DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.017
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

文章编号:1000-5404(2000)01-0039-03

论著

100例重庆市汉族儿童哮喘 α_1-抗糜蛋白酶基因突变初探

尹晓娟,李为明,魏红光,光丽霞,奚 敏,崔凤文,艾有萍,刘晓蓉,姚 俐 (第三军医大学附属新桥医院小儿科,重庆 400037)

提 要 目的:了解儿童哮喘 α_1-抗糜蛋白酶(α_1-antichymotrypsin,α_1-ACT)基因点突变情况。方法:应用聚合酶链反应(PCR)和限制性酶切图谱分析技术,对100例重庆市汉族儿童哮喘 α_1-ACT基因外显子(exon)II和III进行检测。结果:所有研究对象均未发现Bonn-1及Bochum-1变异体。结论:Bonn-1和Bochum-1变异体与100例重庆市汉族儿童哮喘发病无平行关系。

关键词 儿童哮喘;α_1-抗糜蛋白酶;基因突变;聚合酶链反应
中图法分类号 R394.2;R725.622.5 文献标识码 A

Gene analysis of α_1-antichymotrypsin hereditary deficiency among 100 Han asthmatic children in Chongqing

YIN Xiao-juan, LI Wei-ming, WEI Hong-guang, GUANG Li-xia, XI Min, CUI Feng-wen, AI You-ping, LIU Xiao-rong, YAO Li (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract Objective: To understand the situation of α_1-antichymotrypsin gene point mutations of childhood asthma. Methods: One hundred patients with childhood asthma and 100 normal controls were tested for gene analysis of exon II and exon III of α_1-antichymotrypsin by PCR and restriction endonuclease mapping. Results: Molecular structural abnormality of the genes was found in all the subjects. Conclusion: There is no parallel relationship between variants including Bonn-1 and Bochum-1 and 100 han asthmatic children in Chongqing.

Key words childhood asthma; α_1-antichymotrypsin; gene mutation; PCR

哮喘发病具有明显的遗传倾向,为一种多基因遗传病,遗传度为70%~80%。哮喘病因呈现多因性和异质性,并由不同的遗传机制控制。瑞典学者Lindmark等[1]通过测定血浆 α_1-ACT含量,发现 α_1-ACT遗传缺失是哮喘发病的重要因素,另有学者通过基因分析发现 α_1-ACT基因exon III存在点突变 $Pro^{229}\rightarrow$ A1a(CCT→GCT),称Boon-1突变型[2];exon II存在点突变 $Leu^{55}\rightarrow$ Pro(CTG→CCG),称Bochum-1突变型[2]。为探讨Bonn-1和Bochum-1变异体与中国儿童哮喘发病的关系,我们设计了两对特异性引物,应用聚合酶链反应(PCR)分别扩增含上述位点的两段DNA序列,然后通过限制性酶切技术对100例重庆市汉族儿童哮喘 α_1-ACT基因中编码第229位脯氨酸和第55位亮氨酸的基因序列进行了检测,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象及样本的选择

按1992年10月全国儿科哮喘协作组制定的《儿童哮喘诊断标准》在重庆市选择彼此无关的汉族哮喘儿童100例作为哮喘组,年龄为0.25~12.75(6.2±4.1)岁,男女之比60∶40;并选择彼此无关的健康儿童100例作为对照组,年龄0.04~13.2(6.2±4.0)岁,男女之比为60∶40。所有研究对象肝功能正常,对照组排除有遗传及遗传倾向者。采静脉血后用酸性柠檬酸葡萄糖溶液(ACD)抗凝,-20℃保存备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570749)
作者简介:尹晓娟(1969.4),女,湖南省邵阳市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事α-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4篇。电话:(023)68755602
收稿日期:1999-04-05;修回日期:1999-10-15

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

1.2 主要试剂

蛋白酶 K、TaqDNA 聚合酶、4 种脱氧核苷酸、DNA 分子量标记物、限制性内切酶 *Alu* Ⅰ、*Dde* Ⅰ等均购自宝灵曼公司。筛查 α_1-ACT exon Ⅱ和Ⅲ基因相应点突变的引物均由军事医学科学院合成。探测基因 exon Ⅲ Pro^{229}→A1a(CCT→GCT)点突变引物序列为:

引物 1: 5′-TATGAGGACTCTGGGCACTTC-3′

引物 2: 5′-ACTCCAGAGAGTCTCTCCAC-3′

探测基因 exon Ⅱ Leu^{55}→Pro(CTG→CCG) 点突变引物序列为:

引物 3: 5′-TCCATCTGGCCCTCTGAGACT-3′

引物 4: 5′-CTCTACAGTGGTTTGCCTAATAAC-3′

1.3 方法

1.3.1 DNA 抽提 每个样本采 2.5 ml 抗凝静脉血, 经裂解、蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 用 TE 溶解提取 DNA。

1.3.2 PCR 扩增 0.5~1 μg 样本 DNA 加入 100 μl 标准反应体系中(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dATP、dGTP、dCTP、dTTP, 1.0 μmol/L, 2~5 U TaqDNA 聚合酶), 置 PCR 循环仪上扩增, 循环参数: 95 ℃变性 5 min; 94 ℃ 60 s, 56 ℃ 50 s, 72 ℃ 60 s, 循环 30 周期; 72 ℃延伸 10 min。

1.3.3 限制性片段长度多态性(RFLP)检测 每个样本取 10 μl 扩增产物加入 20 μl 标准反应体系中, 再加入相应的内切酶(引物 1、2 扩增物加 5 U *Alu* Ⅰ酶切, 引物 3、4 扩增物加 5 U *Dde* Ⅰ酶切), 37 ℃消化 3~4 h, 酶切产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳检测。

1.3.4 限制性片段长度多态性分析标准 引物 1、2 扩增产物为 366 bp, 用 *Alu* Ⅰ进行酶切, 正常产生 227 bp、118 bp、21 bp 3 个 DNA 片段, 而 Bonn-1 变异体则产生 207 bp、118 bp、21 bp 和 20 bp 4 个 DNA 片段, 其中 227 bp 是否出现 207 bp 和 20 bp 两个 DNA 片段是检测的关键; 引物 3、4 扩增产物为 788 bp, 用 *Dde* Ⅰ进行酶切, 正常产生 268 bp、154 bp、100 bp、77 bp、71 bp、57 bp、36 bp、14 bp 和 11 bp 9 个 DNA 片段, 而 Bochum-1 变异体则产生 368 bp、154 bp、77 bp、71 bp、57 bp、36 bp、14 bp 和 11 bp 8 个 DNA 片段, 其中是否出现 368 bp DNA 片段是检测的关键。

2 结果

我们通过 PCR 和限制性酶切图谱分析技术对 100 例哮喘儿童和 100 例正常儿童 α_1-ACT 基因 exon Ⅱ和Ⅲ分别进行检测, 图 1、2 为检测疾病组基因突变示意图。图 1 为引物 1、2 扩增产物及其酶切产物分析图, 酶切后产生 227 bp DNA 片段, 未见 207 bp 和 20 bp DNA 片段; 图 2 为引物 3、4 扩增产物及其酶切产物分析图, 酶切后未见 368 bp DNA 片段。哮喘组与对照组儿童酶切产物电泳带均与图 1、2 相同, 即 100 例哮喘儿童和 100 例正常儿童均未发现 Bonn-1 和 Bochum-1 突变体。

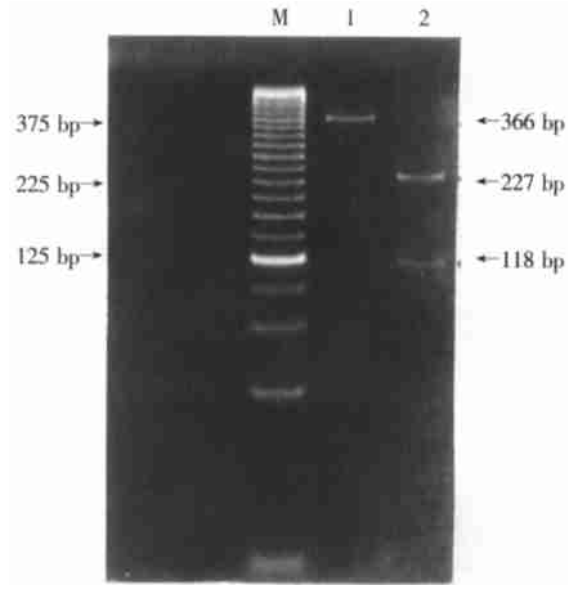
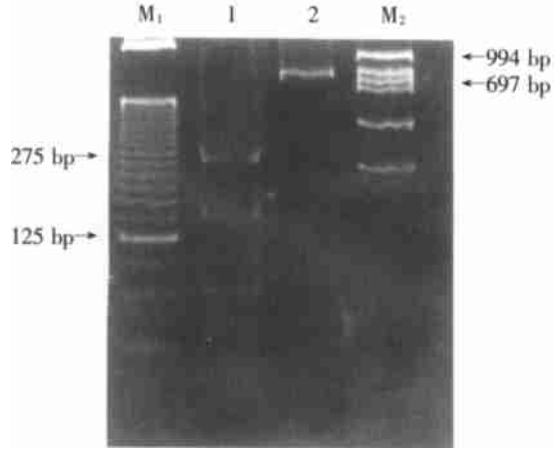


图 1 α_1-ACT 基因 exon Ⅲ RFLP 分析

Fig 1 RFLP analysis of exon Ⅲ of α_1-ACT gene

M: Marker (25 bp DNA ladder); 1: Amplified band;



2: Cut band by restriction endonuclease

图 2 α_1-ACT 基因 exon Ⅱ RFLP 分析

Fig 1 RFLP analysis of exon Ⅱ of α_1-ACT gene

M_1: Marker (25 bp DNA ladder); M_2: PCR Marker; 1: Cut band by restriction endonuclease; 2: Amplified band

3 讨论

国外学者采用基因测序分析方法发现 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体与慢性阻塞性肺病发病有关[2], 同时发现人血浆 α_1-ACT 含量的下降与慢性阻塞性肺病、慢性肝病及支气管哮喘相关联[1~4]。我们通过火箭电泳技术对重庆市 100 例汉族儿童哮喘血浆 α_1-ACT 含量进行测定, 发现 α_1-ACT 杂合缺失与儿童哮喘存在一定的联系,

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

们采用引物 1、2 将 α1-ACT exon Ⅱ第 54 位至第 419 位的基因序列扩增出来，总长度 366 bp。在扩增出的 366 bp 片段中，正常情况下，*Alu* Ⅰ 酶有两个酶切位点，当用 *Alu* Ⅰ 酶进行酶切时，产生 227 bp、21 bp 及 118 bp 3 个 DNA 片段；如果编码第 229 位的脯氨酸的 'CCT' 突变为编码丙氨酸的 'GCT' 时，则增加了一个 *Alu* Ⅰ 酶酶切位点，酶切时将 227 bp 又切成 207 bp 和 20 bp 2 个 DNA 片段，于是，酶切后产生 207 bp、118 bp、21 bp 及 20 bp 4 个 DNA 片段。我们采用引物 3、4 将 α1-ACT exon Ⅱ第 33 位至第 820 位的基因序列扩增出来，总长度 788 bp。在扩增出的 788 bp 片段中，正常情况下，*Dde* Ⅰ 酶有 8 个酶切位点，当用 *Dde* Ⅰ 酶进行酶切时，产生 268 bp、154 bp、100 bp、77 bp、71 bp、57 bp、36 bp、14 bp 及 11 bp 9 个 DNA 片段；如果编码第 55 位亮氨酸的碱基序列 'CTG' 突变为编码脯氨酸的碱基序列 'CCG' 时，则该部位 *Dde* Ⅰ 酶的酶切位点消失，于是，酶切后产生 368 bp、154 bp、77 bp、71 bp、57 bp、36 bp、14 bp 及 11 bp 8 个片段。本研究没有发现 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体所具有的特征性 DNA 片段，此结果表明 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体与 100 例重庆市汉族儿童哮喘发病无平行关系。

本研究虽然没有发现 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体，但不能说 α1-ACT 基因突变与中国儿童哮喘发病无关。首先，本研究仅仅筛查了 α1-ACT 基因 exon Ⅱ 上编码其第 55 位亮氨酸和 exon Ⅲ上编码其第 229 位脯氨酸的基因序列的两个位点的点突变情况，而没有检测 exon Ⅰ、exon Ⅳ、exon Ⅴ以及 exon Ⅱ和 exon Ⅲ的其它位点。其次，种族差异、研究群体、地理环境及疾病种类均影响基因的分布排列。我国幅源辽阔，南北地理环境差异很大，又是多民族国家，本研究仅仅局限于重庆市的 100 例汉族儿童。所以，尽管没有发现相应的变异体，但结合前期研究结果来看，本研究仍然具有不可忽视的意义。

本研究在重庆市 100 例汉族儿童哮喘中对 α1-ACT 基因突变进行了初步探讨，为在中国人群中进一步研究 α1-ACT 打下了基础。要想更多地了解 α1-ACT 遗传缺陷与中国儿童哮喘发病的关系则需要在国内不同的民族、不同的地区广泛进行 α1-ACT 的研究。

参考文献

[1] Lindmark B, Svenonius E, Eriksson S. Heterozygous α1-antichymottypsin and Piz α1-antittypsin Deficiency[J]. Allergy, 1990, 45(3): 197—203.
[2] Poller W, Faber J P, Weidinger S, *et al*. A leucine-toproline substitution cause a defective α1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease[J]. Genomics, 1993, 17(3): 740—743.
[3] Lindmark B. Asthma and heterozygous α1-anchymotrypsin deficiency: a posisible association[J]. J Internal Med-icine, 1990, 227(2): 115—118.
[4] Elzouki A N, Verbaan H, Lindgren S, *et al*. Serine protease inhitors in patients with chronic viral hepatitis[J]. J Hepatol, 1997, 27(1): 42—48.

（编辑　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2000)01-0041-01

经验与短篇

高原藏族酒精性肝纤维化的电镜观察

Ultrastructure of alcoholic hepatic fibrosis of native Tibetan at high altitude

孙克勤，李素芝，李木成，任　燕　（西藏军区总医院病理科电镜室，拉萨 850003）

近年来研究发现，在各种致病因素作用下，脂肪肝与肝纤维化、矽硬化常常相继发生或同时存在[1]。为了研究高原藏族酒精性脂肪肝与肝纤维化的关系及其机制，我们收集了 20 例嗜酒患者经活检肝穿标本作光镜和电镜观察。现报道如下。

1　对象与方法

1.1　对象

20 例嗜酒患者均为世界高原（（海拔 3 658m））男性藏族，年龄 28～61 岁，平均 43 岁。所有患者作 HBsAg，两对半检测均为阴性，每日摄入酒类折合成酒精 100～350g，平均 225g。饮酒时间 5～45 年，平均 21 年。并除外其它原因所致的肝病，作为研究对象。

1.2　方法

采取的活检肝组织一部分经 10%甲醛固定，HE 染色，光镜观察。其余以常规电镜标本制作，采用 Philips—CM 100 透射电镜观察。

2　结果

光镜下肝细胞多显脂肪变性，主要为大泡性脂变，小叶内

（下转 45 页）

作者简介：孙克勤（1962. 1），男，重庆市丰都县人，副主任医师，主要从事高原病理学方面的研究，发表论文 13 篇。电话：（0891）6253226

收稿日期：1999—07—15；修回日期：1999—10—17

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