

秦巴山区儿童 FRAXE 脆性位点 CGG 重复多态性分布及与智力的相关性分析

牛银波¹, 南亚萍², 舒青³, 张科进¹, 高晓彩¹, 张富昌¹

(1. 西北大学生命科学学院人口与健康研究所, 西安 710069; 2. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055;
3. 第四军医大学医学遗传学和发育生物学教研室, 西安 710033)

摘要: 采用 PCR 扩增技术和聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 并结合测序, 对秦巴山区随机抽样儿童及不同智力水平儿童的 FRAXE 脆性位点 CGG 重复序列进行检测。并把所得的 CGG 重复数与智测成绩(用韦氏儿童智力量表(C-WISC)进行智力测量)做关联分析。结果表明, FRAXE 脆性位点 CGG 重复的等位基因分布范围在不同地域人群中有所差异, 同一地域人群中等位基因频率分布基本一致; 随机抽样儿童的 CGG 重复多态性与智力没有相关性($r=0.083$, $P>0.05$), 男性和女性的 CGG 重复多态性分别与儿童智力也无相关性($r_{男}=0.225$, $r_{女}=-0.041$, $P>0.05$); 在智力低下(MR)、边缘和正常儿童中, CGG 重复数值之间也没有显著性差异($F=0.195$, $P>0.05$)。因而认为, 秦巴山区儿童 FRAXE 脆性位点 CGG 的正常重复多态性(重复数为 8-30)与其智力成绩亦无相关性。

关键词: FRAXE 脆性位点; 三核苷酸重复; 多态性; 智力

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)10-1219-05

Polymorphism of CGG Repeats in the FRAXE Fragile Site in the Qinba Mountain area Children and Its Association with Intelligence

NIU Yin-Bo¹, NAN Ya-Ping², SHU Qing³, ZHANG Ke-Jin¹, GAO Xiao-Cai¹,
ZHANG Fu-Chang¹

(1. *Institute of Population and Health, College of Biological Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;*
2. *School of Environmental & Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055, China;*
3. *Department of Medical Genetics and Developmental Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China*)

Abstract: Variations of CGG repeats in the FRAXE fragile site were determined by PCR amplification followed by polyacrylamide gel electrophoresis and sequencing in randomly collected Qinba Mountain Area children whose intelligence level was determined by China-Wechsler Intelligence Scale for Children (C-WISC). Correlations between IQ score and the number of CGG repeats were analyzed. Results indicated a difference in the range of CGG repeats among populations from different regions, but no difference in the distribution of allele frequency in such a population. CGG repeats were not associated with IQ scores in randomly collected subjects ($r=0.083$, $P>0.05$), in males and females ($r_m=0.225$, $r_f=-0.041$, $P>0.05$), or in subjects with different intelligent levels ($F=0.195$, $P>0.05$). It can be inferred that variation in the size of CGG repeats was not associated with intellectual performance in the Qinba Mountain area children.

Key words: FRAXE site; trinucleotide repeats; polymorphism; intelligence

收稿日期: 2005-11-24; 修回日期: 2006-01-26

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30470577)、国家十五科技攻关计划项目(编号: 2001BA901A49)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470577) and the Tenth Five Year Plan National Tackle Problem Item (No. 2001BA901A49)]

作者简介: 牛银波(1979—), 女, 陕西宜川人, 硕士研究生, 研究方向: 认知神经生物学。E-mail: niuyinbo@yeah.net

通讯作者: 张富昌(1947—), 男, 陕西蓝田人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 认知神经生物学。Tel: 029-88303328; E-mail: zhfch@nwu.edu.cn

人们在研究脆性X综合征的同时,在X染色体长臂末端(Xq28)发现了罕见的叶酸敏感位点,即FRAXE^[1,2]。与FRAXA位点相似,也具有三核苷酸重复多态性,正常人中该重复为6~34,前突变个体中有50~150个重复,全突变个体中可达200个以上。由于脆性X在人群中发病率较高,但很多又都是轻度智力低下^[3~5],所以与非特异性X连锁智力低下有关的FRAXE逐渐引起人们的注意。但FRAXE(CGG)_n结构的扩展是否引起智力低下和生长发育障碍尚有争议。Knight S J L等^[3,6]、Wang Q等^[7]以及Mulley J C等^[8]研究认为FRAXE阳性常伴有轻度智力低下;Allingham-Hawkin D J和Ray P N^[9]则认为FRAXE只是群体中的一种遗传多态性而与临床表现无关。本研究采用PCR扩增技术和聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,并结合测序等方法对秦巴山区儿童FRAXE的CGG重复多态性进行检测,研究其分布特点,并分析其与智力的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

样本来自秦巴山区弱智儿童防治试验点。选取无血缘关系的6~14岁儿童,166名(男85人、女81人),每人抽取前臂静脉全血1 mL用于提取DNA,以供分析。

1.2 方法

1.2.1 智力低下儿童的诊断与边缘儿童的筛选

在166名儿童中,有智力低下儿童84名,边缘儿童28名。对智力低下(MR)儿童的诊断和边缘儿童的筛选是先对试验点儿童用瑞文量表(CRT-C2, 1998)做筛查,对筛查出的IQ<85分的儿童用婴儿一初中生社会生活能力量表(SLPS, 1988)做社会适应能力评定,对适应行为≤9分的儿童用韦氏儿童量表(C-WICS, 1993)做智力测验。对用上述方法初步诊断出的MR和边缘儿童做行为观察、体格检查、病史调查和必要的实验室检查。最后,由课题组的心理学、儿科、神经和精神科专家和医生组成病例讨论组进行病例讨论,按WHO(1985)推荐的标准逐一诊断出MR儿童和边缘儿童。在本实验选取的MR个体中,除了智力低下,无其他临床体征,边缘儿童也无其他临床体征。

1.2.2 抽样儿童的智力测量

对68名6~14岁的随机抽样儿童,用韦氏儿童智力量表(C-WISC)逐一做智力测验,获得其智测成

绩。

1.2.3 外周血细胞DNA提取

对已采集的外周血样,用传统酚/氯仿抽提法从白细胞中分离基因组DNA,溶于TE溶液,于-20℃保存。

1.2.4 引物设计与合成

根据生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)所提供的FRAXE位点全序列,针对CGG重复区域设计上、下游引物:Primer F: 5'-CCTGTGAGTGTGTAAGTGTGTGA-TGCTGCCG-3'; Primer R: 5'-GCGAGGAAGCGC-GGCAGTGGCACTGGG-3'。上、下游引物由上海博雅生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.5 PCR扩增

扩增体系为30 μL: 内含基因组DNA 50 ng, 12×GC Buffer II (TaKaRa) PCR缓冲液 15 μL, 10 mmol/L的dNTP 2.4 μL, 50 pmol/3 μL的每种引物 1.3 μL, Taq DNA聚合酶 1.5 μL (3U/1 μL), 加灭菌双蒸水至30 μL。扩增条件: 99℃预变性5 min, 后加酶1.5 μL, 98℃ 30 s变性, 68℃ 2 min复性延伸, 共30个循环, 72℃ 10 min终延伸, 4℃保存。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色

在PCR产物中取12 μL与6×溴酚兰以12:1比例混匀加入点样孔中, 150 V电压电泳5 h, 用EB染色。放于凝胶成像系统下观察, AlphaImager v5.5软件分析并照相。

1.2.7 PCR产物测序部分

PCR产物原液送由基康公司测序, 以确定扩增产物是否正确。

1.2.8 片段大小确定及基因型分析

以SD006 100 bp DNA ladder V为参照, 确定各等位片段大小。将各样本中的等位基因片段按CGG重复次数大小分别命名, 记录各个体的基因型。

1.2.9 统计分析

利用SPSS11.0软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 秦巴山区人群中FRAXE位点CGG重复的多态性分布

在166名无血缘关系的个体的247条X染色体中, 共检测得到22种不同的等位基因, 银染显示的

FRAXE 位点的 CGG 重复序列等位基因见图 1, CGG 重复次数变异范围为 8~30, 最大频率等位基因为 17 个 CGG 重复数, 占 16.19%; 其后依次为 18 个 CGG 重复数, 占 11.74%; 14 个 CGG 重复数, 占 8.10%; 16 个 CGG 重复数, 占 7.69%, 详见表 1。85 名男性个体中共检测得到 20 种基因型, 81 名女性个体中共检测得到 29 种基因型, 其中杂合基因型 9 种。将其分布范围与其他人群做比较(表 2)。

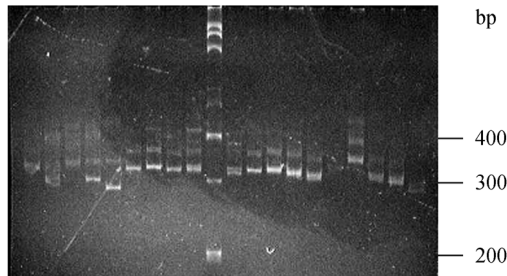


图 1 银染显示的 FRAXE 位点的 CGG 重复序列等位基因

Fig. 1 Allele of CGG repeats located in the FRAXE site by using silver staining

表 1 秦巴山区人群中 FRAXE 位点的 CGG 重复序列等位基因频率分布

Table 1 Allele frequency of CGG repeats located in the FRAXE site in Qinba Mountain area population

CGG 重复数 Number of CGG repeats	等位基因频率 Allele frequency		
	男性 Males	女性 Females	合计 Total
8	0.047 (4)	0.037(6)	0.040(10)
9	0.012 (1)	0.000(0)	0.004(1)
10	0.024 (2)	0.062(10)	0.049(12)
11	0.012 (1)	0.025(4)	0.020(5)
12	0.047 (4)	0.062(10)	0.057(14)
13	0.047 (4)	0.062(10)	0.057(14)
14	0.071 (6)	0.086(14)	0.081(20)
15	0.059 (5)	0.012(2)	0.028(7)
16	0.129 (11)	0.049(8)	0.077(19)
17	0.141 (12)	0.173(28)	0.162(40)
18	0.106 (9)	0.123(20)	0.117(29)
19	0.059 (5)	0.037(6)	0.045(11)
20	0.059 (5)	0.049(8)	0.053(13)
21	0.071 (6)	0.049(8)	0.057(14)
22	0.024 (2)	0.025(4)	0.024(6)
23	0.012 (1)	0.037(6)	0.028(7)
24	0.024 (2)	0.025(4)	0.024(6)
25	0.024 (2)	0.025(4)	0.024(6)
27	0.024 (2)	0.012(2)	0.016(4)
28	0 (0)	0.037(6)	0.024(6)
29	0 (0)	0.012(2)	0.008(2)
30	0.012 (1)	0(0)	0.004(1)
合计 Total	1.000(85)	1.000(162)	1.000(247)

注: 括号中的数字代表染色体数。

Note: Numbers in the parentheses indicate the number of chromosomes.

表 2 秦巴山区人群和其他人群中 FRAXE 位点的 CGG 重复数分布

Table 2 Range of CGG repeats located in the FRAXE site in Qinba Mountain area population and other populations

人群 Population	CGG 重复范围 CGG repeats range	文献 References
加拿大 Canada	7~35	[9]
中国 China	9~25	[10]
美国, 中国, 芬兰 USA, China, Finland	4~39	[11]
英国 UK	4~39, 87	[12]
美国 USA	7~54	[13]
希腊和塞浦路斯 Greece and Cyprus	7~30	[14]
中国秦巴山区人群 Qinba Mountain Areas, China	8~30	本研究 This study

2.2 秦巴山区儿童的 FRAXE 位点 CGG 重复的多态性与智测成绩的关系

对秦巴山区 68 名 6~14 岁随机抽样儿童的 FRAXE 位点 CGG 重复次数与其韦氏 IQ 成绩进行相关分析, 其中对女性杂合体进行分析时采用其 CGG 片段长度的平均值(表 3)^[15]。

表 3 CGG 重复数与智测成绩的关系
Table 3 Correlation between the number of CGG repeats and IQ score

组别 Sample	皮尔逊相关系数 Pearson's r	置信度 Sig. (2-tailed)
男性 Males (n=35)	0.025	0.194
女性 Females (n=33)	-0.041	0.820
总体 Total (n=68)	0.083	0.499

由表 3 可知在秦巴山区儿童在男、女以及整体中 CGG 重复的多态性与智测成绩均没有相关性。

2.3 不同类型儿童 FRAXE 位点 CGG 重复次数的比较

对秦巴山区智力低下(MR)组儿童、边缘组儿童和正常组儿童的 FRAXE 位点 CGG 重复次数的均值进行比较, 其中对女性杂合体进行分析时采用其 CGG 片段长度的平均值, 结果见表 4。

由表 4 可知 MR、边缘及正常儿童 FRAXE 位点 CGG 重复的多态性之间均没有显著性差异。

3 讨论

本研究在扩增 FRAXE 脆性位点 CGG 重复区的

表 4 不同类型儿童的 CGG 重复数比较
Table 4 Number of CGG repeats among various subgroups

不同组儿童 Groups	人数 No.	CGG 重复数 Number of CGG repeats
智力低下组 MR	84	17.39±4.87
智力边缘组 Borderline	28	16.79±4.18
智力正常组 Normal	54	17.35±4.31
合计 Total	166	17.20±4.56

$F=0.195, P>0.05$.

PCR 反应中, 由于扩增片段 GC 含量高达 84.7%, 容易形成二级结构, 不易扩增出目的产物, 故用 TaKaRa 公司专门用于扩增高 GC 含量片段的 Buffer。dNTP 中 ATGC 浓度比为 A:T:G:C=2:2:3:3, 优于原比例 A:T:G:C=1:1:1:1。该扩增片段引物较长, GC 含量高, 其 Tm 值也相应较高, 对于高 Tm 值引物 PCR 产物的扩增, 可采用两温度点, 即复性、延伸温度相同, 且都处于较高温度处, 一般常用范围为 68~75℃, 本实验选择 68℃, 并提高预变性和变性温度到 99℃、98℃, 使模板在较高温度下解链更充分, 从而有利于下一步引物与模板的结合。

由表 1、表 2 可以得出, 秦巴山区人群中 FRAXE 位点的 CGG 重复序列等位基因分布范围(8~30), 与 Patsalis P C 等^[14]报道的希腊和塞浦路斯人群的(7~30)基本一致, 但与 Allingham-Hawkins D J 等^[9]报道的加拿大人群的(7~35)、金润铭等^[10]报道的中国人群的(9~25)、Zhong N 等^[11]报道的美国、中国、芬兰 3 个人群的(4~39)、Murray A 等^[12]报道的英国人群的(4~39, 87)、Crawford D C 等^[13]报道的美国人种的(7~54)都有差异。这一方面与样本量大小、抽样的随机性等有关, 另一方面也反映出不同地域的人群遗传结构的差异。本实验所选用的人群为秦巴山区封闭环境中的山村儿童, 交通不便和长期形成的狭小婚配圈阻碍了当地与外界的基因交流, 所以这也可能是 FRAXE 位点的 CGG 重复序列等位基因分布范围较窄的原因之一, 此次研究所得到的 CGG 重复序列等位基因分布范围很有可能代表了秦巴山区这个相对封闭人群的特征。实验中得到的最大频率等位基因是 17 个 CGG 重复数, Zhong N 等^[11]报道的中国正常人群 CGG 重复多态性最大频率等位基因为 18 个 CGG 重复数, 金润铭等报道的最大频率等位基因为 15、16 个 CGG 重复数, 这说明在同一地域人群中 FRAXE 位点的 CGG 重复序列等位基因频率分布基本

没有差异。

在随机抽取的 68 名儿童个体中, 分别对整体、男性、女性的 CGG 重复数和其智测成绩做了相关分析, 结果表明它们之间都没有相关性($P>0.05$)(表 3)。实验又对智力水平不同且有社会适应能力差异的 MR 儿童、边缘儿童和正常儿童的 CGG 重复数进行分析, 结果表明它们之间均没有显著性差异($P>0.05$)(表 4)。本实验对中度以上的智力低下(MR)的儿童进行了 GCC 重复区域的 PCR 扩增, 结果也均在 8~30 个拷贝的正常范围内, 提示在秦巴山区的试验点, 由 FRAXE 脆性位点的 CGG 异常重复数所引起的 MR 尚未找到。由以上分析结果可以说明, 在秦巴山区试验点儿童中, CGG 重复数的多态性与智力没有相关性。

此次研究探讨脆性位点 FRAXE 的 CGG 重复结构在正常范围内(小于 50 个重复数)的多态性是否与智力相关, 结果表明脆性位点 FRAXE 的 CGG 重复结构在正常范围内的扩展只是一种多态现象, 与智力之间没有关联。这种情况无论在正常儿童还是 MR 儿童以及边缘儿童中都是一样的, FRAXE 位点的 CGG 重复在正常范围内的变化, 都与其智力之间没有相关性。

参 考 文 献 (References):

- [1] Sutherland G R, Baker E. Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum Mol Genet*, 1992, 1: 111~113.
- [2] Flynn G A, Hirst M C, Knight S J, Macpherson J N, Barber J C, Flannery A V, Davies K E, Buckle V J. Identification of the FRAXE fragile site in two families ascertained for X linked mental retardation. *J Med Genet*, 1993, 30: 97~100.
- [3] Knight S J L, Flannery A V, Hirst M C, Campbell L. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell*, 1993, 74: 127~134. [\[DOI\]](#)
- [4] Fu Y H, Kuhl D P, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe J S, Richards S, Verkert A J, Holden J J, Fenwick R G Jr, Warren S T, *et al.* Variation of the CGG repeat at the Fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 1991, 67: 1047~1058. [\[DOI\]](#)
- [5] Hamel B C J, Smits A P T. Segregation of FRAXE in a Large family: clinical, psychometric, cytogenetic and molecular data. *Am J Hum Genet*, 1994, 55: 923~929.
- [6] Knight S J L, Volckel M A, Hirst M C, Flannery A V, Moncla A, Davis K E. Triplet repeat expansion at the FRAXE locus and X-linked mild mental handicap. *Am J Hum Genet*, 1994, 55: 81~86.

- [7] Wang Q, Green E, Bobrow M. A rapid, nonradioactive screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J Med Genet*, 1995, 32: 170~173.
- [8] Mulley J C, Yu S, Loesch D Z, Hay D A, Donnelly A, Gedeon A K, Carbonell P, Lopez I, Glover G, Gabarron I, Lu P W L, Baker E, Haan E A, Hockey A, Knight S J L, Davies K E, Richards R I, Sutherland G R. FRAXE and mental retardation. *J Med Genet*, 1995, 32: 162~169.
- [9] Allingham-Hawkin D J, Ray P N. FRAXE expansion is not a common etiological factor among developmentally delayed males. *Am J Hum Genet*, 1995, 56: 72~76.
- [10] JIN Run-Ming, YANG Ai-De, FEI Hong-Bao, HE Mei-Juan, WANG Shen-Wang, YANG Xiao-Lin. Studies on polymorphism of the fragile X-E site in Chinese population. *The Journal of Medical Wuhan*, 1996, 20(1): 6~7.
金润铭, 杨爱德, 费洪宝, 何美娟, 王申王, 杨晓林. 中国人脆性 X-E 位点多态性研究. *武汉医学杂志*, 1996, 20(1): 6~7.
- [11] Zhong N, Ju W, Curley D, Wang D, Pietrofesa J, Wu G, Shen Y, Pang C, Poon P, Liu X, Gou S, Kajanoja E, Ryyanen M, Dobkin C, Brown W T. Survey of FRAXE allele sizes in three populations. *Am J of Med Genet*, 1996, 64: 415~419. [\[DOI\]](#)
- [12] Murray A, Youings S, Dennis N, Latsky L, Linehan P, McKechnie N, Macpherson J, Pound M, Jacobs P. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 727~735. [\[DOI\]](#)
- [13] Crawford D C, Meadows K L, Newman J L, Taft L F, Pettay D L, Gold L B, Hersey S J, Hinkle E F, Stanfield M L, Holmgren P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman S L. Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large, ethnically diverse, special education-needs population. *Am J Hum Genet*, 1999, 64: 495~507. [\[DOI\]](#)
- [14] Patsalis P C, Sismani C, Hettinger J A, Boumba I, Georgiou I, Stylianidou G, Anastasiadou V, Koukoulli R, Pagoulatos G, Syrou M. Molecular screening of fragile X (FRAXA) and FRAXE mental retardation syndromes in the Hellenic population of greece and cyprus: incidence, genetic variation, and stability. *Am J Med Genet*, 1999, 84: 184~190. [\[DOI\]](#)
- [15] Mazzocco M M, Reiss A L. Normal variation in size of the FMR2 gene is not associated with variation in Intellectual performance. *Intelligence*, 1999, 227(2): 175~182. [\[DOI\]](#)