T	A	C	0.472 2	1.00	—
C	A	C	0.251 1	1.63 (1.18-2.27)	0.003 5
C	A	T	0.216 2	1.23 (0.88-1.72)	0.22
T	A	T	0.034 5	1.69 (0.74-3.85)	0.21
C	G	C	0.022 8	1.37 (0.54-3.45)	0.51

WNT5B 在氨基酸序列上有极高的保守性。我们研究中采集的 163 例 NTDs 胎儿样本均携带严重的 NTDs 表型,如无脑、颅脊柱裂、脑膨出等。虽然人

类 NTDs 与 WNT5B 基因之间的相关性并不能被在 NTDs 胎儿样本中未检测到 WNT5B 基因编码区突变这一结果所验证,但这也进一步反映出 WNT5B 蛋白序列的高度保守性及其功能的重要性。

我们在 WNT5B 基因翻译起始位点上游 180 bp 处的第一内含子中检测到 1 个 c. -57-123G>A 的变异位点,虽然我们无法采集到双亲样本以判定该位点是否为新发,但对 357 例正常对照样本的基因分型结果表明 c. -57-123G>A 是一个潜在的、疾病特异的罕见突变位点。尽管分布频率低,但罕见突变具有很强的选择性,诸多实验室证据都表明罕见突变往往是造成 NTDs 的罪魁祸首^[20-22]。



图 4 rs58317077 位点的转录因子结合预测结果

Fig 4 Transcription factor predictions of rs58317077

3 个 SNP 位点 rs2270036、rs6489313 和 rs58317077 的病例-对照关联研究结果表明,在显性遗传模式下,rs58317077 的 C 等位基因会显著升高个体患 NTDs 的风险,虽然在基因编码区未找到支持 WNT5B 基因与 NTDs 相关的证据,但在 WNT5B 基因的非编码区我们却发现 rs58317077 位点的等位基因 C 与 NTDs 显著相关。近年来有研究报道 WNT5B 基因第三内含子的 rs2270031 和第四内含子的 2 个 SNP 位点与糖尿病的发生显著相关^[23-24]。此外,WNT5B 基因的过量表达会抑制经典 WNT 信号通路,并导致脂肪水平的上升^[25],而在本研究中我们发现与 NTDs 发生显著相关的 rs58317077 位点的 C 等位基因同样位于 WNT5B 基因的第三内含子中。

通常认为 SNP 位点可以通过 MicroRNA、转录因子、外显子剪切等多个方面来影响基因功能。为了探究 rs58317077 位点 C 等位基因是否有潜在的功能意义而不仅仅是一个遗传标记,我们应用在线生物信息学数据库对 rs58317077 位点进行了转录因子和 MicroRNA 的预测,结果发现 rs58317077 位点的 C 等位基因会对转录因子 NF-kap 和 MZF1 与该区域的结合产生影响,但当等位基因 C 出现时,转录因子 NF-kap 和 MZF1 无法与该区域正常结合。NF-kap(NF-kappaB)是一种核转录因子,存在于多种细胞中并参与细胞凋亡和有丝分裂的调控,在神经系统疾病及肿瘤研究中有许多关于 NF-kap 的报道。转录因子 MZF1 本身是一种锌指蛋白,与 DNA 序列有很高的结合特异性。病例组 rs58317077 位点的基因型 C/C 和 C/T 的频率明显高于对照组,根据生物信息学的预测结果,我们推测 C 等位基因可能会影响转录因子与该区域的结合,从而改变基因的正常表达水平,不过这种推测有待

今后功能实验的验证。

通过本研究我们在遗传水平上找到了与 NTDs 发病相关的突变位点 c.-57-123G>A,还发现 rs58317077 位点的 C 等位基因与 NTDs 发病显著相关且具有潜在的功能意义。

参 考 文 献

[1] Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(10): 784 - 793.

[2] Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects[J]. *Clin Genet*, 2007, 71(4):295 - 310.

[3] Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects[J]. *J Pathol*, 2010, 220(2):217 - 230.

[4] Greene ND, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18 (R2): R113 - R129.

[5] Bassuk AG, Kibar Z. Genetic basis of neural tube defects [J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2009, 16(3):101 - 110.

[6] 黄晶,陈东方. 1996 年 - 2004 年山西省神经管缺陷流行病学分析[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(19):2648 - 2649.

[7] Blom HJ. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2009, 85(4):295 - 302.

[8] Tada M, Kai M. Noncanonical Wnt/PCP signaling during vertebrate gastrulation [J]. *Zebrafish*, 2009, 6 (1): 29 - 40.

[9] Simons M, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease[J]. *Annu Rev Genet*, 2008, 42:517 - 540.

[10] Wansleben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240 (3):616 - 626.

[11] Wallingford JB. Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22 (5):597 - 604.

[12] Jenny A, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: a

- common mechanism for cellular polarization[J]. *Mt Sinai J Med*, 2006, 73(5): 738 - 750.
- [13] Jenny A. Planar cell polarity signaling in the Drosophila eye[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 93: 189 - 227.
- [14] Lin S, Baye LM, Westfall TA, *et al.* WNT5B-Ryk pathway provides directional signals to regulate gastrulation movement[J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(2): 263 - 278.
- [15] Bradley EW, Drissi MH. WNT5B regulates mesenchymal cell aggregation and chondrocyte differentiation through the planar cell polarity pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(6): 1683 - 1693.
- [16] Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review)[J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(6): 1583 - 1588.
- [17] Kuorelahti A, Rulli S, Huhtaniemi I, *et al.* Human chorionic gonadotropin (hCG) up-regulates wnt5b and wnt7b in the mammary gland, and hCGbeta transgenic female mice present with mammary Gland tumors exhibiting characteristics of the Wnt/beta-catenin pathway activation [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(8): 3694 - 3703.
- [18] Saitoh T, Katoh M. Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer; up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 10(3): 345 - 349.
- [19] Hardy KM, Garriock RJ, Yatskievych TA, *et al.* Non-canonical Wnt signaling through Wnt5a/b and a novel Wnt11 gene, Wnt11b, regulates cell migration during avian gastrulation[J]. *Dev Biol*, 2008, 320(2): 391 - 401.
- [20] Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, *et al.* Mutations in VANGL1 associated with neural tube defects[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(14): 1432 - 1437.
- [21] Lei YP, Zhang T, Li H, *et al.* VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(23): 2232 - 2235.
- [22] Seo JH, Zilber Y, Babayeva S, *et al.* Mutations in the planar cell polarity gene, Fuzzy, are associated with neural tube defects in humans [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(22): 4324 - 4333.
- [23] Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, *et al.* Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B(WNT5B) with type 2 diabetes[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(5): 832 - 843.
- [24] Salpea KD, Gable DR, Cooper JA, *et al.* The effect of WNT5B IVS3C>G on the susceptibility to type 2 diabetes in UK Caucasian subjects[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009, 19(2): 140 - 145.
- [25] Kanazawa A, Tsukada S, Kamiyama M, *et al.* WNT5B partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(2): 505 - 510.

(收稿日期: 2011-06-24; 编辑: 段佳)

(上接第 17 页)

- [12] An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, *et al.* Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 17808 - 17814.
- [13] Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, *et al.* Estrogen receptor (ER)- β reduces ER α -regulated gene transcription, supporting a "Ying Yang" relationship between ER α and ER β in mice[J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(2): 203 - 208.
- [14] Wan Y. PPAR γ in bone homeostasis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(12): 722 - 728.
- [15] Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(2): 962 - 967.
- [16] Okazaki R, Inoue D, Shibata M, *et al.* Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(6): 2349 - 2356.
- [17] Waters KM, Rickard DJ, Riggs BL, *et al.* Estrogen regulation of human osteoblast function is determined by the stage of differentiation and the estrogen receptor isoform [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 83(3): 448 - 462.
- [18] Akune T, Ohba S, Kamekura S, *et al.* PPAR insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(6): 846 - 855.
- [19] Penza M, Montani C, Romani A, *et al.* Genistein affects adipose tissue deposition in a dose dependent and gender-specific manner[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(12): 5740 - 5751.
- [20] Bonfiglio D, Gabriele S, Aquila S, *et al.* Estrogen receptor alpha binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in breast cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(17): 6139 - 6147.

(收稿日期: 2011-03-18; 编辑: 段佳)