

文章编号:1005-6947(2004)04-0261-03

· 实验研究 ·

先天性巨结肠症内皮素 B 受体基因分析

段降龙¹, 张宪生², 李国威¹

(西安交通大学第二医院 1. 普外科 2. 小儿外科, 陕西 西安 710004)

摘要:目的 检测中国散发先天性巨结肠症(HD)是否有 EDNRB 基因突变,以探讨 EDNRB 与 HD 发生的关系。方法 提取 34 例中国散发性 HD 患儿手术切除的组织标本基因组 DNA,聚合酶链反应(PCR)扩增 EDNRB 基因第 3,4,6 外显子,单链构象多态(SSCP)分析上述外显子是否有突变。结果 13 例短段型 HD 中,2 例有 EDNRB 基因突变;常见型及长段型未见 EDNRB 基因突变。结论 中国散发短段型 HD 有 EDNRB 基因突变,提示 EDNRB 基因与先天性巨结肠症的发生有关。

关键词: Hirschsprung 病/病理学; 内皮素 B 受体

中图分类号: R574.62; Q592.1 **文献标识码:** A

Analysis of EDNRB gene in Hirschsprung's disease

DUAN Xiang-long¹, ZHANG Xian-sheng², LI Guo-wei¹

(1. Department of General Surgery 2. Department of Pediatric Surgery, The Second Hospital, Xian Jiaotong University, Xian 710004, China)

Abstract: Objective To investigate the mutation of endothelin-B receptor (EDNRB) gene in sporadic Hirschsprung's disease in Chinese population, to study the relationship between EDNRB gene and the pathogenesis of HD. **Methods** Genomic DNA was extracted from HD bowel tissues removed by surgery in 34 sporadic HD patients. Exon 3, 4, 6 of EDNRB gene of EDN-3 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and analyzed by single strand conformation polymorphism (SSCP). **Results** EDNRB mutations were detected in 2 of the 13 short-segment HDs, one's mutant was in the exon 3, the another was in the exon 6. No mutations were detected in the ordinary or long-segment HD. **Conclusions** The mutations of EDNRB gene were detected in the short-segment HD of sporadic HD in Chinese population. The results suggest that the EDNRB gene plays an important role in the pathogenesis of HD.

Key words: HIRSCHSPRUNG DISEASE/pathol; ENDOTHELIN-B RECEPTOR

CLC number: R574.62; Q592.1 **Document code:** A

先天性巨结肠症(Hirschsprung's disease, HD)是小儿一种常见的消化道发育畸形。导致神经节细胞发育停顿的病因至今仍不完全明了,目前认为是多因素的共同影响,如病毒、毒素、药物、生物活性因子及基因遗传因子等。各种因素可以作用于神经节细胞发育的不同阶段。近年来发现内皮素-B受体(endothelin-B receptor, EDNRB)对肠神经系统发育起重要作用。EDNRB之间的信号传递若遭受到破坏将造成无神经节细胞肠管的形成。本

研究利用聚合酶链反应-单链构象多态(PCR-SSCP)技术分析34例中国散发HD EDNRB基因第3,4,6外显子,了解是否有EDNRB基因突变及突变位点。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1999~2000年经我科手术治疗并病理证实的HD 34例。男26例,女8例。年龄28d至5岁。按Romeo分型标准,长段型(痉挛段超过结肠脾曲)4例,常见型(痉挛段位于结肠脾曲至乙状结肠之间)17例,短段型(痉挛段位于直肠)13例。

收稿日期:2003-02-07; 修订日期:2003-10-20。

作者简介:段降龙(1970-),男,陕西西安人,西安交通大学第二医院主治医师,博士研究生,主要从事肠道疾病方面的研究。

全部病例均为散发性,近系亲属无 HD 患者,无其他伴发畸形。

1.2 标本来源

在上述 34 例 HD 患儿巨结肠根治术中,无菌条件下从切除的直肠和结肠上留取狭窄段及扩张段肠组织各 1 cm × 1 cm 大小,用生理盐水冲洗干净后液氮速冻置于无菌的 Eppendorf 管中, - 80℃ 保存。同时取 12 例小儿正常直肠、乙状结肠组织作对照。

1.3 基因组 DNA 的提取

PBS 冲洗组织标本,然后用眼科剪剪碎标本;加蛋白酶 K 消化液,混匀,55℃ 过夜;分别加入等体积 Tris 平衡酚、酚/氯仿混合液、氯仿/异戊醇混合液,充分混匀,离心,取上层水相;加入无水乙醇,充分混匀,置 - 20℃ 存放 4 h;离心,收集沉淀;乙醇洗涤,离心弃上清后,37℃ 温箱干燥 DNA 沉淀,加入 TE 缓冲液待用。

1.4 PCR 扩增 EDNRB 基因

1.4.1 引物序列 EDNRB 基因第 3,4,6 外显子引物序列依据文献获得,具体序列见表 1。所有引物均由 BioAsia 公司合成。

表 1 EDNRB 基因引物序列

基因	外显子	引物序列	长度
EDNRB	3	顺向 ATCTTCAGATATCGAGCTGTT	223 bp
		反向 TGAAATTTACCTGCATGAAAG	
	4	顺向 ATCCCTATAGTTTTACAAGACAGC	170 bp
		反向 ATTTTCTTACCTGCTTTAGGTG	
	6	顺向 ACAGAAGCTACAATGACTAC	240 bp
		反向 GAAAGCTTATATTTGAGCC	

1.4.2 PCR 扩增提取物 DNA 取 0.5 ml Eppendorf 离心管,用微量加样器分别加入 PCR 混合液(10 × 缓冲液 3 μl,2.5 mmol/L MgCl₂ 3 μl,2.5 mmol/L dNTPs 3 μl,引物 11 μl,引物 21 μl,模板 DNA 2 μl,三重蒸馏水 17 μl),Taq DNA 聚合酶 1U 及无菌石蜡油 30 μl,然后上机循环。反应条件为 94℃ 35 s,55℃ 50 s,72℃ 1 min,共 35 个循环,最后在 72℃ 延伸 10 min。基因扩增仪用 AMPLITRON II PCR 扩增仪(美国 Barnstead 公司产品)

1.4.3 PCR 扩增产物的 SSCP(单链构象多态)分析 6% 聚丙烯酰胺凝胶 10 ml 灌胶,凝胶聚合后取出梳子,加 1 × TEB 电泳缓冲液;取 PCR 扩增产

物与载样缓冲液混匀后加入样品孔内,接上电极,电压调至 120 V,时间 3 h;取下凝胶,染色 10 ~ 20 min,紫外透射反射分析仪上观察电泳带及其位置。

2 结果

PCR-SSCP 分析系根据单链 DNA 扩增产物在中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳迁移率的变化来检测基因变异,当 PCR 扩增产物中含有单碱基置换等变异时,单链带型即有所改变,发生泳动移位(mobility shift)。经 2 次重复实验,34 例 HD 患儿及正常对照组 12 例,EDNRB 基因第 3,4,6 外显子的 PCR-SSCP 均获成功,可提供有效的判定信号。在 34 例 HD 患儿的 17 例短段型 HD 中,2 例有 EDNRB 基因突变;其中 1 例 EDNRB 基因突变位点在第 3 外显子(图 1),另 1 例 EDNRB 基因突变位点在第 6 外显子(图 2)。常见型及长段型未见 EDNRB 基因和 EDNRB 3 基因突变。

1,3,5,6 为外显子无突变产物:其中 1 为长段型 HD 肠组织,3 为正常肠组织,5 为短段型 HD 扩张段肠组织,6 为常见型 HD 肠组织;7 为 PGEM-3 zf/Hae III Marker;8 为阳性对照;2 为阴性对照;4 为突变产物

图 1 EDNRB 基因外显子 3 PCR-SSCP 结果

1 为 PGEM-3 zf/Hae III Marker;2 为阳性对照;5 为阴性对照;6 为突变产物。3,4,7,8 为无任何外显子突变产物:其中,3 为长段型 HD 肠组织,4 为正常肠组织,7 为短段型 HD 扩张段肠组织,8 为常见型 HD 肠组织

图 2 EDNRB 基因外显子 6 PCR-SSCP 结果

3 讨论

EDNRB 基因位于 13q22, 约 24kb, 含 7 个外显子和 6 个内含子。其编码产物为具有 442 个氨基酸的蛋白质, 传递来自其配体信号, 它介导的信息通路对肠神经节细胞的正常发育有重要作用。而且表达 EDNRB 的内皮细胞参与内皮素激活一氧化氮合酶的过程, 而此酶已发现与 HD 有密切关系。EDNRB 在脑、肾、肺、心脏的血管内皮细胞中存在, 最近发现其也存在在结肠内, 尤其是在肌间神经丛、黏膜下层及黏膜下的血管组织内。Hosoda^[1] 通过体外杂交试验证实 EDNRB 基因缺失可以产生巨结肠。这种基因缺失不同于 RET 基因缺失, 后者有全部消化管无神经节细胞及肾脏损害。EDNRB 剔除试验制成的鼠, 其他部位的大体结构正常, 结肠内也是局部短段结肠内无神经节细胞, 而不是全部结肠, 故认为 EDNRB 缺失更加接近于临床上的 HD。自 EDNRB 基因的错义突变在 Mennonite 家族被发现后^[2], 更多的 EDNRB 基因改变在家族性和散发性 HD 病例中被发现。目前至少发现 18 种不同的 EDNRB 基因突变或改变^[3~5]。在所有的 EDNRB 突变患者中, 除过 II 型 Shah-Waardenburg 综合征 (WS2, 临床特征为感觉神经性听力丧失, 色素病) 合并 HD, Mennonite 家族性 HD 及 13q 缺失外, 其余的 EDNRB 突变中有 3 例为家族性 HD 和 9 例散发性 HD。综合分析所有 HD 患者 EDNRB 突变的报道可以看出: 家族性 HD 的 EDNRB 突变率低于散发性 HD 的突变率; 与 HD 患者的酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosin kinase, RET) 基因突变相比, 尽管 EDNRB 和 RET 的突变率都很低, EDNRB 突变的 HD 患者多为短段型 HD, RET 突变的 HD 患者多为长段型 HD^[6]。上述有关 EDNRB 基因突变的研究对象均是欧美人。本实验研究发现 2 例短段型中国散发 HD 亦有 EDNRB 基因突变。EDNRB 基因突变位点在第 3, 6 外显子。这种基因突变可引起一连串的碱基错配, 导致氨基酸序列的改变, 进而引起基因表达蛋白失去生物作用, 影响肠道神经节细胞的存活和发育。本实验未发现常见型和长段型 HD 存在 EDNRB 基因突变。

综合统计自 1994 至今 HD 主要易患基因的突变报道^[7~10] (表 2), HD 患儿主要易患基因的突变率低, 不能解释其他大部分病例。提示 HD 是一种

多基因影响的先天性疾病; 不是所有 HD 病例都能用单一基因突变的发生来解释。

除了 EDNRB 基因, 还有许多种其他基因和生物分子可以影响肠神经节细胞的存活和发育。HD 的发生可能是多种基因和生物分子共同作用的结果。

表 2 HD 主要易患基因的突变情况统计

突变基因	突变病例数	被检测病例总数	突变率 (%)
RET	67	322	20.8
EDNRB	11	334	3.3
EDN-3	8	324	2.5
合计	86	980	8.8

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, *et al.* A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease[J]. *Cell*, 1994, 79(7): 1257-1266.
- [3] Syrris P, Carter ND, Patton MA. Novel nonsense mutation of the endothelin-B receptor gene in a family with Waardenburg-Hirschsprung disease[J]. *Am J Med Genet*, 1999, 87(1): 69-71.
- [4] Tanaka H, Moroi K, Iwai J, *et al.* Novel mutations of the endothelin-B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(18): 11378-11383.
- [5] Svensson PJ, Anvret M, Molander ML, *et al.* Phenotypic variation in a family with mutations in two Hirschsprung-related genes (RET and endothelin-B receptor)[J]. *Hum Genet*, 1998, 103(2): 145-148.
- [6] Sancandi M, Ceccherini I, Costa M. Incidence of RET mutations in patients with Hirschsprung's disease[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(1): 139-143.
- [7] Gath R, Goessling A, Keller K M, *et al.* Analysis of the RET, GDNF, EDN3, and EDNRB genes in patients with intestinal neuronal dysplasia and Hirschsprung disease[J]. *Gut*, 2001, 48(5): 671-675.
- [8] Pasini B, Rossi R, Ambrosio MR, *et al.* RET mutation profile and variable clinical manifestations in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease[J]. *Surgery*, 2002, 131(4): 373-381.
- [9] Zaahl MG, du Plessis L, Warnich L, *et al.* Significance of novel endothelin-B receptor gene polymorphisms in Hirschsprung's disease: predominance of a novel variant (561C/T) in patients with co-existing Down's syndrome[J]. *Mol Cell Probes*, 2003, 17(1): 49-54.
- [10] Pingault V, Bondurand N, Lemort N, *et al.* A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of EDN3/EDNRB gene mutations on neurocristopathy phenotypes? [J]. *J Med Genet*, 2001, 38(3): 205-209.