

· 论著 ·

中国人群神经管缺陷 *VANGL1* 基因突变的筛查及关联研究徐 织¹ 王 剑² 傅启华² 杨 波¹ 宋云海¹ 鲍 南¹

【摘要】 目的 探讨 *VANGL1* 基因突变和单核苷酸多态性 (SNPs) 与中国人群神经管缺陷 (Neural Tube Defects, NTDs) 的相关性。**方法** 应用聚合酶链反应结合 DNA 测序技术, 对 100 例 NTDs 患者及 240 例对照组的 *VANGL1* 基因进行突变筛查, 并分析 SNP 位点是否与 NTDs 有关。**结果** 在 *VANGL1* 基因的全部 8 个外显子中, NTDs 组及对照组均发现有错义突变 c. 640C > T (p. R214W) 和 c. 1127A > G (p. Q376R) 存在, 但两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 *VANGL1* 基因的 5' 和 3' 端共发现 4 个 SNPs 位点存在, 分别是 -5046C/G、-5048A/C、54740A/G 和 54932A/G。-5046C/G 和 -5048A/C 的基因型频率在两组间比较, 无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 54740A/G 和 54932A/G 的基因型频率在两组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 中国人群 NTDs 患者的 *VANGL1* 基因中未发现单独的基因突变存在, 其转录调控区 SNPs 位点 (54740A/G 和 54932A/G) 与 NTDs 存在相关性。

【关键词】 椎管闭合不全; 遗传筛查

Mutation screening and associated study of *VANGL1* gene in chinese patients with Neural Tube Defects.

XU Zhi¹, WANG Jian², FU Qi-hua², et al. 1, Department of Surgery; 2, Department of Laboratory Medicine, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200127, China.

【Abstract】 Objective To investigate the association and mutation of *VANGL1* gene in Chinese patients with neural tube defects (NTDs). **Methods** 100 patients with NTDs and 240 normal subjects as control group were investigated in this study. The *VANGL1* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR), the PCR products were purified and then sequenced. The association of the SNPs with the NTD were analyzed. **Results** Two missense mutation (c. 640C > T and c. 1127A > G) were identified both in NTDs and Controls. But there were no significant differences between them ($P > 0.05$). Four new single nucleotide polymorphisms (SNPs) were -5046C/G、-5048A/C、54740A/G and 54932A/G. According to analysis, there were no significant differences of the -5046C/G、-5048A/C between the NTDs patients and controls, and there were much significant differences of the 54740A/G and 54932A/G between the NTDs patients and controls ($P < 0.05$). **Conclusion** There was no mutation of gene *VANGL1* with NTDs in Chinese population. But there were may be great relationship of 54740A/G and 54932A/G with NTDs.

【Key words】 Spinal Dysraphism; Genetic Screening

神经系统起源于神经外胚层, 由神经管和神经嵴分化而成。如果神经管闭合和发育不全就会引起先天性畸形 - 神经管缺陷 (neural tube defects, NTDs)。NTDs 主要表现为脑和脊髓发育异常, 并常伴有颅骨和脊柱的异常。虽然目前人类 NTDs 的确切致病基因还不十分清楚, 但有越来越多的研究认为 *VANGL* 基因家族与其密切相关。最近国外研

究^[1-2]报道了在 NTDs 患者中发现的多种 *VANGL1* 基因突变, 证实了 *VANGL1* 基因与 NTDs 存在高度相关性, 但国内还未见相关报道。本文对 100 例 NTDs 患者及 240 例正常对照者进行了 *VANGL1* 基因所有 8 个外显子及其侧翼序列的测序分析, 发现位于 *VANGL1* 基因 3' 端非编码区的 2 个 SNPs 可能与 NTDs 相关。

材料与方法

一、研究样本

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2011.02.005

作者单位: 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心 (上海, 200127), 1, 外科; 2, 检验科, 通讯作者: 鲍南, E-mail: zmxyfb@yahoo.com.cn

100 例 NTDs 患儿为 2009 年 3 月至 2010 年 3 月上海儿童医学中心神经外科收治的患儿。就诊年龄 15 d 至 16 岁,其中男 53 例,女 47 例。经 MRI、术中所见及病理检查证实均为各种类型的神经管缺陷。240 例对照组血液样本由上海儿童医学中心体检时收集,排除 NTDs。以上标本的收集均获得患儿家属知情同意及医院伦理委员会的同意。

二、基因组 DNA 的提取

分别取患儿及对照组血液 1.8 mL,枸橼酸钠抗凝,使用天根生化科技(北京)有限公司的血液基因组 DNA 试剂盒提取基因组 DNA,操作按试剂盒说明进行,提取的 DNA 于 -20°C 冰箱冻存。

三、多聚酶链反应(PCR)扩增

VANGL1 的 8 个外显子引物序列见表 1,所有引物均由英骏(上海)贸易有限公司合成。PCR 反应体系为:10 × Buffer1 μL , 2 mol/L dNTP 0.8 μL , 两条 10 pmol/L 引物各 0.4 μL , TaqDNA 聚合酶 0.1 μL (5 U/ μL), 去离子双蒸水 6.3 μL 和 DNA 样品 1 μL 。扩增条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 退火(Exon1、Exon4、Exon6 和 Exon8 为 64°C ; Exon2 为 62°C ; Exon3、Exon5 和 Exon7 为 61°C) 40 s, 72°C 延伸 40 ~ 55 s (Exon1、Exon2、Exon3、Exon5、Exon6 和 Exon7 为 40 s; Exon4 为 55 s; Exon8 为 50 s), 循环 35 次, 72°C 延伸 2 min。

表 1 *VANGL1* 基因编码区引物序列及扩增片段长度

<i>VANGL1</i>	引物序列	扩增产物大小
Exon1	Forward5'-gggcactcgtgaggca-3' Reverse5'-agacgcccccacccctggacc-3'	674 bp
Exon2	Forward5'-gagaccccagagagggtgt-3' Reverse5'-tgactcagcgtg-3'	400 bp
Exon3	Forward5'-gtgaagatgggtgggtttg-3' Reverse5'-gttctcttggattttg-3'	383 bp
Exon4	Forward5'-tgaatagggttggttagatgc-3' Reverse5'-cttttctggttggggaggag-3'	849 bp
Exon5	Forward5'-tggaaaccagtggactctgt-3' Reverse5'-tggttcgacttc-3'	366 bp
Exon6	Forward5'-aggggttggttagacaacact-3' Reverse5'-aacatgacctgctgggaca-3'	674 bp
Exon7	Forward5'-ttgcttttttcttccctcc-3' Reverse5'-tgtgcttttgaaggcc-3'	612 bp
Exon8	Forward5'-tgagctggctctgttctaaag-3' Reverse5'-gtaaccctttcccag-3'	1 072 bp

四、DNA 序列分析结果

PCR 产物经割胶纯化后(Qiagen 公司产品),

ABI3130XL 测序仪直接测序。

五、统计学分析

病例组和对照组间等位基因频率的比较采用卡方检验,在 SPSS11.5 软件包中进行。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

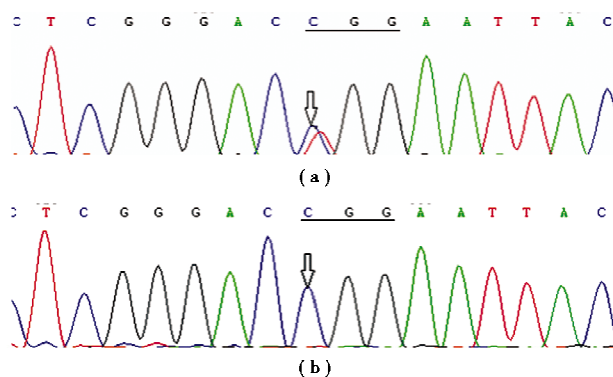
结 果

一、基因突变筛查结果

从 1 例神经管缺陷的患儿和 1 例对照组人群的 *VANGL1* 基因(Genbank 登陆号:NM138959.2)中识别出一个新的错义突变,即 c.640C > T(三联体密码子由 CGG 变为 TGG),导致 p. R214W。另一个是从 1 例神经管缺陷患儿和 2 例对照组人群的 *VANGL1* 基因中识别出 c.1127A > G(三联体密码子由 CAG 变为 CGG),导致 p. Q376R。见图 1~2 及表 2。

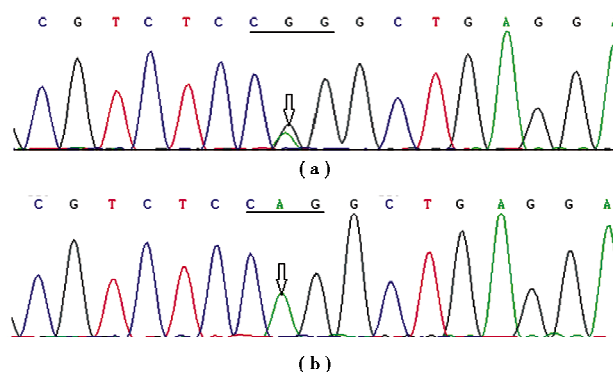
二、转录调控区 4 个新 SNPs 的识别

在 *VANGL1* 的 5' 和 3' 端分别发现了 4 个 SNPs,分别为 -5046C/G、-5048A/C、54740A/G 和 54932A/G。根据对照分析,-5046C/G 和 -5048A/



注:a,箭头所示为 c.640C>T,即 p.R214W;b,箭头所示为同一位点的纯合野生型密码子 CGG

图 1 R214W 不同基因型的测序峰型



注:a,箭头所示为 c.1127A>G,即 p.Q376R;b,箭头所示为同一位点的纯合野生型密码子 CAG

图 2 Q376R 不同基因型的测序峰型

表 2 NTDs 患儿和对照组人群中 *VANGL1* 基因错义位点比较[例(%)]

错义突变	NTDs	Controls	<i>P</i> 值
p. R214W	1/100(1%)	1/240(0.42%)	<i>P</i> > 0.05
p. Q376R	1/100(1%)	2/240(0.83%)	<i>P</i> > 0.05

注: 两组基因型频率比较, $\chi^2 = 0.411, P > 0.05$

C 的基因型在 NTD 组和对照组间的频率分布无统

计学意义(两组 -5046C/G 和 -5048A/C 的基因型频率比较统计量值均为: $\chi^2 = 2.314, P > 0.05$)。而 54740A/G 和 54932A/G 的基因型在 NTD 组和对照组间的频率分布则有明显统计学意义(两组 54740A/G 基因型频率比较: $\chi^2 = 67.115, P < 0.05$; 两组 54932A/G 的基因型频率比较: $\chi^2 = 78.297, P < 0.05$), 见表 3。

表 3 NTDs 患儿和对照组人群中基因 *VANGL1* 4 个新 SNPs 的的基因型频率分布[例(%)]

<i>VANGL1</i> 基因	NTDs 患儿(<i>n</i> = 100)	对照组人群(<i>n</i> = 240)	χ^2 值	<i>P</i> 值
-5046C/G 基因型				
CC	5(5.0%)	10(4.1%)	2.314	>0.05
CG	37(37.0%)	70(29.2%)	2.314	>0.05
GG	58(58.0%)	160(66.7%)	2.314	>0.05
-5048A/C 基因型				
AA	5(5.0%)	10(4.1%)	2.314	>0.05
AC	37(37.0%)	70(29.2%)	2.314	>0.05
CC	58(58.0%)	160(66.7%)	2.314	>0.05
54740A/G 基因型				
AA	12(12.0%)	40(16.7%)	67.115	<0.05
AG	47(47.0%)	20(8.3%)	67.115	<0.05
GG	41(58.0%)	180(75.0%)	67.115	<0.05
54932A/G 基因型				
AA	9(9.0%)	30(12.5%)	78.297	<0.05
AG	51(51.0%)	20(8.3%)	78.297	<0.05
GG	40(40.0%)	190(79.2%)	78.297	<0.05

讨 论

1998 年 Taylor 等^[3]首先在果蝇中克隆 *VANGL* 基因。根据表型的不同,最先发现的基因被命名为 *stbm* 或 *Vang*^[3-4]。在哺乳动物中, *VANGL* 包括 *VANGL1* 和 *VANGL2*, *VANGL1* 定位在小鼠染色体的 3qF2.2、人类的 1p13.1, 而 *VANGL2* 定位在小鼠染色体的 1qH3、人类的 1q23.2。脊椎动物的 *VANGL1* 和 *VANGL2* 蛋白属于高度保守的膜蛋白,由 521 个氨基酸组成,包括 4 个跨膜(TM)区和胞浆区,一个 PDZ 结构域。4 个跨膜区分别位于氨基酸序列的 114-134、152-172、186-206、222-242 残基端^[5]。胞浆区的 PDZ 结构则与其他蛋白质的结合有关。在生物进化过程中, N 端胞质区的 Ser 簇结构域及 C 端胞质尾区的 PDZ 结构域是非常保守的^[6]。

VANGL 是平面细胞极性(Planar Cell Polarity, PCP)过程中的核心基因之一,对神经胚形成时建立 PCP 和调节汇聚延伸(Convergent Extension, CE)过程起关键性的作用。如果在 PCP 过程中, *VANGL* 基

因受到干扰,就会导致高度组织特异性的上皮结构失去正常的极性,从而有可能导致不同程度的神经管缺陷的发生。

目前不仅在孕期的小鼠中检测到 *VANGL1* 的存在,在人类孕 8 和 10 周同样能检测到 *VANGL1* 的广泛存在,而且表现为一种动态表达模式。根据刘坚等^[8]的研究,在维甲酸诱导的神经管缺陷动物,早期使用维甲酸(E9.5)导致 *VANGL1* 和 *VANGL2* 表达显著下调,从颅侧到尾端神经孔均显著下调,并且这种微弱的表达水平持续到出生。稍后使用维甲酸(E10.5)的影响方式较为复杂: *VANGL1* 和 *VANGL2* 基因表达在头侧中度下调,但在尾侧却显著下调。这表明 *VANGL1/2* 与维甲酸诱导的神经管缺陷有关。

有学者首次在家族性和散发性 NTDs 患者的 *VANGL1* 基因中检测出 8 种独立的突变(p. V239I, p. R274Q, p. M328T, p. S83L, p. F153S, p. R181Q, p. L202F 和 p. A404S),表明 *VANGL1* 基因与 NTDs 存在高度相关性^[1-3]。但考虑到种族、地域及民族的差异性,中国人群中 *VANGL1* 突变情况还有待研究。

本实验对 100 例患儿的 *VANGL1* 进行了序列分

析,并未发现有明显相关的突变,这可能是由于我国地理环境不同,人种不同,同种疾病可能有不同基因突变。我国 *VANGL1* 基因是否与神经管缺陷有关,有待进一步实验证实。虽然本实验未找到与 NTDs 相关的基因突变,但发现了 2 个错义突变和转录调控区 4 个新 SNPs,其中 c. 640C > T 位于 *VANGL1* 的 TM3 和 TM4 之间的胞外区,对由此碱基组成的密码子编码的氨基酸在众多物种中比较后得知:在物种进化过程中,此位点保守性较低,容易突变。而 c. 1127A > G 位于 *VANGL1* 的胞浆区,此位点在物种进化中高度保守,发生突变的可能性小。这 2 个错义突变的基因型频率在 NTDs 患儿和对照组中的分布差异无统计学意义。错义突变是编码某种氨基酸的密码子经碱基替换以后,变成编码另一种氨基酸的密码子,从而使多肽链的氨基酸种类和序列发生改变。错义突变的结果能够使多肽链丧失原有功能,导致蛋白质异常。推测 2 个错义突变可能是导致 NTD 的原因之一,或与环境因素相互作用而发病。

基因转录调控区的碱基起控制基因转录的起始时间、表达程度以及转录的终止,如果部分碱基发生改变(突变),则导致基因表达的调节障碍,从而引起不同疾病。本实验中 - 5046C/G 和 - 5048A/C 碱基的改变在 NTDs 组和对照组中的频率分布无统计学意义,说明在神经管缺陷患儿中,这两个位点碱基的改变对神经管缺陷的发生不起作用或作用很小。而 54740A/G 和 54932A/G 碱基的改变在 NTDs 组和对照组中的频率分布有明显统计学意义,这两个位点可能是通过影响 *VANGL1* 基因转录的起始时间、表达程度以及终止的位点,进一步影响 mRNA 的剪切或修饰,造成 *VANGL1* 蛋白功能的改变,从而影响神经管缺陷的发生。

有文献报道,c. 346G > A 突变为 SNPs 具有种族差异性^[2]。本实验 100 例患儿和 240 例对照组中分别发现 27 例和 26 例存在此位点突变,患儿中基因型 GG、GA、和 AA 的频率分别为 0.73、0.26 和 0.01,对照组中基因型 GG、GA、和 AA 的频率分别为 0.77、0.20、0.03。病例组和对照组中此位点的突变并无差别,说明中国人群中 c. 346G > A 的突变率与非洲裔美国人群相似。

由于病例数有限和疾病类型的多样性,本实验只发现了 2 个错义突变和转录调控区 4 个新 SNPs,未发现与 NTDs 相关的基因突变,同时 NTDs 是一种复杂的多因子病,环境和遗传因素在其中起了重要作用,所以应进一步扩大样本量,追踪突变患者的家

系,以确定遗传因素在其中所起的作用;另一方面,目前已明确孕前服用叶酸可使 NTDs 的发生率降低 50% ~ 70%^[7]。有关动物实验也表明,*VANGL1*/2 与维甲酸诱导的神经管缺陷有关^[8];相关实验表明斑马鱼 *VANGL1* 的异位表达部分抑制 *tri*(*VANGL2*) 突变时原肠胚形成时的缺陷,同样,在斑马鱼体内注入 *VANGL1* 的 mRNA 后能部分抑制 *tri*/*VANGL2* 敲除小鼠的 CE 缺陷^[9-10],这些现象说明 *VANGL1* 和 *VANGL2* 不仅具有相似的生物学活性,而且都与神经管畸形有关。应继续研究叶酸代谢和 *VANGL* 突变之间有无关联及相关性如何,阐明 NTDs 发病的分子机理,为临床 NTDs 的预防及治疗提供有效指导。

参考文献

- 1 Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, et al. Mutations in *Vangl1* associated with neural-tube defects[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(14):1432-1437.
- 2 Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, et al. Novel Mutations in *Vangl1* in Neural Tube Defects[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(7):E706-715.
- 3 Taylor J, Abramova N, Charlton J, et al. Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene[J]. *Genetics*, 1998, 150(1):199-210.
- 4 Wolff T, Rubin GM. Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*[J]. *Development*, 1998, 125(6):1149-1159.
- 5 Torban E, Wang HJ, Groulx N, et al. Independent mutations in mouse *Vangl2* that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50):52703-52713.
- 6 Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on *Vangl1* and *Vangl2* genes[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(5):1435-1440.
- 7 van der Linden IJ, Afman LA, Heil SG, et al. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk[J]. *Proc Nutr Soc*, 2006, 65(2):204-215.
- 8 刘坚,戚静,祝婕,等.维甲酸对胎鼠 *Vangl1* 及 *Vangl2* 基因表达的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*. 2008, 16(3):23-26.
- 9 Jessen JR, Solnica-Krezel L. Identification and developmental expression pattern of van gogh-like 1, a second zebrafish strabismus homologue[J]. *Gene Expr Patterns*, 2004, 4(3):339-344.
- 10 Reynolds A, McDearmid JR, Lachance S, et al. *Vangl1* rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish[J]. *Mech Dev*, 2010, 127(7-8):385-392.