

• 论著 •

尿道下裂的 *MAMLD1* 基因研究钱 晨¹ 林厚维¹ 孙 平¹ 徐国峰¹ 徐卯升¹ 杨 涛² 耿红全¹

【摘要】 目的 分析尿道下裂患儿 *MAMLD1* 基因突变的比例,探讨该基因在尿道下裂发病中的作用。**方法** 收集 100 例单纯尿道下裂患者进行 *MAMLD1* 基因检测,为实验组,随机选取健康人群来源的 200 条 X 染色体为对照组。直接测序检测 *MAMLD1* 基因编码区外显子的序列。**结果** 发现 2 个位点碱基改变(c. 1699C > T, c. 1985A > G),其中 c. 1985A > G 为已报道的 SNP; c. 1699C > T 未报道过,通过 Fisher 精确概率法比较正常和尿道下裂患者中出现的频率,结果无统计学意义($P=0.625$)。**结论** *MAMLD1* 基因不是我国单纯尿道下裂发生的热点基因。c. 1699C > T 是 *MAMLD1* 基因新发现的 SNP。

【关键词】 尿道下裂;基因;研究

Research of *MAMLD1* gene in Hypospadias. QIAN Chen, LIN Hou-xiong, SUN Ping, et al. Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China

【Abstract】 Objective Hypospadias is one of the most common congenital malformations of the male external genitalia with elusive etiology. Evidences indicate that *MAMLD1* is mutated in 10% patients with isolated hypospadias. We directly sequenced the *MAMLD1* gene in 100 sporadic Han ethnic patients with hypospadias and 200 X-chromosomes to further elucidate the role of this gene in hypospadias. Two different heterozygous nucleotide variations were identified. Of the 2 variations, one had previously been reported as a polymorphism: c. 1985A > G; One new variation: c. 1699C > T. Both of these variations were also found in control X-chromosomes. In a word, these findings, together with the indicated roles of the gene, imply that it should not be important gene for Han ethnic patients with hypospadias and c. 1699C > T is a new SNP.

【Key words】 Hypospadias; Genes; Research

尿道下裂发病机制复杂,病因尚不明确,一般认为与基因、内分泌和环境因素有关。有研究认为约 10% 的重度尿道下裂患者存在 *MAMLD1* 基因突变。目前 *MAMLD1* 基因已报道突变 9 种,多态 5 种。由于热点突变存在明显地域差异,本研究对 2010 年 8 月至 2011 年 4 月作者收治的 100 例单纯尿道下裂患者采用巢氏 PCR 扩增直接测序方法进行 *MAMLD1* 基因分析,了解其在我国尿道下裂发病中的作用。

材料和方法

一、临床资料

患者均同意接受 *MAMLD1* 基因检测,为实验

组,患儿年龄 9 个月至 15 岁,其中 I 型 16 例,II 型 27 例,III 型 34 例,IV 型 23 例。随机选取健康人群来源的 200 条 X 染色体为对照组。抽取参与研究

二、方法

DNA 提取:使用 Relax Gene Blood System 在患者外周血中提取基因组 DNA,利用核酸检测仪(NANODROP 2000)进行定量和纯度分析。取一定量 DNA 原液稀释至 10 ng/ μ L 的工作浓度, -20℃ 保存备用, DNA 原液 -80℃ 保存。

巢氏 PCR 扩增:经 PUBMED 数据库下载 *MAMLD1* 基因的编码区外显子标准序列。将每个外显子转换成纯文本格式,输入引物设计软件 Sequencer 4.9 中进行引物设计。在每个需要扩增的目的基因片段外围设计 2 对引物,远离目的基因片段外围设计 2 对引物,即第 1 轮 PCR 的引物,靠近目的基因片段的 1 对引物为内侧引物,即第 2 轮 PCR 的引物。由于 *MAMLD1* 的第 3 外显子片段较长

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2012.02.009

作者单位:1,上海交通大学医学院附属新华医院小儿泌尿外科(上海市,200092), E-mail: qianchen8619@163.com; 2,上海交通大学医学院附属新华医院疾病分子学研究中心(上海市,200092); 通讯作者:耿红全, E-mail: ghongquan@hotmail.com, 本课题受上海交通大学医工结合项目资助(项目编号:YG2010MS15)

(1 746 bp), 作者设计了 4 对外侧引物和内侧引物, 即分段扩增。所用引物序列见表 1。2 轮 PCR 的反应体系均为 25 μ L, 包括 10 ng/ μ L 基因组 DNA 1.2 μ L(第 2 轮 PCR 所加的是 2 μ L 的第 1 轮 PCR 的产物)、10 \times 缓冲液 2.5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 2 μ L、5 μ mol/L 正、反向引物各 1 μ L、DNA 聚合酶

1.0 U, 加双蒸水补至 25 μ L。以 25 μ L 反应体系, 应用 ABS 2720 Thermal Cycler 型 PCR 仪进行 96 孔板 PCR 扩增, *MAMLD1* 编码区的各外显子 2 轮 PCR 反应条件相同: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 反应结束后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 *MAMLD1* 基因编码区外显子的引物序列

基因外显子	外侧引物	引物序列	内侧引物	引物序列
<i>MAMLD1</i> -EXON1	<i>MAMLD1</i> -F1a	CTCAATGAGGGTGCT	<i>MAMLD1</i> -F1b	AAGTCTGTGATTGACG
<i>MAMLD1</i> -EXON1	<i>MAMLD1</i> -R1a	GGATCAGCTCATCTCCTA	<i>MAMLD1</i> -R1b	GAGTGAAAGTCTGTG
<i>MAMLD1</i> -EXON2	<i>MAMLD1</i> -F2a	CTCTCAGGATTCACTTTG	<i>MAMLD1</i> -F2b	ACCAAGTTTGCACAG
<i>MAMLD1</i> -EXON2	<i>MAMLD1</i> -R2a	ACCTTCTCACTTCTCCGT	<i>MAMLD1</i> -R2b	ACAGTCTGATCTGTGC
<i>MAMLD1</i> -EXON3-1	<i>MAMLD1</i> -F3A1	GTCTTTAACTGAGAGG	<i>MAMLD1</i> -F3B1	ACCTCTGTAGGTC
<i>MAMLD1</i> -EXON3-1	<i>MAMLD1</i> -R3A1	GCTGCAACTAGAAGCA	<i>MAMLD1</i> -R3B1	GCTTTAATGTGCCAAAC
<i>MAMLD1</i> -EXON3-2	<i>MAMLD1</i> -F3A2	CCACTGTTCTTACTATG	<i>MAMLD1</i> -F3B2	TTCAAGAGCTGCTAGA
<i>MAMLD1</i> -EXON3-2	<i>MAMLD1</i> -R3A2	GCTTGACAGTAAGGCATT	<i>MAMLD1</i> -R3B2	TATTGGACGACATGCA
<i>MAMLD1</i> -EXON3-3	<i>MAMLD1</i> -F3A3	ACCAGTGCTCAGTGGCA	<i>MAMLD1</i> -F3B3	CTACAAAGCAGCAAG
<i>MAMLD1</i> -EXON3-3	<i>MAMLD1</i> -R3A3	GTAAATGGCTCCGTGGC	<i>MAMLD1</i> -R3B3	CTGCTGCATGATCAT
<i>MAMLD1</i> -EXON3-4	<i>MAMLD1</i> -F3A4	TCTGCTCTGCTGCCAGCA	<i>MAMLD1</i> -F3B4	CAGGCTTGCCACA
<i>MAMLD1</i> -EXON3-4	<i>MAMLD1</i> -R3A3	ATTAGCTGACTTCAGTAG	<i>MAMLD1</i> -R3B4	AGAGCCAGATA
<i>MAMLD1</i> -EXON4	<i>MAMLD1</i> -F4a	ATTAGCTGACTTCAGTAG	<i>MAMLD1</i> -F4b	GGCAAAGCACATAGG
<i>MAMLD1</i> -EXON4	<i>MAMLD1</i> -R4a	CCACCTAGCTAATTGGTTG	<i>MAMLD1</i> -R4b	CTCTGAGCCAGCTGATC
<i>MAMLD1</i> -EXON5	<i>MAMLD1</i> -F5a	GCTAAGATCACAAAGCT	<i>MAMLD1</i> -F5b	AGATGACCCAGCTAG
<i>MAMLD1</i> -EXON5	<i>MAMLD1</i> -R5a	GAAGCACTAGAAGTCCC	<i>MAMLD1</i> -R5b	CTCCCAACAACCTGT
<i>MAMLD1</i> -EXON6	<i>MAMLD1</i> -F6a	GGCATGCATGCGAGTG	<i>MAMLD1</i> -F6b	CTGCACCAAAGCCAAG
<i>MAMLD1</i> -EXON6	<i>MAMLD1</i> -R6a	CCTGCTCTTAGAGTTGGAT	<i>MAMLD1</i> -R6b	CACAGTAACTGCTTACT

检验及测序: 采用 Tanon 3500 凝胶图像工作站的全自动数码凝胶成像系统对最终产物实行目的基因片段电泳筛查, 合格标准为每个编码区外显子均有单一清晰条带, 以确保目的基因准确。合格标准为每个编码区外显子均有单一清晰条带。使用 ABI 3730XL 自动测序仪, Sanger 法进行 PCR 产物的序列分析。测序结果应用 Sequencer 4.9 软件进行分析, 找出突变位点。均重复上述过程 1 遍以验证结果的可靠性。

结 果

在 100 例单纯尿道下裂患者中, 共发现 2 种碱基改变, 即 c. 1985A > G (见图 1) 和 c. 1699C > T (见图 2)。2 种碱基改变在各型尿道下裂中分布如下: c. 1699C > T 在 I、II、III 型尿道下裂患者中各 1 例; c. 1985A > G 在 I、IV 型尿道下裂中各 3 例(表 2)。检测对照组 200 条 X 染色体的 *MAMLD1* 基因, 出现 c. 1699C > T 的频率为 3% (6/200), 出现 c. 1985A

> G 的频率为 5.5% (11/200) (表 3)。通过 Fisher 精确概率法比较正常和尿道下裂患者中两者出现的频率, *P* 值分别为 0.625、0.528, 均无统计学意义。

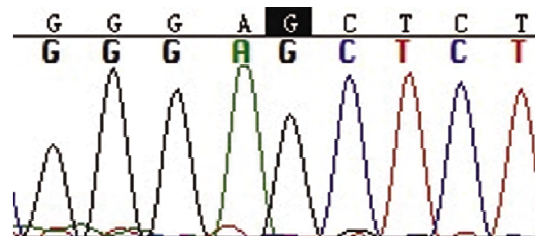


图 1 c.1985A>G

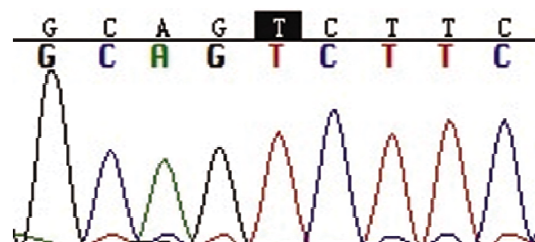


图 2 c.1699C>T

表 2 两个碱基改变在各型尿道下裂中的分布

分型	c. 1699C > T	c. 1985A > G	总计
I 型	1	3	4
II 型	1	0	1
III 型	1	0	1
IV 型	0	3	3
总计	3	6	9

讨 论

尿道下裂可以是单一的缺陷,也可以合并其他畸形(如隐睾等)。尿道下裂的病因学研究不仅是小儿泌尿外科领域的课题,也是全球公共健康的重点之一。阴茎和尿道的发育是一个精细的过程,它

表 3 实验组和对照组比较

外显子	核苷酸改变	氨基酸残基改变	改变的等位基因数	等位基因突变比率	占变化等位基因数的百分率
3	c. 1699C > T	p. P567S	3	3/100	33.3% (3/9)
4	c. 1985A > G	p. N662S	6	6/100	66.7% (6/9)
总计			9	9/100	100%

们的正常发育需要准确的基因程序、激素作用、细胞分化以及组织间的相互作用。这些调节过程中的任何异常都可能导致阴茎向腹侧异常弯曲或尿道口开口异位。传统观念认为雄激素在妊娠早期对阴茎和尿道的发育至关重要。后续研究发现和激素结构相似的一些化学物质可以影响阴茎和尿道的发育。同时基因背景决定的个体差异也是尿道下裂发生的重要因素之一^[1-3]。

MAMLD1 基因是目前热门的尿道下裂候选基因,它和男性生殖器发育有关。到目前为止,已报道基因突变 9 种,多态 5 种。*MAMLD1* 位于 Xq28 上,它是在研究 X 连锁肌小管性肌病的致病基因 *MTM1* 时偶然发现的。随后 Fukami 在日本尿道下裂患者的 *MAMLD1* 基因中发现 3 个无义突变(p. E124X、p. Q197X、p. R653X)^[4]。Kalfa 研究 *MAMLD1* 基因在欧洲尿道下裂患者中的突变情况,发现 3 个突变(p. V432A、p. E109fsX121、p. 531ins3Q),提出 10% 的重度尿道下裂和 *MAMLD1* 基因有关^[5]。Yongen Chen 研究 *MAMLD1* 基因在 99 例瑞典尿道下裂患者中的突变情况,发现 3 个突变(p. Q529K、p. D686D、非编码区 c. 2065 + 8a > t)^[6]。动物实验表明:*MAMLD1* 在胎儿性别形成的关键时期出现在睾丸上皮细胞和睾丸间质细胞中,短暂的抑制 *MAMLD1* mRNA 的表达会显著减少小鼠睾丸间质细胞中的睾酮水平^[7]。*MAMLD1* 基因还与 SF-1 有协同作用,SF-1 能够调控参与性别发育的基因的转录,它的靶向区域之一就位于 *MAMLD1* 基因上^[8,9]。*MAMLD1* 基因突变与尿道下裂关系的研究成为新热点。由于热点突变存在明显的地域差异,因此有必要对我国尿道下裂患者的 *MAMLD1* 基因突变情况进行系统研究。

作者筛查了 100 例单纯尿道下裂患者,通过较大样本量探索 *MAMLD1* 基因突变在我国单纯尿道下裂患者中的比例。在参与编码的外显子区域发现 2 个位点碱基改变,即 c. 1699C > T 和 c. 1985A > G。新发现的碱基改变 c. 1699C > T 导致氨基酸改变 p. P567S,其位于第 3 外显子,出现在 3 例患者中,I、II、III 型各 1 例。这个氨基酸改变是蛋白质中保守的非极性疏水性氨基酸脯氨酸变为极性中性氨基酸丝氨酸。该保守氨基酸的改变是否会导致蛋白质结构发生变化,并最终致病? 作者在对照组中也发现 6 例氨基酸改变 p. P567S。根据统计学结论,考虑其为一个新发现的多态,单一的 p. P567S 不足以致病。

c. 1985A > G 导致氨基酸改变,p. N662S 位于第 4 外显子,2006 年由 Fukami 首次发现,后在日本和欧洲尿道下裂患者及对照组中均有发现。实验组中,该位点碱基改变占有碱基改变的 66.7%,符合国外文献报道的第 4 外显子是 *MAMLD1* 基因突变的高发区域,但该突变在对照组中也有相似的出现频率,通过统计学比较,该位点碱基改变是常见多态。目前也有研究认为该多态一般出现在重度尿道下裂患者中,作者的实验结果显示该突变在重度尿道下裂和轻度尿道下裂患者中各占 50%。

因此,作者认为:该多态不具有地域特异性,在我国单纯尿道下裂患者中对疾病分级也没有明显的趋向性,同时该多态不是尿道下裂发病的危险因素;*MAMLD1* 基因不是导致我国单纯尿道下裂发生的热点基因;c. 1699C > T 是 *MAMLD1* 基因新发现的 SNP。

参 考 文 献