

• 论 著 •

DNA 聚合酶基因在共济失调毛细血管扩张症家系突变状态的研究

刘 宇,王培昌[△]

(首都医科大学宣武医院检验科,北京 100153)

摘要:目的 通过对一个基因损伤修复缺陷性疾病共济失调毛细血管扩张症(AT)家系 DNA 聚合酶基因突变分析,初步观察其稳定突变位点,为上述疾病易感基因风险突变位点的进一步确定奠定基础。方法 对该家系先证者 DNA 聚合酶基因家族, polA、polB、polD1、polD2、polE1、polG 测序,检测突变位点,分析并筛选有意义突变位点;对该家系成员在先证者有意义突变区域直接测序。结果 AT 家系患儿 DNA 聚合酶基因无外显子突变,但在 polE1 12p24.3 132696619 A>G,该突变位置处于该基因的 3'UTR 下游;家系中患儿的母亲、外祖母及舅舅发生 12p24.3 132696619 A>G。结论 AT 家系先证者在 DNA 聚合酶基因外显子没有检测到突变位点,但在 3'UTR 位置检测到一个有意义突变位点,在家系成员中亦有突变,其可能为 AT 疾病的稳定突变位点。

关键词:共济失调毛细血管扩张症; DNA 聚合酶基因; 家系; 基因突变; 基因表达
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.07.014 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)07-0944-04

Study on mutation status of DNA polymerase genes in ataxia telangiectasia families

LIU Yu, WANG Peichang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100153, China)

Abstract: Objective To preliminarily observe the stable mutation site by analyzing DNA polymerase gene mutation in a family with ataxia telangiectasia(AT) as gene damage repair defect disease to lay the foundation of further determination of susceptibility gene risk mutation site of this disease. **Methods** The DNA polymerase gene families polA, polB, polD1, polD2, polE1, polG of the AT proband were performed the direct sequencing for analyzing and screening the meaningful mutation sites. The mutation regions of proband in the family members were directly sequenced. **Results** The child patient with AT had no mutation of exon in the DNA polymerase gene, but which happened at polE1 12p24.3 132696619 A>G. The mutation location was in the gene 3'UTR downstream. The family members sequencing results of the site mentioned above: the child's mother, grandmother and uncle happened 12p24.3 132696619 A>G. **Conclusion** Although no mutation site is not detected in DNA polymerase gene exon of the AT proband, there is a mutation site in the 3'UTR position, there are also mutations in family members, which may be a stable mutation site of AT.

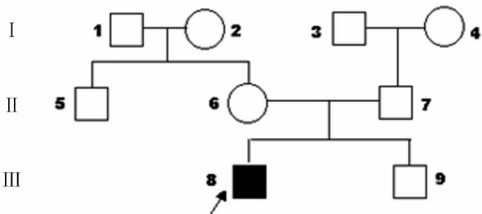
Key words: ataxia telangiectasia; DNA polymerase genes; family; gene mutation; gene expression

共济失调毛细血管扩张症(AT)是一种累及神经、皮肤、血管、内分泌系统、网状内皮系统等的罕见常染色体隐性遗传病,发病率约为 1:100 000~1:40 000^[1]。AT 累及多器官、多系统,并且有肿瘤易感性、基因组不稳定性、辐射敏感性、免疫缺陷、进行性小脑退变及性腺萎缩等诸多特点。该病有 4 个临床特征:恶性肿瘤的高发生率、婴幼儿期开始出现的进行性小脑共济失调、眼球结膜和皮肤毛细血管扩张、免疫缺陷所导致的反复感染^[2]。AT 患者约有 49% 患者有恶性肿瘤,其中最常见为淋巴网状内皮肿瘤,特别是淋巴瘤和淋巴性白血病,在 15 岁以下尤为突出^[3-4]。大量研究表明,AT 的致病基因为 AT 蛋白(ATM)。1995 年,以色列遗传学家克隆了该基因的部分序列并对该基因进行命名^[5]。同年,另有学者克隆并报道了 AT 基因的全部序列。AT 基因全长约 150×10³,编码序列约 12×10³,共有 66 个外显子。研究结果表明,野生型 AT 基因具有以下功能:(1)与 DNA 损伤修复有关;(2)降低 DNA 的重排;(3)调控抗原递呈和细胞免疫;(4)介导胰腺细胞对胰岛素的反应;(5)调控细胞凋亡;(6)与性成熟有关^[6]。如前所述, DNA 聚合酶基因家族不仅参与 DNA 损伤修复,还与肿瘤的发生关系密切,如在某些前列腺癌、乳癌、卵巢癌和结肠癌中发现 DNA polβ 的表达量比癌旁正常组织高数倍到数十倍^[7-8]。

本研究通过一个 AT 家系 polA、polB、polD1、polD2、polE1 和 polG 测序分析,初步揭示上述问题。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者收集自山东省平度地区家系。先证者为 12 岁男性患儿。家系图见图 1。



注:□表示健康男性,○表示健康女性,箭头表示先证者。1、2、3、4、5、6、7、8、9 分别为外祖父、外祖母、祖父、祖母、舅舅、母亲、父亲、先证者、弟弟。

图 1 山东省平度地区 AT 家系系图谱

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 采用聚合酶链式反应(PCR)仪(MG96G 杭州郎基科学仪器有限公司)、测序仪(3730xl DNA Analyzer)、离心机(Eppendor AG 22331 Hamburg)、电泳仪(君意电泳)、

凝胶电泳成像系统(君意电泳)。

1.2.2 主要试剂 采用全血 DNA 提取试剂盒(AxyPrep 爱思进公司)、纯化试剂盒(AxyPrep 爱思进公司),PCR 试剂为 EX Taq 酶(TaKaRa),dNTP(TaKaRa)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和处理 征得家系成员知情同意的情况下,当地采集家系成员 9 人的外周血 5 mL 置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,干冰保存运输回实验室。

1.3.2 提取患儿基因组 DNA 采用 Axygen 公司生产的离心柱式全血 DNA 提取试剂盒。提取过程详见试剂盒说明书。

1.3.3 提取的 DNA 质检 将提取到的总 DNA 用 1%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,凝胶成像系统(JY04S-3C, CHAINA)观察拍照。琼脂糖凝胶电泳条件:琼脂糖胶水平为

1%,电泳电压为 150 V,电泳时间 20 min,电泳所用的 Marker 为 λ DNA/Hind III Maker(Thermo,USA)。DNA 提取结果见图 2。



图 2 全血样品 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

1.3.4 引物设计 对 polA、polB、polD1、polD2、polE1 和 polG 外显子设计引物,引物设计采用 Primer Premier 5.0 专业软件,生工生物合成。外显子测序引物见下表 1(部分)。

表 1 polE1 外显子测序引物

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
polE-9556F	GGACCGCCTGACATTTCC	polE-39050F	GTTTGCAGTATTCACCACAGAT
polE-9766R	GTTTCCCCGCAAAGAAGC	polE-39884R	TTCTTGCCCTCACCTCAG
polE-15741F	CCTAGGCGACAGAGCAAGAC	polE-47131F	ACTACAGGCGCACTACCACG
polE-15882R	ACCTTCACATCTCCACCTG	polE-48091R	CCTACGGAGACAGAGTTCACAA
polE-16798F	AGTGCGCATTTCTGACTTCCT	polE-53043F	GAAGTCTAGGACTCCGAATAGC
polE-17523R	TGAGGGATCTTTTCCCTCT	polE-53796R	CAAGCACTCATGGGCAAA
polE-19301F	TTCTTCGGTTTGAACCTCTGG	polE-54024F	TGCTTGTCGTGATTGAATTG
polE-19657R	GGGGAAGAGCAGCAAACATA	polE-54843R	CCAGAACCAGCAACAGACC
polE-20367F	GGGTCTTCTCCAGCTCTA	polE-55169F	CCCTCGGGAATCTGAATAG
polE-21622R	ATGTGCCTGGTCACTGATGA	polE-55373R	AAGTGGCCCTGGTTAGAAA
polE-23313F	GGTGCCTGTTAGGAACCTTGC	polE-57722F	CAAAGTGGTGGGATTACAGG
polE-23856R	GAATTCTACTGCCGCTCTG	polE-59006R	TCCACTCGCCAACACTGAC
polE-24181F	GTTCAGCTTAGGTTCTTGAC	polE-60996F	TTAGGAGATGGGGTCTTGC
polE-24805R	GTCCACCAGAGACCCTGT	polE-61128R	CCACTGACTTGTGCTTTGC
polE-28081F	TGAATGTCTAAAAGGGGTTGG	polE-62642F	TGGTCTTTTCGTCCTTGGG
polE-29517R	AGGCAGTTGGGTTTCGTAAA	polE-62834R	CAGGGCTTTATCTTCAGCTACT
polE-31570F	TCTATCCTTCATACACCGACG	polE-64225F	TCAGGTGTCAGCGAGTGTTT
polE-33016R	CGAGAAACAACAGACAACCC	polE-64705R	GGTATGTCGGTGTCTTATCTT
polE-35336F	TCCTGCTGCCAAGTCGTGT	polE-70703F	TCCTCACCGATGGAAAAC
polE-36051R	TGGTCTCAAGTGATCCTCCC	polE-71375R	TAGAACGAAGCACCCACAA
polE-37511F	CAGCCTTGGTGTCTTCA	polE-72026F	CCTGTGGGTGCTTCGTT
polE-37725R	CCAACCTATTCCTCTCTCA	polE-73262R	TCCACCACTACTCAAATGCC

1.3.5 PCR 扩增 采用普通 PCR 技术,直接采用设计引物对上述 6 条基因的外显子进行扩增。PCR 扩增体系:10×Ex Buffer 5 μL,Mix dNTP4 Primer-F(10p) 1 μL、Primer-R(10p) 1 μL,EX Taq 酶 0.25 μL,DNA 模板 2 μL,灭菌 ddH₂O 50 μL。扩增参数(例):94℃ 5 min、94℃ 1 min、55℃ 30 s、72℃ 1 min、72℃ 10 min,35 个循环。PCR 扩增参数摸索,退火温度根据每对引物的 TM 值设定,延伸时间根据片段长度设定。

1.3.6 PCR 产物纯化 PCR 产物电泳后用 DNA 纯化试剂盒纯化。纯化过程见 Axygen 纯化试剂盒说明书。

1.3.7 PCR 产物测序 直接交于美吉生物医药科技有限公

司测序。

1.3.8 患儿目的基因序列分析 将上述测序结果用 Chromas 软件与美国 NCBI 基因库所公布的 polA、polB、polD1、polD2、polE1 和 polG 6 条基因外显子序列进行比对,寻找突变位点。发现突变位点后对该位点反向测序进行验证。

1.3.9 家系成员突变位点位置测序 提取家系成员基因组 DNA,对家系成员在上述比对结果所查找出的有意义突变位点位置进行 PCR 扩增、纯化、测序。

2 结 果

2.1 患儿 DNA 聚合酶基因突变位点信息 对 AT 家系先证

者 polA、polB、polD1、polD2、polE1 和 polG 6 条基因外显子测序发现,先证者在上述 6 条基因外显子上未发现突变,但在其他位置发现 4 个突变位点,结果见表 2。这 4 个突变位点均位

于 polE1 基因上,其中 3 个位于 polE1 内含子上,另一个位于 polE1 基因的 3'非编码区(3'UTR)。

表 2 AT 患儿 DNA 聚合酶基因非外显子区域突变位点分析

基因名称	染色体位置	编码/蛋白质	外显子/编号	外显子/区域	STAR	END	REF	ALT	位置
polE1	12p24.3	DNA 聚合酶 ε 催化亚基	EXON/8-11	20367/21662	21049	21049	A	G	intronic
polE1	12p24.3	DNA 聚合酶 ε 催化亚基	EXON/12-13	23313/23856	23487	23487	G	A	intronic
polE1	12p24.3	DNA 聚合酶 ε 催化亚基	EXON/25	37511/37725	37180	37180	T	C	intronic
polE1	12p24.3	DNA 聚合酶 ε 催化亚基	EXON/47-48	72026/73262	132696619	132696619	A	G	3'UTR 下游

2.2 家系成员突变位点分析 鉴于 3'UTR 对于基因表达重要调控作用及先证者 polE1 12p24.3 132696619 A>G 位置突变,本研究对该家系其他成员均进行了该位点检测。发现该家系中患儿的母亲、舅舅及外祖母亦有 12p24.3 132696619 A>G。此位点在家系中的突变情况见图 3。

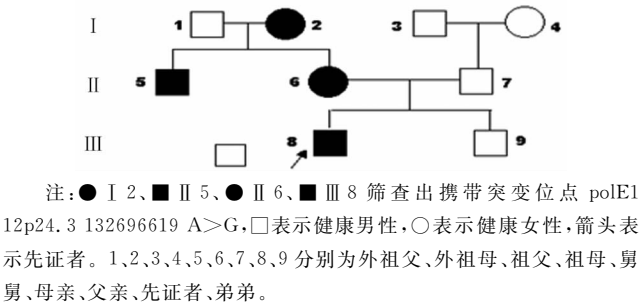


图 3 AT 家系 polE1 12p24.3 132696619 A>G 携带示意图

3 讨 论

AT 是一种罕见的常染色体单基因隐性遗传性疾病,以进行性小脑共济失调、免疫缺陷、染色体不稳定、早期衰竭、不完全性成熟、生长发育迟缓、对电离辐射极度敏感、肿瘤易感性、胰岛素抵抗型糖尿病及缺血性心脏病为特点^[9-11]。

当患者出现 AT 的某些基本症状后就应该怀疑患病。除上述症状外,若伴有典型症状毛细血管扩张,可确定诊断。对于有共济失调表现的儿童,应检测染色体核型、血清甲胎蛋白(AFP)、细胞和体液免疫功能,上述检查均有利于 AT 的早期诊断。AFP>10 ng/mL(1 岁以上儿童)且无其他部位病变(肝脏、睾丸、胰腺等)可视为异常。Verhagen 等^[12]报道的所有多样 AT 案例中,最易获得的是血清 AFP 测量值。但也有 AFP 为正常值或边缘值的 AT 患者报道,约占 AT 总患者数的 5%^[13],故 AFP 应作为 AT 诊断的必要检查。此外,ATM 基因突变检测有助于 AT 诊断和风险预测。AT 患儿淋巴造血干细胞在 1 Gy 放射强度下存活率小于 21%,而健康者大于 36%^[14]。研究发现,免疫印迹法检测淋巴细胞内的 ATM 蛋白有助于该病诊断,淋巴细胞系在大于 95% 的 AT 患儿 ATM 蛋白表达低下,小于 1% 的 AT 患儿 ATM 蛋白正常^[15]。

近年来,国内外对 AT 的研究较为深入,发现 AT 患者细胞在暴露于电离辐射(X 线、γ 线)、博来霉素等后存活率降低、染色体畸变和断裂频率增多;同时发现,AT 患者细胞伴多种 DNA 修复机制缺陷,包括 DNA 链断裂重接障碍、切除修复异常等;另外,研究还发现 AT 细胞在 X 线、博来霉素等处理后,DNA 合成并不像正常细胞一样受到抑制^[16-17]。大量研究表明,AT 的致病基因是 AT 突变基因,后者属于磷脂酰肌醇-3-

OH-激酶家族,其参与了 DNA 损伤识别和修复、细胞周期调控、降低氧化应激反应及保护端粒等过程。

如前所述,DNA 聚合酶在 DNA 复制、损伤修复、重组、S 期关卡调控、线粒体 DNA 复制等过程中均起着十分重要的作用,且与肿瘤的发生和发展密切相关。但目前尚未发现 DNA 聚合酶基因与 AT 有何关联。

本研究选取一个 AT 家系为研究对象,该家系来源于山东省平度地区,家系成员有先证者、其外祖父、外祖母、祖父、祖母、舅舅、母亲、父亲、弟弟。先证者为男性患儿,12 岁,自幼有显著精神运动发育迟缓,反应迟钝、智力减退。身材矮小消瘦,皮肤色素沉着,头发黄。18 个月起病,3~5 岁病情相对平稳,随后加重,随访时已不能正常和人交流对话。2008 年患儿于北京大学医学部遗传所进行 AT 基因检测,随后确诊为 AT。父母生育二胎,母亲怀孕时曾行羊水穿刺,做 AT 基因检测,未见异常。现二胎 3 岁,发育正常,未见发病,家系中也未有其他人患此病。

本研究对家系先证者和家系成员进行 polA、polB、polD1、polD2、polE1 和 polG 基因测序,发现先证者在 polE1 12p24.3 有 4 个非外显子区域突变位点。其中,在内含子位置上 3 个突变位点分别是 polE1 12p24.3 21049 A>G;polE1 12p24.3 23487 G>A;polE1 12p24.3 12p24.3 37180 T>C;另一位点位于该基因的 3'UTR 区域,polE1 12p24.3 132696619。鉴于 3'UTR 对于基因表达重要调控作用,本研究对该家系其他成员均进行了该位点检测。家系中先证者的母亲、舅舅及外祖母亦有 12p24.3 132696619 A>G。

3'UTR 结构包含从终止密码子到 3'末端之间的区域,是长度为 1 000 个左右的核苷酸,典型真核生物信使核糖核酸(mRNA)前体 3'末端具有高度保守的序列(AAUAAA)。该区域对于真核生物的基因表达有重要的调节作用,参与调节转录本的稳定性、定位和翻译^[18]。该区域的基因突变能影响微小核糖核酸(miRNA)的结合,导致 miRNA 对 mRNA 转译后调控作用的异常,与多种疾病的发生相关。本研究发现先证者及部分家系成员 3'UTR 区域 12p24.3 132696619 A>G,该位点的突变直接影响靶基因与 miRNA 的结合,提示先证者发病与该位点的突变有一定关联。

本研究发现了在某 AT 家系中存在的潜在易感突变位点,但它与疾病之间是否存在必然关系还需在更多样本中验证。此外,还需继续对 DNA 聚合酶基因家族扩大测序范围,以找到 DNA 聚合酶基因对该病的易感突变位点。本研究提示,深入开展 DNA 聚合酶基因功能研究对于探索该病的发病机制具有重要意义。

本研究对一个 AT 家系成员进行 DNA 聚合酶基因测序,

在先证者中发现 4 个突变位点: polE1 12p24. 3 21049 A>G、polE1 12p24. 3 23487 G>A、polE1 12p24. 312p24. 3 37180 T>C、polE1 12p24. 3 132696619。在未发病的家系成员测序发现该先证者的母亲、舅舅及外祖母亦有 12p24. 3 132696619 A>G。

参考文献

- [1] 南京铁道医学院生物教研室. 共济失调毛细血管扩张症基因研究进展[J]. 国外医学遗传学分册, 1999, 22(3): 129-133.
- [2] Berg BO. Principles of Child Neurology[M]. Columbus: McGraw-Hill Education, 1996: 891-892.
- [3] Report of WHO Sceentific Group. Primary immunodeficiency diseases[J]. Clin and Exp Immunol, 1995, 99(Suppl): 8-9.
- [4] Aicardi J, Bax M, Ogier H, et al. Diseases of the nervous system in childhood[M]. London: Mackeith Press, 1992: 218.
- [5] Nowak R. Discovery of AT Gene Sparks Biomedical Research Bonanza[J]. Science, 1995, 268(5218): 1700.
- [6] Gungor T, Buhning I, Cremer R, et al. Pathogenesis, diagnosis, clinical and therapeutic aspects of ataxia telangiectasia[J]. Klin Padiatr, 1997, 209(5): 328-335.
- [7] Bergoglio V, Canitrot Y, Hogarth L, et al. Enhanced expression and activity of DNA polymerase beta in human ovarian tumor cells: impact on sensitivity towards antitumor agents[J]. Oncogene, 2001, 20(43): 6181-6187.
- [8] Srivastava HC, Wilson SH. DNA polymerase β expression differences in selected human tumors and cell lines[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(6): 1049-1054.
- [9] Foster CR, Zha Q, Daniel LL, et al. Lack of ataxia telangiectasia mutated kinase induces structural and functional

changes in the heart; role in β -adrenergic receptor-stimulated apoptosis[J]. Exp Physiol, 2012, 97(4): 506-515.

- [10] Gorr MW, Stevens SC, Wold LE. Ataxia telangiectasia mutated kinase in the heart: currency for myocyte apoptosis[J]. Exp Physiol, 2012, 97(4): 476.
- [11] Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA, et al. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(18): 2977-3006.
- [12] Verhagen MM, Abdo WF, Willemsen MA, et al. Clinical spectrum of ataxia-telangiectasia in adulthood[J]. Neurology, 2009, 73(6): 430-437.
- [13] Saunders-Pullman RJ, Gatti R. Ataxia-telangiectasia: without ataxia or telangiectasia[J]. Neurology, 2009, 73(6): 414-415.
- [14] Sun X, Becker-Catania SG, Chun HH, et al. Early diagnosis of ataxia-telangiectasia using radiosensitivity testing[J]. J Pediatr, 2002, 140(6): 724-731.
- [15] Chun HH, Sun X, Nahas SA, et al. Improved diagnostic testing for ataxia-telangiectasia by immunoblotting of nuclear lysates for ATM protein expression[J]. Mol Genet Metab, 2003, 80(4): 437-443.
- [16] Auerbach AD, Verlander PC. Disorders of DNA replication and repair[J]. Curr Opin Pediatr, 1997, 9(6): 600-616.
- [17] Dikom EE, Dahm-Daaphi J, Brammer I, et al. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines[J]. Int J Radiat Biol, 1998, 73(3): 269-278.
- [18] 王海震, 王莹, 刘定干. 真核生物 mRNA3' 非翻译区的功能[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(9): 980-985.

(收稿日期: 2016-12-30 修回日期: 2017-01-21)

(上接第 943 页)

扩大样本量进一步分析或者进行前瞻性研究分析。

参考文献

- [1] Donington JS, Colson YL. Sex and gender differences in Non-Small cell lung cancer[J]. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 23(2): 137-145.
- [2] Froesch P, Martucci F, Gyorik S, et al. Management of non-small cell lung cancer in the elderly[J]. Eur J Intern Med, 2014, 25(10): 888-894.
- [3] 刘仁旺, 刘京豪, 李昕, 等. EGFR 19 和 21 外显子突变肺癌患者的临床特征比较和预后分析[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(11): 804-811.
- [4] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-386.
- [5] Nakamura H, Ando K, Shinmyo T, et al. Female gender is an Independent prognostic factor in Non-Small-Cell lung cancer: a Meta-Analysis [J]. Ann Thorac Cardiovasc

Surg, 2011, 17(5): 469-480.

- [6] Hsu LH, Chu NM, Liu CC, et al. Sex-associated differences in non-small cell lung cancer in the new era: is gender an Independent prognostic factor[J]. Lung Cancer, 2009, 66(2): 262-267.
- [7] 彭宇, 李峥, 熊艳丽, 等. 晚期非小细胞肺癌不同含铂两药方案一线化疗预后因素的分析[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(16): 1703-1708.
- [8] Arinc S, Ece F, Ertugrul M, et al. Analysis of young and elderly advanced stage non-small-cell lung carcinoma cases[J]. South Med J, 2009, 102(10): 1019-1022.
- [9] Yim SH, Chung YJ. Molecular epidemiology of female lung cancer[J]. Cancers(Basel), 2011, 3(2): 1861-1876.
- [10] Bichev SN, Marinova DM, Slavova YG, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in East European non-small cell lung cancer patients[J]. Cell Oncol(Dordr), 2015, 38(2): 145-153.

(收稿日期: 2016-12-21 修回日期: 2017-01-12)