

· 短篇论著 ·

80例山西汉族先天性巨结肠患儿RET基因单核苷酸多态性分析

李雪静 赵文英 张全斌 马云霞 高伟华 郭珍平 王鹏飞 周永安

【摘要】 目的 研究80例山西汉族先天性巨结肠症(Hirschsprung disease, HSCR)患儿RET基因7、12、13、15号外显子的单核苷酸多态性(single nucleotides polymorphisms, SNPs)与HSCR发病的关系。方法 通过测序及序列比对的方法,对山西省80例汉族散发性HSCR患者和80例汉族健康儿童进行RET基因外显子序列分析,比较基因多态性位点等位基因频率在两组的差异。结果 RET基因7号外显子A432A(GCA→GCG)位点存在多态性,病例组和对照组中该位点的等位基因分布频率存在显著性差异($\chi^2 = 5.668, P < 0.05$),风险等位基因为G等位基因,OR = 3.05,95%可信区间为1.218~7.639;RET基因13号外显子L769L(CCT→CTA)位点存在多态性,病例组和对照组中该位点的等位基因分布频率存在显著差异($\chi^2 = 37.458, P < 0.01$),风险等位基因为G等位基因,OR = 4.632,95%可信区间为2.832~7.577。7号外显子D489N(GAC→AAC),15号外显子S904S(TCC→TCG)存在多态位点,病例组与对照组中 $P > 0.05$,该位点与疾病无显著相关性。其余已报道多态位点本次试验未发现。结论 RET密码子A432A、L769L的基因多态性与80例山西汉族HSCR患儿的发生密切相关。

【关键词】 Hirschsprung病; 原癌基因蛋白质c-ret; 多态性,单核苷酸

先天性巨结肠症(Hirschsprung disease, HSCR)又称肠无神经节细胞症,是小儿外科常见的消化道症状。其主要特征为结肠或直肠的肌层及黏膜下层神经节细胞缺失,肠道神经调节紊乱,以致导致累肠段痉挛收缩,其近端结肠代偿性扩张与肥厚,形成巨结肠,从而导致小儿严重的肠梗阻及便秘等消化道症状。HSCR的发病率约为1/5000,其中以高加索人群最低,亚洲人最高,男女发病率约为4:1^[1]。

目前多认为遗传背景的差异与HSCR的发病关系较环境等因素更为密切。经证实的与HSCR相关的最主要的基因是RET原癌基因(RET proto-oncogen)。约50%的家族性和10%~20%的散发性HSCR存在RET基因的突变。RET原癌基因定位于染色体10q11.2,共有21个外显子,编码酪氨酸激酶受体^[2]。研究学者推测含有RET基因单核苷酸多态性(SNP)和单倍型可能作为基因修饰因子存在,从而增加HSCR患病风险^[3]。

目前,已证实高加索人群中,A45A、L769L、G691S、S836S、S904S等编码区SNPs与HSCR相关。在汉族人口中,天津市^[3]、浙江省^[4]、湖北省^[5]等已证实A45A、L769L多态性可能与该地区汉族人群HSCR相关。刘翠平^[4]通过RET基因5'末端和3'末端的2个单倍型与HSCR存在显著关联,提示RET基因是中国汉族HSCR患儿的主要易感基因。Tou等^[6]通过-5G > A(rs10900296),-1A > C(rs10900297),c135G > A(rs1800858),c1296A > G(rs1800860)以及c2307T > G(rs1800861)构建单倍型并证实其与HSCR的发生有相关性。Robert等^[7]研究表明A45A多态性改变与HSCR临床表现的严重程度密切相关,G691S和S904S与HSCR狭窄段的长度有一定关系。

由于遗传背景等方面的差异,不同的人种和种族中多态性存在不同。目前还无山西省汉族HSCR相关基因多态位点的研究报道。本试验分析了80例散发性HSCR汉族患儿和80例正常汉族儿童RET基因7、12、13、15号外显子的基因多态性情况。

一、对象与方法

1. 研究对象:收集2008年1月至2010年12月山西省儿童医院就诊术后病理切片证实的HSCR汉族患者80例,其中男66例,女14例,平均年龄为(2.3±0.7)岁。均为散发性,无家族遗传史;收集同期山西省儿童医院体检健康汉族儿童男65人,女15人,平均年龄为(3.5±0.6)岁,均取静脉血3ml,枸橼酸钠抗凝。

2. 研究方法:(1)DNA提取模板:使用全血基因组DNA快速提取试剂盒(北京索来宝科技有限公司)常规蛋白酶K,酚/氯仿/异丙醇法提取样品DNA,TE溶解,经1%琼脂糖电泳检测,-20℃保存备用。(2)PCR扩增:所提取DNA分别进行RET

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.19.047

作者单位:030001 太原,山西医科大学[李雪静(2009级临床检验诊断学专业研究生)、高伟华(2009级临床检验诊断学专业研究生)];山西省儿童医院病理科(赵文英);太原市中心医院中心实验室(张全斌、马云霞、郭珍平、王鹏飞、周永安)

通讯作者:周永安,Email:zya655903@163.com

基因第7、12、13和15号外显子的PCR扩增。其中第7、12和15号外显子引物序列参考文献^[8],13号引物应用Primer软件自行设计。引物由上海基康生物技术有限公司合成(表1)。50 μl的PCR反应体系:10 × Buffer 5 μl,2 mmol/L MgCl₂ 5 μl,2.5 mmol/L dNTP 5 μl,10 μmol/L引物各2 μl,1 U/μl Taq酶2 μl,100 ng DNA模版2 μl,ddH₂O 27 μl。上述试剂由Takara公司提供。外显子反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,62 ~66 °C 30 s,72 °C 30 s,35个循环;72 °C 10 min。1.0%的琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。

表1 RET基因第7、12、13、15外显子引物序列

外显子	引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
7	F:5'-GAATCTCTACCCTCAGGCCATT-3'	64	358
	R:5'-ACCCTCCCTCCCTGGAG-3'		
12	F:5'-CTTTTCCGCCCTCTTCTCC-3'	64	293
	R:5'-GCATTGGGGGCTTTCAGGCT-3'		
13	F:5'-GACCTGGTATGGTCATGG-3'	62	254
	R:5'-AAGAGGGAGAACAGGGCTG-3'		
15	F:5'-CCCCGGCCAGGTCTCAC-3'	66	358
	R:5'-GCTCCACTAATCTTCGGTATCTTT-3'		

表2 RET基因7号外显子A432A位点基因频数和等位基因频率分布

组别	基因型(频数)				等位基因频率[频数,(%)]		
	AA	AG	GG	合计	A	G	合计
HSCR组	0	6	74	80	6(3.75)	154(96.25)	160(100)
对照组	0	17	63	80	17(10.62)	143(89.38)	160(100)

注:与对照组比较, $\chi^2 = 5.668, P < 0.05$

表3 RET基因13号外显子L769L位点基因频数和等位基因频率分布

组别	基因型(频数)				等位基因频率[频数,(%)]		
	TT	TG	GG	合计	T	G	合计
HSCR组	4	21	55	80	29(18.12)	131(81.88)	160(100)
对照组	17	47	16	80	81(50.63)	79(49.37)	160(100)

注:与对照组比较, $\chi^2 = 37.458, P < 0.01$

表4 RET基因7号外显子D489N位点基因频数和等位基因频率分布

组别	基因型(频数)				等位基因频率[频数,(%)]		
	GG	AG	AA	合计	G	A	合计
HSCR组	74	6	0	80	154(96.25)	6(3.75)	160(100)
对照组	79	1	0	80	159(99.38)	1(0.62)	160(100)

注:与对照组比较, $\chi^2 = 2.337, P > 0.05$

表5 RET基因15号外显子S904S位点基因频数和等位基因频率分布

组别	基因型(频数)				等位基因频率[频数,(%)]		
	CC	CG	GG	合计	C	G	合计
HSCR组	70	10	0	80	150(93.75)	10(6.25)	160(100)
对照组	74	6	0	80	154(96.25)	6(3.75)	160(100)

注:与对照组比较, $\chi^2 = 1.053, P > 0.05$

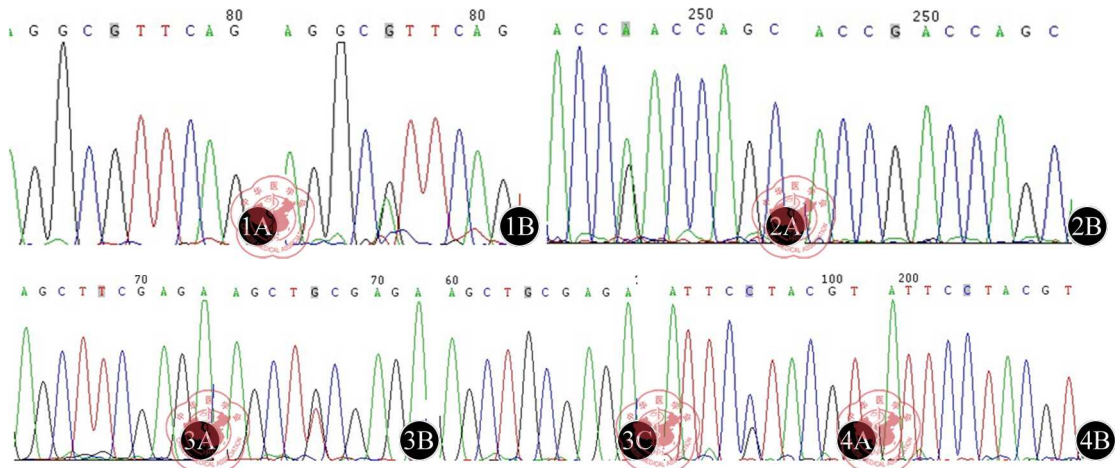


图1 7号外显子A432A位点。1A: GG基因型; 1B: AG基因型 图2 7号外显子D489N位点。
2A: AG基因型; 2B: GG基因型 图3 13号外显子L769L位点。3A: TT基因型; 3B: TG基因型;
3C: GG基因型 图4 15号外显子S904S位点。4A: CG基因型; 4B: CC基因型

3. 测序:采用PCR产物直接进行正反向测序的方法,样品纯化及序列分析由生工生物工程(上海)有限公司完成。所得序列与 GenBank 中正常人基因组序列比对,确定多态性位点。

4. 统计学分析:选择卡方检验(χ^2),检验水准 $\alpha = 0.05$,相对危险度(OR)以及95%可信区间,应用SPSS 13.0统计软件进行分析。

二、结果

80例HSCR汉族患儿和80例对照汉族儿童RET基因第7、12、13、15号外显子序列与GenBank中RET基因DNA序列(NG_007489)比对,发现在患儿和正常儿童中出现四种多态位点。分别是7号外显子A432A(GCA→GCG),D489N(GAC→AAC),13号外显子L769L(CCT→CTA)以及15号外显子S904S(TCC→TCG)(图1~4)。

其中,7号外显子A432A(GCA→GCG)位点对照组和病例组等位基因分布频率存在显著性差异, $\chi^2 = 5.668, P < 0.05$,风险等位基因为G等位基因,OR=3.05,95%可信区间(1.218~7.639)(表2)。13号外显子L769L(CCT→CTA)位点对照组和病例组等位基因分布频率存在显著性差异, $\chi^2 = 37.458, P < 0.01$,风险等位基因为G等位基因,OR=4.632,95%可信区间(2.832~7.577)(表3)。7号外显子D489N(GAC→AAC)(表4),15号外显子S904S(TCC→TCG)(表5)病例组和对照组比较无统计学差异, $P > 0.05$ 。SNP数据库已报道的RET基因7号、12号、13号外显子多态位点G446R、V454V、L746R、R749T、P785P本次试验尚未发现。

三、讨论

HSCR以肠道末端神经节细胞完全缺失的消化道发育畸形为特征。迄今为止,HSCR的病因尚未完全明了,研究表明疾病发生与遗传和环境等因素相关。在遗传因素中,HSCR表现为多基因疾病,与之相关的基因有RET、GDNF、NTN、EDN3等10余种^[1]。其中最主要的是RET原癌基因。迄今已发现多种RET基因突变,以及21个外显子中常见的7个基因多态性,分别为A45A、V125V、A432A、G691S、L769L、S836S、S904S,其中,A45A、L769L的基因多态性与HSCR显著相关^[9]。

由于遗传和环境对HSCR的重要作用,可能在不同种族和人群中基因发挥着不同的作用。本次研究结果显示,A432A、L769L基因多态性分布在正常组和对照组差异有统计学意义,风险等位基因均为G,说明这两个基因多态性可能与山西汉族人群的HSCR存在一定的相关性。而D489N、S904S基因多态性分布在对照组和病例组之间无统计学意义,推测该多态性位点可能与山西汉族HSCR的发展无关。已有文献报道,Borrego等^[10]首先发现L769L等位基因分布在HSCR中和对照组中的有显著差异,认为该位点可能与HSCR发病相关。Lantieri等^[11]发现高加索人中,L769L与S904S与HSCR发病相关。Garcia-Barcelo等^[12]发现中国香港人群中,RET基因多态位点A432A、L769L、S904S在病例组和对照组中等位基因分布有显著差异。刘翠平^[4]的研究发现S904S基因多态性与HSCR有关。该位点在中国浙江人群中为保护性因素。而杜寒松等^[5]证实湖北地区L769L等基因变异是一个普遍多态性,但未发现S904S多态性。Chin等^[8]发现台湾地区有D489N多态性,但未报道该位点与疾病的相关性。推测这可能由种族地域等遗传环境不同造成。本次试验未发现数据库已报道7、12、13、15号外显子G446R、V454V、L746R、R749T、P785P多态性改变。

本次研究结果与<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>数据库比对,未发现新的多态位点,还需扩大样本进一步研究分析确认是否山西省汉族无此多态位点。同时,本次研究通过80例山西汉族HSCR患儿RET基因多态性分析,首次提供中国山西省汉族人群RET基因7、12、13、15外显子基因多态性的遗传分布资料,为以后的关联分析,单倍型分析提供参考。

本次试验仅研究了山西汉族人群80例HSCR患儿RET基因部分外显子多态位与疾病的相关性。Yunia等^[13]研究表明部分内含子影响RET基因的表达,因此还需对余下的外显子及内含子多态位点以及更广泛的人群进行分析,构建单倍型,以

了解 RET 基因多态性与中国人群 HSCR 的相关性。

参 考 文 献

- [1] Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet*, 2001, 38: 729-739.
- [2] Attie T, Pelet A, Ederly P, et al. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 1995, 4: 1381-1386.
- [3] 郝长锁. 天津地区先天性巨结肠 RET 基因 13 号外显子基因多态性研究. 天津: 天津医科大学, 2009: 1-40.
- [4] 刘翠平. 中国汉族人群先天性巨结肠症与 RET、EDNRB 和 PHOX2B 基因的 SNPs 相关性研究. 浙江: 浙江大学, 2009: 1-107.
- [5] 杜寒松, 王国斌. RET 基因多态性与中国湖北地区汉族人群先天性巨结肠的相关性研究. *中华胃肠外科杂志*, 2006, 9: 152-156.
- [6] Tou J, Wang L, Liu L, et al. Genetic variants in RET and risk of Hirschsprung's disease in Southeastern Chinese: a haplotype-based analysis. *BMC Med Genet*, 2011, 12: 32.
- [7] Smigiel R, Lebiada A, Patkowski D, et al. Single nucleotide polymorphisms in the RET gene and their correlations with Hirschsprung disease phenotype. *J Appl Genet*, 2006, 47: 261-267.
- [8] Chin TW, Chiu CY, Tsai HL, et al. Analysis of the RET gene in subjects with sporadic Hirschsprung's disease. *J Chin Med Assoc*, 2008, 71: 406-410.
- [9] 王国斌, 杜寒松, 张颖, 等. 中国汉族人群 RET 基因多态性与先天性巨结肠的遗传易感性研究. *中华小儿外科杂志*, 2005, 26: 627-630.
- [10] Borrego S, Saez ME, Ruiz A, et al. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet*, 1999, 36: 771-774.
- [11] Lantieri F, Griseri P, Puppo F, et al. Haplotypes of the human RET proto-oncogene associated with Hirschsprung disease in the Italian population derive from a single ancestral combination of alleles. *Ann Hum Genet*, 2006, 70: 12-26.
- [12] Garcia-Barcelo MM, Sham MH, Lui VC, et al. Chinese patients with sporadic Hirschsprung's disease are predominantly represented by a single RET haplotype. *J Med Genet*, 2003, 40: e122.
- [13] Yunia S, Marco M, Jan O, et al. Variants in RET associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology*, 2011, 140: 572-582.

(收稿日期: 2011-06-13)

(本文编辑: 戚红丹)

李雪静, 赵文英, 张全斌, 等. 80 例山西汉族先天性巨结肠患儿 RET 基因单核苷酸多态性分析[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(19): 5775-5778.