Bergmeyer H V. Methods In Enzymology[M]. New York: Academic Press, 1967. 94.

[3] Estabrook R W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratio[A]. In: Bergmeyer H V. Methods In Enzymol[M]. New York: Academic Press, 1967. 41—47.

[4] 严 涛, 张 平, 段恒春, 等. 组织ATP、ADP、AMP水平的荧光素酶系测定[J]. 第三军医大学学报, 1987, 9(3): 294—296.

[5] Williamson D H, Mellanby J. β-Hydroxybutyrate[A]. In: Bergmeyer H V. Methods of Enzymatic Analysis[M]. New York: Aca-demic Press, 1974. 1 836—1 839.

[6] Mellanby J, Williamson D H. Acetoacetate[A]. In: Bergmeyer H V. Methods of Enzymatic Analysis[M]. New York: Academic Press, 1974. 1 446—1 451.

[7] Okada Y. Experimental study on the interruption of hepatic blood flow in obstructive jaundice, with special reference to the cause of death and prolonged decompression[J]. Nippon Geka Hokan, 1989, 58(3): 275—288.

[8] Ersöz S, Cakmakh S, Gecim E, *et al*. The safety of total hepatic vascular occlusion in rabbits with acute extrahepatic cholestasis [J]. Eur Surg Res, 1996, 28(2): 104—110.

[9] Itoh H, Miyazaki M, Udagawa I, *et al*. Experimental study on cell damage of ischemic liver in obstructive jaundiced rats[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1991, 88(5): 1 200—1 203.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)11-1032-01

重庆市儿童哮喘 α_1-抗糜蛋白酶遗传缺陷基因频率及基因分析研究

Study on gene frequency of α_1-antichymotrypsin deficiency and gene analysis in childhood asthma

尹晓娟[1], 李为明[2], 魏红光[2], 光丽霞[2] (第三军医大学: [1]附属西南医院儿科, 重庆 400038; [2]附属新桥医院儿科, 重庆 400037)

哮喘发病具有明显的遗传倾向, 国外研究显示α_1-抗糜蛋白酶(α_1-ACT)遗传缺陷是哮喘发病的重要因素[1]。为探讨α_1-抗糜蛋白酶遗传缺陷在中国儿童哮喘发病中的作用, 本研究对90例重庆市汉族儿童哮喘血浆α_1-ACT含量、Bonn-1和Bochum-1变异体进行了初步探讨, 取得如下结果。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象选择及血样本来源 按文献[3]选择汉族哮喘儿童90例作为哮喘组, 年龄0.25~12.75岁; 并选择汉族健康儿童180例作为儿童对照组, 年龄0.03~13.4岁; 健康献血员200例作为成人对照组。518份血样用于测定血浆α_1-ACT含量和表型分析, 其中470份采自研究对象(哮喘组在缓解期采血); 48份血样采自3组25个汉族家庭的父母。用于基因分析的5份血样采自5例α_1-ACT杂合缺失者。所有血样均用ACD液抗凝。

1.1.2 主要试剂 人血浆蛋白标准品、兔抗人α_1-ACT抗血清; PCR试剂盒, PCR Marker, AluⅠ、DdeⅠ内切酶。检测α_1-ACT exon Ⅲ[Pro^{229}→Ala(CCT→GCT)]点突变引物序列: 引物1为5'-TAT-GAGGACTCTGGGCACTTC-3', 引物2为5'-ACTCCAGAGAGTCTCT-CCAC-3'; 检测α_1-ACT exonⅡ[Leu^{55}→Pro(CTG→CCG)]点突变引物序列: 引物3为5'-CTCTACAGTGGTTTGCCTAATAAC-3', 引物4为5'-TCCATCTGGCCCTCTGAG ACT-3'。

1.2 方法

1.2.1 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦免疫固定技术检测α_1-ACT表型。

1.2.2 常规火箭电泳检测血浆α_1-ACT含量, 确定α_1-ACT杂合缺失。

1.2.3 聚合酶链反应及酶切检测技术检测Bonn-1和Bochum-1变异体。

1.2.4 临床资料 判定哮喘组α_1-ACT杂合缺失与非缺失患者在如下指标是否存在差异: 哮喘的初发年龄、发作住院次数、放射性过敏原吸附试验(RAST)结果。

1.3 统计学处理

用Mantel-Haenszel χ^2_{MH}检验、t检验及Fisher确切概率法进行数据处理。

2 结果

α_1-ACT杂合缺失及其频率: 哮喘组4例、成人对照组1例

(下转1035页)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570749)

作者简介: 尹晓娟(1966—), 女, 湖南省邵阳市人, 硕士, 主治医师, 主要从事α_1-抗糜蛋白酶遗传缺陷在中国人发病中的作用方面的研究, 发表论文10余篇。电话: (023)68754413

收稿日期: 1999-11-01; 修回日期: 2000-08-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

p16 基因失活是人类肿瘤中最频繁发生的基因改变。国内外对 p16 基因在肝癌中的表达及基因改变研究甚少。Sun 等[6] 发现原发性肝细胞癌和肝癌细胞系中普遍存在甲基转移酶明显增高, 但未对其相关基因的甲基化状态进行分析。Wong 等[7] 研究发现原发性肝细胞癌中 p16 基因呈高甲基化。Hui 等[8] 在研究中发现 6 个肝癌细胞系中只有一个 p16 mRNA 未表达, 在排除了突变与杂合缺后, 推测与甲基化异常相关, 而其余 5 个细胞系有不同程度的 p16 mRNA 表达。Heish 等[9] 研究进一步证实基因转录抑制与基因启动子区域 CpG 甲基化的密度相关, 低密度的 CpG 岛甲基化只能使 67%到 90%的转录被抑制, 只有 CpG 岛呈高度的甲基化修饰时, 才表现为基因转录的完全抑制。然而, 这种抑制作用是可逆的, 已有大量实验研究证明甲基转移酶抑制剂 5-脱氧杂氮胞苷通过 DNA 去甲基化机制可以恢复多种抑癌基因的表达。

本实验中 SMMC-7721、$HePG_2$ 两肝癌细胞系中都存在 p16 mRNA 和蛋白微弱表达, 但是经甲基转移酶抑制剂 5-脱氧杂氮胞处理后, p16 mRNA 和蛋白表达水平均明显增强, 说明 5-Azc-cdR 可明显诱导 p16 基因高表达。由于 5-Azc-cdR 的特殊作用机制-DNA 去甲基化作用, 本研究提示: SMMC-7721 和 $HePG_2$ 肝癌细胞株可能存在 p16 基因 CpG 岛部分甲基化, 经 5-Azc-cdR 处理后, p16 基因进一步去甲基化, 其转录和蛋白表达也明显增强。p16 基因编码的 P16 蛋白属于细胞周期依赖性激酶的抑制蛋白, 调节 G_1/S 期细胞的转化, 因此, 我们认为 p16 的复活可能会引起这两株肝癌细胞的生长行为发生改变; 5-Azc-cdR 有可能在未来肝癌的治疗中发挥较大的作用。

参考文献:

[1] 肖文华, 刘为纹, 吕有勇, 等. 肝细胞癌多种抑制癌基因失活机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(2): 324—327.

[2] Chaubert P, Gayer R, Zimmermann A, *et al*. Germ-line mutation of the $p16^{INK4}$(MTSI) gene occur in a subset of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1997, 25(3): 1 376—1 381.

[3] Liew C T, Li H M, Lo K W, *et al*. High frequency of $p16^{INK4}$ gene alteration in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 1999, 18(2): 789—795.

[4] Costello J F, Berger M S, Huang H T, *et al*. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation[J]. Cancer Res, 1996, 56(4): 2 405—2 410.

[5] Herman J G, Merlo A, Mao L, *et al*. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrent DNA methylation in all common human cancers[J]. Cancer Res, 1995, 55(1): 4 525—4 530.

[6] Sun L, Yae A M H, Sakamoto K M, *et al*. Increased DNA methyltransferase expression is associated with an early stage of human hepatocarcinogenesis[J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(3): 1 165—1 170.

[7] Wong I H, Lo Y M, Zhang J, *et al*. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(1): 71—73.

[8] Hui A M, Sakamoto M, Kanai Y, *et al*. Inactivation of p16 INK4 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1996, 24(2): 575—579.

[9] Heish C L. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14(7): 5 487—5 494.

[10] Bachman K E, Herman J G, Corn P G, *et al*. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers[J]. Cancer Res, 1999, 59(2): 798—802.

(编辑　王　红)

(上接 1032 页)

确定为 α_1-ACT 杂合缺失; 哮喘组 α_1-ACT 杂合缺失频率为 4.4%, 比健康儿童对照组(0)及成人对照组(0.5%)明显增高($P<0.05$)。哮喘组 α_1-ACT 杂合缺失的基因频率为 0.022, 成人对照组 α_1-ACT 杂合缺失的基因频率为 0.003, 哮喘组较成人对照组增高($P<0.05$)。

α_1-ACT 表型分析: 在蛋白水平存在遗传多态性。

基因分析: 未发现 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体。

临床资料分析: α_1-ACT 杂合缺失患者哮喘初发年龄早, 哮喘住院次数多; RAST 阳性率显著增高。

3　讨论

以上结果提示 α_1-ACT 杂合缺失增加了儿童患哮喘的危险性, 并在一定程度上影响儿童哮喘的严重性, 血浆 α_1-ACT 检测可望为儿童哮喘临床治疗提供一项有价值指标。α_1-ACT 遗传多态性的发现提示 α_1-ACT 有希望成为新的遗传标记。虽然 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体与所研究的 90 例汉族儿童哮喘发病无关, 但由测定血浆含量确定的 α_1-ACT 杂合缺失与该基因分析的不平行现象提示可能存在本筛查范围外的基因突变, 这为进一步研究 α_1-ACT 与疾病的相互关系拓宽了视野。

关键词: 儿童哮喘; α_1-抗糜蛋白酶; 遗传
中图法分类号: R562.250.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Lindmark B, Svenonius E, Eriksson S. Heterozygous α1-antichymotrypsin and PiZ α1-antitrypsin deficiency, Prevalence and clinical spectrum in asthmatic children[J]. Allergy, 1990, 45(3): 197—203.

[2] 尹晓娟, 李为明. α_1-抗糜蛋白酶的研究进展[J]. 四川医学, 1999, 20(3): 281—283.

[3] 全国儿科哮喘协作组. 儿童哮喘诊断标准和治疗常规[J]. 中华儿科杂志, 1993, 31(3): 222—224.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net