

[文章编号] 1000- 4718(2005)01- 0054- 04

我国辽宁地区遗传性粘多糖贮积症 I 型患者 α- L- 艾杜糖醛酸酶基因突变的研究*

孙鲁宁¹, 王海波¹, 董贵章², 张海鹏¹

(中国医科大学¹病理生理学教研室, ²第一临床医院儿科实验室, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的: 探讨我国粘多糖贮积症 I 型患者 α- L- 艾杜糖醛酸酶基因的突变情况。方法: 采用 PCR- SS-CP 和 DNA 测序的方法检测我国辽宁地区 10 个粘多糖贮积症 I 型家系 α- L- 艾杜糖醛酸酶基因的突变类型。结果: ①发现我国辽宁地区粘多糖贮积症 I 型患者 α- L- 艾杜糖醛酸酶基因存在 2 种新的突变类型 R363H 和 880+ g- c。②同时发现 3 种多态性位点 R105Q L118 和 A361T。结论: 我国辽宁地区粘多糖贮积症 I 型患者 α- L- 艾杜糖醛酸酶基因的突变情况不同于其他国家和地区, 但其多态性与 Scott 等报道的欧裔患者情况相似^[1]。

[关键词] 粘多糖累积病 I 型; 艾杜糖醛酸酶; 突变; 多态现象

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

遗传性粘多糖贮积症 I 型 (mucopolysaccharidosis type I, MPS- I) 是一种常染色体隐性遗传病, 主要是因为患者体内缺乏降解硫酸乙酰肝素 (heparitin sulfate, HS) 和硫酸皮肤素 (dermatan sulfate, DS) 的 α- L- 艾杜糖醛酸酶 (α- L- iduronidase, IDUA) 使其在体内大量堆积而引起了一系列的临床症状。根据临床表现不同, 可将 MPS- I 型分为胡尔勒综合征 (hurler syndrome, IH)、沙伊综合征 (scheie syndrome, IS) 和胡尔勒沙伊综合征 (hurler/scheie syndrome, IH/S)。其中 MPS- IH 型的发病率为 1/100 000 至 1/150 000, 居各种 MPS 之首, 被称为标准型 MPS, 我国也以该型居多^[2]。采用荧光底物法或成色底物法检测患者白细胞中 IDUA 的活性, 低于正常人的 5% 便可确诊为 MPS- I 型。

目前对该病尚无有效的治疗方法。1999 年, Lutzko 等^[3]以 IDUA 缺陷犬为模型, 采用子宫内造血干细胞移植的方法来对该病进行治疗, 虽然移植获得成功, 但并没有改变病犬的临床症状。Russell 等^[4]的研究表明: 只有依赖于真正意义上的基因治疗才能彻底治愈该病。而我国有关 MPS- I 型的研究尚停留于酶学诊断水平。作者在以前研究的基础上, 采用 PCR- SSCP 和 DNA 测序的方法检测我国辽宁地区 MPS- I 型患者 α- L- 艾杜糖醛酸酶 (α- L- iduronidase, IDUA) 基因的突变类型, 期望有所发现。

材 料 和 方 法

1 研究对象

MPS- I 家系 10 个, 患者 8 例 (两个家系中患者已死亡), 其中男 5 例, 女 3 例, 年龄 8 个月至 9 岁。患者父母 19 例 (一个家系中缺少患者父亲)。

2 主要试剂

蛋白酶 K, 放射性同位素 [³²P], LA Taq DNA 聚合酶, GC buffer, DL2000 DNA marker 及限制性内切酶 HapII 为 Takara 生物工程有限公司产品, 限制性内切酶 Bfa I (Mae I 的同工酶) 为 Biolabs 有限公司产品。引物由赛百盛生物工程有限公司和生工生物工程有限公司合成。

3 标本采集和基因组 DNA 的制备

取 EDTA 抗凝新鲜血液 500 μL, 加入等体积 TE, 离心 10 000 r/min, 10 min, 弃上清, 加 TE 补至 500 μL, 加入 SDS 25 μL, 蛋白酶 K 10 μL, 37 °C 水浴过夜后, 加入饱和盐和氯仿提取基因组 DNA, 溶于 TE 中, 置 4 °C 保存。使用前 200 倍稀释, Beckman DU- 600 型分光光度计测定 A 值, 波长为 280 nm 及 260 nm, 计算 DNA 的浓度及纯度。

4 PCR 法扩增上述 MPS- I 型家系 IDUA 基因外显子 III、外显子 VI、外显子 VIII

根据 Scott 等^[5]的报道, 扩增 IDUA 基因外显子 III 的引物为: Forward: 5' - AGGTCCTGCCTG-GCTCCTGA - 3'; Reverse: 5' - GGCTGGGAGCA-GAGCCCACA - 3'。PCR 扩增产物长度为 450 bp, 反应总体积为 20 μL, 含 2 × GC buffer 10 μL, dNTP 3.2

[收稿日期] 2003- 06- 13 [修回日期] 2003- 10- 20

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 39570745)

μL, 200 pmol/L 引物各 0.5 μL, LA Taq 酶 0.2 μL, 去离子水 6 μL, 模板 DNA 1 μL。PCR 扩增条件为: 初始变性 95 °C 5 min, 循环温度为 95 °C 30 s, 66 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共计 35 个循环。外显子 VI 的引物为: Forward: 5' - CCGCTCATCCCCAGGGCAGGTGTA - 3'; Reverse: 5' - ACAGCGGCTGAGGGCGCAGAACAC - 3', 其 PCR 扩增产物长度为 301 bp。PCR 反应总体体系同上。PCR 扩增条件为: 初始变性 95 °C 5 min, 循环温度为 95 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环。扩增外显子 VIII 的特异引物: Forward: 5' - TTCCTCCCGA-GACGGGACAGGCCA - 3'; Reverse: 5' - TTCCTCCC-GAGACGGGACAGGCCA - 3'。PCR 扩增产物长度为 350 bp。PCR 反应总体积为 20 μL, 反应体系同上。PCR 扩增条件: 初始变性 95 °C 5 min, 循环温度 95 °C 30s, 67 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共计 35 个循环。总延伸 72 °C 7 min。

PCR 扩增产物的电泳检测: 8% PAGE 垂直电泳, 取 PCR 产物 5 μL, 加入 6 × loading buffer 1 μL, 用微量加样器点于加样孔, 在 1 × TBE 缓冲液中电泳 30 min

(电压 100 V), 0.5 mg/L EB 染色 5 min, 紫外灯下观察。

5 单链构象多态 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)

取上述扩增产物各 5 μL, 加入 1 × loading buffer 25 μL, 混匀, 离心, 97-98 °C 变性 15 min, 冰浴 10 min, 上样 3 μL, 电泳 6.5 h, 压片, 静置于 -70 °C 冰箱中 48 h 后, 洗片观察。

6 DNA 测序

取上述扩增产物 35 μL, IBM PRISM 377 测序仪进行 DNA 序列分析。

结 果

1 1 例患者外显子 VIII 出现一种新突变 R363H, 即外显子 VIII 的第 200 个碱基 G 变为 A, 使编码精氨酸的密码子 CGC 变为编码组氨酸的密码子 CAC (见图 1)。

2 1 例患者内含子 6 发现一种新突变 880+ g-c 使内含子 6 的 5' 端剪接位点 gt 变为 ct (见图 2)。

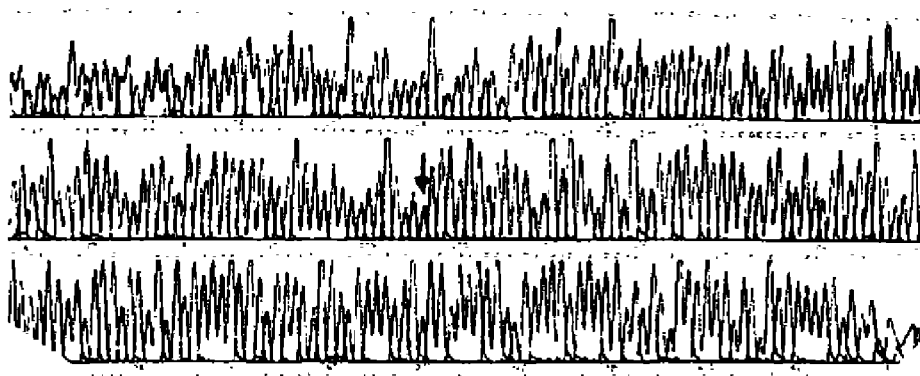


Fig 1 Patient Zheng (girl, 9 years old) DNA sequences of exon VIII in IDUA gene, ↓ indicates mutant site.
图 1 患者郑某(女, 9 岁) IDUA 基因外显子 VIII DNA 序列分析, 箭头所示为突变位点

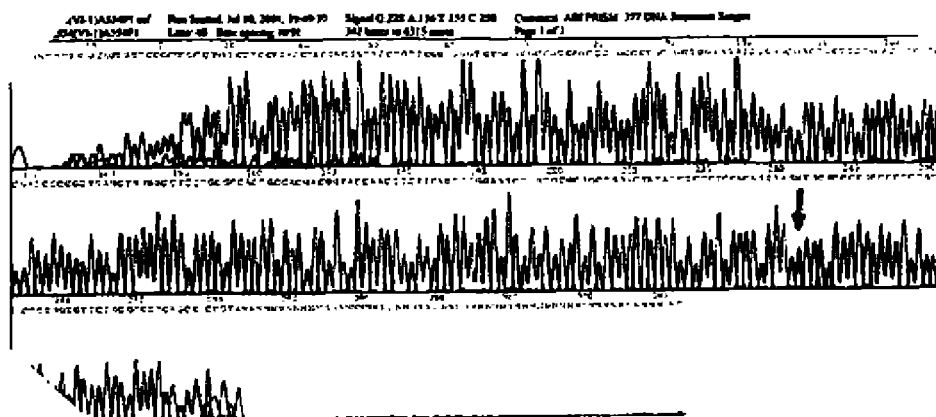


Fig 2 Patient Zhang (girl, 5 years old) DNA sequences of exon VI in IDUA gene, ↓ indicates mutant site.
图 2 患者张某(女, 5 岁) IDUA 基因外显子 VI DNA 序列分析, 箭头所示为突变位点

3 分别在外显子 III、外显子 VIII 发现 IDUA 基因的 3 种多态性位点 R105Q、L118 和 A361T。

讨 论

粘多糖贮积症 I 型是一种常染色体隐性遗传病, 现已明确大部分 MPS- I 是由于 IDUA 基因的突变造成的。自 1992 年 Scott 等首次发现 IDUA 基因存在的一种常见突变 W402X 以来, 至今已发现各种突变达 60 余种。除了这些突变之外, 还在 IDUA 基因中检测到至少 30 种多态性位点和(或)非病理性序列改变, 同其它相似大小的基因相比, 这是一个相当大的数目^[6]。关于多态性位点的作用, 现在还不十分清楚, 但已往的研究发现: 无论采用何种方法, 都不能完全探明所有 MPS- I 中患者 IDUA 基因的突变情况, 即使是正常人, 其白细胞中 IDUA 活性也存在着很大的差异, 所以, Taylor 等^[7]认为 IDUA 基因的不同组合可能正是引起正常个体 IDUA 活性改变的因素之一, 而且某些多态性位点的积累与严重型突变基因的组合可能是引起轻型 MPS- I 的原因。

作者在以往研究的基础上又发现了 2 种新突变: 880+ g- c 和 R363H, 前者是 IDUA 基因内含子 6 的 5' 端剪切位点发生改变, 由 gt 变为 ct, 携有该突变的患者为 880+ g- c 和 1 278- g- a 的双重杂合子, 根据 Terlato 等^[8]的报道, 剪切位点的改变通常会引起严重的临床表现型, 而该患者的临床表现正是 IH 型, 所以推断 880+ g- c 是一种重型突变基因。后者是位于外显子 VIII 的第 200 位碱基 G 变为 A, 从而使得编码精氨酸的密码子 CGC 变为编码组氨酸的密码子 CAC, 发生该突变的患者表现型为中间型, 她所携带的另一个突变基因为 1 278- g- a, 所以推测 R363H 是一种轻型突变基因, 该突变与我国台北报道的突变 T364M 发生位置紧密相邻, 且携带这两种突变基因的患者临床表现均为中间型, 所以推测它们应该属于比较少见的轻型突变基因。

此外, 在我们的研究中还发现了 IDUA 基因的 3 种多态性位点: R105Q、L118 和 A361T。其中 L118 在欧美患者中占 22%, 它是发生于外显子 III 的一种同义突变, 即编码 118 位亮氨酸的密码子由 CTG 变为 TTG, 它并没有改变 IDUA 的氨基酸序列。A361T 在欧美患者中占 20%^[9], 它是一种发生于外显子 VIII 的错义突变, 该突变使编码 361 位丙氨酸的密码子 GCG 变为编码苏氨酸的密码子 ACG。虽然它改变了 IDUA 的氨基酸的序列, 但是却不足以引起临床表

现。R105Q 也是一种比较常见的多态性位点, 有文献报道它可以提高 IDUA 的活性^[10], 但在我们的研究中没有发现它的这一作用。

由于本研究只限于我国辽宁地区 10 个 MPS- I 型家系 IDUA 基因的突变情况, 所以检测结果存在一定的局限性, 今后我们将更多地采集我国其它地区的标本以便更全面、客观地阐明我国 MPS- I 型患者 IDUA 基因的突变情况。

[参 考 文 献]

[1] Scott HS, Bunge S, Gal A, et al. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications[J]. Hum Mutat, 1995, 6(4): 288- 302.

[2] 吴文彦. 遗传代谢病[A]. 见: 杜传书, 刘祖洞 主编. 医学遗传学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 475- 476.

[3] Lutzko C, Omori F, Abramsogget AC, et al. Gene therapy for canine alpha- L- iduronidase deficiency: in utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(9): 1521- 1532.

[4] Russell C, Henderson G, Jevon G, et al. Murine MPS- I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome[J]. Clin Genet, 1998, 53(5): 349- 361.

[5] Scott HS, Nelson PV, Hopwood JJ, et al. PCR of a Kpn I RFLP in the alpha- L- iduronidase gene[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(20): 5796- 5797.

[6] Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, et al. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate- 2- sulphatase gene[J]. Hum Mutat, 1993, 2(6): 435- 442.

[7] Taylor HA, Thomas GH. Pseudodeficiency of alpha- L- iduronidase[J]. J Inher Metab Dis, 1994, 16(6): 1058- 1059.

[8] Terlato NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on patient's genotype? A comprehensive review of the literature[J]. Genet Med, 2003, 5(4): 286- 294.

[9] Scott HS, Nelson PV, Litjens T, et al. Multiple polymorphisms within the alpha- L- iduronidase gene (IDUA): implications for a role in modification of MPS- I disease phenotype[J]. Hum Mol Genet, 1993, 2(9): 1471- 1473.

[10] Lee- Chen GL, Wang CK, Huang SF, et al. Human alpha- L- iduronidase (IDUA) gene correlation of polymorphic DNA haplotype and IDUA activity in chinese population[J]. Proc Natl Sci Counc Repub China B, 1998, 22(1): 31- 38.

The mutation of α -L-iduronidase gene for mucopolysaccharidosis type I in Liaoning district populations

SUN Lu-ning¹, WANG Hai-bo¹, DONG Gui-zhang², ZHANG Hai-peng¹

(¹Department of Pathophysiology, ²The First Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the mutation type and polymorphism site in the α -L-iduronidase (IDUA) gene of Liaoning district MPS-I patients. **METHODS:** The mutation type and polymorphism site in the IDUA gene of Liaoning district mucopolysaccharidosis type I (MPS-I) patients were detected by PCR-SSCP and DNA sequencing. **RESULTS:** ① 2 new mutations: R363H, 880+g-c in the IDUA gene of Liaoning district MPS-I patients were found. ② There were 3 polymorphism sites: R105Q, L118 and A361T in the IDUA gene of Liaoning district MPS-I patients. **CONCLUSIONS:** The mutation type in the IDUA gene of Liaoning district MPS-I patients is different from that of other countries and districts, while the polymorphism site in the IDUA gene of Liaoning district MPS-I patients is the same as that of other countries.

[KEY WORDS] Mucopolysaccharidosis I; Iduronidase; Mutation; Polymorphism

北京大学医学长学制教材病理生理学出版发行

为适应医学教育的蓬勃发展和教育改革的不断深化,北京大学医学部、中国协和医科大学、四川大学华西基础医学和法医学院、西安交通大学医学院、山东大学医学院和武汉大学医学院共同编写了供长学制医学生使用的《病理生理学》。本教材为普通高等教育“十五”国家级规划教材,北京市高等教育精品教材立项项目。本书除保留原有章节外,新增加了目前严重威胁人类健康的高血压病和糖尿病;在教学内容上力求反映现代医学的进展,从整体、器官、细胞和分子水平解释疾病的机制;在章内增加了临床病例,以便学生尽早地将基础理论和临床实践相结合。为提高学生的专业英语水平,书中标题采用中英文对照,给出英文的学习要求、英文病例和英文小结。本书附带光盘,光盘中录入了英文专业词汇、英文小结,以及由复旦大学上海医学院、第二军医大学和北京大学医学部病理生理学教师制作的电子教案。本书既是医学生学习病理生理学的教材,也可供研究生和临床医生参考,对教师进行教学辅导也有一定的帮助。

本书已由北京大学医学出版社出版发行,有意购买者可与北京大学医学出版社读者服务部联系,电话:010-82802475,邮编:100083,或登录北京大学医学出版社网站www.pumppress.com.cn网上订购。