

一个中国 Gilbert 综合征家系的遗传学分析

余利红¹, 高静², 王春丽¹, 王静³, 高艳¹,
袁巧玲², 孙志贤¹, 王航雁³, 张成岗¹

(1. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; 2. 解放军 94 医院, 南昌 330002; 3. 解放军总医院小儿内科, 北京 100853)

摘要: 对一个中国汉族 Gilbert 综合征遗传家系致病基因突变位点进行鉴定, 以期了解该病的分子遗传学基础。首先提取先证者基因组 DNA, PCR 扩增尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 *UGT1A1* 基因的 5 个外显子, 以琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物, 纯化后直接测序鉴定。基因扫描显示, 与血清胆红素水平密切相关的 *UGT1A1* 基因在第 1 和第 5 外显子存在纯合突变, 而 *UGT1A1* 基因启动子区域和内含子/外显子剪接边界位点序列未检测到突变。进一步对其他家系成员该基因的相应位点进行突变检测, 结果显示他们在第 1 和第 5 外显子也存在杂合突变, 其中还有两个成员在启动子区域检测到 (TA) 插入突变。对家系成员未抗凝新鲜血液进行生化检测证实了基因突变分析的结果。综合以上结果发现该家系 3 种突变并存, 致病因素为第 1 和/或第 5 外显子突变, 为显性遗传, 两种突变位点纯合导致先证者出现严重胆红素代谢功能障碍。该家系因此成为 Gilbert 综合征突变位点及其致病机理研究的一个典型临床病例。

关键词: Gilbert 综合征; 基因突变; *UGT1A1*

中图分类号: R596

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)01-0011-06

Genetic Analysis of the *UGT1A1* Gene Mutation Sites in a Chinese Family Suffered from Gilbert's Syndrome

YU Li-Hong¹, GAO Jing², WANG Chun-Li¹, WANG Jing³, GAO Yan¹,
YUAN Qiao-Ling², SUN Zhi-Xian¹, WANG Hang-Yan³, ZHANG Cheng-Gang¹

(1. Department of Neurobiology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;

2. The 94th Hospital, The People's Liberation Army of China, Nanchang 330002, China;

3. Department of Pediatrics, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: To learn the variation in the gene for *UGT1A1* enzyme, the genetic mechanism in a Chinese Han nationality family suffered from Gilbert's syndrome was studied. At first, genomic DNA from peripheral blood of the sufferer in this family was used for amplifying all of the five exons of the *UGT1A1* gene by PCR, and then direct sequencing of the PCR product was applied to analyze gene mutation. The results showed that there existed a G→A homozygous transition at nucleotide 211 leading the substitution of arginine for glycine at position 71 of corresponding protein product (G71R) and a T→G homozygous transition at nucleotide 1456 leading the substitution of aspartic acid for tyrosine at position 486 of corresponding protein product (Y486D). No mutation was detected in promoter region and the splicing junction sites. The relevant mutation sites of the other family members were sequenced and identified to be heterozygous in the two above-mentioned mutation sites and in the TA repeat mutation in the promoter region. Furthermore, fresh blood samples were collected from all of the members to detect the serum bilirubin levels to determine the suffer-

收稿日期: 2004-12-22; 修回日期: 2005-01-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 30200154)、北京市科技计划重大项目 (编号: H020220020) 资助 [Supported by National Nature Science Foundation of China (No. 30200154) and Key Program of Science & Technology of Beijing City (No. H020220020)]

作者简介: 余利红 (1975—), 女, 河南焦作人, 博士研究生, 研究方向: 生物化学。E-mail: yyulihong@hotmail.com; Tel: 010-66930210

通讯作者: 张成岗 (1970—), 男, 陕西白水人, 副研究员, 研究方向: 神经生物学, 生物信息学。E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn; Tel: 010-66931590

er. The result was consistent with the mutation analysis. It could thus be inferred that this family was caused by mutation in the open reading frame of the gene *UGT1A1*.

Key words: bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase; gene mutation; Gilbert's syndrome

Gilbert 综合征 (Gilbert syndrome, GS) 又称先天性非溶血性黄疸, 1901 年由 Gilbert 首先报道^[1]。该综合征男性多见, 发现黄疸的年龄一般在 10 岁左右, 并有家族性, 为常染色体遗传。一般认为, 其发病机理主要是由于尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase, UGT) 表达水平或活力下降, 导致肝脏内非结合型胆红素向结合型胆红素的转化过程发生障碍, 从而引起以血清非结合型胆红素水平升高为主的临床综合征。此病在国内外均有报道, 发病率为 3% ~ 7%^[2]。

UGT 功能多种多样, 但主要与各种物质的代谢有关, 人体内仅有 1 种 UGT 即 *UGT1A1* 与胆红素的代谢有关。目前, 已发现 30 多个 *UGT1A1* 基因突变位点, 分别位于启动子区域和 5 个外显子中^[3~5]。Gilbert 综合征中 *UGT1A1* 基因异常包括两种类型: (1) TATA 框 TA 插入型, 为常染色体隐性遗传, 在 *UGT1A1* 的启动子 TATA 框中一般有 TA 插入, 使正常 A (TA)₆TAA 突变为 A (TA)₇TAA^[3,6]。(2) 单碱基突变, 为常染色体显性遗传, 东方人中多为此类型, 其中, *UGT1A1* 的 (Gly71Arg) 较为多见, 另外, *UGT1A1* (Pro229Gln)、第 4 外显子 (Arg367Gly)、第 5 外显子 (Tyr486Asp) 的突变等也有报道^[2,7]。

目前, 国内外对此综合征的研究都有报道, 大多数相关研究都涉及分子水平, 深入研究导致产生高胆红素表型的分子机制, 并且通过体外实验研究了这种突变对于酶活性的影响^[8,9], 还有证据表明磷酸化修饰也是 *UGT1A1* 酶活性所必需的^[10], 而国内针对中国人群该突变的分子遗传学研究尚未被充分报道。在对中国人群 Gilbert 综合征跟踪研究的过程中, 我们发现了 1 个 Gilbert 综合征遗传家系。为了解其分子遗传学基础, 本研究采用 PCR 及直接测序的方法, 对与胆红素的代谢相关的 *UGT1A1* 基因进行了详细的突变筛查, 鉴定了 Gilbert 综合征家系中该基因的突变位点, 并通过血液生化指标的检测进一步对突变的表型与基因型的一致性进行了验证。

1 材料和方法

1.1 样本来源

所研究的核心家系共 4 人 (图 1)。先证者, 男, 9 岁, 汉族, 患者缘于出生后 1 周即出现皮肤、巩膜黄染, 至今未退, 黄染 9 年, 1 年前患发热性疾病时黄染加重, 因巩膜黄而到当地医院检查, 发现其血中非结合胆红素高, 诊断为黄疸, 原因待查。患者无烟酒嗜好。既往无肝炎、疟疾及血吸虫病。家中有皮肤黄染类似家族史。根据流行病学调查结果排除其他疾病。调查前每位成员都做到知情同意, 并与所有采血对象签署知情同意书。

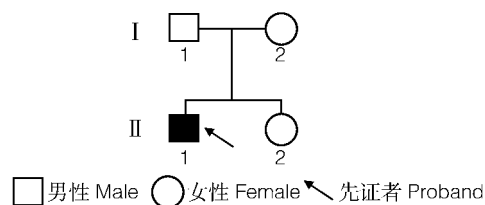


图 1 Gilbert 综合征核心家系图谱

Fig. 1 The pedigree of the Gilbert's syndrome core family

1.2 引物设计及合成

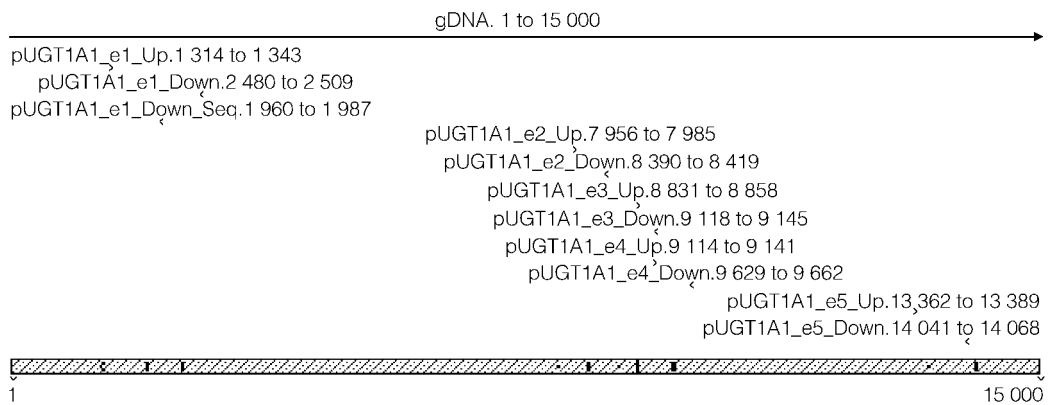
设计对 *UGT1A1* 进行全外显子扫描的引物, 扩增产物包含外显子及内含子/外显子剪接边界位点序列, 用于鉴定该家系 *UGT1A1* 基因突变情况, 所设计的引物见表 1。所设计的引物与模板的匹配方式见图 2, 全部引物均由上海博亚 (BioAsia) 生物技术有限公司合成, 使用浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 基因组 DNA 制备及 PCR 扩增

用 TaKaRa 公司试剂盒提取外周全血基因组 DNA, 操作方法按试剂盒说明书。以基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 50~200 ng 基因组 DNA, 上下游引物各 10 pmol, 0.25 mmol dNTP, LA-Taq 酶 (TaKaRa 公司) 2.5 U, PCR 缓冲液补充双蒸水至 50 μL 。PCR 反应在 TECHNE 热循环仪上完成, 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。

表 1 扩增 *UGT1A1* 基因外显子及内含子/外显子剪接边界位点序列引物Table 1 The sequence of primers for amplifying the exons of the *UGT1A1* gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增对象	片断长度
		Amplified region	Product size(bp)
pUGT1A1_e1_Up	CTGAAAGTGAACTCCCTGCTACCT	promoter + 1	1 195
pUGT1A1_e1_Down	ATCCAGAAGATGATGCCAAAGACA		
pUGT1A1_e2_Up	TTGAAAACCTAGCACATTACCTGG	2	463
pUGT1A1_e2_Down	TGGAAGCTGGAAGTCTGGGATTAG		
pUGT1A1_e3_Up	ACACCCTTGTAATAAACCTCC	3	314
pUGT1A1_e3_Down	CTATACATCCAATCCGCCAAC		
pUGT1A1_e4_Up	GTATGTTGGGCGGATTGGATGT	4	548
pUGT1A1_e4_Down	ATGCCATGACCAAAGTATTCTTCTGTAT		
pUGT1A1_e5_Up	AAGCAGCCATGAGCATAAAGAG	5	706
pUGT1A1_e5_Down	TTGAATCCCGCACTCCCAAACA		

图 2 针对基因 *UGT1A1* 各外显子所设计的引物与模板的匹配方式Fig. 2 Diagram shows the location and direction of primers used for amplifying each exon of the *UGT1A1* gene

1.4 PCR 产物纯化和测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并回收纯化特异性片段并使用引物测序。PCR 扩增产物分别采用扩增用引物进行测序。1 号外显子扩增产物包括基因启动子区域的 TATA 框部分, 为避免 TATA 框部分 TA 插入差异对测序结果产生的影响, 在 1 号外显子的中间部位设计一个下游测序引物 pUGT1A1_e1_Down_Seq, 5'-GCAAGAAGAATA-CAGTGGCAG-3', 位于 1 号外显子 PCR 产物的第 668 位。测序由上海博亚生物技术有限公司进行。所有测序结果采用 BLAST 程序及 Sequencher™ 软件进行综合分析。

1.5 生化检测

生化检测在日本 HITACHI 自动分析仪上进行。所有家系成员空腹取血。未抗凝新鲜血液 2 mL 用于肝功检测, 主要指标包括谷丙转氨酶 ALP(U/L)、谷草转氨酶 AST(U/L)、总胆红素 T. BIL($\mu\text{mol/L}$)和

直接胆红素 D. BIL($\mu\text{mol/L}$)4 项, 对应以上各项采用正常波动范围分别为 0~40 U/L、0~37 U/L、3.42~20.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 0~6.8 $\mu\text{mol/L}$ 。间接胆红素(D. BIL)为总胆红素与直接胆红素之差, 正常波动范围为 1.7~13.1 $\mu\text{mol/L}$ 。参考生化检测结果超出正常波动范围的样品初步确定为患者。

2 结果

2.1 先证者启动子区域及全外显子扫描结果

利用 5 对引物扩增均得到预期大小的特异性扩增产物。1 号外显子扩增产物包括启动子区序列, 扩增产物较长, 分别用上、下游引物从两端测序, 其余 5 个外显子扩增产物较短, 只游上游引物测序。将测序结果与基因库中的序列通过 BLAST 软件进行序列比对分析, 结果表明, *UGT1A1* 的 1 号外显子(exon 1, 简记为 e1)第 211 位的鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A), 5 号外显子(exon 5, 简记为 e5)第 1456

位的胸腺嘧啶(T)突变为鸟嘌呤(G),且二者均为纯合突变,这两个突变导致编码产物中第71位甘氨酸变为精氨酸(Gly71Arg),第486位的酪氨酸变为天冬氨酸(Tyr486Asp)。在其余区域未检测到序列差异。启动子区TATA框为正常纯合基因型A(TA)₆TAA。对各内含子/外显子剪接边界位点序列

分析发现(表2),内含子/外显子剪接边界位点序列都遵循GT/AG法则,未见突变。以上结果排除了非编码区突变,并明确了编码区的两个突变。因此,推断先证者的病因为UGT1A1编码区突变,即此家系的致病突变很可能定位于e1或/和e5。

表2 UGT1A1基因的内含子/外显子剪接边界位点序列

Table 2 The splicing structure of UGT1A1 gene

外显子 Exon	外显子大小 Size of exon	3'剪接位点 3' splice site	5'剪接位点 5' splice site
1	864	5'UTR	ACTATCCCAggtgtgtattg
2	132	ctggctctagGAATTTGAAG	CCCTCAGACAgtaagaagat
3	88	ccctccagGTCCTGTGGC	GATCTGCTTGtatgttggg
4	220	tgcactcagGTCACCCGAT	ATGACAAAAGgtaagaaaga
5	298	ttgtgttagTTACAAGGAG	3'UTR

注:大写为外显子,小写为内含子。

Note: Upper case letters indicate exon, lower case letters for intron.

2.2 其他成员第1和第5外显子突变检测结果

通过对先证者(I-2)的外显子扫描,排除了启动子和第2、3和4外显子突变,在内含子/外显子剪接边界位点序列也未突变。因此,将致病原因初步确定为第1和/或第5外显子的突变,为了明确该家系突变的具体情况,进一步对此核心家系的其他成

员(I-1、I-2和II-2)的第1和第5外显子测序,发现在I-1和II-2的扩增产物启动子区有TA插入突变,导致后续的序列错乱,出现双峰,无法判断在第211位的碱基变化,进一步用反向测序引物pUGT1A1_e1_Down_Seq对所有成员做反向测序。5号外显子测序结果见图3。分析表明,家系其他成

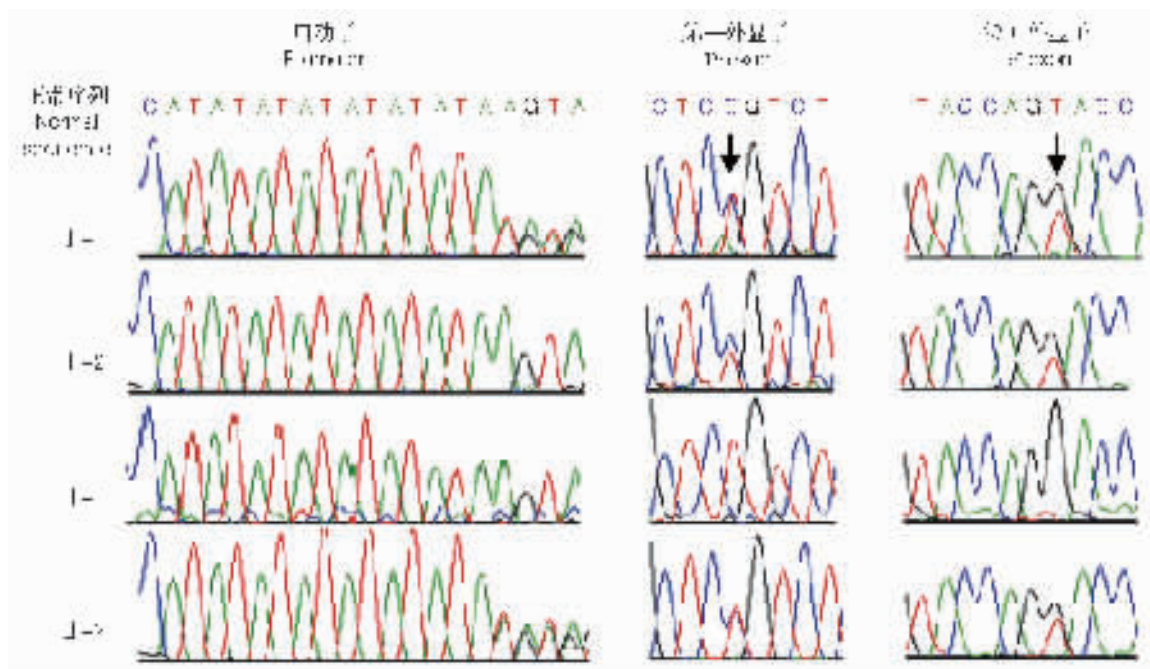


图3 各家系成员UGT1A1突变部位测序结果

Fig.3 The sequences of UGT1A1 gene mutation sites in the family

员中均存在 *UGT1A1* 的 e1 第 211 位的 G→A 突变 (因用反向引物测序, 峰图中显示为 C→T), e5 第 1456 位的 T→G 突变, 但与先证者不同的是两个突变为杂合突变, 且有两个成员在启动子区域均存在 TA 插入的杂合突变。

2.3 生化检测结果

为了进一步分析基因型与表型之间的一致性,

我们对家系成员的血液样品做了生化检测。检测结果见表 3。间接胆红素与直接胆红素之和就是总胆红素。所有家系成员的间接胆红素值均高于正常波动范围, 基因型为杂合突变的样品, 间接胆红素水平超出正常范围的最大值, 而先证者的间接胆红素水平显著高于家系其他患者 (约 5~7 倍), 推测与 e1 和 e5 纯合突变密切相关。

表 3 Gilbert 综合征家系成员血液样品生化检测结果

Table 3 The biochemistry results of a Gilbert's syndrome family members' blood samples

编号 Number	ALP (0~40 U/L)	AST (0~37 U/L)	T. BIL (3.42~20.5 μmol/L)	D. BIL (0~6.8 μmol/L)	I. BIL (1.7~13.1 μmol/L)	检查结果 Result
I-1	21	25	23	9	14	*
I-2	21	25	23	9	14	*
II-1	14	26	118	20.8	97.2	**
II-2	11	26	25	7.4	17.6	*

*: 超出正常波动范围的样品, 初步确定为患者; ** : 严重超出正常波动范围的样品, 先证者。

* : Indicates the sufferers with higher levels of T. BIL, D. BIL and I. BIL; ** : Indicates the proband with extremely higher levels of T. BIL, D. BIL and I. BIL extremely higher than the normal level.

3 讨论

Gilbert 综合征是一个多因素导致的遗传性疾病。目前, 已发现与胆红素代谢相关的基因 *UGT1A1* 有 30 多个 *UGT1A1* 突变位点, 在启动子和 5 个外显子区域有分布。与本文所报道的中国汉族家系有关的突变位点均已有所报道, 例如 Koiwai 等^[8] 1995 年报道了 e1 的 Gly71Arg 突变, 而启动子区的 TA 插入突变和 e5 的 Tyr486Asp 突变也已报道^[6]。而该中国汉族家系中 3 种突变共存的现象在国内外尚属首次报道, 提示了 Gilbert 综合征遗传突变的复杂性。

在对该 GS 家系的研究过程中, 我们首先对先证者进行全面的基因突变筛查, 通过测序分析, 排除了启动子区域突变, 全部内含子/外显子剪接边界位点序列遵守 GT/AG 法则, 也未检测到相关疾病突变^[11, 12], 而在编码区内第 1 和第 5 外显子中发现两个纯合突变。因此, 初步判定这两个突变是导致先证者出现 GS 症状的原因。进一步对家系其他成员相应突变位点进行基因型分析, 在他们相应位点的基因型均为杂合突变, 同时在两个成员中检测到启动子区域有 TA 插入突变。血清中非结合胆红素水平检测结果证实了发生突变的成员其血清胆红素水

平均高于正常值, 支持了基因型分析结论, 先证者血清中非结合胆红素水平大大高于正常值, 这可能与突变的纯合密切相关, 而存在杂合突变的成员中血清非结合胆红素水平也高于正常变动范围的最大值, 属于轻微的 GS 症状。而启动子的插入突变属于常染色体隐性突变, 在这个家系可能并非致病因素。综上所述, 表型分析与基因型分析的结果是一致的, 本家系中同时存在 *UGT1A1* 启动子、第 1 和第 5 外显子突变, 但致病因素为第 1 或/和第 5 外显子突变, 为显性遗传。提示这种突变与 GS 之间的关系, 可用于临床诊断及干预。

就临床角度而言, 本病系先天性良性疾病, 预后良好, 通常无需特殊治疗, 虽有黄疸, 对健康无影响。但该病患者成年后应避免与同样患有该病的异性婚配。因 Gilbert 综合征基因纯合子的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶数量仅为正常的 5%, 表现为 Crigler-Najjar 综合征 II 型^[13], 临床症状较重, 预后相对较差。本家系中先证者即为这种情况。由先证者所表现的更为严重的黄疸进一步明确了此突变位点与疾病发生有关, 且推断其加重了对尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶活性的损伤, 预后并不乐观, 故本研究进一步扩展了对 Gilbert 综合征发病机制与临床表现的认识。以往该病的诊断多依据临床表现, 缺乏

客观指标。通过遗传筛查寻找出致病基因位点,针对临床中不明原因的黄疸病人进行基因筛查诊断,对该病的明确诊断,与其他黄疸性疾病的鉴别,疾病的治疗与预后的判断都将有重要意义。

参考文献(References):

- [1] Gilbert A, Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Semaine Medicale*, 1901, 21: 241~243.
- [2] Clarke D J, Moghrabi N, Monaghan G, Cassidy A, Boxer M, Hume R, Burchell B. Genetic defects of the *UDP glucuronosyltransferase-1 (UGT1)* gene that cause familial nonhaemolytic unconjugated hyperbilirubinaemias. *Clin Chim Acta*, 1997, 266 (1): 63~74.
- [3] Bosma P J, Chowdhury J R, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra B A, Lindhout D, Tytgat G N, Jansen P L, Oude Elferink R P, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med*, 1995, 333(18): 1171~1175.
- [4] Sampoetro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's syndromes. *Haematologica*, 1999, 84(2): 150~157.
- [5] Raijmakers M T, Jansen P L, Steegers E A, Peters W H. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the *UGT1A1* gene. *J Hepatol*, 2000, 33(3): 348~351.
- [6] Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet*, 1996, 347(9001): 578~581.
- [7] Iyanagi T, Emi Y, Ikushiro S. Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1407(3): 173~184.
- [8] Koiwai O, Nishizawa M, Hasada K, Aono S, Adachi Y, Mamiya N, Sato H. Gilbert's syndrome is caused by a heterozygous missense mutation in the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Hum Mol Genet*, 1995, 4(7): 1183~1186.
- [9] Yamamoto K, Sato H, Fujiyama Y, Doida Y, Bamba T. Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (*UGT1A1*) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1406(3): 267~273.
- [10] Basu N K, Kole L, Owens I S. Evidence for phosphorylation requirement for human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (*UGT1A1*) activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303 (1): 98~104.
- [11] LIU Qi-Ji, GONG Yao-Oin, ZHANG Xi-Yu, GAO Gui-Min, GUO Yi-Shou. Characterization of genomic structure and mutation analysis of *SMARCA1* gene in a Smith-Fineman-Myers syndrome family. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(2): 114~118.
刘奇迹, 龚瑶琴, 张锡宇, 高贵敏, 郭亦寿. *SMARCA1* 基因组结构鉴定及其在 Smith-Fineman-Myers 综合征家系中的突变分析. *遗传学报*, 2004, 31(2): 114~118.
- [12] Gantla S, Bakker C T, Deocharan B, Thummala N R, Zweiner J, Sinaasappel M, Roy Chowdhury J, Bosma P J, Roy Chowdhury N. Splice-site mutations: a novel genetic mechanism of Crigler-Najjar syndrome type 1. *Am J Hum Genet*, 1998, 62 (3): 585~592.
- [13] JIN Han-Zhen, HUANG De-Min, GUAN Xi-Ji. Applied Neonatology. The 2nd edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997. 222.
金汉珍, 黄德珉, 官希吉. 实用新生儿学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 222.

更正

《遗传》杂志 2005 年 27 卷第 6 期, 877~881 页, 题目为《BGC823 和 A549 细胞染色体着丝粒点变异》作者何俊琳, 曹波, 王应雄的文章栏目应为“研究报告”, 特此更正!