

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP trong xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) của gene VEGFA

Hà Thị Minh Thi^{1*}, Lê Phan Tường Quỳnh¹, Nguyễn Thị Mai Ngân¹,
Ngô Thị Diệu Hương¹, Nguyễn Đức Duy Nghiêm¹
(1) Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Gene VEGFA mã hoá cho VEGF-A, là yếu tố quan trọng nhất trong sự hình thành mạch máu. Đa hình rs3025039 (+936C>T) của gene VEGFA có liên quan với nhiều bệnh lý. Đề tài nhằm mục tiêu: (1) Ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) của gene VEGFA; (2) Bước đầu khảo sát sự phân bố các kiểu gene và tần suất allele của đa hình rs3025039 ở nhóm người tình nguyện. **Đối tượng và phương pháp:** Tách chiết DNA từ mẫu máu ngoại vi của 60 tình nguyện viên. Xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) của gene VEGFA bằng kỹ thuật PCR-RFLP. Kiểm chứng ngẫu nhiên một số mẫu cho mỗi kiểu gene bằng giải trình tự Sanger. **Kết quả:** Tất cả các mẫu được kiểm chứng đều cho kết quả tương đồng. Sự phân bố các kiểu gene của đa hình rs3025039 gene VEGFA là CC, CT và TT lần lượt chiếm tỷ lệ 80%, 16,7% và 3,3%. Tần suất các allele C và T lần lượt là 88,3% và 11,7%. **Kết luận:** Áp dụng thành công kỹ thuật PCR-RFLP để xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) gene VEGFA, tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về mối liên quan giữa đa hình này và các bệnh lý khác nhau trên lâm sàng.

Từ khoá: VEGFA, rs3025039, PCR-RFLP.

Application of PCR-RFLP technique for determining the VEGFA rs3025039 (+936C>T) polymorphism

Ha Thi Minh Thi^{1*}, Le Phan Tuong Quynh¹, Nguyen Thi Mai Ngan¹,
Ngo Thi Dieu Huong¹, Nguyen Duc Duy Nghiem¹
(1) University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Background: The VEGFA gene encodes vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), which plays a key role in vasculogenesis and angiogenesis. The VEGFA rs3025039 (+936C>T) polymorphism is associated with many diseases. This study aimed to: (1) Apply PCR-RFLP technique to identify the VEGFA rs3025039 (+936C>T) polymorphism; (2) Primarily evaluate the distribution of genotypes and allele frequencies of the rs3025039 polymorphism in volunteers. **Materials and methods:** DNA extraction was isolated from peripheral blood of 60 volunteers. Determining the VEGFA rs3025039 (+936C>T) polymorphism by PCR-RFLP technique. Confirming the results of the genotypes randomly by Sanger sequencing. **Results:** All PCR-RFLP results of validated samples were in concordance with sequencing results. The distribution of CC, CT and TT genotypes by rs3025039 polymorphism accounted for 80%, 16.7% and 3.3%, respectively. The frequencies of C and T alleles were 88.3% and 11.7%, respectively. **Conclusion:** Successfully applying PCR-RFLP technique to determine the VEGFA rs3025039 (+936C>T) polymorphism, which establishes the groundwork for further research into the association between this polymorphism and various disorders.

Keywords: VEGFA, rs3025039, PCR-RFLP.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A) là thành viên đầu tiên của họ protein bao gồm các yếu tố tăng trưởng khác như VEGF-B, VEGF-C và yếu tố tăng trưởng bánh nhau (placental growth factor: PlGF) [1]. Yếu tố VEGF-A được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1983 [2], sau đó gene mã hoá nó là VEGFA được

tạo dòng vào năm 1989 [3]. Gene VEGFA nằm trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 6 (6p21.1) và bao gồm 8 exon. VEGF-A là yếu tố điều hoà quan trọng nhất trong sự hình thành mạch máu. Vì vậy, VEGF-A cần thiết cho các quá trình hình thành mạch máu và sinh mạch máu của phôi, nó cũng được xem là yếu tố trung gian quan trọng của sự tân tạo mạch máu trong ung thư và các bệnh lý khác [4]. Sự biểu hiện

mạnh của VEGF-A được quan sát thấy trong nhiều mô khác nhau, như hệ sinh sản nữ, mô thiếu máu cục bộ, khối u và các dòng tế bào chuyển dạng. Có sự biến thiên khá lớn về nồng độ VEGF-A huyết tương và sự biểu hiện gene *VEGFA* giữa người này và người khác. Năm 2000, lần đầu tiên Renner và cộng sự phát hiện một đa hình mới thuộc vùng 3' không dịch mã của gene *VEGFA* có liên quan đến mức độ biểu hiện của gene [5]. Đó là đa hình đơn nucleotide, với sự thay thế C thành T ở nucleotide thứ 936, nên được gọi là đa hình +936C>T, hay đa hình rs3025039 theo danh pháp mới.

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy đa hình rs3025039 có mối liên quan với nhiều bệnh lý khác nhau như tiền sản giật [6], sẩy thai liên tiếp [7], bệnh mạch vành [8], tâm thần phân liệt [9], bệnh thần kinh ngoại biên ở bệnh nhân đái tháo đường type 2 [10], và nhiều bệnh lý ung thư khác nhau [11]... Vì vậy, việc xây dựng một quy trình kỹ thuật sinh học phân tử đơn giản và chính xác để xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) của gene *VEGFA* là cần thiết, nhằm tạo tiền đề cho việc khảo sát các mối liên quan của đa hình này với nhiều bệnh lý khác nhau. Ngoài ra, tần suất các allele cũng như sự phân bố kiểu gene của các đa hình thường thay đổi tùy theo các chủng tộc. Trong khi đó, ở Việt Nam chưa có dữ liệu nào về đa hình rs3025039. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm các mục tiêu như sau:

1. Ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) của gene *VEGFA*.

2. Bước đầu khảo sát sự phân bố các kiểu gene và tần suất allele của đa hình rs3025039 ở nhóm người tình nguyện.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 60 người tình nguyện, bao gồm 30 nam và 30 nữ trưởng thành, sức khỏe bình thường. Thời gian thực hiện từ tháng 4 đến tháng 10 năm 2021, tại Bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế. Đề tài nghiên cứu được thông qua Hội đồng Y đức, mã số H2021/229.

Mỗi người được lấy 2 ml máu tĩnh mạch ngoại biên, trong ống chống đông bằng EDTA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

+ Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA từ mẫu máu ngoại vi bằng kit Wizard genomic DNA purification kit (Promega

Corp., Madison, WI) theo protocol chuẩn.

- Nồng độ DNA được đo bằng máy quang phổ kế NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Wilmington, USA), sau đó pha loãng ở nồng độ 100 ng/μl trong đệm TE rồi giữ ở nhiệt độ -20 °C. Độ tinh sạch của DNA tách chiết được đánh giá bằng tỷ số A260/A280, chỉ những mẫu có tỷ số này trong khoảng 1,8 - 2,0 được sử dụng cho nghiên cứu.

+ Xác định đa hình bằng kỹ thuật PCR-RFLP

Bước 1: Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại đoạn gene *VEGFA* chứa đa hình rs3025039

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng cặp mồi được thiết kế bởi Amin-Beidokhti nhưng có tối ưu hoá các điều kiện phản ứng [12].

- Trình tự cặp mồi được thiết kế bởi Amin-Beidokhti [12]:

Mồi xuôi 5'- CCTCAGATGTGACAAGCCGA -3'

Mồi ngược 5'- TTCCGGGCTCGGTGATTAG -3'

- Thành phần phản ứng: 12,5 μl GoTaq Green Master Mix 2X (Promega), 10 pmol mỗi mồi xuôi và mồi ngược, 100 ng DNA khuôn mẫu và nước cất vô trùng đã khử nuclease cho đủ 25 μl.

- Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Agilent SureCycler 8800 (Agilent Technologies, Malaysia), với điều kiện nhiệt độ:

+ Biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút

+ Sau đó thực hiện 35 chu kỳ mỗi chu kỳ gồm:

. Biến tính ở 95°C trong 30 giây

. Gắn mồi: 52°C, trong 30 giây

. Kéo dài ở 72°C trong 1 phút

+ Cuối cùng, kéo dài ở 72°C trong 8 phút nữa.

- Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%, có bổ sung thuốc nhuộm DNA RedView. Kích thước sản phẩm dự kiến là 328 bp.

Bước 2: Thực hiện cắt sản phẩm PCR bằng enzyme cắt hạn chế

- Sử dụng enzyme *FastDigest Hin1II* (*NlaIII*) (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania).

Trình tự nhận biết: 5'- CATG↓-3'
3'-↑GTAC -5'

- Thành phần phản ứng cắt: 8 μl sản phẩm PCR, 1 μl enzyme cắt hạn chế *Hin1II* (*NlaIII*) (10 U/μl), 1,5 μl đệm Green (10X), 4,5 μl nước cất vô trùng đã khử nuclease.

- Ủ nhiệt độ 37°C, thời gian 45 phút trong bể ổn nhiệt.

- Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 2,5% có bổ sung thuốc nhuộm DNA RedView, hiệu điện thế 80 V, thời gian 80 phút.

- Kiểu gene tương ứng vị trí đột biến được xác định như sau:

Bảng 1. Xác định kiểu gene của đa hình rs3025039 bằng kỹ thuật PCR-RFLP

Kiểu gene	Sản phẩm phản ứng cắt	
	Số băng	Kích thước (bp)
CC	1	328
CT	3	63, 265, 328
TT	2	63, 265

+ Kiểm chứng kết quả kiểu gene bằng giải trình tự Sanger

Lấy ngẫu nhiên mỗi kiểu gene 3 mẫu để kiểm chứng kết quả bằng Sanger, các bước thực hiện như sau:

- Thực hiện PCR khuếch đại đoạn gene chứa đa hình rs3025039 (+936C>T) bằng cặp mồi và điều kiện phản ứng như mô tả ở bước 1 ở trên.

- Gửi sản phẩm PCR và mồi đến phòng thí nghiệm chuyên giải trình tự Sanger, 1st BASE (Malaysia).

- Nhận kết quả dưới dạng file .seq và .ab1

- Sử dụng phần mềm tin sinh học BioEdit để đọc các đỉnh tín hiệu của trình tự.

- Sử dụng công cụ BLAST để đối chiếu với trình tự gene tham chiếu của cơ sở dữ liệu GenBank.

- So sánh kết quả xác định kiểu gene của hai phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự Sanger.

+ Xác định kiểu gene của nhóm người tình nguyện

Xác định kiểu gene cho 60 người tình nguyện bằng phương pháp PCR-RFLP.

2.3. Phương pháp xử lý thống kê

- Xác định sự phân bố các kiểu gene ở 60 người tình nguyện theo tỷ lệ phần trăm.

- Kiểm định cân bằng Hardy-Weinberg bằng công cụ online:

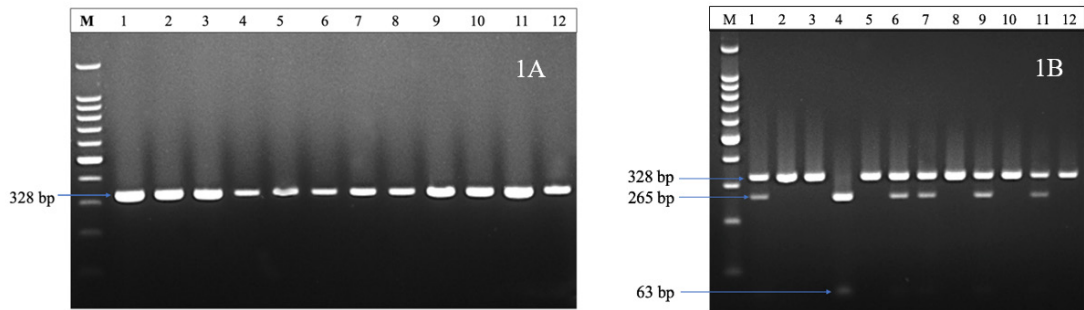
<https://www.had2know.org/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>

- So sánh sự phân bố kiểu gene tại vị trí đa hình rs3025039 với các nghiên cứu khác.

- Sử dụng phần mềm thống kê y học MedCalc.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP xác định đa hình rs3025039

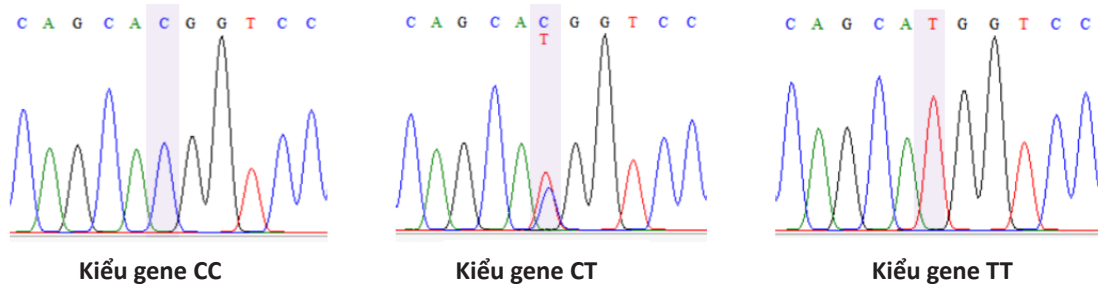


Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm của quy trình PCR-RFLP xác định đa hình rs3025039

1A. Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gene *VEGFA* chứa đa hình rs3025039

1B. Sản phẩm phản ứng cắt bằng enzyme *Hin1II*

Nhận xét: Sản phẩm PCR được thể hiện qua các băng điện di đậm, rõ nét, tương ứng kích thước 328 bp. Không xuất hiện băng của sản phẩm không đặc hiệu và sản phẩm bắt cặp giữa hai mồi (primer dimer). Băng sản phẩm cắt 328 bp và 265 bp rõ ràng, đủ tín hiệu để xác định các kiểu gene tương ứng. Các băng 63 bp có kích thước nhỏ nên thường chỉ thấy ở kiểu gene đồng hợp tử TT do số lượng nhiều, còn ở kiểu gene CT thường không thấy rõ.



Hình 2. Hình ảnh tín hiệu giải trình tự tương ứng các kiểu gene tại vị trí đa hình rs3025039

Nhận xét: Các đỉnh tín hiệu giải trình tự rõ ràng, tại vị trí đa hình rs3025039 kiểu gene đồng hợp tử CC cho thấy một đỉnh tương ứng nucleotide C, kiểu gene đồng hợp tử TT cho thấy một đỉnh tương ứng nucleotide T, trong khi đó kiểu gene dị hợp tử cho thấy hai đỉnh tương ứng nucleotide C và T.

3.2. Đặc điểm của nhóm nghiên cứu

Bảng 2. Đặc điểm tuổi, giới và nhóm nghiên cứu

Đặc điểm chung	Số lượng	Tỷ lệ %
Giới		
Nam	30	50
Nữ	30	50
Tuổi		
< 40 tuổi	42	70
≥ 40 tuổi	18	30
Tổng	60	100

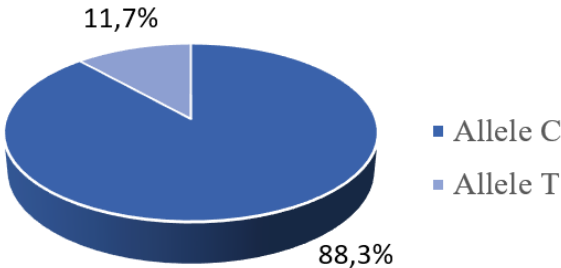
Nhận xét: Nhóm nghiên cứu có tỷ lệ nam nữ tương đương nhau, 70% dưới 40 tuổi.

3.3. Phân bố các kiểu gene và cân bằng Hardy-Weinberg

Bảng 3. Phân bố kiểu gene theo đa hình rs3025039 (+936C>T) và cân bằng Hardy-Weinberg

Kiểu gene	Tần số quan sát (%)	Tần số kỳ vọng theo cân bằng Hardy-Weinberg	p
CC	48 (80)	46,8	0,138
CT	10 (16,7)	12,4	
TT	2 (3,3)	0,8	
Tổng	60 (100)	60	

Nhận xét: Kiểu gene CC chiếm đa số (80%). Kiểu gene TT rất ít, chỉ 3,3%. Sự phân bố các kiểu gene đạt cân bằng Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).



Hình 3. Biểu đồ tỷ lệ các allele C và T của đa hình rs3025039

Nhận xét: Allele C chiếm đa số với tỷ lệ 88,3%, trong khi đó allele T là allele hiếm với tỷ lệ chỉ 11,7%.

4. BÀN LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam thực hiện xác định kiểu gene tại đa hình rs3025039 của gene *VEGFA*. Chúng tôi thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP là kỹ thuật sinh học phân tử đơn giản, có thể triển khai ở các phòng xét nghiệm có thiết bị sinh học phân tử cơ bản, đồng thời kỹ thuật này có độ chính xác cao nếu chuẩn hoá tốt. Kỹ thuật PCR-RFLP chỉ áp dụng để xác định kiểu gene đối với các biến thể (đột biến hoặc đa hình) có liên quan đến trình tự nhận biết của một enzyme cắt hạn chế (restriction endonuclease) nào đó. Cụ thể, tại vị trí đa hình rs3025039, có trình tự 5'-CACG-3', trong đó nucleotide C thứ hai (in đậm, gạch chân) tương ứng vị trí +936 trên gene *VEGFA* có thể bị thay thế thành T. Những allele T này sẽ mang trình tự 5'-CATG-3' có tính lặp lại đảo ngược và là trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế type II, *Hin1II* (*NlaIII*). Vì vậy, enzyme *Hin1II* đã được sử dụng để cắt sản phẩm khuếch đại đoạn gene chứa đa hình rs3025039 nhằm xác định kiểu gene. Sản phẩm PCR của kiểu gene đồng hợp tử CC không bị cắt, kiểu gene đồng hợp tử TT bị cắt hoàn toàn, trong khi đó kiểu gene dị hợp tử CT sẽ có sản phẩm của allele C không bị cắt và sản phẩm của allele T bị cắt. Vì vậy, kiểu gene sẽ dễ dàng được xác định dựa vào số băng và kích thước sản phẩm cắt như mô tả ở Bảng 1. Trên thực tế, do băng 63 bp kích thước nhỏ nên thường xuất hiện không rõ ràng, nên nếu thấy xuất hiện băng 265 bp là chứng tỏ đã có sản phẩm bị cắt (đoạn DNA kích thước 328 bp bị cắt thành hai sản phẩm 265 bp và 63 bp).

Chúng tôi đã áp dụng quy trình PCR-RFLP được công bố bởi Amin-Beidokhti [12]. Kết quả điện di ở Hình 1A cho thấy băng sản phẩm PCR đậm, rõ nét, không có sản phẩm không đặc hiệu, không có hình ảnh của sự bắt cặp giữa hai mồi (primer dimer). Vì vậy, sản phẩm PCR đủ điều kiện để thực hiện bước tiếp theo là cắt bằng enzyme cắt hạn chế. Hình 1B cho thấy các sản phẩm phản ứng cắt xuất hiện rõ, các kích thước phù hợp với kích thước dự kiến của từng kiểu gene. Trong đó, kiểu gene CC không có allele nào bị cắt nên sản phẩm vẫn còn nguyên kích thước 328 bp, kiểu gene TT có cả allele bị cắt nên chỉ tạo ra những sản phẩm 265 bp và 63 bp. Trong khi đó, kiểu gene dị hợp tử CT có một allele bị cắt và một allele không bị cắt nên vừa có sản phẩm nguyên vẹn 328 bp, và các sản phẩm bị cắt là 265 bp và 63 bp. Trên thực tế, do băng 63 bp kích thước nhỏ lại chỉ được tạo ra từ một allele trong kiểu gene dị hợp tử CT nên thường có số lượng ít và khá khó thấy trên gel điện di. Tuy nhiên, việc xuất hiện băng 265 bp là chứng tỏ đã có sản phẩm bị cắt (đoạn DNA kích thước 328 bp

bị cắt thành hai sản phẩm 265 bp và 63 bp).

Chúng tôi đã giải trình tự Sanger một số mẫu của cả ba kiểu gene, kết quả hoàn toàn tương ứng với PCR-RFLP. Như vậy, chúng tôi đã áp dụng thành công quy trình PCR-RFLP để xác định đa hình rs3025039 với kết quả chính xác.

Trong nhóm 60 người tình nguyện trưởng thành bao gồm 30 nam và 30 nữ, tỷ lệ của các kiểu gene CC, CT và TT lần lượt là 80%; 16,7% và 3,3%. Phân tích cân bằng Hardy-Weinberg cho thấy $p = 0,138$, chứng tỏ sự phân bố các kiểu gene ổn định trong quần thể. Khi khảo sát tần suất allele, biểu đồ ở Hình 3 cho thấy allele C chiếm đa số (88,3%), trong khi đó allele T chỉ chiếm 11,7%. Theo cơ sở dữ liệu về đa hình đơn nucleotide (dbSNP), tần suất allele T tính chung cho tất cả các chủng tộc là khoảng 14,1%, cụ thể ở châu Âu là 13,9%; châu Á là 15,9%; châu Mỹ là 13,3 - 26,0% [13]. Kết quả về tần suất allele C và T trong khảo sát của chúng tôi không có sự khác biệt so với các công bố trên thế giới. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy allele T của đa hình rs3025039 liên quan với nồng độ VEGF-A trong huyết thanh thấp [5,14,15]. Vị trí đa hình rs3025039 tương ứng với nucleotide 936 của gene, nằm trong vùng 3' không dịch mã (3'-UTR). Đây là vị trí gần của yếu tố phiên mã AP-4, sự thay thế của nucleotide C bởi nucleotide T tại vị trí đa hình đã huỷ bỏ sự gắn kết này [5]. Ngoài ra, allele T còn có thể làm giảm thời gian bán huỷ của *VEGFA* mRNA do gây cản trở các protein bị cảm ứng bởi tình trạng thiếu oxy đến gắn vào vùng 3' không dịch mã [16]. Ngoài ra, sự mất cân bằng liên kết (linkage disequilibrium) giữa đa hình rs3025039 và những đa hình khác của gene *VEGFA* cũng được cho là có ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gene này [5]. Chẳng hạn sự mất cân bằng liên kết có ý nghĩa thống kê của đa hình rs3025039 với đa hình rs3025040 được ghi nhận ở người Trung Quốc [16], với đa hình rs3025020 được ghi nhận ở người Bahraini [14]. Ở Việt Nam chưa có các dữ liệu về mất cân bằng liên kết này. Dựa trên vai trò của đa hình rs3025039, allele T đã được tiên đoán sẽ gây nên các hậu quả lâm sàng. Thực tế, những người mang kiểu gene TT hoặc CT được ghi nhận có nhiều nguy cơ mắc các bệnh lý khác nhau như tiền sản giật [6], sẩy thai liên tiếp [7], bệnh mạch vành [8], tâm thần phân liệt [9], bệnh thần kinh ngoại biên ở bệnh nhân đái tháo đường type 2 [10], và nhiều bệnh lý ung thư khác nhau [11].

Như vậy, chúng tôi đã áp dụng thành công kỹ thuật PCR-RFLP để xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) gene *VEGFA* ở nhóm người tình nguyện trưởng thành và khoẻ mạnh. Hy vọng đây là cơ sở

để triển khai những nghiên cứu tiếp theo về mối liên quan giữa đa hình này và các bệnh lý khác nhau trên lâm sàng. Từ đó, có cơ sở xây dựng kế hoạch dự phòng và theo dõi các bệnh lý liên quan.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu áp dụng quy trình xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) gene *VEGFA* trên 60 người tình nguyện trưởng thành và khỏe mạnh, chúng tôi có một số kết luận như sau:

5.1. Quy trình PCR-RFLP xác định đa hình rs3025039 (+936C>T) gene *VEGFA* đã được áp dụng thành công tại Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế, đây là cơ sở để triển khai những nghiên cứu tiếp theo về mối liên quan giữa đa hình này và các bệnh lý khác nhau trên lâm sàng.

5.2. Bước đầu xác định được sự phân bố các kiểu gene của đa hình rs3025039 là CC, CT và TT lần lượt chiếm tỷ lệ 80%, 16,7% và 3,3%. Tần suất các allele C và T lần lượt là 88,3% và 11,7%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 2005;6:209.
2. Senger Donald R., Galli Stephen J., Dvorak Ann M., Perruzzi Carole A., Harvey V. Susan, Susan, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* (1979). 1983;219:983–5.
3. Leung David W., Cachianes George, Kuang Wun-Jing, Goeddel David V., Ferrara Napoleone. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* (1979). 1989;246:1306–9.
4. Ferrara Napoleone, Gerber Hans-Peter, LeCouter Jennifer. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* [Internet]. 2003;9:669–76.
5. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels. *J Vasc Res.* 2000;37(6):443–8.
6. Wang X, Sun T, Chen G, Gao H. Association between Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Pre-Eclampsia Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Immunol Invest.* 2020 Feb 17;49(1–2):120–33.
7. Sun Y, Chen M, Mao B, Cheng X, Zhang X, Xu C. Association between vascular endothelial growth factor polymorphism and recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2017;211:169–76.
8. Ma WQ, Wang Y, Han XQ, Zhu Y, Liu NF. Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: A meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2018 Jul 4;19(1).
9. Saoud H, Aflouk Y, Afia A Ben, Gaha L, Jrad BBH. Association of VEGF and KDR polymorphisms with the development of schizophrenia. *medRxiv* [Internet]. 2021 Jan 1;2021.08.06.21261566.
10. Arredondo-García VK, Cepeda-Nieto AC, Batallar-Gómez T, Salinas-Santander M, Zugasti-Cruz A, Ramírez-Calvillo L, et al. Association of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphism +936 C/T with Diabetic Neuropathy in Mexican Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res.* 2019 May 1;50(4):181–6.
11. Ballester S, Pineda B, Rodrigues P, Tormo E, Terol MJ, Eroles P. Clinical relevance of +936 c>t vegfa and c.233c>t bfgf polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia. *Genes (Basel).* 2020 Jun 1;11(6):1–13.
12. Amin-Beidokhti M, Gholami M, Abedin-Do A, Pirjani R, Sadeghi H, Karamoddin F, et al. An intron variant in the FLT1 gene increases the risk of preeclampsia in Iranian women. *Clin Exp Hypertens.* 2019 Nov 17;41(8):697–701.
13. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. rs3025039. dbSNP Short Genetic Variations. 2023 [cited 2023 Sep 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3025039>
14. Al-Habboubi HH, Sater MS, Almawi AW, Al-Khateeb GM, Almawi WY. Contribution of VEGF polymorphisms to variation in VEGF serum levels in a healthy population. *Eur Cytokine Netw.* 2011 Sep;22(3):154–8.
15. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer.* 2003 Sep 10;106(4):468–71.
16. Zhao J, Bai Y, Jin L, Weng Y, Wang Y, Wu H, et al. A functional variant in the 3'-UTR of VEGF predicts the 90-day outcome of ischemic stroke in Chinese patients. *Xue Y, editor. PLoS One.* 2017 Feb 24;12(2):e0172709.