基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0432-03

散发性嗜铬细胞瘤与 SDHD 基因突变关系研究

李秀兰[1],柳 青[1],吴小候[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院临床研究中心,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:了解重庆地区散发性嗜铬细胞瘤(Pheochromocytoma,PHEO)与琥珀酸脱氢酶复合物 DⅡ单位(Succtnate dehydrogenaes complex,subunit D,SDHD)基因第 1、2 外显子突变的关系。方法:采用多聚酶联反应结合单链构像多态性分析(Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism,PCR-SSCP) 对 32 例病理确诊的散发性 PHEO 患者 (其中 21 例为肾上 PHEO,11 例为肾上腺外 PHEO 即副神经节瘤)和 80 例健康体检者对 SDHD 基因 1、2 外显子进行突变分析。结果:32 例嗜铬细胞瘤患者中未发现 SDHD 基因第 1、2 外显子的突变。结论:在本研究中未发现重庆地区散发 PHEO 存在 SDHD 基因第 1、2 外显子的突变。

【关键词】嗜铬细胞瘤 PHEO;副神经节瘤;琥珀酸脱氢酶复合物 D 亚单位Ⅱ;突变

【中国图书分类法分类号】R736.6;R730.231 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-19

Study on the mutations of SDHD gene in sporadic pheochromocytoma in Chongqing

LI Xiu-lan, et al

(*Department of Clinical Research Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the association between mutations in the first and second exons of(Succtnate dehydrogenaes complex, subunit D (SDHD) gene and sporadic pheochromocytoma in Chongqing *Methods*: Polymerase chain reaction combining with single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) was selected to analysis the mutations in the first and second exons of SDHD gene in 32 cases of sporadic pheochromocytoma who were diagnosed by pathology (including 21 cases of pheochromocytoma and 11 cases of extra-adrenal paraganglioma) and 80 cases of the healthy controls. *Results*: No mutation was found in the first and second exons of SDHD gene in the 32 patients. *Conclusion*: In our study, we had not found any mutation in the first and second exons of SDHD gene in sporadic pheochromocytoma in Chongqing.

【Key words】Pheochromocytoma; Paraganglioma; Succinate dehydrogenase complex, subunit D; Mutation

嗜铬细胞瘤(Phcochromocytoma,PHEO)是引起内分泌性高血压的重要原因,当其发生于肾上腺髓质时称为 PHEO, 发生于肾上腺外者称为副神经节瘤。该病的临床表现错综复杂,常规的抗高血压药物治疗效果不好,常引起严重的心、脑血管并发症。如果能够早期明确诊断,经手术切除肿瘤后大部分患者是可以治愈的。PHEO 可散发,也可表现为遗传性肿瘤综合征,如:多发性内分泌腺瘤 2 型(Multiple endocrine neoplasia type 2,MEN 2),VHL 综合征(Von Hippel-Lindau syndrome,VHL),神经纤维瘤病 1 型(Fibromatosist type 1,NF1),遗传性副神经节瘤-嗜铬细胞瘤(Hereditary paraganglioma and pheochromocytomas,PGL/PHEO)等。2000 年,头颈部家族性副神经节瘤易感基因-琥珀酸脱氢酶复合物 DⅡ单位(Succtnate dehydrogenaes complex,subunit D,SDHD)基因突变的确定[1],使线粒体 SDHD 基因成为 PHEO 研究的热点,为 PHEO 的发病机制研究、基因诊断和治疗提供了新的线索。Eng 等[2]发现与 PHEO 相关的突变主要发生在 SDHD 基因的 5'端,与头颈部副神经节瘤相关的突变发生在基因的 3'端。目前在琥珀酸脱氢酶复合物(Succinate deluydrogenase complex,SDH) 基因突变数据库中列出的散发性患者中发生 SDHD 基因突变的共有 136 例,除外两种荷兰建立者突变(Founder mutation),约有 50%的突变发生在基因的1,2 外显子,这些突变多数为无义突变,可使多肽链合成提前终止,肽链长度缩短,成

作者介绍:李秀兰(1980-),女,硕士,
研究方向:遗传性疾病的基因诊断。

通讯作者:柳 春,女,研究,E-mail:qingliu5566@yahoo.com。

为无活性的多肽片断，最终使琥珀酸脱氢酶功能障碍[3]。国内对PHEO的研究多集中于病例报道和家系的研究，对散发性患者的研究较少，因此本研究拟对散发性患者的SDHD基因第1、2外显子进行突变分析，以了解重庆地区散发性PHEO与SDHD基因第1、2外显子的关系。

1 对象与方法

1.1 患者及标本收集

自2005年5月至2009年2月从重庆医科大学附属第一，第二医院以及第三军医大学附属大坪医院、新桥医院泌尿外科的住院患者中收集PHEO患者，经术后病理检查确诊的共32例，其中外周血标本19例，肿瘤组织石蜡标本13例，各病例均无家族遗传病史。32例PHEO患者平均就诊年龄(43.97 ± 15.6)岁，其中男14例，女18例。肿瘤位于肾上腺者21例，肾上腺外者11例。选择80例正常健康体检者作为正常对照。以上标本的收集均获得患者及人类道德研究伦理委员会的同意。

1.2 DNA 抽提

用枸橼酸钠抗凝血4.8 ml，采用饱和盐析法提取DNA。肿瘤组织石蜡标本DNA的抽提步骤为：10 μm 厚病理切片10张，破碎分装入1.5 ml离心管，每管各加1 ml二甲苯55℃水浴15 min，室温下12 000 r/min离心5 min后弃上清，重复两次；加入无水乙醇1 ml，55℃水浴15 min，室温下12 000 r/min离心5 min后弃上清，重复一次；待无水乙醇尽量挥发干净后加入1 ml消化缓冲液：100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，25 mmol/L 乙二铵四乙酸，pH 8.0以及25 μl蛋白酶K(20 mg/ml)，55℃水浴过夜；再加入25 μl蛋白酶K(20 mg/ml)消化，55℃水浴过夜，各管短暂离心后置沸水浴中8 min灭活蛋白酶K，分装后加等体积酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)上下颠倒混匀，4℃，12 000 r/min离心10 min，取上层80%水相转移至另一离心管，重复一次。上清液中加入1/10体积的醋酸钠3 mol/L，2.5倍体积预冷的无水乙醇混匀，-20℃过夜，14 000 r/min，4℃离心30 min，弃去上清，70%乙醇洗涤两次，尽量挥发乙醇后加TE 20 μl，pH 8.0，4℃溶解过夜。

1.3 多聚酶联反应(Polymerase chain reaction，PCR)扩增

SDHD基因第1、2外显子引物序列参照文献[1]。总反应体系为25 μl：上下游引物6.25 pmol，DNA模板100~200 ng，Mg^{2+}浓度1.5 mmol/L，dNTP浓度0.2 mmol/L，10×缓冲液2.5 μl，Taq DNA聚合酶2 U。反应条件为：94℃预变性10 min后，94℃变性45 s，56℃退火60 s，72℃延伸60 s，共35个循环，最后72℃延伸10 min。取PCR扩增产物3 μl加6×凝胶电泳加样缓冲液2 μl混匀后上样于2%琼脂糖(含Goldview染料)凝胶电泳，90 V电压下电泳30 min，在凝胶成像仪上观察结果，分析PCR产物特异性及产量。

1.4 单链构像多态性分析（Single-strand conformation polymorphism，SSCP）分析

取PCR产物6 μl加等体积甲酰胺上样缓冲液混匀，95℃变性10 min后立即冰浴10 min，全部上样于8%和12%非变性聚丙烯酰胺凝胶(49:1)在150 V，4 W，10℃电泳7~8 h，Goldview染色30 min，在凝胶成像仪上观察结果。

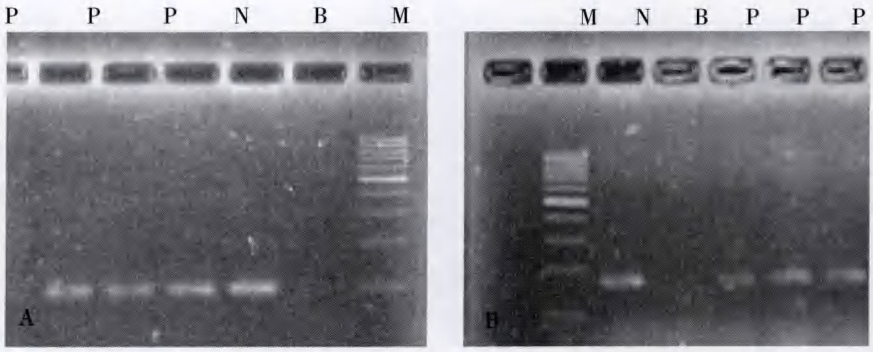
2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

各外显子扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳，每一标本均成功扩增出目的片断，目的片断第1外显子为98 bp，第2外显子为168 bp，产物特异性较好。如图1所示。

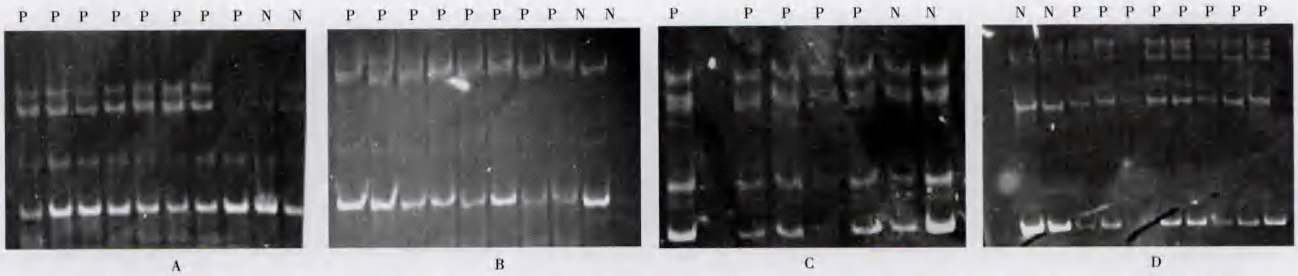
2.2 SSCP 电泳结果

32例患者的各外显子产物变性后在8%和12%非变性聚丙烯酰胺胶电泳中电泳，各电泳条带显影清晰，但与对照组相比均未发现异常片断。如图2所示。



A、B分别为1、2外显子PCR产物电泳图，分子大小分别为98 bp、168 bp。P. 病例组；N. 正常对照；B. 阴性对照；M. 分子量标准100 bp DNA ladder

图1 PCR产物2%琼脂糖电泳图



A,B 分别为 1 号外显子 8%,12%非变性聚丙烯酰胺电泳图;C,D 分别为 2 号外显子 8%,12%非变性聚丙烯酰胺电泳图;
P. 病例组;N. 正常对照

图 2　非变性聚丙烯酰胺电泳结果图

3　讨　论

线粒体 SDH 是三羧酸循环和有氧电子传递呼吸链的关键酶之一。它由 4 个亚基组成，分别由 SDHA,SDHB,SDHC,SDHD 等 4 个抑癌基因编码。其中 SDHD 基因位于第 11 号染色体长臂 11q23,基因序列长约 19 Kb,编码琥珀酸-辅酶 Q 氧化还原酶细胞色素 b 小亚单位（cybs）。2000 年,Baysal [1]和 Gimm 等[4]先后报道 SDHD 基因突变与家族性或散发性 PHEO 的发病密切相关。据文献报道,SDHD 基因突变可导致线粒体 SDH 功能障碍,这种功能缺失引起细胞处于慢性缺氧状态和细胞内琥珀酸积聚,因此而抑制低氧诱导因子 1α 的降解和上调低氧诱导因子 1,2 和其他低氧诱导靶基因的表达(如血管内皮生长因子),导致肿瘤血管形成,在 PHEO 的发生和发展中起着重要的作用[5-8]。而最近 Lee 等[9]研究认为 SDHD 基因突变导致的线粒体功能障碍,可通过抑制交感神经元前体细胞凋亡,导致 PHEO 的发生。

据研究发现,随着种族、地域的差异 SDHD 基因突变在散发性 PHEO 患者中的发生率有所不同。Neumann 等[10]在 271 例散发性 PHEO 患者(主要为德国、波兰、美国)外周血中发现有 11 例发生 SDHD 基因突变,突变率为 4%,而 Amar 等[11]在法国258 例散发性患者中仅发现 2 例,突变率为 0.8%,Neumayer[12]在澳大利亚 70 例散发性患者中检出 3 例,突变率为 4.3%。Korpershoek 等[13]在荷兰患者散发患者 126 例中检出 2 例，突变率为 1.5%,Castellano 等[14]在意大利散发性患者中未发现 SDHD 基因突变,仅发现几个多态性位点。Kytölä [15],Aguiar 等[8]也未发现 SDHD 基因突变,仅在 SDHD 区域发现杂合性缺失。此外,结合 SDH 基因突变库列出的与 1、2 外显子突变相关的疾病表型发现:携带基因突变的患者临床表现多为发病年龄较早,多部位肿瘤和肾上腺以外 PHEO 遗传倾向[3]。因此众多学者建议对散发性 PHEO 患者进行 SDHD 基因突变筛查。在本研究中,32 例病理确诊的散发性 PHEO 患者均未发现 SDHD 基因第 1、2 外显子存在突变。

国内关于 SDHD 基因突变与散发性 PHEO 发生关系的研究中,Sun 等[16]也未发现相关基因突变,仅发现几种内含子改变和在 SDHD 区域杂合性缺失,杂合性缺失频率为 30.8%(8/26)。此外,在香港地区发现的 SDHD 基因 1 号外显子 M1I 突变,也曾在澳大利亚和新加坡的华裔家系中有过报道,有学者认为这种突变可能是华人群体中的一种建立者突变[17],但我们在重庆地区尚未发现该突变。

综上所述,在本研究中,32 例 PHEO 患者 SDHD 基因 1、2 外显子未发现基因突变,可能与人种不同,地区不同和样本量大小有关系,也许中国重庆的 PHEO 患者在 SDHD 基因第 1、2 外显子没有突变发生。如果扩大样本量和对该基因其他位点以及其他易感基因进行进一步研究,将有助于进一步明确散发性 PHEO 的发生机制。

参　考　文　献

[1]　Baysal B E,Ferrell R E,Willett-Brozick J E,et al. Mutations in SDHD,a mitochondrial complex Ⅱ gene,in hereditary paraganglioma[J]. Science,2000,287(5454):848-851.

[2]　Eng C,Kiuru M,Fernandez M J,et al. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond[J]. Nat Rev Cancer,2003,3:193-202.

[3]　Bayley J P,Devilee P,Taschner P E. The SDH mutation database: an online resource for succinate dehydrogenase sequence variants involved in pheochromocytoma,paraganglioma and mitochondrial complex Ⅱ deficiency[J]. BMC Med Genet,2005,6:39.

[4]　Sun H Y,Cui B,Su D W,et al. LOH on chromosome 11q,but not

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0435-04

AT1R 基因 A1166C 多态性与重庆地区高血压病的相关性研究

向 林,柳 青,雷 寒
(重庆医科大学附属第一医院临床研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究重庆地区人口血管紧张素Ⅱ的Ⅰ型受体(Angiotensin Ⅱ type Ⅰ,AT1R)A1166C 基因多态性与原发性高血压的关系 方法:用多聚酶联反应(Polymerase chain reaction,PCR)结合限制性片段长度多态性(Restriction fragment length poly morphism,RFLP)方法对 104 例原发性高血压(Essentiac hypertension,EH)患者和 100 例健康体检者进行 AT1R(A1166C)的基因多态性分析。结果:EH 组 AC 基因型频率明显高于正常对照组(0.240 vs 0.005,$P<0.05$),EH 组 C1166 等位基因频率明显高于正常对照组(0.130 vs 0.025,$P<0.05$);而 EH 组中的 AA 基因型频率明显低于正常对照组(0.750 vs 0.950,$P<0.05$);EH 组中还发现了较罕见的 CC 纯合子基因型。结论:高血压组和正常对照组 AT1R 基因的 AC、AA 基因型频率有显著性差异,而其它指标无显著性差异。重庆地区原发性高血压与 AT1R 基因的 A1166C 多态性有密切的关系。

【关键词】原发性高血压;血管紧张素Ⅱ-Ⅰ型受体;基因多态性
【中国图书分类法分类号】R544.1;Q753 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

作者介绍:向 林(1973-)男,硕士,
研究方向:遗传性疾病的基因研究。
通讯作者:柳 青,女,研究员,E-mail:qingliu5566@yahoo.cn。
基金项目:教育部科研基金资助项目教计司[2000]65 号文。
重庆市科委科研基金资助项目渝科委计[2000]50 号文
重庆市卫生局科研基金资助项目 99-4005。

SDHD and Men1 mutations was frequently detectable in Chinese patients with pheochromocytoma and paraganglioma[J]. Endocrine,2006,30(3):307-312.

[5] Gimm O,Armanios M,Dziema H,et al. Somatic and occult germ-line mutations in SDHD,a mitochondrial complex Ⅱ gene,in nonfamilial pheochromocytoma[J]. Cancer Res,2000,60(24):6822-6825.

[6] Pollard P J,Bri è re J J,Alam N A,et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations [J]. Hum Mol Genet,2005,14(15): 2231-2239.

[7] Gimenez-Roqueplo A P,Favier J,Rustin P,et al. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway [J]. Am J Hum Genet,2001,69(6):1186-1197.

[8] Selak M A,Armour S M,MacKenzie E D,et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase [J]. Cancer Cell,2005,7(1): 77-85.

[9] Aguiar R C,Cox G,Pomeroy S L,et al. Analysis of the SDHD gene, the susceptibility gene for familial paraganglioma syndrome (PGL1),in pheochromocytomas[J]. J Clin Endocrinol Metab,2001,86(6):2890-2894.

[10] Lee S,Nakamura E,Yang H,et al. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer [J]. Cancer Cell,2005,8(2):155-167.

[11] Neumann H P,Bausch B,McWhinney S R,et al. Germline mutations in nonsyndromic pheochromocytoma[J]. N Engl J Med,2002,346(19):1459-1466.

[12] Amar L,Bertherat J,Baudin E,et al. Genetic Testing in Pheochromocytoma or Functional Paraganglioma[J]. J Clin Oncol,2005,23(34): 8812-8818.

[13] Neumayer C,Moritz A,Asari R,et al. Novel SDHD germ-line mutations in pheochromocytoma patients[J]. Eur J Clin Invest,2007,37(7): 544-551.

[14] Korpershoek E,Van Nederveen F H,Dannenberg H,et al. Genetic analyses of apparently sporadic pheochromocytomas: the Rotterdam experience[J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1073:138-148.

[15] Castellano M,Mori L,Giacch è M,et al. Genetic mutation screening in an Italian cohort of nonsyndromic pheochromocytoma/paraganglioma patients [J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1073 :156-165.

[16] Kyölä S,Nord B,Elder E E,et al. Alterations of the SDHD gene locus in midgut carcinoids,Merkel cell carcinomas,pheochromocytomas, and abdominal paragangliomas[J]. Genes Chromosomes Cancer,2002,34(3):325-332.

[17] Ma R C,Lam C W,Chan W B,et al. A Chinese family with familial paraganglioma syndrome due to succinate dehydrogenase deficiency [J]. Hong Kong Med J,2007,13(2):151-154.

(责任编辑:关蕴良)