一 VHL 家系致病基因突变的检测与分析*

张前军[1,2] 李 汶[1,2] 李双飞[2] 汤蔚琳[2] 李麓芸[1,2] 卢光琇[1,2△]

(1 中南大学生殖与干细胞工程研究所 湖南 长沙 410078;2 中信湘雅生殖与遗传专科医院 湖南 长沙 410078)

摘要 目的:研究中枢神经系统血管母细胞瘤(VHL)基因突变的主要类型和发生情况,探讨 VHL 疾病发生的原因、临床特点等。**方法**:以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 VHL 基因 3 个外显子及 5'UTR 区域,结合 DNA 直接测序的方法,对一个有多个小脑血管母细胞瘤患者的家系进行 VHL 基因突变检测。**结果**:发现该家系 VHL 基因 5'UTR 区、外显子 1 和外显子 2 正常,外显子 3 存在 c.499C>G 的改变,为一个错意突变,氨基酸改变为 Arg-Gln(p.R167Q),该突变是导致这个家系的患者发病的直接原因。**结论**:VHL 疾病的突变主要集中在 VHL 蛋白的 α、β 结构域,位于 α 结构域的 p.R167Q 突变为该 VHL 家系致病的主要原因。

关键词:VHL 病;中枢神经系统疾病;多态;遗传

中图分类号:R394.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2012)26-5005-04

Identification and Analysis of Mutations in VHL Patients*

ZHANG Qian-jun[1,2], LI Wen[1,2], LI Shuang-fei[2], TANG Wei-lin[2], LI Lu-yun[1,2], LU Guang-xiu[1,2△]

(1 Insistitute of Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410078, China;

2 Reproductive and Genetic Hospital of Citic-Xiangya, Changsha, Hunnan, 410078, China)

ABSTRACT Objective: To determine characters and distributions of VHL gene mutations and discuss the pathogenic, clinical characteristics, diagnosis and treatment progress of VHL disease. Methods: Using genome DNA PCR (polymerase chain reactions) amplify all 3 exons of VHL gene and 5'UTR (un-transcribed region). PCR products were analyzed and sequenced. Results: There are no mutations in exon 1 and exon 2 of VHL. A missense mutation c.499C>G (p.R167Q) in exon 3 was identified to lead to the onset of the VHL family by DNA sequencing. Conclusions: Mutations of VHL gene are mainly found in the α β function domain. Mutation of p.R167Q is the reason for the VHL patients.

Key words: Von Hippel- Lindau Disease; Central Nervous System Diseases; Polymorphism; Genetic

Chinese Library Classification(CLC): R394.3 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)26-5005-04

前言

中枢神经系统血管母细胞瘤约占颅内肿瘤的一小部分,可分为散发性和 von Hippel- Lindau(VHL)病相关性两种[1]。VHL 病是由于 3 号染色体短臂基因缺失或突变引起的常染色体显性遗传疾病,涉及多个器官系统,发病率为 1:35000~1:40000,各种年龄均可发病,以 20~50 岁多见。文献报道相当一部分的中枢神经系统血管母细胞瘤患者伴有 VHL 病[2],与散发性中枢神经系统血管母细胞瘤相比,von Hippel-Lindau 病相关性中枢神经系统血管母细胞瘤患者的临床特点、治疗方案、基因诊断及预后报道较少。VHL 综合征肾肿瘤和大部分散发性肾细胞癌病因都与 VHL 基因结构或功能失常有关。由此人们认为 VHL 综合征是由 VHL 基因的突变引起。VHL 基因位于 3 号染色体断臂的 3p25-p26,基因全长 4.7 kb,VHL 基因在基因组上的分布跨度约为 20 kb。VHL 基因含 3 个外显子,由 642 个核苷酸组成的开放阅读框架(open reading frame, ORF)编码 213 个氨基酸残基,其分子量约为 25 kD,在 85~125 位残基处有 5 个酸性重复区域,该蛋白质残基与其它蛋白质序列无明显同源性[1]。同时该基因还编码一个 160 个氨基酸残基的蛋白,该基因的表达与器官发生病变与否并无关系,其在各成年与胎儿组织中均有表达。VHL 病家族的基因型与表型分类主要包括以下类型:1 型:主要包括视网膜血管母细胞瘤、中枢神经系统血管母细胞瘤、肾细胞癌、胰腺肿瘤和囊肿等;2A 型:包括嗜铬细胞瘤、视网膜血管母细胞瘤、中枢神经系统血管母细胞瘤等;2B 型:嗜铬细胞瘤、视网膜血管母细胞瘤、中枢神经系统血管母细胞瘤、肾细胞癌、胰腺肿瘤和囊肿等;2C 型:嗜铬细胞瘤。脑血管母细胞瘤较少见,肝、脾、肺的血管瘤也较少见[3-5]。患者常死于肾细胞癌和中枢神经系统血管母细胞瘤,早期诊断可以改善预后,但困难较大。针对 VHL 基因的检测技术有助于早期确诊,该基因的突变存在热点区即 α、β 结构域编码区,该蛋白有三个氨基酸残基是常见突变热点区,即 Cys162, Arg167、Leu178。其余常见突变包括 Val170、Ile180、Leu184、Leu188、Arg161 和 Gln164 等[6]。其中 Cys162 突变位于 α 结构域,关系到 VHL 蛋白与另外一个蛋白 Elongin C 的相互作用;而

* 基金项目:教育部博士点基金资助项目(20090162120032);湖南省科技计划资助项目(2010FJ3026)

作者简介:张前军(1974),男,博士研究生,讲师,主要研究方向:干细胞工程学与遗传学,

电话:0731-82355300,E-mail:zhangqianjun@csu.edu.cn

△通讯作者:卢光琇,E-mail:lugxdirector@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-03-15 接受日期:2012-04-10)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Arg167 则在结构上具有稳定组蛋白 H1 上的螺旋及 α、β 两个结构区域的相互作用；Leu178 在介导与蛋白 Elongin C 的相互作用以及稳定 H2-H3 对 α 结构域的包装都起着重要作用。VHL 蛋白的泛素化对其功能的执行也起着至关重要的作用[7]。VHL 蛋白对肿瘤的抑制作用主要通过调控一系列肿瘤抑制因子的方式进行，VHL 作为抑癌基因可以调控肿瘤抑制因子 miR-204，也可以通过调节 Mdm2 介导的泛素化对 p53 基因进行调控，同时对细胞周期进行调控[8,9]。VHL 基因突变导致部分或全部肿瘤抑制因子失活从而病人极发生散发性肾透明细胞癌，如果病人 VHL 基因生殖细胞发生突变，在儿童期可发展为中枢神经系统母细胞瘤，尽管发病会推迟到 29 岁，可伴有头痛，呕吐，步态不稳或共济失调小脑等症状血管母细胞瘤[10,11]。此外 VHL 蛋白还可以直接结合到纤连蛋白上从而参与细胞基质的装配，并影响细胞的生长与分化[12]。目前该疾病治疗主要是手术切除相应肿瘤。近年随着基础研究的深入，新的药物在血管生长抑制剂等可能提供新的治疗途径。由于 VHL 病为常染色体显性遗传病，所以对患者进行准确地遗传学诊断对该病的治疗、预后以及后代的优生优育都有显著的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2012 年 1 月到中信湘雅生殖与遗传专科医院就诊的 1 个 VHL 家系，其中患者 3 人。现症患者中，男性 1 例，女性 2 例，来自福建地区。患者经 1.5 T 双梯度核磁共振直接增强扫描发现右侧小脑半球处有类圆形囊样病灶，囊壁下缘处可见一小结节明显强化影，边界清楚。其余囊性部分无明显强化。另外一侧小脑半球及小脑上蚯蚓处均可见小结节明显强化影，直径小于 0.5 cm。其余脑实质内未见明显强化影，上脑室呈现对称性扩大，疑似小脑血管母细胞瘤。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 在患者及其家属签署知情同意书后，抽取上述研究对象外周静脉血 2 mL，用 0.2% EDTA·Na（乙二胺四乙酸钠盐）抗凝。用 DNA 提取试剂盒（Gentra 公司）提取基因组 DNA。同时提取 100 例无血缘关系健康个体的 gDNA 作为基因多态性排除分析的对照组。

1.2.2 聚合酶链式反应（PCR polymerase chain reactions）PCR 扩增 VHL 基因的 3 个外显子的引物序列采用在线软件 primer 3 设计，由上海生工公司合成，引物序列见表 1。PCR 反应体系为 10 μL，含有 gDNA 50～100 ng, dNTPs 250 μmol/L，引物 0.2 μmol/L，2 mmol/L $MgCl_2$，1U Taq DNA 聚合酶及 1× 缓冲液(MBI)。PCR 反应条件：95 ℃ 变性 1.5 min，94 ℃/40 s 变性，56 ℃退火 40 s，72℃延伸 1-3 min（35 个循环），72 ℃ 延伸 5 min。经电泳检测后，将 PCR 产物 95 ℃ 变性 10 min，缓慢降温至室温。用 ABI 公司测序仪对扩增的 DNA 片段进行测序，并与已知突变数据库和多态性数据库进行比较分析。

表 1 VHL 基因诊断引物序列

Table 1 Primers for gene diagnosis of VHL

Primer name	Primer sequence F	Primer sequence R
VHLEXON1	AGCGCGTTCCATCCTCTAC	GCTTCAGACCGTGCTATCGT
VHLEXON2	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA	AGCCCAAAGTGCTTTTGAGA
VHLEXON3	GCAAAGCCTCTTGTTCGTTC	CAAAAATGCCACCACCTTCT

2 结果

2.1 家系调查及体查结果

先症者（III-7）患小脑血管母细胞瘤，经外科手术切除。家系中其外婆（I-2）、母亲（II-3）、大姨（II-1）、小舅舅（II-6）及弟弟（III-8、III-10）均患有类似症状，其中外婆、小舅舅、大姨、大弟弟因此病过世。核磁共振结果检查患者（III-7）小脑后枕部呈现术后改变，局部颅板结构不清，局部可见囊样长 T2 信号改变，平扫脑实质信号未见明显异常，增强后相当于延髓背侧处可见两个小结节状明显强化影，直径小于 0.5 cm 左侧小脑半球也可见一结节状明显强化，其余脑实质未见异常强化影，诸脑室无明显异常，脑沟无增宽，中线结构居中。

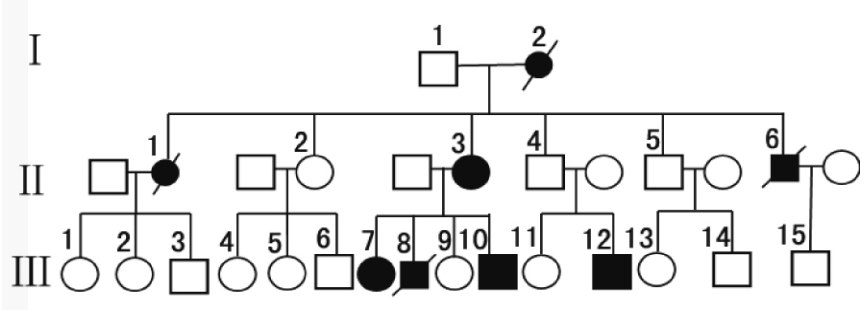


图 1 VHL 疾病遗传家系图

□ 为正常男性，○ 为正常女性，■ 为男性患者，● 为女性患者，/为已逝者

Fig.1 Map of the pedigrees of VHL disease

□ normal male, ○ normal female, ■ male patient, ● female patient, /of the dead

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 PCR 及测序结果

患者 (III-7) VHL 基因三个外显子 PCR 片段琼脂糖电泳结果表明分别得到 706bp (图 B-3) ,421bp (图 B-1) 以及 504bp (图 B-2) 的 DNA 片段,与预期大小完全一致。DNA 测序结果表明 VHL 基因外显子 1 和外显子 2 没有发现任何多态、缺失、重复以及碱基突变。在第三号外显子发现 cDNA 存在 c.499 C>G 的碱基改变，导致第 167 位氨基酸残基出现 Arg-Gln,(p.R167Q) 的改变。人类遗传疾病数据库中的编号为 CM941382 (HGMD http://www.hgmd.cf.ac.uk.ac) 。检测 (III-9) VHL 基因外显子 3 没有发现该位点的碱基改变 (图 2B) 。同时检测患者无小脑血管母细胞瘤症状的同胞妹妹的 VHL 基因没有发现此位点的改变 (图 2B) 。

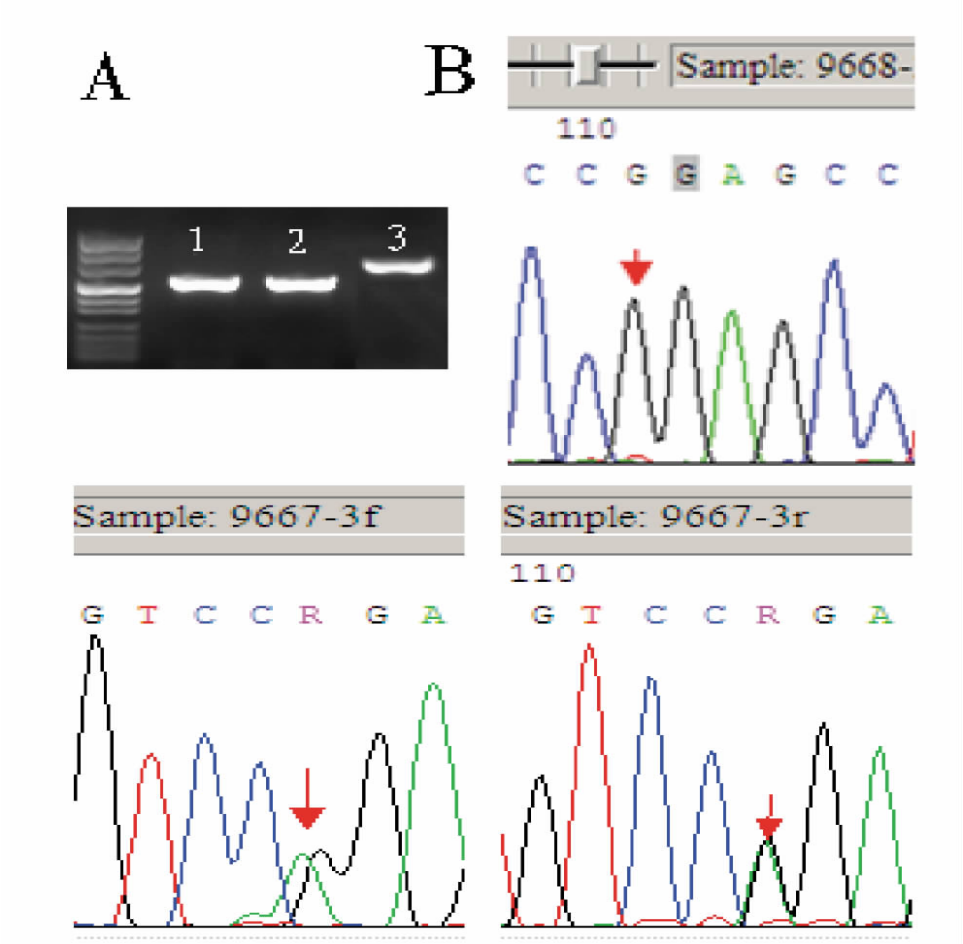


图 2 VHL 基因外显子突变检测电泳及测序图

A. VHL 基因外显子 PCR 电泳结果,1.外显子 1 ;2.外显子 3 ;3.外显子 2 B. VHL 基因突变位点的测序图,箭头显示的为突变碱基处

Fig.2 Map of PCR DNA electrophoresis and DNA sequencing data for VHL gene

Panel A. the map of DNA electrophoresis, Panel B. data of sequencing sites of mutation are marked by red arrows

3 讨论

VHL 疾病是一种常染色体显性遗传疾病，常导致中枢神经系统血管瘤、肾细胞瘤等恶性肿瘤[4,13]。基因诊断是该病特异性的诊断方法,及时准确的对患者进行基因诊断对患者的康复及实施产前诊断确保下一代的生育都尤为重要。本文综合运用 PCR 直接测序的方法,设计 PCR 引物,对该家系的患者及表型正常的妹妹进行突变分析,发现了一个登记号为 CM941382 已知突变。该突变位点位于 VHL 基因外显子 3,VHL 基因的 cDNA 存在 c.499 C>G 的碱基改变，导致第 167 位氨基酸残基出现 Arg-Gln 的改变(p.R167Q),为已知致病突变。根据人类遗传疾病数据库的资料显示,截止 2011 年 VHL 疾病累计登记致病突变 543 种。其中错意突变 226 种,大片段缺失和插入 115 种,小片段缺失与插入突变 129 种,剪切位点改变 22 种,其它突变 11 种。其突变主要以错意突变和插入缺失突变为主,分别占突变的 42%和 45%,二者合计占到所有突变的 87%。这些突变主要分布在 VHL 蛋白的 N 端 50 个氨基酸残基后和第 200 个氨基酸残基前。说明该区域是 VHL 蛋白的主要功能区。VHL 基因编码的蛋白包括 N 端的 8 个 (GXEEX) 结构,2 个 β 结构域和一个 α 结构域。其中 β 结构域又包括 β1-β77 个 β 折叠,α 结构域包括 α1、α2、α3 三个结构单元。N 端的 (GXEEX) 8 连体结构主要包括 VHL 蛋白前 60 位氨基酸残基,该区域的突变较少导致 VHL 疾病的发生[14]。VHL 蛋白的 60 位到 200 位氨基酸为 α 和 β 结构域所在位置,98%的点突变都发生在这个区域。本案例中检测到的突变 p.R167Q 就位于该蛋白 α 结构域的第一个 α 折叠区，也是 VHL 蛋白与其它蛋白结合的一个主要结

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

构域，也是功能体现的主要结构域。R167 氨基酸残基主要负责 VHL 蛋白结构的稳定，尤其是 α 和 β 结构的稳定。所以该氨基酸残基的改变会导致严重的中枢神经系统母细胞瘤以及肾细胞瘤等疾病的发生。具体详细的致病原因通过下一步的生物学功能研究以及结合临床表现可望得到解答。

VHL 与大多数其他疾病的不同之处是它的最初症状不是单一的，即该病往往不是出现在一个器官，且并不是发生在固定的年龄段。而且疾病的严重程度差异很大，很多家族成员只有相对无害的表现，而其他成员则病情很重。VHL 疾病通常会出现多种肿瘤同时发生，各种肿瘤在不同家族、不同人种中的发生率差异很大。法国人易患神经系统肿瘤，德国人易患嗜铬细胞瘤，日本人则更易患肾肿瘤。研究表明妊娠既不会加速 VHL 病相关的肿瘤生长也不会使其停止生长。针对 VHL 基因的诊断目前已经应用到各种 VHL 综合症患者的治疗中，尤其是一些新的产前诊断方法，如 孕妇外周血诊断胎儿 VHL 突变携带的情况也已经走入临床应用[15-17]。因此随着 VHL 疾病的基因诊断在国内的推广，越来越多一些 VHL 疾病患者将在生育下一代时得到专业的遗传学咨询与生育指导。

参考文献(References)

[1] Kaelin W G, Von Hippel-Lindau disease [J]. Annu. Rev. Pathol, 2007, 2:145-173

[2] Wanebo J E, Lonser R R, Glenn G M, et al. The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease[J]. Neurosurg, 2003, 98: 82-94

[3] Ong K R, Woodward E R, Killick P, et al. Genotype - phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease [J]. Hum. Mutat, 2007, 28: 143-149

[4] Kaelin J. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer[J]. Nat. Rev. Cancer, 2008, 8:865-873

[5] Frew I J, Krek W. Multitasking by pVHL in tumour suppression[J]. Curr. Opin. Cell Biol, 2007, 19:685-690

[6] Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma[J]. Tumor Biol, 2012, 33: 9-16

[7] Cockman M E, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia inducible factor-binding and ubiquitylation by the Von Hippel Lindau tumor suppressor protein[J]. J Biol Chem, 2000, 275:257-233

[8] Sumara I, Maerki S, Peter M. E3 ubiquitin ligases and mitosis: embracing the complexity[J]. Trends Cell Biol, 2008, 18: 84-94

[9] Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, et al. VHL-Regulated MiR-204 Suppresses Tumor Growth through Inhibition of LC3B-Mediated Autophagy in Renal Clear Cell Carcinoma [J]. Cancer Cell, 2012, 21(4): 532-546

[10] Maher ER, Neumann HPH, Richard S. Von Hippel - Lindau disease: a clinical and scientific review[J]. Eur J Hum Genet., 2011, 19: 617-623

[11] Wind JJ, Lonser RR. Management of Von Hippel-Lindau diseaseassociated CNS lesions[J]. Expert Rev Neurother, 2011, 11: 1433-1441

[12] Kaelin Jr WG. Von Hippel-Lindau disease[J]. Annu Rev Pathol Mech Dis, 2007, 2: 145-173

[13] Ali T, Kandil D and Piperdi B. Long Term Disease Control With Sunitinib in a Patient With Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumor (NET) Associated With Von Hippel-Lindau Syndrome (VHL) [J]. Pancreas, 2012, 41(3): 492-493

[14] Leonardi E, Murgia A, Tosatto S C E. Adding structural information to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor interaction network[J]. FEBS Letters, 2009, 583: 3704-3710

[15] Ellison J. Novel human pathological mutations. Gene symbol: VHL Disease: Von Hippel-Lindau syndrome [J]. Hum Genet, 2010, 127 (4): 477

[16] Huang Y, Zhou D, Liu J, et al. Germline mutations of the VHL gene in seven Chinese families with von Hippel-Lindau disease [J]. Int J Mol Med, 2012, 29(1): 47-52

[17] Martino M, Klatte T, Haitel A, et al. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker[J]. Cancer, 2012, 118(1): 82-90

(上接第 5022 页)

[13] Gao Rong, Gao Cong-fen, Tian Xuan , et al. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from Juniperus sabina L,and related lignans against larvae of Pieris rapae L[J]. Pest Management Science, 2004, 60:1131-1136

[14] 程宏,王昌松,汪溪洁,等.地昔帕明对大鼠海马神经元钾电流的影响[J].中国药理学通报, 2006, 22(8):935-938
Cheng Hong, Wang Chang-song, Wang Xi-jie, et al. Effect of desipramine on potassium currents in Rat Hippocampal Neurons[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 22(8): 935-938

[15] 鹿勇,钟风,孔晓霞. 红霉素对小鼠海马神经元电压依赖性钾电流的影响[J]. 中国药房, 2009, 20(10):741-743
Lu Yong, Zhong Feng, Kong Xiao-xia. Effect of erythromycin on voltage-gated potassium current in Hippocampal Neurons of mice[J]. China Pharmacy, 2009, 20(10):741-743

[16] Stein RT, Soderlund DM. Role of the local anesthetic receptor in the state-dependent inhibition of voltage-gated sodium channels by the insecticide metaflumizonel[J]. Mol Pharmacol, 2012, 81(3):366-374

[17] Jones PL, Pask GM, Romaine IM, et al. Allosteric antagonism of insect odorant receptor ion channels. [J]. PLoS ONE, 2012,7(1):3030

[18] Zhang XL, Michael S. Gold. Dihydropyridine block of voltage-dependent K^+ currents in rat DRG neurons[J]. 2009, 161(1):184-194

[19] Li Q, Ma HJ, Song SL, et al. Effects of anandamide on potassium channels in rat ventricular myocytes: a suppression of Ito and augmentation of KATP channels [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012,302(6): 924-930

[20] Wang RR, Li N, Zhang YH, et al. The effects of paeoniflorin monomer of a Chinese herb on cardiac ion channels [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(19):3105-3111

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net