论著·临床研究

叶酰多聚谷氨酸合成酶基因一个新的错义突变的发现

胡椿艳[1,2]　岳丽杰[1]　于洁[2]　张洪洪[1]　杨春兰[1,2]

（1. 重庆医科大学附属深圳市儿童医院儿科研究所，广东 深圳　518026；
2. 重庆医科大学附属儿童医院血液科，重庆　400014）

［摘　要］ **目的**　研究叶酰多聚谷氨酸合成酶（*FPGS*）基因编码区突变及多态性在中国汉族急性白血病（AL）患儿与健康儿童中的频率分布特征，为探讨 *FPGS* 基因多态性与肿瘤化疗个体化用药之间的关系提供理论依据。**方法**　采用 PCR-DGGE 结合 DNA 直接测序的方法对 91 例 AL 患儿和 124 例上呼吸道感染儿童（对照组）的 *FPGS* 基因第5 号外显子的突变及多态性情况进行分析，计算等位基因频率和基因型频率并分析其差异性。**结果**　在对照组儿童 *FPGS* 编码区中发现了一个国内外未见报道的错义突变 502/490 T > C（L151/101P），分别在 *FPGS* 线粒体型和胞浆型中发现了新突变 2 例和 3 例，并鉴定了其等位基因频率为 0.70%（胞浆型）和 0.47%（线粒体型）。这个新的错义突变与儿童 AL 无明显的相关性。**结论**　首次在中国汉族儿童中发现 *FPGS* 外显子 5 的一个新的错义突变 502/490 T > C（L151/101P），其在中国汉族儿童中的等位基因频率为 0.70%（胞浆型）和 0.47%（线粒体型）。

［中国当代儿科杂志，2012，14（7）：529－532］

［关　键　词］ 叶酰多聚谷氨酸合成酶基因；单核苷酸多态性；急性白血病；儿童

［中图分类号］ R725.5　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1008－8830（2012）07－0529－04

A novel missense mutation of folypolyglutamate synthetase gene

HU Chun-Yan, YUE Li-Jie, YU Jie, ZHANG Hong-Hong, YANG Chun-Lan. Institute of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital of Chongqing Medical University, Shenzhen, Guangdong 518026, *China* (*Yue L-J, Email: lijieyue@ yahoo. com*)

Abstract: Objective　To examine allelic frequencies of coding single nucleotide polymorphisms (cSNPs) of folypolyglutamate synthetase (*FPGS*) gene in Chinese Han children with acute leukemia (AL), in order to provide a basis for detecting the relationship between *FPGS* genetic polymorphisms and tumor individualized chemotherapy. **Methods**　cSNPs of exon 5 were detected with polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in 91 children with AL and 124 children with upper respiratory infection as controls. Genotypes and allelic frequencies were examined. **Results**　A novel missense mutation, 502/490 T > C (L151/101P), was found in exon 5 of *FPGS* from control children. The novel mutation was found in mitochondrial variants in two cases and cytosolic variants in three cases. The cytosolic and mitochondrial variants displayed allelic frequencies of 0.70 % and 0.47 % respectively. The novel mutation was not associated with susceptibility to AL. **Conclusions**　A novel missense mutation 502/490 T > C (L151/101P) in exon 5 of *FPGS* gene is firstly found in Chinese Han children, and the cytosolic and mitochondrial variants display allelic frequencies of 0.70 % and 0.47 % respectively.　[**Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(7): 529－532**]

Key words:　Folypolyglutamate synthetase gene; Single nucleotide polymorphism; Acute leukemia; Child

叶酰多聚谷氨酸合成酶（folypolyglutamate synthetase，FPGS）催化叶酸及叶酸拮抗剂多聚谷氨酸化形成相应的多聚谷氨酰衍生物，是叶酸拮抗剂类抗肿瘤药物如甲氨喋呤（methotrexate，MTX）、培美曲塞等在细胞内代谢过程中的关键酶[1]。MTX 是目前急性白血病（acute leukemia，AL）治疗中最有效的药物之一，对 MTX 耐药可导致绝大多数 AL 治疗失败。体内外研究表明，*FPGS* 低表达或突变是 MTX 类药物耐药的一个重要原因[2-5]。近年来，关于人类 *FPGS* 基因多态性的研究被陆续报道，其多态性越来越受到关注[6-7]。本研究以 AL 患儿及急性上呼吸道感染患儿作为研究对象，旨在阐明中国

［收稿日期］2011－12－29；［修回日期］2012－03－28
［项目基金］国家自然科学基金资助项目（No. 30471830）；深圳市科技计划项目（No. 200802065）。
［作者简介］胡椿艳，女，硕士研究生。
［通信作者］岳丽杰，教授。

汉族人群中 *FPGS* 多态性的分布特征,为 MTX 的个体化用药以及肿瘤化疗个体化提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例组为 2003 年 1 月至 2010 年 12 月深圳市儿童医院血液科住院的初治 AL 患儿 91 例,其中男性 51 例,女性 40 例,中位年龄 4.13 岁 (5 d ~ 12 岁);诊断符合《血液病诊断及疗效标准》[8]。对照组为 2008 年 6 月至 2011 年 7 月于我院门诊就诊的单纯上呼吸道感染患儿 124 例,男性 68 例,女性 56 例,中位年龄 4.21 岁(37 d ~ 12 岁)。两组儿童均为汉族。

1.2 研究方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 制备 经深圳市儿童医院伦理委员会审批通过,并获得患儿家长知情同意后,采集患儿治疗前骨髓液 1 ~ 1.5 mL,对照组儿童空腹静脉血 1.5 mL,EDTA 抗凝。使用 QIAamp® RNA Blood Mini Kit 提取总 RNA,禽成髓细胞瘤病毒(AMV)逆转录酶逆转录获取 cDNA。

1.2.2 PCR 扩增 (1) *FPGS* cDNA 全编码区扩增参照 GenBank 中 *FPGS* 两种亚型的 mRNA 序列(序列号:线粒体型为 NM-004957.4,胞浆型为 NM-001018078.1),分别设计两对可扩增 *FPGS* 全编码区的引物。线粒体型上游引物 5′-CGCCGGGAC-TATGTCG-3′,下游引物 5′-GGAGCCCCTCTGCTATC-3′。胞浆型上游引物 5′-TGATCCCGGAGTCT-GAACC-3′,下游引物 5′-GCACTGGGAGGAG-GAAATCTA-3′。反应体系 25 μL,包括:2 × GC Buffer Ⅰ 12.5 μL,1 μg cDNA,400 μmol/L dNTPs,上下游引物各 0.2 μmol/L,1.5 U Ex Taq DNA 聚合酶(TaKaRa,中国)。反应条件为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 4 min,循环 36 次;最后 72℃ 末次延伸 5 min。(2)巢式 PCR 根据 NCBI SNP 数据库中 *FPGS* 基因第 5 号外显子 473/461 位点,结合 Primer Primier 5、Oligo 6.0 和 WinMelt 2.0软件设计引物,在其中一条引物的 5′端加入60 bp的 GC 夹。PCR 扩增上下游引物分别为 F4:5′-TATGCCGTCTTCTGCCCTAA-3′ 与 R4:5′-GCTCTTCGTCCAGGTGGTTC-3′。GC 夹序列为 5′-GCCCGCCCGCCCCCGCCGCCCGCCCGTGCCCGCG CCCCGCGCCGCCCGCGCCCCGCCCGC-3′。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)筛查变异 制备变性梯度为 30% ~63%(100% 变性为 40% 甲酰胺及 7 mol/L 尿素混合物)的 10% 聚丙烯酰胺凝胶,梯度方向与电泳方向平行。PCR 产物 25 μL 混合等量载样缓冲液,60℃、150 V 恒压电泳 6 h,Gold View 染色后紫外灯下根据条带位置初步判断基因型并摄像。

1.2.4 DNA 测序 对 DGGE 筛查中发现的异常电泳行为的全部样本和随机挑选的 2 ~ 3 个正常条带的样本进行测序,以确定变异碱基的序列。

1.3 统计学分析

等位基因频率及基因型频率通过直接计数法获取,经 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组间等位基因频率及基因型频率分布的比较采用 χ^2 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DGGE 及 DNA 测序结果

应用 DGGE 结合 DNA 测序法对 91 例 AL 患儿和 124 例对照儿童 *FPGS* 基因第 5 号外显子进行了包含已报道的 473/461 位点的 cSNPs 检测。DGGE 发现 5 例对照组样本出现异常电泳带型,在电泳图上,除了与正常位置相同的一条单链条带外,尚可见异常位置上出现的 3 条带,初步判定为杂合型碱基改变(图 1)。经过 DNA 测序证实为 *FPGS* 基因第 5 外显子的杂合型单碱基变异,是目前国际上尚未发现的一个新的错义突变:502/490 T > C。该变异在 *FPGS* 两种亚型的编码基因中均有发现,5 例出现异常电泳带型的样本,其中 2 例为线粒体型变异即 L151P,另外 3 例为胞浆型变异即 L101P,见图 2。

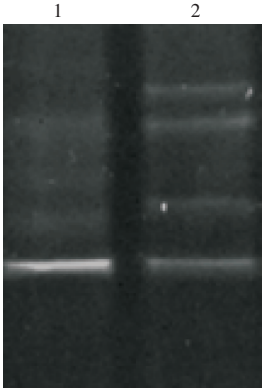

图 1 DGGE 检测代表图 1:TT 基因型(野生型);2:CT 基因型(杂合型变异)。

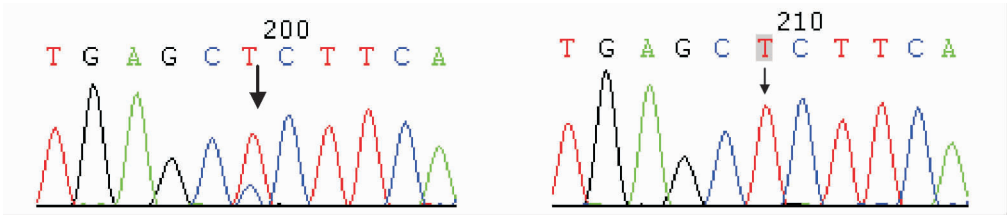

图 2　502/490 T > C(L151/101P)测序代表图　箭头代表变异的碱基。

2.2　*FPGS* 突变分析

借助于 215 例 cDNAs 片段的 PCR-DGGE 分析及 DNA 序列测定,本研究在国内外首次发现了 *FPGS* 基因外显子 5 的一个新的错义突变 502/490 T > C,此突变在 *FPGS* 基因的两种亚型中均有发现。线粒体型和胞浆型变异在对照组儿童中的等位基因频率分别为 0.81% 和 1.21%,AL 患儿中未检测到变异,故线粒体型和胞浆型变异的等位基因总频率分别为 0.47% 和 0.70%。两种亚型的等位基因频率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.20$, $P > 0.05$)。两种亚型变异碱基的定位、氨基酸改变、等位基因频率和基因型在两组人群中的分布见表 1。本组研究人群并未检测出 473/461 位点变异。

经 χ^2 检验,本研究中 *FPGS* 502/490 T > C 基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,具有群体代表性。

表 1　中国汉族儿童 *FPGS* 502/490 T > C 多态性

亚型	碱基改变	外显子位置	氨基酸改变	等位基因频率(%)		
				白血病组($n = 91$)	对照组($n = 124$)	总频率(r^2)
线粒体型	502T > C	5	$Leu^{151} > Pro$	0 (0 CT,0 CC)	0.81(2 CT,0 CC)	0.47
胞浆型	490T > C	5	$Leu^{101} > Pro$	0 (0 CT,0 CC)	1.21(3 CT,0 CC)	0.70

3　讨论

作为叶酸拮抗剂药物代谢过程中的关键酶,FPGS 在叶酸拮抗剂类抗肿瘤药物(如 MTX、培美曲塞等)的体内代谢中起着重要作用。以 MTX 为例,在 ATP 催化下,FPGS 可以迅速地将进入细胞内的 MTX 连接上长度不等的谷氨酸,形成 MTX 多聚谷氨酸盐。细胞内 MTX 的多聚谷氨酸化能防止其从细胞内流出;与单谷氨酸形式相比,多聚谷氨酸形式与靶酶的亲和性显著增高[1]。细胞内存在两种亚型的 FPGS:胞浆型(cFPGS)和线粒体型(mFPGS),cFPGS 和 mFPGS 源自同一基因即 *FPGS* 基因,由于第 1 号外显子使用了不同起始密码子的开放阅读框而导致表达产物有所不同:mFPGS 包含一段 50 个氨基酸的线粒体引导肽而 cFPGS 没有。cFPGS 和 mFPGS 共同构成了 FPGS 酶的活性[9]。

FPGS 基因多态性可导致其表达水平、活性等的改变,近年研究发现 *FPGS* mRNA 低表达及突变都可导致叶酸拮抗剂抵抗,因此研究 *FPGS* 基因多态性对恶性肿瘤的药物治疗及预后具有重要指导意义[10]。目前,国外研究较多的是 *FPGS* 基因几个标签单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)与肿瘤易感性及预后关系的研究,关于编码区的 SNPs(coding SNPs,cSNPs)研究则比较少,国内未见报道[11-12]。本研究应用 PCR-DGGE 技术对 215 例样本(包括 91 例 AL 患儿和 124 例对照儿童)*FPGS* 基因的第 5 号外显子进行扫描分析,以获得此外显子的 SNPs 情况。

本研究发现了一个目前国际上尚未报道的错义突变。这个新的错义突变是在 *FPGS* 基因 502/490 碱基位点发生 T→C 置换,引起亮氨酸突变为脯氨酸即 L151/101P。该变异在 *FPGS* 两种亚型的编码基因中均有发现,5 例出现异常电泳带型的样本中 2 例为线粒体型变异即 L151P,另外 3 例为胞浆型变异即 L101P。在本研究人群中,对照组儿童 T151/101C 的等位基因频率为 1.21%(L101P)和 0.81%(L151/P),AL 组未检出此变异,其总等位基因频率为 0.70%(L101P)和 0.47%(L151/P)。T151/101C 变异是一个新的错义突变,由于 FPGS 氨基酸的改变,推测其有可能改变 FPGS 酶活性,进而影响 FPGS 的正常功能,对 MTX 类抗肿瘤药物的耐药性产生一定的影响。由于检出的 T151/101C 标本均为杂合子,且例数较少(线粒体型 2 例,胞浆型 3 例),关于此突变可能引起

的酶活性改变还需进一步的功能分析研究阐明。另外,本研究中未发现 NCBI 数据库中第 5 号外显子唯一已知的 cSNP 位点 473/461(R141/91R)突变,推测可能与 SNPs 的种族差异性有关,中国汉族人群中可能并不存在此 SNP 位点,但尚需更多的或者进一步大样本量研究证实。

目前对于 *FPGS* 基因多态性与 MTX 类叶酸拮抗剂抗肿瘤治疗的研究才刚刚开始,本项研究发现了 *FPGS* 基因一个新的错义突变 T151/101C,确定了其在中国汉族儿童中的等位基因频率,由于这是国内外第一次发现的变异,有必要大样本量检测此变异在其他种族的多态性分布和研究多态性导致的功能改变,进一步研究 *FPGS* 基因多态性与 MTX 类抗肿瘤药物耐药的关系,从而明确 *FPGS* 在肿瘤化疗个体化用药中的角色。

[参 考 文 献]

[1] Gorlick R, Groken E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate an acute leukamia[J]. N Engl J Med, 1996, 335(14): 1041-1048.

[2] Wang Y, Zhao R, Goldman I. Decreased expression of the reduced folate carrier and folypolyglutamate synthetase is the basis for acquired resistance to the pemetrexed antifolate (LY231514) in an L1210 murine leukemia cell line[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(7): 1163-1170.

[3] Liani E, Rothem L, Bunni M, Smith C, Jansen G, Assaraf YG. Loss of folylpoly-gamma-glutamate synthetase activity is a dominant mechanism of resistance to polyglutamylation-dependent novel antifolates in multiple human leukemia sublines[J]. Int J Cancer, 2003, 103(5): 587-599.

[4] Stark M, Wichman C, Avivi I, Assaraf YG. Aberrant splicing of folylpolyglutamate synthetase as a novel mechanism of antifolate resistance in leukemia[J]. Blood, 2009, 113(18): 4363-4369.

[5] 孙利,沈佐君,何晓东. 氨甲蝶呤对映体耐药 A549 细胞株中叶酰聚谷氨酸合成酶 mRNA 和蛋白表达[J]. 安徽医科大学学报,2011, 46(6):549-522.

[6] Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Miyamae T, et al. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis[J]. Br J Clin Pharmacol, 2011, 71(2): 237-243.

[7] Adjei AA, Mandrekar SJ, Dy GK, Molina JR, Adjei AA, Gandara DR, et al. Phase II trial of pemetrexed plus bevacizumab for second-line therapy of patients with advanced non-small-cell lung cancer: NCCTG and SWOG study N0426[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(4): 614-619.

[8] 杨天楹. 急性白血病[M]//张之南. 血液病诊断及疗效标准. 第 2 版. 北京: 科学出版社,1998:168-214.

[9] McGuire JJ, Russell CA, Balinska M. Human cytosolic and mitochondrial folylpolyglutamate synthetase are electrophoretically distinct. Expression in antifolate-sensitive and-resistant human cell lines[J]. J Bio Chem, 2000, 275(17):13012-13016.

[10] Leclerc GJ, York TA, Hsieh-Kinser T, Barredo JC. Molecular basis for decreased folypoly-gamma-glutamate synthetase expression in a methotrexate resistant CCRF-CEM mutatant cell line[J]. Leu Res, 2007, 31(3): 293-299.

[11] Figueiredo JC, Levine AJ, Lee WH, Lonti DV, Poynter JN, Campbell PT, et al. Genes involved with folate uptake and distribution and their association with colorectal cancer risk[J]. Cancer Causes Control, 2010, 21(4): 597-608.

[12] Warren RB, Smith RL, Campalani E, Eyre S, Smith CH, Barker JN, et al. Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis and relationship to genetic polymorphisms[J]. Br J Dermatol, 2009, 160(2): 438-441.

(本文编辑:王庆红)