

文章编号 1006-8147(2014)02-0108-03

论著

# 天津地区肠无神经节细胞症 RET 基因 13 号外显子 基因多态性研究

孟庆娅<sup>1,2</sup>, 詹江华<sup>2</sup>

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.天津市儿童医院外科,天津 300074)

**摘要** 目的:探讨 RET 基因 13 号外显子的基因多态性改变与肠无神经节细胞症(HSCR)的发生关系。方法:提取 74 例 HSCR 患者和 53 例与胃肠道疾病无关的对照组病人的全血 DNA,聚合酶链反应(PCR)扩增 RET 基因 13 号外显子,纯化,应用直接测序方法分析 13 号外显子的基因表达情况。结果:在 HSCR 组与对照组中,RET 基因 13 号外显子存在 T769G 基因多态性改变,其基因型频率在 HSCR 组中为 GG78.27%,GT18.93%,TT2.8%;在对照组中为 GG58.5%,GT15.1%,TT26.4%。等位基因频率在 HSCR 组中为 G:87.84%,T:12.16%;在对照组中为 G:66.0%,T:34.0%。两组的基因型和等位基因频率差异均有统计学意义( $\chi^2=18.383, P<0.001$ ;  $\chi^2=19.834, P<0.001$ )。结论:RET 基因 13 号外显子的 T769G 基因多态性改变与先天性巨结肠的发生可能相关。**关键词** 巨结肠,先天性;RET 基因;原癌基因;单核苷酸多态性

中图分类号 R725.7

文献标志码 A

## Study of RET proto-oncogene exon 13 DNA Polymorphism in patients with Hirschsprung's disease in Tianjin district

MENG Qing-ya<sup>1,2</sup>, ZHAN Jiang-hua<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Surgery, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China)

**Abstract Objective:** To investigate the relationship between RET proto-oncogene exon 13 DNA Polymorphism and Hirschsprung's disease. **Methods:** Genomic DNA was extracted from whole blood samples from 74 patients with Hirschsprung's disease and 53 control children. Polymerase chain reaction (PCR) amplified the 13 exon of the RET proto-oncogene. Direct DNA sequencing was carried out after purification, and gene expression was detected. **Results:** In HSCR group and control group, T769G polymorphism was found. The genotype frequencies of T769G were GG78.27%, GT18.93% and TT2.8% in HSCR group, and GG58.5%, GT15.1% and TT26.4% in control group. The allele frequencies of T769G were G87.84% and T12.16% in HSCR group, while in control group the frequencies were G66.0%, T34.0%. Significant statistic difference was found in genotype and allele frequency ( $\chi^2=18.383, P<0.001$ ;  $\chi^2=19.834, P<0.001$ ). **Conclusion:** These findings suggest that the T769G polymorphism in the RET proto-oncogene Exon 13 may contribute to the occurrence of Hirschsprung's disease.

**Key words** Hirschsprung's disease, congenital; RET gene; proto-oncogene; SNPs

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HSCR)又称肠无神经节细胞症,是小儿比较常见的先天性消化系统疾病,其主要病理特征为结肠或直肠的肌层及黏膜下层神经节细胞缺失,造成病变段肠管痉挛收缩,近端肠管代偿性扩张,从而导致小儿严重的肠梗阻及便秘等消化道症状。目前的研究表明 HSCR 的发生与多种基因有关,其中 RET 基因是最主要的易感基因<sup>[1]</sup>。已经有报道显示 50%的家族性和 10%~20%的散发性巨结肠有 RET 基因的突变<sup>[2-3]</sup>。RET 基因位于染色体 10q11.2 上,编码酪氨酸激酶

受体,共有 21 个外显子。在以往的研究中,有学者证实 RET 基因突变和基因多态性与 HSCR 的发生相关<sup>[4-5]</sup>。笔者利用直接测序方法筛查 74 例 HSCR 患者血标本的 DNA,并以 53 例与胃肠道疾病无关的病人作为对照,了解 HSCR 患者 RET 基因 13 号外显子的基因表达的规律。

### 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 收集 2010 年 5 月-2013 年 5 月在天津儿童医院外科就诊的 HSCR 患者的血标本 74 例,男 58 例,女 16 例;所有患者均经手术病理证实为 HSCR。其中 72 例散发性病例,2 例为家族性 HSCR(父亲为巨结肠,儿子也为巨结肠);74 例患者

基金项目 天津市委基金资助项目(033606111)

作者简介 孟庆娅(1975-),女,副主任医师,硕士在读,研究方向:小儿外科学;通信作者:詹江华, E-mail:zhanjianghuatj@163.com。

中长段型 8 例,其余为短段型,没有全结肠型巨结肠。对照组 53 例病人均采自与胃肠道无关的小儿腹股沟斜疝或小儿血管瘤的血标本。

## 1.2 方法

1.2.1 标本采集及保存 于术前抽取静脉经 EDTA 抗凝全血 2 mL,用盐析法提取基因组 DNA,Tris-EDTA 溶解,放置, -20℃ 备用。

1.2.2 引物序列 外显子 13, 上游引物: GAACTTGGGCAAGGCGATGC;下游引物:ACCTCAC-CCTGCAGCTGGC;扩增片段长度为 231bp,所有引物由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.3 反应条件 总量 25  $\mu$ L,PCR 共 35 个循环,首先 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 变性 40 s,61℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min。

1.2.4 测序 由上海生工生物工程技术有限公司对琼脂糖凝胶电泳检验合格的 PCR 产物进行测序分析,并与基因库中数据对比,找出相应突变碱基。

1.3 统计学处理 统计学方法采用  $\chi^2$  检验分析病例组与对照组基因型和等位基因频率的差异显著性,均在 SPSS13.0 版软件包上完成。

## 2 结果

正常对照组与 HSCR 组外显子 13 突变分析:外显子 13 上存在 T769G 基因多态性改变,在 HSCR 组与对照组中出现 3 种基因型,分别为 GG, GT, TT(图 1,2,3)。在 HSCR 组中,3 种基因型频率分别为 78.27%、18.93%、2.8%,在对照组中基因型频率分别为 58.5%、15.1%、26.4%;在 HSCR 组中,其中 G 和 T 的基因构成比分别为 87.84% 和 12.16%。在对照组中,G 和 T 的基因构成比分别为 66.0% 和 34%(表 1)。两组中突变型 G 等位基因占有明显优势。采用  $\chi^2$  检验进行统计学分析表明,两组间基因型和基因频率差异均有统计学意义 ( $\chi^2=18.383, P<0.001; \chi^2=19.834, P<0.001$ )。

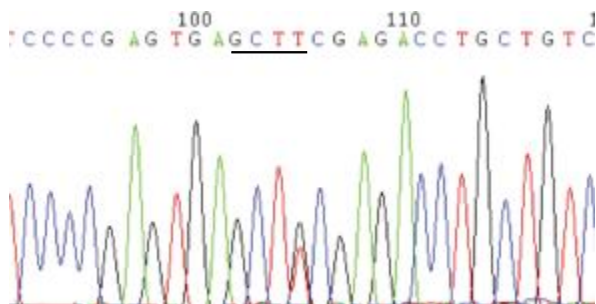


图1 RET 基因 13 号外显子 769 位点杂合子 G/T 基因型

Fig 1 Exon 13 of RET gene 769 loci heterozygous with G/T genotype

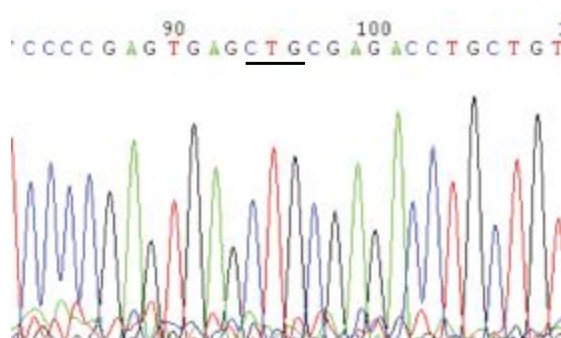


图2 RET 基因 13 号外显子 769 位点纯合子 G/G 基因型

Fig 2 Exon 13 of RET gene 769 loci homozygote with G/G genotype

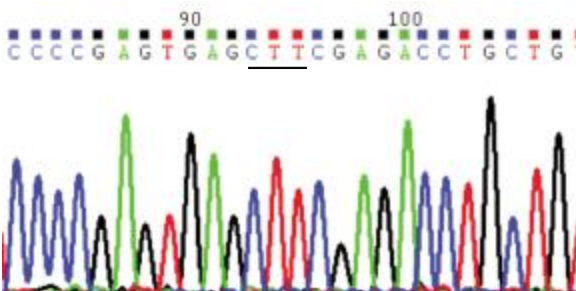


图3 RET 基因 13 号外显子 769 位点纯合子 T/T 基因型

Fig 3 Exon 13 of RET gene 769 loci homozygote with T/T genotype

表1 密码子 769 基因型与等位基因频率

Tab 1 Codon 769 genotype and allele frequency

组别	例数	基因型			基因频率/%	
		GG	GT	TT	G	T
HSCR	74	58	14	2	130(87.84)	18(12.16)
对照组	53	31	8	14	70(66.00)	36(34.00)

## 3 讨论

RET 基因是 HSCR 形成过程中最主要基因,它的突变可以引起神经基胚细胞不能分化或移行过程停止而导致巨结肠的发生。在 HSCR 病人的肠壁内可以检出 RET 基因和 GDNF(神经胶质细胞衍化亲神经营养因子)基因缺失表达,这种缺失表达可能会影响到肠道神经节细胞的发育和成熟过程<sup>[6]</sup>。目前的研究表明,不仅仅是基因突变,基因多态性改变与 HSCR 也密切相关。在 RET 基因的 21 个外显子上共有 7 种多态性改变,与 HSCR 发生密切相关的有 135A 等<sup>[7]</sup>;国内也有文献报道 HSCR 的发生与 G45A、T769G 有关<sup>[8]</sup>。

我们应用直接测序的方法检测 74 例 HSCR 病人和 53 例正常对照的血标本 13 号外显子的碱基突变情况,结果显示 13 号外显子上存在 T769G 基因多态性改变,在 HSCR 组与对照组中出现 3 种基因型,分别为 GG, GT, TT;采用  $\chi^2$  检验进行统计学分析,两组间基因型和基因频率均有统计学意义。与国内外其他研究结果比较,我们的实验中 GG 基

因型频率和等位基因 G 的频率明显偏高, HSCR 组中仅仅检测到 1 例野生型 AA 基因型, 与国外的研究数据有很大差异, 这种差异是否由地域或种族分布引起, 还是与我们的病人组样本量较小有关, 有待于进一步的研究。我们检测的病人来源是围绕天津市周围的人口, 民族上有汉、回族, 未见到其他民族的病人在本组资料中, 并且未考虑由性别等因素引起的误差, 仅检测了 13 号外显子的基因表达情况, 今后还需做大样本全方面的筛查, 才能明确其中是否存在差异。

发生在 RET 基因编码区域多肽性的碱基改变已有报道, 从目前的研究来看, 由于 RET 基因单个碱基或一对碱基改变可以引起 HSCR 发生的相关基因的外显率改变或者引起 RET 基因本身发生改变<sup>[9]</sup>。这些改变可以使得 RET 基因的调节区域发生改变, 增加 HSCR 的发生概率。体外功能分析已经证实发生在 RET 基因的 HSCR 相关的单核苷酸改变可以引起 HSCR 的相应症状发生<sup>[10]</sup>。值得关注的问题是, 相关于 HSCR 的 RET 基因的单核苷酸多肽性 (SNPs) 在中国人中显著高于欧美的发生率, 因此, 在国人中进行此项检测非常必要。

SNPs 在正常人群中可以检测到, 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。SNPs 所表现的多态性只涉及到单个碱基的变异, 这种变异可由单个碱基的转换 (transition) 或颠换 (transversion) 所引起, 也可由碱基的插入或缺失所致。过去认为 SNPs 不产生疾病的表型改变, 但最近的研究证实多态性并不是完全无害的。Robert 等<sup>[11]</sup>的研究表明, RET 基因多态性可能会引起巨结肠的发生并改变疾病的表型, 尤其是 135A 基因多态性与 HSCR 的临床表型的关系十分密切, 并且几乎所有的 SNPs 均为沉默突变, 并不引起氨基酸的改变。这种基因多态性在 HSCR 的遗传学方面的意义, 我们目前尚不清楚, 但它是否可以创建新的接合位点, 可以减少不同方位等位基因 (variant-bearing allele) 表达, 或者是这种多态性的发生打破了基因之间的连接片段平衡, 直接引起 HSCR

的发生。在将来的工作中我们会对这方面工作做进一步深入研究。

从实验的结果我们可以推测不仅是 RET 基因的突变, 而且 RET 基因的多态性可能与 HSCR 的发生相关, 大宗病例、完全 21 个外显子的基因筛查对于 HSCR 的病因学研究非常重要。

#### 参考文献:

- [1] Ruiz Aja E, Vega Hernández L, Martínez Ezquerro N, et al. Genetic, population and phenotypic characteristics of patients with Hirschsprung disease[J]. *Cir Pediatr*, 2012, 25(3):135
- [2] Sribudiani Y, Metzger M, Osinga J, et al. Variants in RET associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(2):572
- [3] Fernandez R M, Ruiz-Ferrer M, Lopez-Alonso M, et al. Polymorphisms in the genes encoding the 4 RET ligands, GDNF, NTN, ARTN, PSPN, and susceptibility to Hirschsprung disease[J]. *J Pediatr Surg*, 2008, 43(11):2042
- [4] Liu C P, Tang Q Q, Lou J T, et al. Association analysis of the RET proto-oncogene with Hirschsprung disease in the Han Chinese population of southeastern China[J]. *Biochem Genet*, 2010, 48(5-6):496
- [5] Miao X, Leon T Y, Ngan E S, et al. Reduced RET expression in gut tissue of individuals carrying risk alleles of Hirschsprung's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(8):1461
- [6] Moore S W, Zaahl M G. Intronic RET gene variants in down syndrome-associated Hirschsprung disease in an African population[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(2):299
- [7] Phusantisampan T, Sangkhathat S, Phongdara A, et al. Association of genetic polymorphisms in the RET-protooncogene and NRG1 with Hirschsprung disease in Thai patients [J]. *J Hum Genet*, 2012, 57(5):286
- [8] Pan Z W, Luo C F, Liu Z J, et al. RET 3'UTR polymorphisms and its protective role in Hirschsprung disease in southeastern Chinese[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(9):1699
- [9] Garcia-Barcelo M M, Tang C S, Ngan E S, et al. Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(8):2694
- [10] Miao X, Leon T Y, Ngan E S, et al. Reduced RET expression in gut tissue of individuals carrying risk alleles of Hirschsprung's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(8):1461
- [11] Robert S, Arleta L, Dariusz P, et al. Single nucleotide polymorphisms in the RET gene and their correlations with Hirschsprung disease phenotype[J]. *J Appl Genet*, 2006, 47(3):261

(2013-11-06 收稿)