

中国江苏地区健康人群CFTR基因M470V多态性分析132例

黄沁, 丁炜, 魏睦新

背景资料
囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)是广泛分布于上皮细胞顶膜的氯离子通道。CFTR基因突变引起CFTR蛋白缺失或异常可导致囊性纤维化(CF)。CF在白种人中是最常见的常染色体隐性遗传性疾病。M470V是外显子10上470位点碱基氨基酸发生替换属于错义突变,引起CFTR蛋白氯离子通道活性改变导致疾病。本文分析了江苏地区132名健康人CFTR基因M470V多态性。

黄沁, 丁炜, 魏睦新, 南京医科大学第一附属医院中医科 江苏省南京市 210029
江苏省中医药领军人才基金资助项目, No. 2006-01
通讯作者: 魏睦新, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院中医科. weimuxin@njmu.edu.cn
电话: 025-83718836-6267
收稿日期: 2007-07-19 修回日期: 2007-10-20

Polymorphisms of M470V genotypes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in 132 healthy people in Jiangsu Province of China

Qin Huang, Wei Ding, Mu-Xin Wei

Qin Huang, Wei Ding, Mu-Xin Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Key Talents of Traditional Chinese Medicine Foundation from the Government of Jiangsu Province, No. 2006-01

Correspondence to: Dr. Mu-Xin Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. weimuxin@njmu.edu.cn
Received: 2007-07-19 Revised: 2007-10-20

Abstract

AIM: To investigate the polymorphic backgrounds of the cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator gene (CFTR) in Chinese people and the correlation between these polymorphisms and those in Caucasians and other Asian populations.

METHODS: Polymerase chain reaction was used to amplify Exon 10 of the CFTR gene. *Hph* was used to detect the M470V polymorphism.

RESULTS: The M/V polymorphism at position 470 was similar to that in Caucasians and other Asian populations. The V allele was slightly more frequent than the M allele (50.00% vs 43.94%). The frequency of genotypes MV, VV and MM was 45.5%, 33.3% and 21.21%, respectively.

CONCLUSION: The data on the M470V poly-

morphism in exon 10, provide genotype information for the CFTR gene.

Key Words: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene; Polymorphism; M470V genotypes

Huang Q, Ding W, Wei MX. Polymorphisms of M470V genotypes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in 132 healthy people in Jiangsu Province of China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3664-3667

摘要

目的: 研究中国人CFTR基因外显子10 M470V等位基因背景并与亚洲其他各国及高加索人种对比。

方法: 应用PCR技术对无亲缘关系的132位中国江苏地区健康人外周血样品进行CFTR外显子10片段扩增及*Hph* 限制性内切酶酶切方法分析M470V基因型及等位基因型。

结果: 中国江苏地区健康人CFTR基因外显子10 M470V等位基因与亚洲其他国家及高加索人相似, V470等位基因频率(56.06%)高于M470等位基因频率(43.94%), MV基因型频率最高为45.45%, 其次为VV基因型33.33%, MM基因型21.21%。

结论: 通过此次筛查, 首次获得了中国江苏地区CFTR Exon 10 M470V等位基因分型数据, 为中国CFTR基因及其相关疾病的研究提供了重要的遗传学资料。

关键词: CFTR基因; 多态性; M470V基因型

黄沁, 丁炜, 魏睦新. 中国江苏地区健康人群CFTR基因M470V多态性分析132例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3664-3667
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3664.asp>

0 引言

囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是位于上皮细胞顶膜的氯离子通道。CFTR广泛

分布于人体组织,如胆管上皮、呼吸道、消化道、生殖道及尿道等组织,对于跨上皮细胞的盐类运输、液体流动及离子浓度调节等具有重要的作用^[1]. CFTR基因突变引起CFTR蛋白缺失或异常可导致囊性纤维化(cystic fibrosis, CF). CF在白种人中最常见的致死性常染色体隐性遗传性疾病,而在亚洲人中却较少发生. M470V多态性是CFTR基因在外显子10上470位点A→G多态导致的氨基酸替换,其突变等位基因M/V多态性能够影响CFTR蛋白氯离子通道功能^[2-5]. CFTR基因是重要的氯离子通道, M470V多态性与CFTR蛋白氯离子通道功能相关. 在国外, CFTR基因突变及多态性一直是研究热点. 而我国却较少对其研究,可能与CFTR基因的突变在亚洲人中少见有关, M470V多态性在我国人群中的分布未见报道. 为了解中国人群中CFTR基因背景,我们首次分析了江苏地区132名健康人CFTR基因M470V多态性,为中国CFTR基因及其相关疾病的研究提供重要的遗传学资料.

1 材料和方法

1.1 材料 根据知情同意原则,男女不限,在江苏地区采集132例外周血样品. 每份样品均为健康个体外周血液标本, EDTA抗凝, -80℃保存.

1.2 方法

1.2.1 模板DNA制备和PCR扩增反应体系: 应用QIAamp Blood DNA Mini Kit(德国Qiagen公司)提取外周血基因组DNA, 操作步骤按说明书进行. 根据参考文献^[2]设计CFTR Exon 10上游引物: 5'-TTGTGCATAGCAGAGTACCTGAAA-3', 下游引物: 5'-GCTTCTTAAAGCATAGGTCATGTG-3', 扩增产物506 bp. 引物由上海英俊生物公司合成、纯化及鉴定. PCR反应液总体积为50 μL, 基因组DNA 100 ng, 10×Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Plus)5 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol)4 μL, 50 μmol/L的上下游引物各1 μL, Ex Taq Polymerase(5×10⁶ U/L)0.3 μL(TaKaRa大连生物工程有限公司), 加灭菌去离子水至终体积50 μL. 反应参数为: 94℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环, 72℃延伸10 min. PCR扩增产物5 μL, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电压为120 V, 时间约30 min, 凝胶成像系统(美国BLO-RAD公司)分析结果(图1). 用High Pure PCR Product Purification kit(Roche公司)纯化PCR阳性扩增反应液, 操作步骤按说明书进行.

1.2.2 Hph 限制性内切酶酶切鉴定: M470V基因型20 μL反应体积, 其中纯化PCR反应产物5

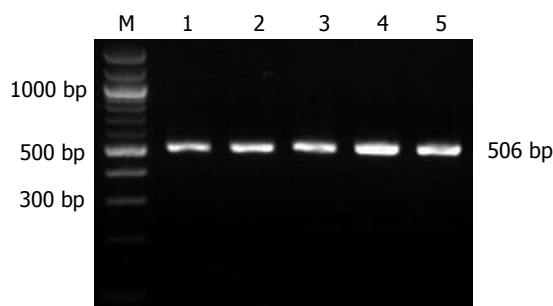


图1 Exon 10 PCR扩增结果.

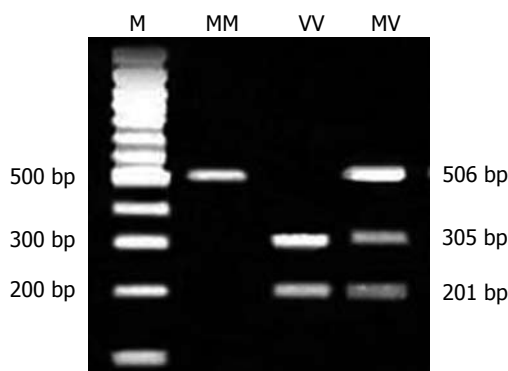


图2 M470V *Hph* I 酶切结果.

μL, 10×NE Buffer 2 μL, *Hph* I 0.5 μL(NEB公司), 灭菌去离子水12.5 μL, 37℃孵育过夜, 20 μL酶切产物上样电泳, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电压为100 V, 时间约50 min. 凝胶成像系统(美国BLO-RAD公司)分析并记录、保存实验结果, 鉴定M470V基因分型(图2).

2 结果

2.1 CFTR基因M470V多态位点基因型与等位基因频率 CFTR基因外显子10 M470V有3种基因分型, 分别为MM、MV、VV基因型. 我们分析了132例研究对象, 发现MV基因型频率最高(45.5%), 其次为VV基因型(33.3%), MM基因型(21.2%). 264条DNA链中, V470等位基因频率高于M470等位基因频率, 分别为56.1%和43.9%.

2.2 中国江苏地区人群与其他国家CFTR基因M470V多态位点基因型与等位基因频率 中国人CFTR基因外显子10 M470V等位基因与亚洲其他国家及高加索人相似, V470等位基因频率均高于M470等位基因频率, MV、VV、MM三种基因型分布频率也与亚洲其他国家及高加索人相似(表1).

3 讨论

CFTR基因是一种重要的氯离子通道. 1989年,

研发前沿
CFTR基因是重要的氯离子通道, M470V多态性与CFTR蛋白氯离子通道功能相关. 在国外, CFTR基因突变及多态性一直是研究热点, 而我国却较少对其研究. M470V多态性在我国人群中的分布未见报道.

相关报道
CFTR基因突变频率及热点因地域、种族不同而有差异. CFTR基因的突变在亚洲人中少见. 日本、韩国、越南等国家对本国人群的CFTR基因做了大量筛查, 未发现白种人中常见的CFTR基因严重突变, 而M470V突变表型与类CF疾病的发生相关.

应用要点

本文对我国正常人群CFTR基因M470V多态性进行研究分析,有助于了解我国人群CFTR基因突变基因携带者情况,为我国CFTR基因突变及CFTR蛋白功能异常所致的疾病如支气管扩张、慢性胰腺炎、CBAVD等的研究提供重要的遗传学资料。

表 1 中国江苏地区人群与其他国家^[1]CFTR基因M470V多态位点基因型与等位基因频率

种群(n)	基因型数量及频率n(%)			等位基因数量及频率2n(%)	
	MM	MV	VV	M	V
Chinese(132)	28(21.2)	60(45.5)	44(33.3)	116(43.9)	148(56.1)
Caucasians(50)	9(18.0)	22(44.0)	19(38.0)	40(40.0)	60(60.0)
Japanese(50)	8(16.0)	19(38.0)	23(46.0)	35(35.0)	65(65.0)
Vietnamese(495)	106(21.4)	250(50.5)	139(28.1)	460(46.7)	528(53.3)

Riordan *et al*^[6]首次克隆了CFTR基因,其位点在第七对常染色体的长臂上(7q31),全长250 kb,共有27个外显子和26个内含子;cDNA全长6129 bp,含1480个氨基酸,分为12个跨膜片段(M1-M12)。目前已报道CFTR基因有1000多种突变和200多种多态现象^[7]。其中最常见的突变为 Δ F508,即外显子10上3-bp缺失引起蛋白质508位点苯丙氨酸丢失, Δ F508约占CFTR基因突变的35%^[8]。CFTR基因突变引起CFTR蛋白缺失或异常可导致囊性纤维化(CF)。CF是白种人中最常见的常染色体隐性遗传性疾病,发病率以西欧、北欧及北美人群为高,约为1/2500,而在亚洲人种中发病率很低,约1/100 000^[9]。CF患者几乎所有的外分泌功能都会受影响,但变异很大,多以肺和胰腺受累为主。由于外分泌液黏性增大,可阻塞分泌管腔,从而引起相应的临床表现。如在肺部,可阻塞气道,引起肺部感染,最后引起严重的、弥漫性的支气管扩张;在胰腺,由于胰液分泌受阻,引起消化不良、胰腺自身消化、慢性胰腺炎、胰腺纤维化。CFTR基因突变频率及热点因地域、种族不同而有差异,CFTR基因的突变在亚洲人中少见。日本、韩国、越南等国家对本国人群的CFTR基因做了大量筛查,均未发现在白种人中常见的CFTR基因严重突变,如 Δ F508、N1303K、 Δ I507、W1282A、R117A、R334W、R1162X、2789+5G-A等^[2,4,10-12]。CFTR基因突变可分以下5种^[13]:(1)无义突变,(2)错义突变,(3)移码突变;(4)剪接位点突变,(5)密码子缺失如 Δ F508。这些突变可分为如下5级:1级:蛋白生物合成缺陷,2级:蛋白加工成熟缺陷,3级:氯离子通道调控缺陷,4级:氯离子传导或门控功能下降,5级:蛋白质合成功能下降。这一级突变包括启动子突变、核苷酸和氨基酸替换,他们减少了结构及功能正常的CFTR蛋白数量。一般认为1、2或3级较4或5级有更严重的表型后果。M470V属于错义突变,是外显子10上470位点碱基

氨酸发生了替换。研究表明M470V多态现象能够影响CFTR蛋白氯离子通道活性,V470等位基因型CFTR蛋白通道活性低于M470等位基因型蛋白通道活性^[3]。日本、韩国、越南等亚洲国家均对CFTR基因突变及多态性做了人群背景研究,而我国对该基因的研究却较少。有学者认为,虽然中国人CF发病率较高加索人低,但突变等位基因的绝对量可能相当大^[14]。如果按中国人CF发病率为1/100万计,至少有200万以上的CFTR突变基因携带者。目前我国尚未见对CFTR基因M470V多态位点的研究报道。我们首次分析了中国江苏地区132例正常人群CFTR基因M470V多态性,结果显示我国以MV基因型为主(45.45%),其次为VV型(33.33%)、MM型(21.21%),V470等位基因频率为56.06%,分别低于日本人群65%及高加索人群60%。我国M470V基因型及等位基因频率与越南相似,可能与我国同越南地域差异不大有关。通过此次筛查,我们首次获得了中国江苏地区CFTR Exon 10 M470V等位基因分型数据,为我国CFTR基因及其相关疾病的研究提供了重要的遗传学资料。本实验仅筛查了外显子10 M470V基因分型,至于其与CFTR常见突变相关性及其CFTR蛋白功能异常所致疾病如支气管扩张、慢性胰腺炎、CBAVD(congenital bilateral absence of the vas deferens)等相关性仍有待进一步研究。

4 参考文献

- Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999; 79: S23-S45
- Fujiki K, Ishiguro H, Ko SB, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2004; 41: e55
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic

- (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998; 101: 487-496
- 4 Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2321-2332
- 5 Tzetzis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E, Doudounakis S, Kanavakis E. CFTR gene mutations--including three novel nucleotide substitutions--and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet* 2001; 108: 216-221
- 6 Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073
- 7 Turcios NL. Cystic fibrosis: an overview. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 307-317
- 8 Kilinc MO, Ninis VN, Dagli E, Demirkol M, Ozkinay F, Arikan Z, Cogulu O, Huner G, Karakoc F, Tolun A. Highest heterogeneity for cystic fibrosis: 36 mutations account for 75% of all CF chromosomes in Turkish patients. *Am J Med Genet* 2002; 113: 250-257
- 9 Findlay I. Approaches for cystic fibrosis diagnosis. *Hum Reprod* 1997; 12: 166-169
- 10 Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, Fujiki K, Ko SB, Mizuno N, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Jin C, Suzuki R, Kitagawa M, Tsuda T, Kondo T, Hayakawa T. A finger sweat chloride test for the detection of a high-risk group of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: e80-e85
- 11 Nam MH, Hijikata M, Tuan le A, Lien LT, Shojima J, Horie T, Nakata K, Matsushita I, Ohashi J, Tokunaga K, Keicho N. Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese. *Am J Med Genet A* 2005; 136: 249-253
- 12 Kimura S, Okabayashi Y, Inushima K, Yutsudo Y, Kasuga M. Polymorphism of cystic fibrosis gene in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2007-2012
- 13 Wine JJ, Kuo E, Hurlock G, Moss RB. Comprehensive mutation screening in a cystic fibrosis center. *Pediatrics* 2001; 107: 280-286
- 14 Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Genet* 1999; 104: 511-515

同行评价
本文采用分子生物学研究手段, 方法先进, 结论客观, 有一定的临床意义。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 2007 年 1 - 11 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 2007年1-48期共发表文章1120篇, 其中国际文章791篇, 占71%; 国内文章329篇, 占29%。社论63篇, 综述30篇, 专题亮点139篇, 文章663篇(基础研究和临床研究), 病例报告193篇, 读者来信等32篇, 评论性文章占发文总量的21%。2007年1-11月份共收稿2432篇, 其中国内稿件912篇, 占38%; 国外稿件1520篇, 占62%; 退稿1000篇, 退稿率为41%。(常务副主任: 刘晔 2007-11-15)