

[文章编号] 1000-4718(2006)12-2458-04

妊娠期肝内胆汁淤积症中 ABCB4 基因点突变的研究*

李铁臣¹, 胡卫华¹, 孙惠兰¹, 孔丽娜²

(皖南医学院¹ 遗传医学研究室,² 附属弋矶山医院妇产科, 安徽 芜湖 241001)

[摘要] 目的: 探讨 ABCB4 基因点突变与妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)发病的关系。方法: 采用聚合酶链反应单链构象多态性(PCR-SSCP)方法对 31 例妊娠期肝内胆汁淤积症患者进行 ABCB4 基因外显子 6 和外显子 14 的点突变筛查。对疑有点突变的病例, 进行 DNA 序列测定, 以明确其具体的突变性质。结果: 31 例妊娠期肝内胆汁淤积症患者的血样品, 均扩增出 ABCB4 基因的外显子 6 及外显子 14 的靶基因片段, 未发现外显子 6 及外显子 14 的缺失。对所有外显子 6 及外显子 14 的 PCR 产物进行 SSCP 筛查, 无异常发现。为验证实验结果, 随机挑选 7 例样品测定外显子 6 及外显子 14 的 DNA 序列, 未发现点突变。结论: 这 2 个突变热点可能与 ICP 的发生无关, ABCB4 基因点突变与 ICP 发病的相关性, 仍应进行更大样本量的研究及其它突变热点的筛查。

[关键词] 妊娠; 胆汁淤积, 肝内; 基因, ABCB4; 序列分析, DNA

[中图分类号] R714.255

[文献标识码] A

Relationship between the point mutation of ABCB4 gene and intrahepatic cholestasis of pregnancy

LI Tie - chen¹, HU Wei - hua¹, SUN Hui - lan¹, KONG Li - na²

(¹Laboratory of Medical Genetics, ²Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the relationship between the point mutation of ABCB4 gene and intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **METHODS:** Using the method of polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), the point mutation of the ABCB4 gene exon 6 and exon 14 in 31 women with ICP were detected. The PCR products of suspected cases with the point mutation were further DNA sequenced so as to determine its mutation characters. **RESULTS:** The target band of ABCB4 gene exon 6 and exon 14 was found in all blood samples from 31 cases with ICP. No ABCB4 gene exon 6 and exon 14 deletion and point mutation were detected by PCR and PCR-SSCP, respectively. To check the finding, 7 cases amongst the 31 ICP cases were selected randomly for DNA sequencing. No point mutation of ABCB4 gene exon 6 and exon 14 were detected also. **CONCLUSION:** The finding suggests that there may be no relationship between the two mutation hot spots and the ICP pathogenesis. Further investigation of other mutation hot spots of ABCB4 gene and enlargement sample size are needed to testify the relationship between the point mutation of ABCB4 gene and the pathogenesis of ICP.

[KEY WORDS] Pregnancy; Cholestasis, intrahepatic; Gene, ABCB4; Sequence analysis, DNA

妊娠肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠期特有的肝内疾病,可致胎儿窘迫、早产或死胎,是一种高危的妊娠期疾病,其发病机制尚不明确^[1-4]。一些研究报道,ABCB4 基因的点突变可能是导致 ICP 的原因^[5-9],大部分突变发生在编码蛋白的功能区,突变热点主要涉及外

显子 6、9、12、14、23^[9]。本研究采用 PCR-SSCP 及 DNA 测序方法,研究安徽省皖南地区 31 名 ICP 患者 ABCB4 基因的 2 个突变高发部位-外显子 6 和外显子 14 的突变情况,旨在了解中国人群中 ABCB4 基因的点突变与 ICP 发病的相关性,探讨 ICP 的发病机制。

[收稿日期] 2005-12-19 [修回日期] 2006-03-29

* [基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2004kj345)

E-mail: litiechen@yahoo.com.cn

材 料 和 方 法

1 临床资料

诊断标准参见第6版妇产科学^[1]:瘙痒;血清总胆汁酸或血清谷丙转氨酶活性显著增高;没有流行性病毒感染;超声检查无胆道扩张。如果孕妇同时出现上述情况,则确诊为ICP病例。31例ICP样品采自2004年1月至2004年11月在皖南医学院附属弋矶山医院、宣城地区医院、芜湖市第一、第二人民医院的住院患者,年龄22-43岁,平均年龄(27.6±3.9)岁,31例患者均无家族史。分娩前(或剖宫产前)抽取外周静脉血2-3 mL,制备DNA样品。

2 DNA提取和PCR-SSCP

常规酚-氯仿方法抽提ICP患者的外周血DNA样品,4℃保存、备用。PCR引物序列由伦敦皇家学院医学系生物生殖与发育研究所Mullenbach博士提供,并在NCBI网站进行BLAST验证无误后(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),由上海博亚生物技术有限公司合成,引物序列、产物大小及复性条件见表1。

PCR总反应体积50 μL:模板DNA为2 μL, Taq酶2.5 U, 10×buffer 5 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 上游及下游引物各10 pmol/L, 加ddH₂O至总体积50 μL。PCR反应在PTC-150型PCR仪(美国MJ公司产品)上进行,循环条件为:98℃预变性5 min,加入Taq酶(FBI公司产品),进入热循环扩增,94℃变性30 s;根据扩增的目的基因的不同,复性温度及时间见表1;70℃延伸30 s,共35个循环,最后70℃延伸4 min。取10 μL PCR扩增产物加样,1.5%琼脂糖凝胶电泳30-60 min(电压100 V),溴乙锭(ethidium bromide, EB)染色,紫外灯下检测扩增产物,数码相机摄片保存,PCR产物4℃保存备用。

表1 PCR引物序列和退火条件

Tab 1 PCR primers and conditions

Exon	Primer	Product size(bp)	Annealing condition (°C × s)
Exon 6	5'-gtgtgacattacaatgtacc-3'	255	55×30
	5'-agagaagggtatttaataagagc-3'		
Exon 14	5'-gtttctgttagaatt-3'	203	52×30
	5'-gcttttagagctactg-3'		

取PCR扩增产物3 μL与15 μL去离子甲酰胺指示剂混匀,煮沸10 min,取出立即置于冰上并迅速放入冰箱冷冻室(-20℃)骤冷5 min后,按序加样,

进行6%聚丙烯酰胺凝胶电泳。上样前250 V预电泳30 min,上样后250 V电泳3-4 h,银染显示结果,凝胶置于X-线胶片观察灯上,数码相机摄片保存。

3 DNA测序

PCR产物经DNA Gel Extraction Kit试剂盒(维洁特公司产品)纯化回收,100 μL纯化后的PCR产物连同其上游引物一起寄送北京诺赛基因组研究中心有限公司,在ABI-3730_{XL}测序仪上进行单向测序(双脱氧法),测序结果在NCBI网站进行BLAST比对确认(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。

结 果

本实验分别采用1对ABCB4基因外显子6和外显子14的引物,对31例ICP患者的DNA样品进行PCR扩增,外显子6的目的片段大小为255 bp,外显子14的目的片段大小为203 bp,所有样品均扩增出目的片段(图1、图2)。

所有外显子6和外显子14的PCR扩增产物经变性处理后,6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳并银染,结果均未发现异常泳动的条带(图3和图4)。为验证SSCP结果的可靠性,随机挑选了7例样品,对外显子6和外显子14的PCR产物进行DNA序列测定(图5、图6),测序结果在NCBI网站进行BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)比对验证,结果也未发现ABCB4基因外显子6及外显子14的异常。

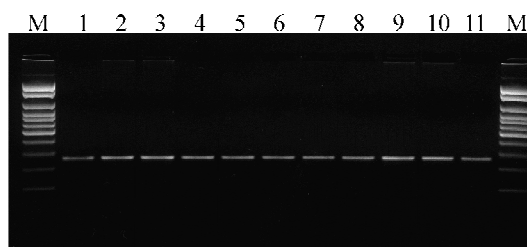


Fig 1 PCR products of ABCB4 gene exon 6. M: 100 bp ladder DNA marker; 1-11: ICP patients.

图1 ABCB4基因外显子6的PCR产物

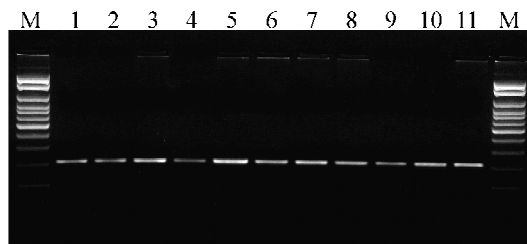


Fig 2 PCR products of ABCB4 gene exon 14. M: 100 bp ladder DNA marker; 1-11: ICP patients.

图2 ABCB4基因外显子14的PCR产物

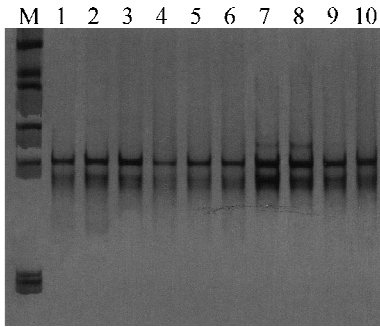


Fig 3 Electropherogram of ABCB4 gene exon 6 by PCR-SSCP. M; 100 bp ladder DNA marker; 1-10; ICP patients.

图3 ABCB4 基因外显子6的PCR-SSCP电泳图

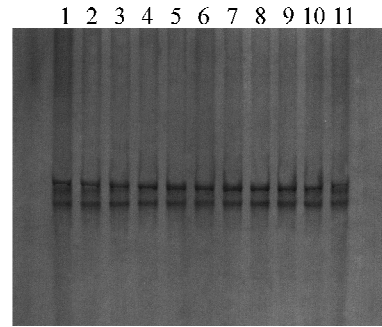


Fig 4 Electropherogram of ABCB4 gene exon 14 by PCR-SSCP. 1-11; ICP patients.

图4 ABCB4 基因外显子14的PCR-SSCP电泳图

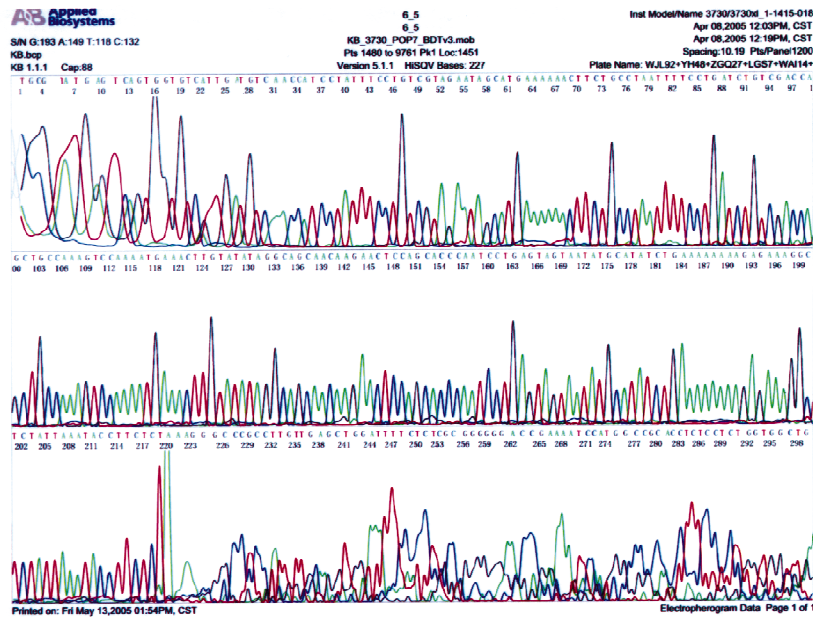


Fig 5 Sequence of ABCB4 gene exon 6.

图5 ABCB4 基因外显子6的测序图

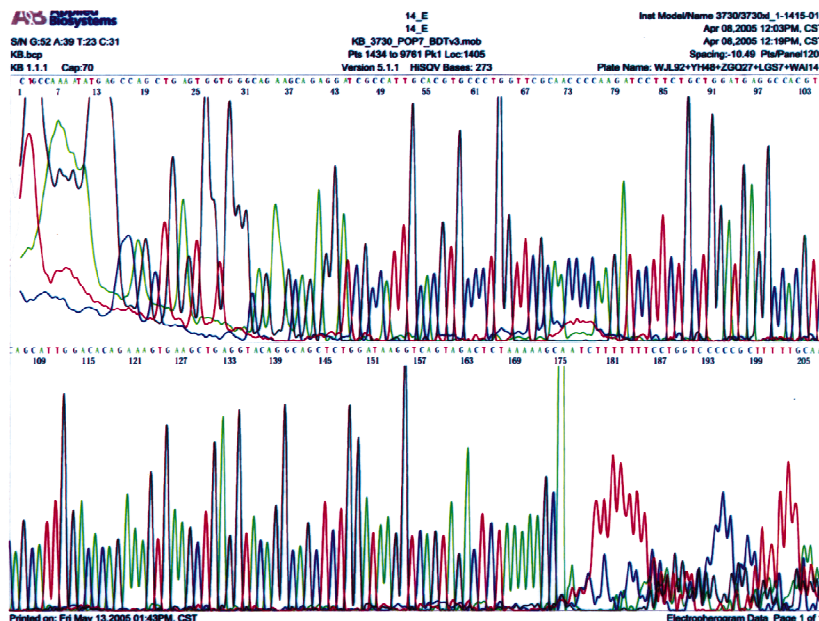


Fig 6 Sequence of ABCB4 gene exon 14.

图6 ABCB4 基因外显子14的测序图

讨 论

ICP 的发病机制至今不明^[1],分娩后患者仍有增高的患胆石症的风险,提示这些妇女存在着先天性的肝胆管异常^[10,11]。ABCB4 基因也称多药耐药基因 3 (multidrug resistance 3, MDR3), 位于人类染色体 7q21.1^[9], 共有 28 个外显子^[12]。编码 P 糖蛋白, 属于 ATP 结合转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter) 家族, 与肿瘤细胞耐药有关。该 P 糖蛋白是一种 ATP 依赖性药物排出泵, 输出磷脂酰胆碱, 磷脂酰胆碱可以保护胆管免受胆汁盐的损伤^[13, 14], 因此, ABCB4 基因的突变可能会导致胆管损伤, 从而引起胆汁淤积。1999 年, Jacquemin 等^[5]首次证明了 ABCB4 基因突变与 ICP 相关。

本实验研究了安徽省皖南地区 31 名 ICP 患者 ABCB4 基因的 2 个突变高发部位 - 外显子 6 和外显子 14 的突变情况, 结果没有发现 ABCB4 基因外显子 6 和外显子 14 的点突变, 表明这 2 个突变热点与 ICP 发生可能无关。此结果与 Savander 等^[15]的一致, 而与 Jacquemin 等^[5]、Dixon 等^[6]、Rosmordue 等^[7]、Lucena 等^[8]、Gendrot 等^[9]的不同。综合上述的研究报道, 我们认为可能是由于种族和地域的差异, 文献报道的 ABCB4 基因的这 2 个突变热点可能不是中国 ICP 患者的突变热点, 中国 ICP 患者中可能存在其它的 ABCB4 基因突变热点。ABCB4 基因点突变与中国人 ICP 发病的相关性, 仍应进行更大样本量的研究和其它突变热点的筛查。

参 考 文 献

- [1] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 107-109.
- [2] 胡卫华, 李铁臣, 孙惠兰. 妊娠期肝内胆汁淤积症发病的分子机制研究进展[J]. 国外医学: 妇产科学分册, 2004, 31(5): 300-302.
- [3] Mullenbach R, Bennett A, Tetlow N, et al. ATP8B1 mutations in British cases with intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Gut, 2005, 54(6): 829-834.
- [4] Painter JN, Savander M, Ropponen A, et al. Sequence variation in the ATP8B1 gene and intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Eur J Hum Genet, 2005, 13(4): 435-439.
- [5] Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, et al. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. Lancet, 1999, 353(9148): 210-211.
- [6] Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(8): 1209-1217.
- [7] Rosmordue O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis[J]. Gastroenterology, 2001, 120(6): 1459-1467.
- [8] Lucena JF, Herrero JJ, Quiroga J, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis[J]. Gastroenterology, 2003, 124(4): 1037-1042.
- [9] Gendrot C, Bacq Y, Brechot MC, et al. A second heterozygous MDR3 nonsense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. J Med Genet, 2003, 40(3): e32.
- [10] Ropponen A, Aittomaki K, Tikkanen MJ, et al. Levels of serum C-reactive protein during oral and transdermal estradiol in postmenopausal women with and without a history of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(1): 142-146.
- [11] Ropponen A, Aittomaki K, Vihma V, et al. Effects of oral and transdermal estradiol administration on levels of sex hormone-binding globulin in postmenopausal women with and without a history of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(6): 3431-3434.
- [12] Lincke CR, Smit JJ, van der Velde-Koerts T, et al. Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus[J]. J Biol Chem, 1991, 266(8): 5303-5310.
- [13] Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatocellular transporters and cholestasis [J]. J Clin Gastroenterol, 2005, 39(4 Suppl 2): S103-S110.
- [14] Ferenci P, Zollner G, Trauner M. Hepatic transport systems [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(Suppl): S105-S112.
- [15] Savander M, Ropponen A, Avela K, et al. Genetic evidence of heterogeneity in intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. Gut, 2003, 52(7): 1025-1029.