

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.050

eNOS 基因多态性与神经管畸形的研究进展 *

邓朝霞^{1,2} 何俊峰¹ 周 林¹ 冉 媛¹ 李佩珍^{1△}

(1 遵义医学院珠海校区预防医学教研室 广东 珠海 519041; 2 黔南民族医学高等专科学校 贵州 都匀 558000)

摘要:神经管畸形(neural tube defects, NTDs)是一类常见的出生缺陷,严重威胁着妇女儿童的身心健康和人口素质的提高,给社会的发展带来沉重负担,可引起孕妇流产、婴儿死亡和终生残疾。NTDs 可分为无脑儿、脑膨出和脊柱裂三种类型,其病因和具体的发病机制尚不清楚。国内外多数研究认为,NTDs 是一种由基因的多态性和环境因素所引起的严重的基因突变,还不能用一种单一原因来解释该病的发生。目前的研究热点是易感基因与 NTDs 的关系,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因最近已被认为是导致 NTDs 发生的重要候选基因。eNOS 基因的点突变或成串突变可以导致酶活性的变化,使 eNOS 的表达上调,引起 NO 分泌的异常,促进神经元的凋亡,进而导致大脑的发育异常。本文从 eNOS 基因多态性与 NTDs 的相关性研究进行综述。

关键词:神经管畸形;内皮型一氧化氮合酶;基因多态性

中图分类号:R722 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2193-03

Advances in Researches Between Polymorphisms of eNOS Gene and NTDs*

DENG Zhao-xia^{1,2}, HE Jun-feng¹, ZHOU Lin¹, RAN Yuan¹, LI Pei-zhen^{1,△}

(1 Prevention of Medical Department, Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong, 519041, China;

2 Qiannan Medical College for Nationality, Duyun, Guizhou, 558000, China)

ABSTRACT: Neural tube defects (NTDs) are common birth defects, which seriously threaten the physical and mental health of women and children, and the improvement of population quality, lead a great burden on the development of the society, it can cause pregnant women abortion, infant mortality and permanent disability. NTDs can divide into three kinds including: anencephalus, encephalocele, spina bifida. Its etiology and specific mechanism is unclear. Most of the research at home and abroad consider that NTDs are serious gene mutation which caused by one kind of gene polymorphism and environmental factors, it has been not yet to explain the occurrence of the disease by a single reason. Research hotspot at present is the relationship between susceptibility gene and NTDs. Endothelial nitric oxide synthase(eNOS)gene has been recently regarded as the important candidate genes which lead to NTDs. The point mutation or string mutations of eNOS can cause the change of enzyme activity, which can cause eNOS expression up-regulation, lead the abnormal secretion of NO, promote neuron apoptosis, and then lead to abnormalities growth of the brain. This article will summarize relevant research between the gene polymorphism of eNOS and NTDs.

Key words: Neural tube defects; Endothelial oxide nitric synthase; Gene polymorphism

Chinese Library Classification (CLC): R722 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2193-03

神经管畸形(neural tube defects, NTDs)是由于在早期胚胎形成期间神经管闭合不全或延迟闭合所致,包括脊柱裂、脑膨出和无脑儿三种类型。全世界每年有神经管畸形儿 30 万~40 万例^[1];在我国,每年就有 8 万~10 万的神经管畸形儿出生,而华北是世界上神经管畸形儿患病率最高的地区之一^[2]。虽然有超过 200 个基因已被证实会导致老鼠神经管畸形^[3],但关于人类神经管畸形分子基础和细胞致病机制的研究进展有限。Karen 等^[4]通过研究后发现,脊柱裂神经管末端突变可能与孕产妇或胚胎的叶酸-同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢紊乱有关,因此,影响这一途径的变异基因是一组有价值的脊柱裂和 NTDs 其他类型的候选基因;并认为在正常成年人群中,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因的 G894T 突变位点中的 T 等位基因纯合子的变异与 Hcy 升

高有关。eNOS 基因最近已被认为是导致 NTDs 发生的重要候选基因。

1 NOS 与 eNOS 的结构和类型

1980 年,美国药理学家 Furchgott 等^[5]首次发现在缓激肽的诱导下内皮细胞可产生一氧化氮(nitric oxide, NO),是通过 L-精氨酸到瓜氨酸转化的产物。NO 的化学性质十分活跃,半衰期短,目前还不能确定组织中 NO 的分布,需要借助一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)来确定 NO 的分布。

NOS 是仅存于哺乳动物的一个酶的家族,由 1025 个氨基酸残基组成,相对分子量为 13.3kDa。根据 NOS 在细胞内的分布及功能的不同,可将其分为三种类型:I 型:内皮型一氧化氮合酶(endothelial NOS, eNOS);II 型:神经型一氧化氮合酶(neuronal NOS, nNOS);III 型:巨噬细胞型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81060245);贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 J 字 2008-2316)

作者简介:邓朝霞(1977-),女,在读研究生,讲师,主要研究方向:慢性病流行病学, E-mail: hwnweshan@163.com

△ 通讯作者:李佩珍,男,博士,教授,硕导,主要研究方向:慢性病流行病学, E-mail: lpzh228@163.com

(收稿日期:2013-10-28 接受日期:2013-11-25)

(neuronal NOS, nNOS); III型:诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)。其中I型主要分布于内皮细胞中,II和III型属于钙依赖性一氧化氮合酶,其活性依赖于细胞内钙离子浓度的升高。Forstermann和Pollock于1991年第一次在内皮细胞中发现了eNOS,编码该酶的DNA序列也已经从人和牛的内皮细胞中分离出来。

人的eNOS基因分布在人的7号染色体短35-36区,其单体分子量长为130kb;整个基因全长为21kb,分为25个内含子和26个外显子。eNOS可呈现在内皮细胞、血小板、心肌细胞和大脑的海马区。人的eNOS基因常见于两种变异:

(1)第894位核苷酸G为T所替换,最终导致了谷氨酸(Glu)突变为天冬氨酸(Asp)。而谷氨酸(Glu)恰好位于 α -螺旋的中心,突变导致eNOS的构象发生改变,是唯一能改变蛋白质序列的eNOS基因变异。

(2)4号内含子处27个碱基数目可变的串联重复序列(VNTR),即4a/b VNTR。a是一长为27bp的核苷酸序列重复2次和一长为25bp的核苷酸序列重复2次;b是一长为27bp的核苷酸序列重复3次和一长为25bp的核苷酸序列重复2次,虽然该序列是非编码序列,但在基因调控的过程中起了重要的作用。

2 eNOS 的功能

NOS催化生成的NO,是一个可调节许多生物效应的重要信号分子。NOS不仅能够催化合成NO,同时还对NO的生物学效应起着关键作用,而来源于eNOS的NO对细胞凋亡起着主导作用。有研究表明^[6]在鸡胚的神经管发育过程中,NO能够通过细胞凋亡来影响神经管的闭合;同时,如果在神经管发育的过程中,NO水平的高低均可导致NTDs的发生。胡淑敏^[7]通过对NTDs大鼠模型研究后,发现神经管的发育和神经细胞的凋亡关系密切,过高的NO水平则会导致神经细胞凋亡进一步影响到神经管的发育;并认为nNOS在脑膨出类型的胎鼠大脑皮质中的表达减少,但eNOS在大脑皮质中的表达却在增加。eNOS表达增加引起了NO的合成分泌增多和神经元凋亡,从而导致神经管闭合不全使大脑发育出现异常,进一步说明了eNOS在NTDs发育过程中起了主导作用。eNOS产生的NO可以提高鸟苷酸的合成,并进一步调节血管的紧张性和增加微血管的通透性^[8];在中枢神经系统中,NO以扩散的方式在靶细胞中起作用,参与脑内的许多生理功能。

内皮细胞的结构和功能与NO相关。eNOS催化L-精氨酸到瓜氨酸转化后获得的产物是NO,受eNOS表达升高影响。通常情况下,脑血管内皮细胞中的L-精氨酸将会产生大量NO。超氧自由基与NO反应生成ONOO⁻等过氧亚硝酸盐阴离子,导致脑血管中内皮细胞结构和功能受损,使细胞膜通透性增强。此外,内皮细胞三羧酸循环中关键酶的活性受ONOO⁻干扰使ATP减少,造成内皮形态构象改变,内皮细胞无法正常连接,最终导致血脑屏障通透性增强。

研究表明,超氧化阴离子自由基(O₂⁻)与NO的浓度平衡对内皮细胞功能影响很大。正常生理状态下,人体内的抗氧化防御机制可以维持超氧化阴离子自由基(O₂⁻)与NO的平衡。eNOS底物缺乏、eNOS表达降低、活性氧增多都会加速NO酶

降解,造成NO生物活性下降。大量的文献报道显示,eNOS和NO与细胞的分化^[9]、血管内皮细胞的成熟分化完整性^[10]及血管生成^[11]有关。

若人体叶酸缺乏和5-甲基四氢叶酸合成不足,则会引起Hcy排泄障碍,形成血浆中Hcy的堆积,造成高同型半胱氨酸血症(high homocysteine, HHcy),而HHcy血症可导致NTDs的发生^[12];在对导致NTDs发生的基因间的交互作用研究后发现,内皮细胞的NO系统也存在着明显的损伤作用,这种损伤机制涉及eNOS酶蛋白和eNOS基因表达^[13]。在人类胚胎发育过程中第10-13周,脑膜深层白质和软脑膜的血管中将出现eNOS阳性内皮细胞;在人类胚胎发育第14-17周,eNOS阳性内皮细胞出现在中间白质处;在人类胚胎发育第18-21周,eNOS阳性内皮细胞出现在下层白质处;在人类胚胎发育第23-26周,eNOS阳性内皮细胞出现在白质皮层下,这提示eNOS在大脑发育过程中起着重要的作用^[14]。有研究发现eNOS的表达和犬的心脏侧枝血管的生长发育有密切关系^[15]。

3 eNOS 基因多态性与 NTDs

NTDs的具体发病机制尚不清楚,早期的研究结果显示,NTDs是多种机制相互作用的结果,主要与细胞间信息传递障碍、细胞凋亡以及HHcy有关。Afman等^[16]认为孕前服用叶酸可使NTDs的发病率降低50%~70%。大量研究显示,叶酸代谢和Hcy蓄积的相互作用与NTDs的发生率的提高关系密切;孕妇在代谢过程中,若机体出现HHcy,将干扰神经管的闭合,从而导致NTDs的发生。根据文献^[13]的研究成果,在HHcy患者中,eNOS的基因表达有明显的抑制,即使孕妇服用叶酸,对eNOS基因表达的抑制效应改善不明显。而eNOS基因表现出来的某些异常,将使血中Hcy水平升高,进而影响到神经管的正常闭合。因此,eNOS基因多态性与NTDs密切相关。

eNOS基因对大脑的正常发育起着重要的作用。eNOS的表达上调,将使NO分泌异常,加速神经元的凋亡,导致大脑发育异常。对患有脊柱裂的301个家庭的母亲和胚胎有关eNOSG894T基因多态性位点相关数据采用传递不平衡检验(TDT)和对数线性模型分析,通过分析后发现,胚胎的eNOS基因G894T位点变异与脊柱裂具有显著相关性^[4]。Ivon等^[17]通过对荷兰人群进行传递不平衡检验(TDT)及病例对照研究,认为Hcy新陈代谢系统受损的母亲和孩子为eNOS基因G894T位点中GT基因型变异是增加脊柱裂的高危因素;若脊柱裂患儿的母亲为HHcy患者或为5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)C677T突变位点中的TT基因型,则其eNOS基因G894T突变位点中TT基因型和GT基因型的突变,脊柱裂患儿的发病率将分别提高3.4倍和4.5倍。可能是由于eNOS基因G894T突变位点的变化,改变了eNOS的蛋白功能和/或活性,使NO的合成降低,干扰了神经胚的形成。由于低水平的NO可以使Hcy生成S-腺苷Hcy降低,导致Hcy的堆积,进而影响神经管的闭合。这说明了由于eNOS基因G894T突变位点引起的出生缺陷和环境因素的关系紧密,但国内尚无这方面研究的报道。

有研究认为^[18]eNOS基因4a/b位点的基因多态性与eNOS的功能活性有关,对比eNOS的活性显示,a等位基因携带者比

b 等位基因携带者的 eNOS 活性高 7 倍, a 等位基因携带者中的 NO 浓度较高, 神经胚细胞的程序性死亡受阻, 增加 NTDs 的发生概率。在国内, 谷强等通过对生育神经管畸形儿的 30 名母亲进行病例对照研究后发现^[19], 母亲 eNOS 基因 894 位点 G→T 突变是出生 NTDs 患儿的独立遗传学因素, 而 eNOS 基因的第 4 内含子 27bpVNTR 基因突变不是诱发 NTDs 的独立遗传学因素。国外研究成果显示, 妊娠晚期出现的无法确定原因的胎死宫内, 可能与 eNOS 基因 4a/b VNTR 位点突变有关^[20]。众所周知, NTDs 是导致死胎、死产、自然流产和围产儿死亡的重要原因, 考虑胎死宫内的原因与 NTDs 的发生是否存在关联? 这需要通过进一步研究来明确 4a/b VNTR 位点的变异与 NTDs 的发生是否有关。

对于 NTDs 患儿, 已明确存在 eNOS 基因突变, 但是由于基因突变存在着种族、环境和地理因素的差异, 以及 NTDs 表型的可变性和研究数量的有限性尚不能将不同的基因突变与不同类型的 NTDs 相对应。我们只有在现有研究基础上进一步明确 eNOS 基因的各种突变在 NTDs 发生发展过程中所起的作用, eNOS 基因 G894T 突变位点和 eNOS 基因 4a/b VNTR 位点的变异在 NTDs 的发生发展中的相互作用, eNOS 基因与其他基因或环境因素是否存在交互作用, 为 NTDs 的及时诊断和可能的基因治疗提供科学依据, 以便于指导相关部门采取行之有效的预防措施, 从而提高患者的生活质量和减轻社会的经济负担。

参考文献(References)

- [1] 李佩珍, 卢祖洵, 杨艳芳, 等. 出生儿神经管缺陷发病相关因素的病例对照研究[M]. 疾病控制杂志, 2005, 9 (4):296-298
Li Pei-zhen, Lu Zhu-xun, Yang Yan-fang, et al. A case control study on the related factors of neural tube defects [M]. Chinese Journal of Disease Control and Prevention, 2005, 9(4):296-298
- [2] L.Zhu, H.Ling. National neural tube defects prevention program in China [J]. Food and Nutrition Bulletin, 2008, 29(2): 196-204
- [3] Andrew J. Copp, Philip Stanier, Nicholas D.E, et al. Genetics of human neural tube defect [J]. Human Molecular Genetics, 2009, 18 (2): 113-129
- [4] Karen S. Brown, Michelle Cook, Katy Hoess, et al. Evidence that the risk of spina bifida is influenced by genetic variation at the NOS3 locus [J]. Birth Defects Research, 2004, 70(Part A): 101-106
- [5] Furchgott RF, Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide[J]. Biosci Rep, 1999, 19 (4): 235-251
- [6] Traister A, Abashidze S, Gold V, et al. BMP controls nitric oxide-mediated regulation of cell numbers in the developing neural tube [J]. Cell Death and Differentiation 2004, 11: 832-841
- [7] 胡淑敏. 一氧化氮合酶与神经管畸形关系的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2007
Hu Shu-min. Relationship between Nitric Oxide Synthase and Neural Tube Defects[D]. SHEN Yang: China Medical university, 2007
- [8] Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development [J]. N Engl J Med, 2006, 355: 2003-2011
- [9] Chen Z, Iding K, Luetkemeyer D, et al. A low-cost chemically defined protein free medium for a recombinant CHO cell line producing prothrombin [J]. Biotechnol Lett, 2000, 22: 837-841
- [10] Chen X, Li Y, Zheng H, et al. A randomized controlled trial of acupuncture and moxibustion to treat Bell's palsy according to different stages: design and protocol [J]. Contemp Clin Trials, 2009, 30(4): 347-353
- [11] Wang Pi-min, Zhang Wei-dong. Efficacy Observation on Peripheral Facial Paralysis at Different Stages Treated with Early Application of Acupuncture with Moxibustion [J]. World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2010, 5(4): 324-326 (In Chinese)
- [12] Marilyn Felkner, Lucina Suarez, Mark A, et al. Maternal Serum Homocysteine and Risk for Neural Tube Defects in a Texas-Mexico Border Population [J]. Birth Defects Research (Part A), 2009, 85: 574-581
- [13] 张敬各, 王丽珍, 韩晓群, 等. 同型半胱氨酸对内皮细胞一氧化氮合酶系统的操作机制及叶酸的拮抗效应 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(1):17
Zhang Jin-ge, Wang Li-zhen, HAN Xiao-qun. The pathogenic mechanism of homocysteine induced endothelial nitric oxide synthase dysfunction and the antagonistic effects by folic acid [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2007, 40(1):17
- [14] Miyawak T, Sohma Q, Mizuguchi M, et al. Development of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell in the human cerebrum[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1995, 89(2): 161-166
- [15] Cai WJ, Kocsis E, Luo XG, et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis [J]. Mol Cell Biochem, 2004, 264(1-2): 193-200
- [16] Vander Linden U, 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
- [17] Ivon J.M.Sandra G. Heil, Inden, Henk J. Blom, et al. The 894G>T variant in the endothelial nitric oxide synthase gene and spina bifida risk[J]. J Hum Genet, 2007, 52(6): 516-520
- [18] Ell GA, Trudinger B, Wang J, et al. Genotype dependent and cigarette specific on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity[J]. FEBS Lett, 2000, 471(1): 45-50
- [19] 谷强, 崔志利, 罗小平. 内皮型一氧化氮合酶基因多态性与神经管畸形的关系[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25: 5272-5275.
Gu Qiang, Cui Zhi-li, Luo Xiao-ping. Relationship between gene polymorphism of endothelial nitric synthase and neural tube defects [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2010, 25: 5272-5275
- [20] Huber A, Grimm C, Jirecek S, et al. Polymorphisms of the NOS3 gene and unexplained late intrauterine fetal death [J]. Eur.J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol, 2005, 122(2): 151-155