

# 中国人粘多糖贮积症 I 型 IDUA 基因突变的检测

于洪枫, 曾瑞萍, 林群娣

(中山医科大学医学遗传教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:** 【目的】检测中国人粘多糖贮积症 I 型患者 IDUA 基因 (*IDUA*) 突变。【方法】采用 PCR-SSCP、PCR 产物直接测序等技术对 35 例粘多糖贮积症 I 型患者的 *IDUA* 第 2、6、7、8、9 和 10 外显子及其相邻区域进行突变筛查。【结果】本研究筛查出 7 种突变, 均为单碱基置换。一内含子区突变 nt1486C→T; 一中性突变 nt1945G→C; 1 种无义突变 E404X; 4 种错义突变: F198L、L218V、A361T 和 V454I。【结论】中国人 *IDUA* 在第 2、6、7、8、9 和 10 外显子区存在突变。在上述检测到的 7 种突变中, A361T 国外已确定为多态性, E404X 国外已报道为重型突变。而 nt1486C→T、F198L 和 L218V 和 V454I 为我们首次发现和报道, 可能为新突变, 但其突变性质还有待于进一步鉴定。

**关键词:** 粘多糖贮积症 I 型;  $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶; 突变; DNA 突变分析/方法

**中图分类号:** R394.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2001)06-0439-04

## Mutations Analysis of IDUA Gene in Chinese Mucopolysacchridosis Type I Patients

YU Hong-feng, ZENG Rui-ping, LIN Qun-di

(Department of Medical Genetics Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510080 China)

**Abstract:** 【Objective】To screen the mutation of IDUA gene (*IDUA*) in Chinese patients with MPS-I. 【Methods】Using PCR-SSCP and directly sequencing techniques, the 2, 6, 7, 8, 9 and 10 exons and the adjacent regions of *IDUA* were screened for 35 MPS-I patients. 【Results】In this study, 7 mutations have been found, which are all base substitutions. One mutation is in the intron 5: nt1486C→T; One same-sense mutation in exon 7: nt1945G→C; One nonsense mutation and in exon 9: E404X; 4 missense mutations: A361T (exon 8), F198L (exon 6), L218V (exon 6) and V454I (exon 9). 【Conclusion】The exons 2, 6, 7, 8, 9 and 10 of IDUA gene have mutations among the Chinese. Out of the 7 mutations we have found, A361T and V454I has been identified as poly morphic site, and nt1945G→C is a same-sense mutation. E404X have been reported as a severe mutation in abroad. However, nt1486C→T, F198L, L218V and V454I are first reported by us. These 4 mutations may be pathogenic mutations, which needs further identification.

**Key words:** mucopolysacchridosis type one; iduronidase; mutation; DNA mutational analysis/method

粘多糖贮积症 (mucopolysacchridosis, MPS) 是糖氨基聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 降解代谢障碍引起的一组遗传代谢病, 主要分为 7 型和若干亚型。该病在我国并不少见, 严重威胁患儿的健康, 以 I 型最为常见。MPS-I 型是由于艾杜糖醛酸酶基因 (iduronidase gene, *IDUA*) 突变, 导致  $\alpha$ -L-艾

杜糖醛酸酶缺陷而引起, 呈常染色体隐性遗传。该病临床表现多样, 由轻至重呈连续性波谱状改变。可表现为角膜浑浊、面容粗陋、骨骼畸形、肝脾肿大、心脏瓣膜病或多发畸形等, 目前尚无有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。自 1992 年, 随着 *IDUA* 的克隆和鉴定, MPS-I 的研究进入了分子水平。现已报道 50 余种

收稿日期: 2001-07-13

基金项目: 国家教委博士点基金资助课题(2000044)

作者简介: 于洪枫(1974-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士生, E-mail: hongfengyu@163.net

致病性突变和 30 多种多态性<sup>[2,3]</sup>, 使该病呈现了复杂的分子异质性, 且突变类型存在显著的种族差异。我们应用 PCR-SSCP 等技术对 30 例 MPS-I 患者 *IDUA* 的第 2, 6, 7, 8, 9 和 10 外显子进行了突变检测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本收集

35 例 MPS-I 患者, 其中男性 18 例, 女性 17 例, 平均年龄为 4 岁, 病情轻重不等。

### 1.2 DNA 提取

抽取患者外周血 2~3 mL, 肝素抗凝。采用低渗溶血, SDS-蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿/异戊醇法抽提白细胞 DNA。

### 1.3 PCR 扩增 *IDUA* 外显子 2, 6, 7, 8, 9 和 10

从 Genebank 中获取人 *IDUA* 序列, 选取国外报道突变高发区域, 自行设计 6 对引物, 并用 PCR DESIGN 软件分析其合理性。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 5 μL, 10×dNTPs (2 mmol/L) 5 μL, DMSO 3 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 模板 1~2 μL/0.3~0.5 μg, Probest<sup>TM</sup> DNA 聚合酶 (购自大连宝生物公司) 2.5 U, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。引物序列及扩增条件见表 1。

表 1 PCR 引物序列及扩增条件

Table 1 The primer sequences and specific conditions of PCR

Exon	Genomic position	Primer sequences	Product size (bp)	Annealing Temperature (°C)
E2	Sense; 1231~1254	5' GGCTTGAA CGTGTGTGTCAGCCG C3'	258	65
	Antisense; 1488~1465	5' GTAAGGGGCTCTGGGACGCC CAGA3'		
E6	Sense; 1424~1447	5' GGAA GGCA GGAGCAGAGGCTAA GC3'	324	59
	Antisense; 1747~1724	5' ACAGCGGCTGAGGGCGCAGAACAC3'		
E7	Sense; 1760~1783	5' GCTGACCCTGGTGGTGCTGAGGCG3'	275	65
	Antisense; 2034~2011	5' CTGTCCCGTCTCGGGAGGAAGGTG3'		
E8	Sense; 2054~2031	5' CCCG GTCCCAGCTGCCCTG GACAC3'	404	65
	Antisense; 2457~2434	5' TCCCCTTG GTGAAGGAGTCCC CAG3'		
E9	Sense; 2434~2457	5' TGGG GACTCCTTCA CCAAGGGGAG3'	370	61
	Antisense; 2804~2781	5' CA GAGCCCCAG CGGG GCCAGAG AC3'		
E10	Sense; 2781~2804	5' GTCTCTG GCCCGCTGGG GCTCTG3'	298	66
	Antisense; 3078~3055	5' CA CCGCTCCA CCTCCCA CCGACAC3'		

### 1.4 SSCP 银染

取 PCR 产物 5~8 μL, 加入等体积的变性剂, 混匀, 98 变性 10 min, 立即冰浴 10 min, 上样于 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (49:1), 120 V 室温恒压电泳 8~16 h。电泳结束后进行银染<sup>[2]</sup>: 体积分数 10% 乙醇浸泡 5 min, 体积分数 1% 硝酸浸泡 3 min, 0.012 mol/L AgNO<sub>3</sub> 染色 20 min, 0.28 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和体积分数 0.019% 甲醛显色数分钟, 最后用体积分数 10% 醋酸固定 10 min。每步之间均用去离子水漂洗。

### 1.5 DNA 序列分析

SSCP 异常标本, 经 PCR 扩增, 产物纯化后采用 ABI PRISM BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Kit 自动测序。

## 2 结 果

### 2.1 PCR 扩增

我们采用 6 对特异性引物分别扩增正常人和 MPS-I 患者的 *IDUA* 第 2, 6, 7, 8, 9 和 10 外显子, 获得了相应的目的片段, 长度分别为 258, 324, 275, 404, 370 和 298 bp (图 1)。

### 2.2 SSCP 分析

在 35 例 MPS-I 患者第 2, 6, 7, 8, 9 和 10 外显子的检测中, 即 210 例次 (不包括正常对照) PCR-SSCP 中, 共出现 26 次异常电泳带, 分布于第 6, 7, 8, 9 外显子。而在第 2 和第 10 外显子中未发现异常电泳带 (图 2)。



图 1 PCR 扩增 IDUA 的 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 The results of PCR amplification of IDUA gene

M: PCR marker; 1: exon 2 (258 bp); 2: exon 7 (275 bp); 3: exon 10 (298 bp); 4: exon 6 (324 bp); 5: exon 9 (370 bp); 6: exon 8 (404 bp)

### 2.3 测序结果

上述 SSCP 异常者经测序证实, 均为单碱基置换(图 3)。在第 6 外显子区, 9 例(M 1, M 4, M 43,

M49, M 54, M55, M 58, M 59, M72) 是在距第 6 外显子 5'端-10 碱基处(即第 5 内含子)发生了碱基置换, 为 nt1486C→T; 1 例(M43)在第 6 外显子第 2 个密码子 TCC 变成 TAC, 导致 α-L-艾杜糖苷酶第 198 位的苯丙氨酸被亮氨酸所取代, 即 F198L; 另 1 例 IDUA 的 1 556 位碱基发生置换, 由 C→G, 产生错义突变 L218V。在第 7 外显子, 有 4 例(M 1, M4, M39, M49)在第 1945 位碱基发生置换, 由 G→C, 产生同义突变。在第 8 外显子, 有 5 例(M 1, M4, M39, M43, M49)第 2192 位碱基由 G→A, 导致了错义突变 A361T。在第 9 外显子, 有 2 例患儿(M 32, M33) IDUA 第 2 567 位碱基发生置换, 使 GAA→TAA, 产生无义突变。另有 2 例(M49, M54) IDUA 基因的第 2717 位的鸟嘌呤被腺嘌呤所取代, 即 nt2717G→A, 引起错义突变 V454I。有关突变的命名、突变的位置及突变的性质参见表 2。

表 2 IDUA 突变检测

Table 2 Summary of IDUA mutation types

Allele designation	Base change	Exon/ Intron	Gene position	cDNA position	Mutation effect	Positive patients
nt1486C→T	C→T	Intron 5	1 486	—	? Splice site mutation or polymorphism	M 1, 4, 43, 49, 54, 55, 58, 59, 72
F198L	C→A	E6	1 498	682	Missense mutation	M43
L218V	C→G	E6	1 556	740	Missense mutation	M58, 59, 72
nt1945 G→C	G→C	E7	1 945	1 030	Same sense mutation	M 1, 4, 39, 49
A361T	G→A	E8	2 192	1 169	Missense mutation	M 1, 4, 39, 43, 49
E404X	G→T	E9	2 567	1 298	Nonsense mutation	M 32, 33
V454I	G→A	E9	2 717	1 448	Missense mutation	M49, 54

### 3 讨论

近年来分子生物学方面研究已证实, IDUA 突变与 MPS-I 的发生有关。IDUA 位于 4p16. 3, 全长约 19kb, 含有 14 个外显子和 13 个内含子<sup>[4]</sup>。目前, 已报道了 50 余种致病性突变, 分布于各外显子, 但以第 VI、VII、VIII、IX、较为常见, 包括无义突变、错义突变、剪切位点突变和微缺失和插入<sup>[5, 9]</sup>。另外, 还发现 30 多种多态性。鉴于 IDUA 突变的特点, 我们采用 PCR-SSCP 技术对突变高发区域进行筛查, 为了防止 PCR 错配引起的碱基置换, 我们选用 Pfu DNA 聚合酶的系列产品, 其具有 3'→5'的外切酶活性, 可有效防止 PCR 错配。实验证明, SS-

CP 技术是用于检测点突变一简便、灵敏的方法。

在本研究中我们检测出 7 种突变, 其中 A361T 和 V454I 国外已报道为多态性<sup>[7]</sup>, 多态性虽不直接引起发病, 但对表型的产生起重要的修饰作用; nt1945 G→C 为中性突变, 可能为中国人群众多态性; E404X 使编码谷氨酸的密码子 GAA 变成终止密码子 TAA, 使肽链合成提前终止, 引起重型 MPS-I<sup>[3]</sup>。而 nt1486C→T、F198L、L218P 尚未报道, 可能为新突变或为多态性, 还有待于进一步鉴定。

目前许多研究表明 IDUA 突变具有显著的种族、地域差异性。在欧洲患者群中, 以 W402X (35%) 和 Q70X (23%) 最为常见, 位于第 IX 和第 II 外显子, 占 50% 以上<sup>[8]</sup>。而在日本人中尚未见到这两种突变, 而以 R89Q 和 704ins5 较常见, 位于第

II和第VI外显子,占21%和10%<sup>[9]</sup>。在其他国家亦不断有新突变的报道<sup>[10]</sup>,我们首次研究中国人IDUA突变,未检测到上述突变,提示中国人IDUA改变可能具有自己的特点。

(本文图2,3见插页1)

#### 参考文献:

- [1] Peters C, Shapiro E G, Krivit W. Hurler syndrome; past, present and future [J]. J Pediatr, 1998, 133(1): 7.
- [2] 于洪枫. 粘多糖贮积症的分子遗传学进展 [J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(2): 86.
- [3] Scott H S, Bunge S, Gal A, et al. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I; diagnosis, clinical and biological implications [J]. Hum Mutat, 1995, 6: 288.
- [4] Scott H S, Guo X H, Hopwood J J, et al. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene [J]. Genomics, 1992, 13(4): 1311.
- [5] Lee-Chen G J, Lin S P, Tang Y F, et al. Mucopolysaccharidosis type I; characterization of novel muta-

tions affecting  $\alpha$ -L-iduronidase activity [J]. Clin Genet, 1999, 56(1): 66.

- [6] Teng Y N, Wang T R, Hwu W L, et al. Identification and characterization of -3c-g acceptor splice site mutation in human  $\alpha$ -L-iduronidase associated with mucopolysaccharidosis type IH/S [J]. Clin Genet, 2000, 57: 131.
- [7] Scott H S, Nelson P V, Litjens T, et al. Multiple polymorphisms within the  $\alpha$ -L-iduronidase gene (IDUA); implications for a role in modification of MPS-I disease phenotype [J]. Hum Mol Genet, 1993, 2: 1471.
- [8] Scott H S, Litjens T, Hopwood J J, et al. A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype [J]. Hum Mutat, 1992, 1: 103.
- [9] Yamagishi A, Tomatus S, Fukuda S, et al. Mucopolysaccharidosis type one; identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations [J]. Hum Mutat, 1996, 7: 23.

(编辑 张敏瑞)

(上接第432页)

轻微组织。④非心肌炎,正常人及某些暴力死亡者的心肌可有少量炎细胞浸润,与不典型心肌炎酷似。以上因素给轻度、不典型VMC的诊断带来了困难。本研究结果提示,利用MHC II类抗原在VMC心肌组织中的表达特点,有可能较为灵敏、准确地识别上述3类不典型心肌炎改变。Herskowitz等<sup>[4]</sup>发现,心肌缺血及继发的炎细胞浸润性改变均不诱导心肌MHC II类抗原异常表达。因此,MHC II-LSAB染色对于轻度、不典型VMC的免疫病理学诊断可能具有较大的应用价值,我们将在人体标本上作进一步研究和验证。

(本文图1,2见插页4)

#### 参考文献:

- [1] 成建定,陈玉川,胡丙杰,等.病毒性心肌炎猝死模型的建立 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(6): 421.
- [2] 成建定,陈玉川,胡丙杰,等.实验性病毒性心肌炎纤维连接蛋白的免疫组化研究 [J]. 中国法医学杂志, 2000, 15(4): 200.
- [3] 成建定,陈玉川,胡丙杰.病毒性心肌炎纤维连接蛋白的免疫组化初步研究 [J]. 法医学杂志, 1999, 15(1): 9.
- [4] Ahvie Herskowitz, Aftab A A, David A N, et al. Induction of major histocompatibility complex antigens within the myocardium of patients with active myocarditis; a non-

histologic marker of myocarditis [J]. J Am Coll Cardiol, 1990, 15(3): 624.

- [5] Rezkalla S, Kloner R A, Khatib G, et al. Beneficial effects of captopril in acute Coxsackie virus murine myocarditis [J]. Circulation, 1990, 81(3): 1039.
- [6] Hufnagel G, Maisch B. Expression of MHC class I and II antigens and the IL-2 receptor in rejection, myocarditis and dilated cardiomyopathy [J]. Eur Heart J, 1991, Suppl D: 137.
- [7] Hengstenberg C, Hufnagel G, Haverich A, et al. De novo expression of MHC class I and class II antigens on endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart disease and rejection following heart transplantation [J]. Eur Heart J, 1993, 14(6): 758.
- [8] Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wodniecki J, et al. Immunohistological diagnosis of myocarditis. Potential role of sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury [J]. Eur Heart J, 1998, 19(10): 1564.
- [9] Reinhard D, Marc S, Burkhard M. Immunohistochemical techniques improve the diagnosis of myocarditis in case of suspected sudden infant death syndrome (SIDS) [J]. Foren Sci Int, 1999, 105(1): 83.

(编辑 黄小延)

