

文章编号:1005-6947(2006)09-0668-04

· 基础研究 ·

湖北汉族人群先天性巨结肠症内皮素受体 B 基因多态性与突变的研究

牛彦锋¹, 王国斌¹, 卢晓明¹, 汤绍涛², 杜寒松¹, 杨鹏¹, 陶凯雄¹, 魏明发³

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 1. 胃肠外科 2. 小儿外科, 湖北 武汉 430022; 3. 附属同济医院 小儿外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究中国湖北汉族人群内皮素受体-B(EDNRB)基因的多态性与散发性先天性巨结肠症发病的关系。方法 收集104例散发性先天性巨结肠症患者(病例组)及其中42例(子代组)的双亲(双亲组)血样,120例正常儿童作对照(对照组)。PCR-SSCP与DNA测序确定并比较EDNRB基因外显子4的突变与多态性位点(SNPs)等位基因与基因型分布差异,分析sHD表型与SNPs的关联,传递不平衡检验(TDT)分析3样本家系SNPs的传递不平衡。结果 EDNRB基因外显子4,检测到c831 G→A(L277L)多态性位点,未发现突变;病例组c831 G→A位点的等位基因A频率(68%:53%)和纯合子AA基因型频率(49%:30%)均明显高于对照组($P < 0.01$);病例组等位基因A频率明显高于双亲组(68%:54%, $P < 0.01$);短段型(SSA)患者等位基因A频率明显高于长段型(LSA)患者(76%:63%, $P < 0.05$);TDT检验未发现亲代间在c831 G→A(L277L)位点存在传递不平衡。结论 中国湖北汉族人群EDNRB多态性与散发性先天性巨结肠症发病关系密切,尤其与短段型表型关系密切。

关键词: Hirschsprung病/人种学; Hirschsprung病/遗传学; 受体,内皮素; 突变; 多态性

中图分类号: R574.62; R394

文献标识码: A

Polymorphisms and mutations of EDNRB gene in Hubei provincial patients of Han ethnicity with Hirschsprung disease

NIU Yan-feng¹, WANG Guo-bin¹, LU Xiao-ming¹, TANG Shao-tao², DU Han-song¹, YANG Peng¹, TAO Kai-xiong¹, WEI Ming-fa³

(1. Department of Gastrointestinal Surgery 2. Department of Pediatric Surgery, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 3. Department of Pediatric Surgery, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To analyze the relationship between polymorphisms of EDNRB gene and Hubei provincial patients of Han ethnicity with sporadic Hirschsprung disease (sHD). **Methods** Peripheral blood samples from 104 patients with sHD and 84 parents of 42 patients, and 120 normal children (as controls) were collected. PCR-SSCP and direct DNA sequencing were used to detect mutations and polymorphisms of exon-4 in EDNRB gene. The differences of allele frequencies and genotype distribution in polymorphic sites were further analyzed between the three groups. Allele frequencies of SNPs in forty-two sHD trios were analyzed by transmission disequilibrium test (TDT), and the association between phenotype of HD and SNPs was analyzed. **Results** No mutant site was detected and one polymorphic site of c831 G→A(L277L) was observed in Hubei provincial patients of Han ethnicity with sHD. The allele frequency of A(68% vs 53%) and genotype frequency

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371397);湖北省自然科学基金资助项目(2003ABA151)。

收稿日期:2006-05-11; **修订日期:**2006-06-26。

作者简介:牛彦锋,男,山西运城人,华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师,主要从事消化道疾病的基础方面的研究。

通讯作者:王国斌 E-mail:nyfeng752003@yahoo.com.cn。

of AA (49% vs 30%) were significantly higher in sHD group than that in control group ($P < 0.01$); the allele frequency of A in sHD group was significantly higher than that in parental group (68% vs 54%, $P < 0.01$); The allele frequency of A in SSA group was significantly higher than that in LSA group (76% vs 63%, $P < 0.05$). No transmission disequilibrium was detected in polymorphic site of c831 G→A (L277L) between parental generation and filial generation. **Conclusions** The polymorphisms of EDNRB gene may play an important role in the pathogenesis of sporadic Hirschsprung disease, especially for patient with short-segment aganglionosis.

Key words: Hirschsprung Disease/ethnic; Hirschsprung Disease/genet; Receptors, Endothelin; Mutations; Polymorphism

CLC number: R574.62; R394

Document code: A

先天性巨结肠症(hirschsprung disease, HD)是肠道末端神经节细胞完全缺如的常见的先天性消化道畸形,系胚胎期神经嵴细胞迁移障碍所致。目前多认为遗传背景的差异与HD的发病关系更密切。其中散发性巨结肠(sporadic HD, sHD)占绝大多数。受体酪氨酸激酶家族的RET原癌基因和G蛋白耦联受体家族的内皮素受体-B(endothelin receptor B, EDNRB)基因参与的信号通路对胚胎期肠神经系统的发育非常关键^[1-2]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)作为第3代遗传标记,更适于HD多基因病的研究^[3]。本研究检测EDNRB基因外显子4的多态性与突变,为sHD病因探讨、罹患风险评估提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床病例分组

1.1.1 病例组 连续收集2002年1月—2005年9月武汉市协和医院、同济医院、儿童医院手术病理证实的sHD 104例,男:女=3.7:1.0(82/22),中位年龄14(2~192)个月。短段型(含国内分类中常见型、短段型及超短段型)56例,长段型38例,全结肠型10例。排除有HD家族史或合并其他综合征与肛肠畸形的患儿。

1.1.2 双亲组 同时收集104例sHD患儿中的42例(子代组,短段型27例,长段型15例)父、母亲的血样标本,双亲均无HD病史。

1.1.3 对照组 以同期体检正常儿童120例作对照(性别、年龄1:1或1:2匹配)。

以上3组均为湖北地区汉族人群。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取与聚合酶链反应(PCR) 抽取外周静脉血2.5 mL, EDTA-Na₂抗凝,改良盐析法提取DNA后溶于TE缓冲液中,紫外光核酸检测仪检测DNA浓度与纯度, -20℃保存。用Primer 5.0软件设计引物(由上海生物工程公司合成)。EDNRB-4F链的引物为5'-AGATAATCATTCCCTGATGA -3'; R

链的引物为5'-AAATTCAACCACGAGTTATC -3'。扩增片段298 bp。50 μL PCR反应体系含DNA模板2 μL(50~200 ng), MgCl₂终浓度2.0 mmol/L, 上、下游引物终浓度0.14 μmol/L, dNTP终浓度200 μmol/L, Pfu DNA聚合酶1 μL(2 U/μL)等。PCR循环条件为95℃预变性5 min。进入循环:95℃变性30 s, 52℃退火40 s, 72℃延伸30 s; 35个循环后,再72℃延伸10 min。PCR产物以2%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 单链构象多态性(SSCP)分析及产物测序

制备6%(49:1)非变性聚丙烯酰胺凝胶,含5%甘油,2 μL PCR产物与10 μL SSCP缓冲液混合后95℃变性10 min;冰浴骤冷后取10 μL上样,4℃凝胶电泳,150 V电泳12 h后银染观察。对有异常条带的PCR产物纯化后经ABI Prism 310测序仪测序。重复SSCP筛检,提高灵敏性。对测序结果存在重叠峰而难准确判断的样本,将目的片段纯化后与T载体克隆后测序,即获得完整准确序列。

1.2.3 多态性/突变位点的判断标准及BLAST软件比对 参照国际SNPs标准:病例组与对照组均存在碱基改变,且等位基因的最低频率>1%,则定为SNPs位点,否则为突变位点。BLAST软件与GeneBank收录的EDNRB基因cDNA序列(GI:4557546)比对后确定碱基改变。

1.3 统计学处理

采用SPSS11.5软件包对计数资料行 χ^2 检验及Fisher精确概率法, Logistic回归分析计算比值比(OR)与95%可信区间(CI)。 $P < 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 PCR产物的电泳结果

PCR产物均显示单一亮带,且与正常对照的扩增片段位置一致,均处于Marker所示的适当位置(图1)。表明所得PCR产物确为EDNRB基因第4外显子片段,且扩增片段上无大片段的插入与缺失。

2.2 SSCP 银染结果

对3组的PCR产物进行SSCP银染。结果发现,病例组、双亲组与对照组均有3个单链条带,并构成3种带型。提示存在多态性位点。重复试验得相同结果(图2)。

2.3 DNA 测序与 BLAST 比对结果

在病例组、双亲组及对照组中任选全部代表带型的样本测序,经BLAST比对后发现1个多态性位点,未见突变位点;SNPs位点为c831 G > A (L277L), G → A 的碱基转换,属同义多态性位点(图3A~C)。

2.4 SNPs 等位基因与基因型频率分布

M:标准分子质量DNA;1:正常对照;2:长段型患儿;3:全结肠型患儿;4:空白对照;5:短段型患儿;6:该短段型患儿的父亲

图1 EDNRB 基因 exon-4 的 PCR 产物电泳结果

所有样本符合 Hardy-Weinberg 平衡,反映样本有群体代表性。由附表可见,病例组 c831 G → A 位点的等位基因 A 和纯合子 AA 基因型频率均明显高于对照组 ($\chi^2 = 8.501, P = 0.004$; $\chi^2 = 10.947, P = 0.001$);病例组等位基因 A 频率亦明显高于双亲组 ($\chi^2 = 7.843, P = 0.005$);短段型组等位基因 A 频率不仅比病例组高,也明显高于长段型组 ($\chi^2 = 3.548, P = 0.042$),而长段型组与病例组之间等位基因频率分布相近 ($P > 0.05$)。经传递不平衡(TDT)检验,子代组与双亲组 c831 G → A 位点不存在易感等位基因的优先传递。

可见3种带型,分别为泳道1,4~10,2,3和12,13。11未变性为对照;a,b,c为单链条带,d为未变性完全的双链条带

图2 EDNRB 基因 exon-4 的 SSCP 分析

a:纯合子 AA

b:杂合子 AG

c:纯合子 GG

图3 EDNRB 基因 exon-4 的 c831 G > A (L277L) DNA 测序图

附表 EDNRB 基因 c831 G > A (L277L) 多态位点的基因型及等位基因分布

分组	基因型 (n)			等位基因频率 (%)	
	AA	AG	GG	A	G
病例 (n = 104)	51	40	13 ¹⁾	68	32 ^{1),2)}
对照 (n = 120)	36	55	29	53	47
子代 (n = 42)	-	-	-	63	37
双亲 (n = 42)	-	-	-	54	46
短段型 (n = 56)	-	-	-	76	24 ³⁾
长段型 (n = 38)	-	-	-	63	37

注:1)与对照组比, $P < 0.01$;2)与双亲组比, $P < 0.01$;3)与长段型组比, $P < 0.05$

3 讨论

由于 HD 是一种多基因遗传病,其遗传背景在发病中的作用更倍受关注。HD 与 RET, EDNRB, GDNF, EDN, SOX-10 和 NTN 等多种基因有关。研究最多的是 RET 基因,但其突变与多态性仅能解释 50% 的家族性 HD 与 15% ~ 20% 的 sHD。Hosoda 等^[4]通过体外杂交证实,EDNRB 基因缺失使实验鼠产生巨结肠,引起的结肠损害为短段肠壁内无神经节,比 RET 基因缺失导致的全消化道无神经节细胞及肾脏损害的模型更接近临床上的 HD;

并且 sHD 以短段型最多见。因此,研究 EDNRB 基因是探讨 HD 发病的另一重要方向。

EDNRB 基因位于 13q22, 含 7 个外显子和 6 个内含子, 编码与 G 蛋白耦联的跨膜受体蛋白, 所介导的信号通路对肠神经脊细胞的移行发育起重要作用。sHD 患者 EDNRB 基因突变率达 2.1% ~ 10.7%, 以短段型的突变率为更高^[5]。突变受体的作用可出现在多个环节:(1) 有的不改变配、受体间的亲和力, 却使结合后钙内流的增加降低或对腺苷酸环化酶活性的抑制作用降低, 引起细胞内信号传导受损;(2) 有些突变受体的分布发生改变, 如近细胞核而在细胞膜上缺乏, 与配体的结合几率降低;(3) 有些突变的受体与野生型具有相同的亲和力和功能特性;(4) 有些突变后与内皮素-1 缺乏亲和性, 减弱诱导钙内流与激活 AP-1 通路的作用;(5) 有些突变存在 Galphai 信号通路缺陷, 影响肠管神经元细胞的分化等^[6-7]。EDNRB 突变后的功能改变复杂, 机制尚待深入研究。

查阅国外文献, 不同种族、国家遗传背景可能相异, 表现为 EDNRB 基因突变或多态性相似又存差异。该基因已发现的突变或多态性位点有 19 种以上, 外显子 4 为最多, 亦无明显突变热点。但 831G/A 存在于亚、非种族中均见报道^[8-11], 而欧美种族中尚未见报道。本研究也证实 sHD 患者 c831 G > A (L277L) 多态位点的存在, 并且 A 等位基因频率 (68%) 明显高于 G (32%), 提示 A 为易感等位基因。进一步发现病例组 AA 基因型频率明显比正常人群高 (49.0% : 30.0%)。关联分析表明 AA 基因型罹患风险比非 AA 基因型增加 2.2 倍 (OR = 2.2, 95% CI 1.3 ~ 3.9, P < 0.01); 而正常人群 A/G 的分布相近。此结果与多数文献一致^[9-11]。国内研究多认为 831G → A 属于突变且突变率很低^[12], 仅周妙妮等^[8]认为是多态位点, 但 A 等位基因频率极低。本研究与之的差异较大。考虑可能与选择的实验条件不同从而影响敏感性有关。本研究结果与台湾、香港地区的 831G/A 结果更为接近^[10-11], 不同的是患者基因型 AA (49.0%) 和等位基因 A (68%) 的分布与正常人群差异显著 (P < 0.05)。本研究还发现短段型组等位基因 A 频率显著高于长段型组。提示 c831 G > A 位点与临床表型关系密切, 并且 EDNRB 基因与短段型

sHD 发病更密切。临床上短段型占 sHD 比例高达 75%。故认为对 c831 G > A 位点在蛋白功能作用的深入研究可能更具价值。

由上可见, SNPs 对分析易感基因与疾病易感性的关联强度, 提供线索为进一步研究基因激活及影响编码蛋白的功能活性方面确有重要价值。因此, 从多态性角度阐明 sHD 病因可能成为新的研究方向。

参考文献:

- [1] Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review [J]. *J Med Genet*, 2001, 38 (11): 729 - 739.
- [2] Lantieri F, Griseri P, Ceccherini I. Molecular mechanisms of RET-induced Hirschsprung pathogenesis [J]. *Ann Med*, 2006, 38 (1): 11 - 19.
- [3] Couzin J. Genomics. Consensus emerges on HapMap strategy [J]. *Science*, 2004, 304 (5671): 671 - 673.
- [4] Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice [J]. *Cell*, 1994, 79 (7): 1267 - 1276.
- [5] 段降龙, 张宪生, 李国豪. 先天性巨结肠症内皮素 B 受体基因分析 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (4): 261 - 263.
- [6] Tanaka H, Moroi K, Iwai J, et al. Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung disease and their characterization [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (18): 11378 - 11383.
- [7] Fuchs S, Amiel J, Claudel S, et al. Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung disease: evidence for selective loss of Gi coupling [J]. *Mol Med*, 2001, 7 (2): 115 - 124.
- [8] 周妙妮, 李继承, 丁世萍. 中国人散发性先天性巨结肠症内皮素受体 B 基因的研究 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2005, 26 (7): 350 - 353.
- [9] Zaahl MG, du Plessis L, Warnich L, et al. Significance of novel endothelin-B gene polymorphisms in Hirschsprung disease: predominance of a novel variant in patients with co-existing Down's syndrome [J]. *Mol Cell Probes*, 2003, 17 (1): 49 - 54.
- [10] Garcia-Barcelo M, Sham MH, Lee WS, et al. Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease [J]. *Clin Chem*, 2004, 50 (1): 93 - 100.
- [11] Wu TT, Tsai TW, Chu CT, et al. Low RET mutation frequency and polymorphism analysis of the RET and EDNRB genes in patients with Hirschsprung disease in Taiwan [J]. *J Hum Genet*, 2005, 50 (4): 168 - 174.
- [12] 魏明发, 王果, 朱珉, 等. 先天性巨结肠症 RET 和 EDNRB 基因的突变 [J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12 (3): 635 - 638.