

· 论 著 ·

儿童原发性肾病综合征激素抵抗与糖皮质激素受体基因多态性的相关性

彭华保, 易著文, 何庆南, 何小解, 马祖祥, 程国华

(中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室, 湖南 长沙 410011)

[摘 要] **目的** 原发性肾病综合征(PNS)是常见的小儿肾脏疾病,其发病机制目前尚不清楚,研究发现,急性淋巴细胞白血病、狼疮性肾炎糖皮质激素耐药与糖皮质激素受体(GCR)突变有关。是否是由于 GCR 基因发生改变引起 GCR 功能异常,导致 PNS 患儿对糖皮质激素(GC)耐药,目前尚未见报道。该文探讨儿童原发性肾病综合征对糖皮质激素治疗的效应与糖皮质激素受体 DNA 结合区、激素结合区基因多态性的相关性。**方法** 采用常规方法提取 100 例原发性肾病综合征患儿(其中激素敏感组 44 例、激素抵抗组 56 例)及 100 例对照组儿童外周血单核细胞 DNA,聚合酶链反应(PCR)技术扩增所有 DNA,GCR DNA 结合区,激素结合区全部外显子目的片断,然后进行单链构象多态性(SSCP)分析。SSCP 显示异常的 DNA 片断直接测序。**结果** 激素敏感组、激素抵抗组、对照组儿童外周血 GCR DNA 结合区、激素结合区所有外显子 PCR 产物 SSCP 电泳结果,未发现 SSCP 条带多态性。**结论** 该研究未发现 PNS 患儿激素抵抗与 GCR DNA 结合区、激素结合区基因多态性之间存在相关性。

[中国当代儿科杂志,2004, 6(4): 274—276]

[关 键 词] 肾病综合征;糖皮质激素;受体;多态性;儿童

[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008—8830(2004)04—0274—03

Correlation between glucocorticoid-resistance and gene polymorphisms of glucocorticoid receptor in children with primary nephrotic syndrome

Hua-Bao PENG, Zhu-Wen YI, Qing-Nan HE, Xiao-Jie HE, Zu-Xiang MA, Guo-Hua CHENG. Laboratory of Pediatric Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Email: heqn2629@hotmail.com)

Abstract: Objective Previous studies have shown that the reduced glucocorticoid (GC) sensitivity is associated with the mutations of glucocorticoid receptor (GCR) in patients with acute lymphocytic leukemia or with lupus nephritis. It has not been confirmed whether GC-resistance is the result of abnormal function of GCR induced by the alteration of GCR gene in children with primary nephrotic syndrome (PNS). The purpose of this study is to investigate the correlation between GC-resistance and the polymorphisms of GCR in DNA-binding domain and hormone-binding domain in children with PNS. **Methods** DNA was isolated from peripheral blood leukocytes in 100 children with PNS (44 with GC-sensitive, 56 with GC-resistance) and 100 healthy controls and each exon of the DNA-binding domain and hormone binding domain of GCR was amplified by the polymerase chain reaction (PCR). Single-strand conformation polymerase (SSCP) analysis of the PCR products was carried out for screening polymorphisms. DNA fragments displaying an abnormal migration pattern during SSC analysis were subjected to direct sequencing. **Results** PCR-SSCP analysis in all of the PCR products from the GC-resistance and GC-sensensitivity cases did not display an abnormal DNA fragment migration pattern. Polymorphism of GCR in neither the DNA-binding domain nor the hormone-binding domain was found. **Conclusions** There is no correlation between GC-resistance and the polymorphisms of GCR in DNA-binding domain and hormone-binding in children with PNS.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(4): 274—276]

[收稿日期] 2003—07—05; [修回日期] 2004—01—10
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(NO 30000184)。
[作者简介] 彭华保(1966—),男,硕士,副主任医师。主攻方向:小儿肾病。现在湖南省郴州市第一人民医院儿科,邮编:423000。
[通讯作者] 何庆南,湖南长沙市人民中路 86 号中南大学湘雅二医院儿科,邮编:410011。
• 274 •

Key words: Nephrotic syndrome; Glucocorticoid; Receptor; Polymorphism; Child

糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GCR) 是细胞内能与糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 特异结合并产生生物学效应的位点。GCR 在体内分布广泛, 具有重要的生理作用。有作者报道^[1]部分狼疮肾炎发病和对 GC 疗效可能与 GCR 突变有关。最近, 我们研究发现, GC 抵抗的原发性肾病综合征 (PNS) 患儿外周血单个核细胞及肾内组织 GCR 表达异常^[2]。PNS 患儿 GC 抵抗机制尚未完全明了, 我们认为如果机体 GCR 基因发生改变可能出现 GCR 功能异常, 导致 GC 抵抗, 在 PNS 研究领域里, 目前尚未见有关报道。为在 GC 受体水平上探索 PNS 患儿 GC 抵抗的机制, 本研究运用聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 方法对 PNS 患儿 GCR 的 DNA 结合区和激素结合区基因进行多态性分析。

1 材料和方法

1.1 对象

1.1.1 病例组 来源于 2001 年 4 月至 2002 年 12 月我院门诊或住院的 PNS 患儿, 共 100 例, GC 敏感者 44 例, 年龄 9 个月至 11 岁, 其中男 33 例, 女 11 例, 男性平均年龄 6.8±4.2 岁, 女性平均年龄 7.6±2.1 岁; GC 抵抗者 56 例, 年龄从 1 岁 9 个月至 13 岁 2 个月, 其中男 47 例, 女 9 例, 男性平均年龄 7.9±3.2 岁, 女性平均年龄 8.7±3.1 岁。PNS 的诊断依据 2000 年中华医学会儿科学分会肾脏病学组珠海会议制定的《关于小儿肾小球疾病的临床分类、治疗的建议》的标准^[3]。即: PNS 患者具备大量蛋白尿(++++)(++++), 1 周内 3 次 24 h 尿蛋白定量≥50 mg/kg; 血浆白蛋白低于 30 g/L; 血浆胆固醇高于 5.7 mmol/L; 不同程度的水肿。其中大量蛋白尿和低蛋白血症为必要条件。以泼尼松足量治疗≤8 周尿蛋白转阴者为激素敏感型 PNS, 尿蛋白仍阳性者为激素抵抗型 PNS。

1.1.2 对照组 100 例, 来源于健康体检的儿童, 经体格检查、胸部 X 线片、尿常规、肝肾功能、乙型肝炎病原检验及心电图等检查, 确认为健康的儿童。年龄从 5 岁 6 个月至 12 岁 4 个月, 其中男 46 例, 女 54 例, 男性平均年龄 9.0±1.4 岁, 女性平均年龄 9.1±1.2 岁。

1.2 方法

1.2.1 仪器和试剂 聚丙烯酰胺垂直电泳槽为 Bio-RAD 公司生产, 低恒温循环水浴箱: 美国 NESLAB 公

司制造, Taq DNA 多聚酶、脱氧核苷酸 (dNTP) 由 Promega 公司提供。PCR 引物由北京赛百盛公司合成, DNA 提取试剂盒由 Gentra 公司提供。

1.2.2 标本采集 取新鲜静脉血 1 ml 放于 1.5 ml 经高压灭菌处理的 EP 管中, 内含 200 μl 灭菌处理的 0.5% EDTA 抗凝剂, 严格避免标本污染。标本在 2 h 内进行 DNA 提取。

1.2.3 外周血白细胞 DNA 提取 DNA 由提取试剂盒提取。

1.2.4 PCR 产物扩增 ①扩增产物对象为 GCRα 基因的 DNA 结合区的基因外显子序列; ②引物设计: 引物均设计在各外显子两侧内含子内 (见表 1); ③PCR 产物反应体系 (25 μl): 10× Buffer 2.5 μl, 2.5 mmol dNTP 1 μl, 25 μmol 5' 引物 0.5 μl, 25 μmol 3' 引物 0.5 μl, Taq DNA 聚合酶 0.5 μl (0.5 U), DNA 模板 1.0 μl, 25 mmol MgCl 0.5 μl, D₂H₂O 18.5 μl; ④扩增条件: 预变性 95℃ 5 min, 变性 94℃ 1 min, 退火 56℃ 50 s, 延伸 72℃ 45 s, 最后伸延 72℃ 5 min, 共 30 次循环。

表 1 各 PCR 扩增引物
Table 1 PCR amplified primers

名称	引物序列
exon3 (bp241)	5'-CTG TTC TTC CCC TTC TTT AG-3' 5'-CGT GAG AAA TAA AAC CAA GT-3'
exon4 (bp229)	5'-GAC AGA AGG CTG TCC TTA TA-3' 5'-GCT ACA GAG ACA AAC AAT TG-3'
exon5 (bp341)	5'-ACC TTC CCA TTA CAG-3' 5'-TGT TTT GCA TCT TAC-3'
exon6 (bp217)	5'-GAT CTT CTG AAG AGT GTT GC-3' 5'-GGG AAA ATG ACA CAC ATA CA-3'
exon7 (bp216)	5'-CCC TGC TAT TTA TCT TTC AC-3' 5'-ACC TTT GTT TCT AGG CCT TC-3'
exon8 (bp350)	5'-GAC ACA GTG AGA CCC TAT CT-3' 5'-CAC CAA CAT CCA CAA ACT GG-3'
exon9 (bp250)	5'-TGT TCC CAC TGA CCA ATT TG-3' 5'-TAT TAA TTC GAC TTT CTT TAA GG-3'

1.2.5 PCR-SSCP 分析 PCR 产物加变性剂, 98℃ 放置 8 min, 零度骤冷却, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 其中含 5% 的甘油, 30 W 恒功率, 4℃ 电泳 10 h, 银染观察结果。

1.2.6 DNA 序列分析 PCR-SSCP 分析异常的 PCR 产物, 用 DNA 测序仪直接测序。

2 结果

从 PNS 和正常儿童的外周血抽提的 DNA 吸光度 A260/A280 为 1.60~1.75,说明 DNA 的纯度高,PCR 产物在凝胶电泳后,显示条带清晰,无拖尾现象、无明显杂带,适于作 SSCP 分析。

全部 PNS 患儿及对照组儿童 GCR DBD、HBD 相应外显子的 PCR 扩增产物的 SSCP 电泳结果:同一外显子 PCR 扩增产物 SSCP 电泳后,两条单链分别在相应的同一水平,未发现 SSCP 条带多态性。

3 讨论

目前研究发现在某些疾病中 GC 治疗的反应性与 GCR 表达水平或 GCR 突变有关^[4,5],本实验室对 PNS 激素敏感型、激素抵抗型患儿外周血单个核细胞(PBMC)以及肾脏组织中 GCR α 、GCR β 进行了检测,发现 GCR α 表达降低和 GCR β 表达亢进可能是导致部分糖皮质激素抵抗的主要原因^[2]。国内姜悦等^[1]研究发现 GCR 异常可能与狼疮肾炎发病有关,并认为 GCR 异常导致了狼疮肾炎患者内源性 GC 抵抗。迄今为止,在 PNS 研究领域里,目前尚未见有关报道。为了探索 PNS 患儿 GC 抵抗与 GCR 基因多态性之间的关系,本研究选择了目前已报道的对 GC 敏感性影响最大的 GCR 自然突变所在区——DBD、HBD,采用 PCR-SSCP 方法,对对照组 100 例儿童及病例组 100 例 PNS 患儿(其中 GC 敏感者 44 例、GC 抵抗者 56 例)进行了多态性分析,在全部检查对象中,未发现 SSCP 条带多态性,提示 PNS 患儿激素抵抗与 GCR DNA 结合区、激素结合区基因多态性可能无相关性。

目前,已发现的人类 GCR 突变,除几个原发的先天性遗传家系外^[6~8],其余均可能为继发性突变,这就是说,GCR 突变绝大多数可能继发于后天疾病过程中,非先天遗传,不同疾病其病因及其病理损伤过程不尽相同,一些因素在某些疾病可能导致 GCR 突变,而在另外一些疾病中却可能不会,我们认为,这也就是为什么同样是肾脏疾病,在狼疮肾炎中发现了较高频率的 GCR 突变或多态性,而在 PNS 患儿体内却未发现。结合我们前期研究的结果^[2]:PNS 病人存在 GCR 两种亚型表达异常,GC 抵抗的 PNS 患儿 GCR α 表达降低、GCR β 表达亢进,我们认为部分 GC 抵抗的 PNS 患儿虽然其 GCR 亚型表达异常——GCR α 表达下降,GCR β 表达亢进,但从本

研究的结果,推测其体内 GCR DBD、HBD 基因异常的可能性甚小。这有待进一步证实。

在此,有必要提出的是:GCR 的另一结构区免疫原区(ID)未在本研究之列,ID 位于 NH2 端,主要功能是具有特异性抗原,虽然,目前已报道的位于 GCR ID 的突变似乎并不使 GC 敏感性降低,我们认为有必要继续完成 PNS 患儿 GCR 的 ID 的基因序列分析,来全部了解 PNS 患儿体内 GCR 基因结构。另外,SSCP 适应于大样本未知突变基因的筛选,已被广泛应用于临床和基础研究,但随 PCR 产物片段的扩大,其敏感性下降。本研究在设计时,虽然充分考虑到这一点,也只能说明是在该条件下未发现 SSCP 条带多态性,不能断言本组研究对象中无 GRDBD、HBD 基因突变或多态性,将在后续研究中对它进一步完善^[9]。

[参 考 文 献]

[1] 姜悦,刘双信,谭敏,黄锋先,孙玉玲,董秀清,等. 糖皮质激素受体外显子 9 移码突变在狼疮肾炎发病及治疗中的意义 [J]. 中华肾脏病杂志,1999, 15(3): 166—169.

[2] 何庆南,易著文,何小解,黄丹琳. 肾病综合征患儿外周血单核细胞内 GR α 和 GR β 表达的意义 [J]. 中华儿科杂志,2001, 39(7): 406—410.

[3] 杨霁云,陈述枚,姚勇,丁洁. 中华医学会儿科学分会肾脏学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗 [J]. 中华儿科杂志,2001, 39(12): 746—749.

[4] Tanaka H, Akama H, Ichikawa Y, Makino I, Homma M. Glucocorticoid receptor in patients with lupus nephritis: relationship between receptor levels in mononuclear leukocytes and effect of glucocorticoid therapy [J]. J Rheumatol, 1992 (6), 19: 878—883.

[5] 张献,张明轩,赵志平,刘钟明,王春燕,等. 系统性红斑狼疮患者白细胞糖皮质激素受体的测定及其意义 [J]. 中华肾脏病杂志,1997, 13(1): 37—39.

[6] Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rover E, et al. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance [J]. J Clin Invest, 1991, 87(2): 680—686.

[7] Malchoff DM, Brufsky A, Reardon G, Mcdermott P, Javier EC, Bergh CH, et al. A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance [J]. J Clin Invest, 1993, 91(5): 1918—1925.

[8] Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, et al. Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1993, 76(3): 683—689.

[9] 易著文. 儿童肾病综合征临床研究的展望 [J]. 中国当代儿科杂志,2001, 3(2): 129—131.

(本文编辑:吉耕中)