文章编号 1006-8147(2014)05-0346-04

论 著

汉族多巴反应性肌张力障碍患者中的GTP环化水解酶I基因缺失

李明珊[1],蔡春友[1],时文涛[1],张本恕[2],李卫东[1]
(1.天津医科大学基础医学研究中心,天津 300070;2.天津医科大学总医院神经内科,天津 300052)

摘要 **目的**:基于对汉族人群中的多巴反应性肌张力障碍(DRD)患者基因突变的研究,进一步探究GTP环化水解酶I基因(GCH1)、酪氨酸羟化酶基因(TH)、Epsilon-sarcoglycan编码基因(SGCE)上是否存在外显子缺失。**方法**:对来自4个DRD家系共8名患者及其5名无症状家属、10名散发性DRD患者和3名正常对照者的GCH1、TH、SGCE基因的22个外显子进行多重连接式探针扩增(MLPA)分析,对MLPA结果出现异常的外显子采用实时定量PCR(qPCR)进行验证,然后使用ddCt法与正常对照者比较分析GCH1、TH、SGCE基因是否存在外显子缺失。**结果**:1名散发性DRD患者的GCH1基因1号外显子出现杂合缺失,正常对照均未发现此外显子缺失。其余家系或散发性患者未检测到外显子缺失或扩增。**结论**:在汉族人群中,散发性DRD患者GCH1基因存在外显子缺失,但出现频率较低;对于突变阴性的散发性DRD患者,有必要检测其GCH1基因是否存在缺失。

关键词 多巴反应性肌张力障碍;GTP环化水解酶I;多重连接依赖式探针扩增;实时定量PCR;外显子缺失
中图分类号 R394.5 **文献标志码** A

Heterozygous exonic deletion of the GTP cyclohydrolase I gene in a Han Chinese dopa-responsive dystonia patients

LI Ming-shan[1], CAI Chun-you[1], SHI Wen-tao[1], ZHANG Ben-shu[2], LI Wei-dong[1]
(1.Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University,Tianjin 300070,China;2.Department of Neurology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract **Objective:** To investigate whether exonic deletions of GTP cyclohydrolase I (GCH1), Tyrosine hydroxylase (TH), and Epsilon-sarcoglycan Encoding (SGCE) genes account for the etiology of dopa-responsive dystonia (DRD) in Han Chinese patients. **Methods**: The blood samples were collected from 26 subjects: 8 patients and 5 healthy family members in four pedigrees, 10 sporadic patients, and 3 unrelated normal individuals. Multiple ligation-dependent probe amplification analysis was performed on 22 exons of 3 genes (GCH1, TH, and SGCE) to detect plausible deletions. To confirm the MLPA results, quantitative real-time PCR was applied to candidate exons, and the comparative threshold cycle method (ddCt) was used to detect exonic deletions of GCH1, TH, SGCE genes. **Results**: A GCH1 exon 1 heterozygous deletion was detected in a sporadic DRD patient while no other deletions/duplications were observed in family or sporadic samples. **Conclusion**: Exonic deletion of GCH1 may contribute to certain DRD cases, but it is relatively rare; It is necessary to detect exonic deletions in the DRD cases if no genetic mutation is found.

Key words dopa-responsive dystonia; GTP cyclohydrolase 1; multiple ligation-dependent probe amplification; real time PCR; exonic deletion

1971年,Segawa首次系统描述了多巴反应性肌张力障碍(dopa-responsive dystonia,DRD),并根据该病表现出晨轻暮重的规律以及症状进行性发展的特点,将其命名为伴有显著日间波动的遗传性进展性肌张力障碍(hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation,HPD)[1],又称为遗传性肌张力障碍第5型(DYT5)。DRD患者还表现出对小剂量左旋多巴治疗有快速而显著的疗效并且不产生明显的副作用[2]。曾有DRD患者的尸检显示,黑质纹状体细胞数量减少同时黑质色素也减少,由此可以确定,DRD患者的发病与黑质纹状体合成的酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)水平减少有关[3]。TH酶调控儿茶酚胺(多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素)的生物合成,并且是神经递质多巴胺生物合成过程中的关键酶[4]。四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin,BH_4)是TH酶的辅助因子,因此TH的活性受BH_4水平的调控。而GTP环化水解酶I(GCH1)是合成BH_4的关键酶,所以GCH1的活性直接参与

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81070576);天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC 24700)
作者简介 李明珊(1987-),女,硕士在读,研究方向:病理与病理生理学;通信作者:李卫东,E-mail:liweidong98@hotmail.com。

TH 水平的调节并且间接调节儿茶酚胺的水平。GCH1 及 TH 基因是 DRD 的主要致病基因，突变导致 GCH1、BH_4、TH 水平降低或活性减弱，都可以导致 DRD 或 HPD[5]。以往对 DRD 基因水平的研究大多是检测相关基因的点突变、较小的缺失或扩增，但大约有 40%的 DRD 患者进行基因检测并未发现其 GCH1 及 TH 基因存在突变[6]。我们先前对 18 名汉族 DRD 患者及 5 名无症状家系成员进行了 GCH1 及 TH 基因检测，在 DRD 家系中发现了 GCH1 基因的 3 个杂合错义突变，但有 12 例 DRD 患者（主要是散发病例）未检出基因突变[7]。近年来有研究显示，DRD 的发生可能与相关基因外显子缺失有关[8-9]。为检测致病基因在 DRD 患者中是否存在缺失，本研究对 18 名汉族 DRD 患者、5 名无症状家系成员和 3 例无血缘关系正常对照的 GCH1、TH、SGCE 基因的 22 个外显子进行多重连接式探针扩增分析（MLPA）。

1　资料和方法

1.1　*研究对象和临床资料*　本试验收集了 18 名就诊于天津医科大学总医院神经内科的 DRD 患者及其 5 名无症状家属、3 名来自天津医科大学代谢病医院的正常对照者的临床资料和外周血标本。18 名患者包括来自 4 个家系共 8 名患者以及 10 名散发性 DRD 患者，均符合 Calne[10]临床诊断标准，并且都对多巴胺治疗有显著的效果。4 个家系的遗传系谱图见参考文献[7]。我们先前经 Sanger 测序发现，在 3 个 DRD 家系中存在 3 种不同的 GCH1 基因的杂合错义突变。其余 10 名散发性 DRD 患者中，有 2 名患者的 TH 基因存在 2 种杂合突变[7]。在本研究开展以前，所有参与本试验的患者、家庭成员及正常对照者均书面签署知情同意书并且纯属自愿，本研究的试验程序经天津医科大学伦理学委员会审核，认为符合卫生部关于《涉及人的生物医学研究伦理学审查办法（试行）》及赫尔辛基宣言关于生物学人体试验的相关规定。

1.2　*实验方法*

1.2.1　DNA 提取　用大量全血基因组 DNA 提取试剂盒（北京 Bioteke 生物技术公司）从 EDTA 抗凝的静脉血中提取 DNA 样本。用 Nanodrop 测定 DNA 样本的浓度及 260/280 nm、260/230 nm 吸光度比值。

1.2.2　DNA 纯化　用磁粒纯化试剂盒（厦门致善生物公司）对 DNA 样本进行纯化，去除样本中的蛋白、RNA 及盐离子。

1.2.3　多重探针扩增 MLPA　实验中严格依照 MRC-Holland ，Amsterdam, Netherlands 公司提供的技术方案（SALSA P099-C1 GCH1-TH-SGCE）进行基因外显子的定量。反应过程：（1）DNA 变性。5 μL DNA 在 PCR 仪上 98 °C 处理 5 min，降到 25 °C。（2）探针与样本 DNA 的杂交。加入 3 μL 探针混合液，95 °C 反应 1 min，60 °C 温浴 16~24 h。（3）杂交探针的连接。加入 32 μL 连接酶混合物，54 °C 温浴 15 min，98 °C 5 min 灭活连接酶，降到 20 °C。（4）连接探针的 PCR 扩增。加入 10 μL PCR 混合物，开始 PCR 反应。反应条件：95 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 60 s，以上 35 个循环。72 °C 充分延伸 20 min，然后降到 15 °C 。

1.2.4　毛细管电泳　用 GS500 size marker 9 和 ABI 3730 DNA 分析仪进行探针扩增产物的分析。

1.2.5　qPCR 反应　对 MLPA 分析结果表现异常的外显子进行验证。引物由 Primer3 软件设计（http://frodo.wi.mit.edu/primer3/）[11]，由 Invitrogen 生物公司合成。用 SYBR Green PCR Mix（TransGen 生物公司）和 ABI 7500 fast 进行 qPCR 反应。引物序列为：上游 5′-GGAGGATAACGAGCTGAACC-3′，下游 5′-GTCTCCTGGTAGCCCTTGGT-3′。

1.3　*数据分析*　毛细管电泳结果用 MRC-Holland 提供的 Coffalyser 软件计算。用 ddCt 法与正常对照值进行比较分析 GCH1 外显子缺失情况。

2　结果

2.1　*毛细管电泳结果*　见图 1、图 2。其中 142 nt、256 nt 探针的目标结合序列为 GCH1 基因的 1 号外显子。纵坐标表示探针的信号，横坐标代表大小不同的扩增片段位置。箭头标记处为 142 nt、256 nt 片段的探针信号峰。

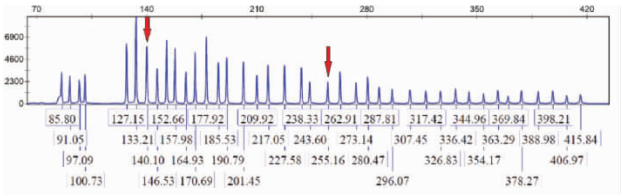

图 1　正常毛细管电泳图

Fig 1　The normal electrophoresis

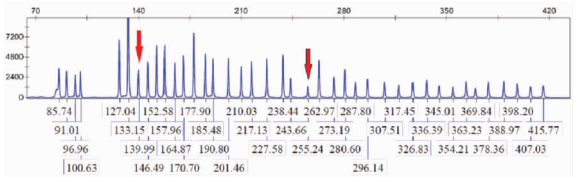

图 2　GCH1 基因 1 号外显子杂合缺失的毛细管电泳图

Fig 2　The electrophoresis of a heterozygous exonic deletion of the GTP cyclohydrolase I gene

2.2　*MLPA 数据分析结果*　输入毛细管电泳数据，

输出结果为直观的比率柱状图。MLPA 扩增产物的绝对峰面积(APA)与该样本中所有参考探针产物的绝对峰面积总和之比得到相对峰面积,然后再与正常对照的相对峰面积的平均数求比值得到相对峰值率(RPR)。根据试剂盒说明,RPR 在 0.3~0.7 之间为 1 拷贝,代表杂合缺失,RPR 在 0.75~1.25 之间为 2 拷贝,表示正常。本试验结果显示 GCH1 基因 1 号外显子相对峰值率约为 0.5,拷贝数为 1,提示杂合缺失。其余被检测者的 GCH1、TH、SGCE 基因外显子均未见缺失。见图 3。

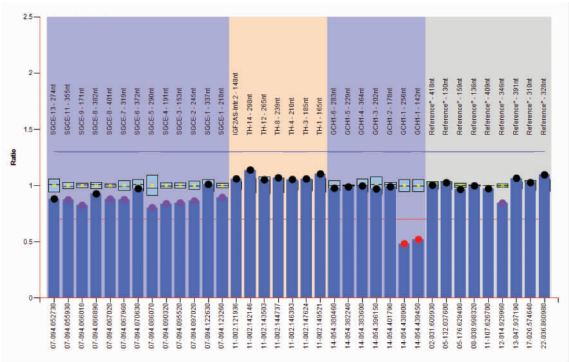

图 3 1 名散发性 DRD 患者 GCH1、TH、SCGE 基因共 22 个外显子 MLPA 数据分析结果

Fig 3 The MLPA result of 22 exons in GCH1,TH,SGCE genes of a sporadic DRD patient

2.3 qPCR 结果分析 采用 qPCR 对 MLPA 结果进行验证,结果用 ddCt 法将患者与正常对照者基因 Ct 值进行比较,用二者之间的相差来计算基因表达的差异(Ct 值是荧光值达到阈值时的 PCR 循环次数,一般控制在 15~35 之间)。通过计算得出 22 号 DRD 患者 GCH1 基因 1 号外显子 ddCt 值为 0.6~1.4,正常对照者 ddCt 值为 0。结果表示在荧光值达到阈值时,22 号患者 GCH1 基因比正常者多了 1 次 PCR 循环,由此应证了 MLPA 的分析结果。见图 4。

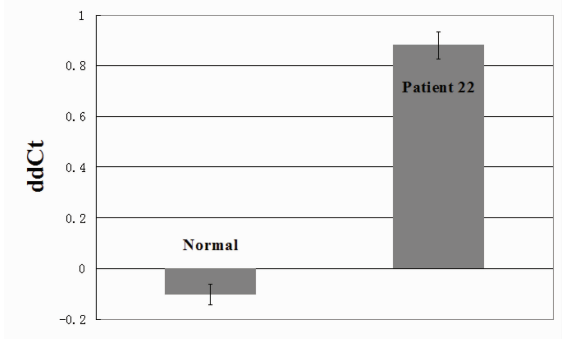

图 4 22 号 DRD 患者与正常对照 GCH1 基因 1 号外显子 ddCt 对比分析结果图

Fig 4 The ddCt values (comparative threshold cycle method) of normal samples and the patient 22

3 讨论

多巴反应性肌张力障碍是一种罕见的遗传性儿童或者青少年时期发病的运动障碍性疾病,早在 30 年前由 Segawa 提出,发病率约为 1/100 万[1]。DRD 初发症状主要表现为局部的肌张力障碍和步态异常,但不同的发病年龄会出现不同的症状。儿童期发病的患者,表现近似脑瘫;成年期发病的患者则多数表现为帕金森综合征,并且症状随年龄的变化不明显。症状轻微者可为姿势异常,而严重者则表现为全身肌张力障碍甚至致残。由于 DRD 临床表现复杂多样,缺乏特异性,所以使临床诊断困难,导致不能及时、正确地给予患者有效治疗。随着对 DRD 致病基因研究的不断深入,基因检测可以为临床诊断提供基因水平的依据。DRD 主要有两种不同的遗传方式,可分为:(1)常染色体显性遗传(autosomal dominant,AD),该致病基因确定为 GCH1 基因,定位于染色体 14q22.1-q22.2 上,是 GTP 环化水解酶 I 的编码基因。(2)常染色体隐性遗传(autosomal recessive,AR),其致病基因为 TH 基因,它是酪氨酸羟化酶的编码基因。现有对 DRD 基因水平的研究报道大多是关于 GCH1、TH 基因的点突变以及小片段的缺失或扩增。后来又有一些关于其它基因突变的报道,扩充了 DRD 致病基因的范围,如墨蝶呤还原酶基因(sepiapterin reductase gene,SPR)的突变与 AR-DRD 有关[12]。但是,仍有大约 40%的 DRD 患者检测不到基因突变的存在。因此有研究者推测,DRD 发病可能与某些基因外显子缺失有关,而这种缺失是传统的 Sanger 测序无法检出的。

自 2000 年以来,GCH1 基因的大片段缺失开始成为 DRD 研究的热点。2000 年,Furukawa 等[8]在一个家系的 3 代个体中发现有外显子大段碱基序列丢失。2008 年,Zirn 等[9]发现在欧洲人群中,DRD患者 GCH1 基因外显子杂合缺失率约为 8%,但 Wu-Chou 等[13]对台湾汉族人群的研究发现在 3 个 DRD 家系中的杂合缺失率高达 54%。2010 年,Liu 等[14]在 16 名汉族 DRD 患者中发现 1 名突变阴性的患者 GCH1 基因 2 号外显子存在杂合缺失。2013 年,Yu 等[15]通过结合其它同类的实验报道,以来自 36 个汉族家庭的 62 名 DRD 患者为研究对象,采用 MLPA 技术对 GCH1 基因进行分析,结果有 13 名(20.1%)患者存在外显子缺失。但是,关于 TH 基因的缺失目前还未见报道。

传统用于分析外显子缺失的方法通常为 DNA 印迹实验和半定量 PCR 技术。2007 年,Steinberger 等[16]首次将 MLPA 技术用于 DRD 致病基因的分析。

它整个过程以简单的杂交(hybridization) 、连接(ligation)及 PCR 扩增(PCR amplification)反应,可以在单一反应管内对 50 个不同的核苷酸序列的拷贝数变化进行同时检测。这种高通量、能针对待测核酸中靶序列进行定性和定量分析的新技术表现出更加方便、快捷的优越性。

在我们先前的研究中，已对该 18 名患者的 GCH1、TH 基因进行突变检测，结果显示在 3 个 DRD 家系中,GCH1 基因存在 Tyr75Cys, Ala98Val, Ile135Thr 3 个杂合突变;在 10 名散发性患者中有 2 名检测出 TH 基因存在 Ser19Cys ,Gly397Arg 2 个杂合突变。本实验采用 MLPA 技术分别对 GCH1、TH、SGCE 基因的 22 个外显子进行分析，仅发现 22 号散发性 DRD 患者 GCH1 基因 1 号外显子出现杂合缺失,缺失率为 5.5%(1/18),远低于台湾人群的缺失率(54%)。TH、SGCE 基因均未发现外显子缺失。我们分析,造成这种差距的原因可能是:(1)本实验发现的外显子缺失是来自散发性 DRD 患者，台湾汉族人群中较高的缺失率是来自 DRD 家系。而欧洲人群中散发性 DRD 患者 GCH1 外显子缺失率为 6.25%,与我们的研究结果相差并不大。(2)台湾汉族 DRD 家系被检出的 GCH1 基因 1 号外显子缺失有可能是来自同一祖先。

目前已报道的 GCH1 基因缺失大多是发生在外显子,但也有少数的缺失发生在调控区(regulatory region)。2012 年,Theuns 等[17]用全基因组关联分析(genome-wide linkage analysis) 和定位克隆(positional cloning) 方法在一个比利时 DRD 家系中发现 GCH1 基因的调控序列(regulatory sequences)存在大片段缺失,造成等位基因转录缺失,使所有患者的 GCH1 活性降低。这为以后的 DRD 研究又拓展了新的思路。

虽然本实验结果显示在汉族人群中,DRD 患者基因的外显子杂合缺失率较低,但是对于 Sanger 测序未发现突变的患者,仍应该考虑存在相关基因外显子缺失的可能。并且,有关 DRD 基因水平的致病机制仍然不完全清楚，需要进行更加深入的研究，如对多巴通路中的其它基因进行检测,或者进行全基因组测序等。

参考文献:

[1] Segawa M. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation[J]. Adv Neurol, 2000,22(Suppl 1):S65

[2] Nygaard T G, Marsden C D, Duvoisin R C. Dopa-responsive dystonia[J]. Adv Neurol, 1988,50:377

[3] Fletcher N A, Holt I J, Harding A E, et al . Tyrosine hydroxylase and levodopa responsive dystonia[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1989, 52(1):112

[4] Fink J K, Barton N, Cohen W, et al . Dystonia with marked diurnal variation associated with biopterin deficiency[J]. Neurology, 1988, 38(5):707

[5] Nagatsu T, Ichinose H. Molecular biology of catecholamine-related enzymes in relation to Parkinson's disease[J]. Cell Mol Neurobiol, 1999,19(1):57

[6] Furukawa Y, Kish S J. Dopa-responsive dystonia: recent advances and remaining issues to be addressed[J]. Mov Disord, 1999,14(5): 709

[7] Cai C, Shi W, Zeng Z, et al . GTP cyclohydrolase I and tyrosine hydroxylase gene mutations in familial and sporadic dopa-responsive dystonia patients[J]. PLoS One, 2013,8(6):e65215

[8] Furukawa Y, Guttman M, Sparagana S P, et al . Dopa-responsive dystonia due to a large deletion in the GTP cyclohydrolase I gene[J]. Ann Neurol, 2000,47(4):517

[9] Zirn B, Steinberger D, Troidl C, et al . Frequency of GCH1 deletions in Dopa-responsive dystonia [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008, 79(2):183

[10] Calne D B. Dopa-responsive dystonia[J]. Ann Neurol, 1994,35(4): 381

[11] Rozen S, Skaletsky H. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers[J]. Methods Mol Biol, 2000,132:365

[12] Bonafé L, Thöny B, Penzien J M, et al . Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia[J]. Am J Hum Genet, 2001,69(2):269

[13] Wu-Chou Y H, Yeh T H, Wang C Y, et al . High frequency of multiexonic deletion of the GCH1 gene in a Taiwanese cohort of dopa-response dystonia[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2010, 153B(4):903

[14] Liu X, Zhang S S, Fang D F, et al . GCH1 mutation and clinical study of Chinese patients with dopa-responsive dystonia [J]. Mov Disord, 2010,25(4):447

[15] Yu L, Zhou H, Hu F, et al . Two novel mutations of the GTP cyclohydrolase 1 gene and genotype-phenotype correlation in Chinese Dopa-responsive dystonia patients[J]. Eur J Hum Genet, 2013,21 (7):731

[16] Steinberger D, Trübenbach J, Zirn B, et al . Utility of MLPA in deletion analysis of GCH1 in dopa-responsive dystonia[J]. Neurogenetics, 2007,8(1):51

[17] Theuns J, Crosiers D, Debaene L, et al . Guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 promoter deletion causes dopa-responsive dystonia [J]. Mov Disord, 2012,27(11):1451

(2014-04-08 收稿)