

Filaggrin 基因在鼻息肉中突变的研究*

周倩¹ 白伟良¹ 李进兴¹

[摘要] 目的:探讨中间丝聚合蛋白(*FLG*)基因突变与鼻息肉的关系。方法:提取 48 例病例组的鼻息肉组织和 30 例对照组下鼻甲黏膜的 DNA,先用聚合酶链反应扩增目的基因 R501X 3321delA,再用聚丙烯凝胶电泳进行检测,最后采用直接测序法进行测序。结果:鼻息肉组织中有 2 例(4.17%)出现 *FLG* 基因突变位点 c.3321delA,均为杂合突变,对照组无此突变,同时发现 *FLG* 新的突变位点 c.1711C>A 碱基序列由 CAC→AAC,病例组出现 12 例(25.00%),2 例(4.17%)是纯合突变,对照组仅 1 例(3.33%)是纯合突变,鼻息肉与正常黏膜比较,c.1711C>A 的基因突变率的差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:*FLG* 基因突变可能与鼻息肉发生、发展有关,有可能是鼻息肉发生原因之一。

[关键词] 鼻息肉;中间丝聚合蛋白;基因突变

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2018.03.014

[中图分类号] R765.25 **[文献标志码]** A

Study on the mutation of *Filaggrin* gene in nasal polyps

ZHOU Qian BAI Weiliang LI Jinxing

(Department of Otolaryngology, Shengjing Hospital, the Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, 110004, China)

Corresponding author: BAI Weiliang, E-mail: bweiliangcmu@163.com

Abstract Objective: The aim of this study is to investigate the relationship between *Filaggrin* (*FLG*) gene mutations and nasal polyps. **Method:** Genomic DNA was extracted from 48 nasal polyps tissues, and 30 samples of inferior turbinate tissues from normal human controls. Two *FLG* gene mutation points (R501X and 3321delA) were detected by polymerase chain reaction (PCR) first, then detected by polypropylene gel electrophoresis, and finally gene sequencing. **Result:** The *FLG* gene c.3321delA was found in 2 cases (4.17%) of nasal polyps, both of them were heterozygous mutations, and the control group did not detect this mutation. At the same time, the new mutation site of *FLG* (c.1711C>A) was found in 12 patients in cases group (25.00%), two of which were homozygous mutation 4.17% (2/48). Only one of homozygous mutation was found in the control group 3.33% (1/30). The difference of c.1711C>A in mutation rate between the case group and the control group was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The mutation of the *FLG* gene is associated with the occurrence and the development of nasal polyps, which may be one of the causes of nasal polyps.

Key words nasal polyps; *Filaggrin*; gene mutation

目前,鼻息肉的发病机制仍未阐明清楚,虽然其发病机制尚无相对统一的认识,但是对其病因学的研究一直在进行。近年来,关于遗传学和基因功能改变在鼻息肉的发病机制中的作用越来越受到关注,使我们对鼻息肉发病机制的认识更进一步,在很多情况下鼻息肉与肿瘤细胞的形成在细胞生长调节、基因表达激活上有着一定的相似性。近几年研究发现中间丝聚合蛋白(*filaggrin*, *FIG*)基因与许多疾病有一定的关系,*FIG* 主要位于人类染色体 1q21.3,由 3 个外显子组成,其中 1 号和 2 号外显子较小,3 号外显子比较大。外显子 1 和 2 均不编码蛋白质,*FLG* 的主要功能域在外显子 3。*FLG* 基因有多个突变位点,突变位点主要位于 3

号外显子,并且突变点有明显的种族以及人群差异性。*FLG* 基因突变引起相应的蛋白表达下降导致多种过敏性疾病。同时多项研究指出:*FLG* 突变与鱼鳞病、特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘等特应性疾病相关。变应性鼻炎、鼻息肉、支气管哮喘是 3 种常见的呼吸道疾病,这 3 种疾病之间存在一定的联系,并且往往表现为伴随发生或彼此转化。本实验就 *FLG* 易突变位点 R501X 及 3321delA 进行检测,探讨突变位点与鼻息肉的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2015-01—2017-03 我院鼻科 48 例经鼻内镜手术后病理确诊为鼻息肉患者的鼻息肉组织作为病例组,其中男 29 例,女 19 例;年龄 14~65 岁,平均 45 岁。同时选取 30 例因行鼻中隔偏曲手术的正常下鼻甲黏膜作为对照组,其中男 19 例,女 11 例;年龄 17~60 岁,平均 36.5 岁。所有受试者彼此间无血缘关系。

*基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金资助(No:2013001010);沈阳市科学计划项目资助(No:F11-264-1-07;F13-220-9-21)

¹中国医科大学附属盛京医院耳鼻咽喉科(沈阳,110004)
通信作者:白伟良, E-mail: bweiliangcmu@163.com

1.2 方法

1.2.1 收集标本提取 DNA 及引物的设计 收集的标本放置于-80℃冰箱保存,从收集的标本中每例取 20 mg 鼻息肉组织提取 DNA,使用离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 69504),按照产品操作说明书提取样本基因组 DNA。根据文献报告选择基因突变位点,突变位点 R501X 引物设计参考文献[1],突变位点 3321delA 引物设计根据 *FLG* 基因序列(NG_016190.1)设计的引物,设计的引物在序列号 NM002016.1 上进行匹配,由上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 PCR 扩增 将提取的 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增使用试剂盒(Takara R010A),使用高保真酶进行,PCR 反应体系为 50 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ Plus)10 μl,dNTP Mixture 4 μl,模板 DNA 5 μl,ddH₂O 29.5 μl,PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μl。PCR 反应条件:94℃ 50 s,51.9~62.2℃ 40 s,72℃ 40 s,共 31 个循环,72℃ 6 min。PCR 扩增产物长度及退火温度见表 1。

取 5 μl PCR 产物在溴化乙锭染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度,全自动凝胶成像分析仪进行拍照、保存图像。

1.2.3 直接测序 PCR 产物送往上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,测序图像使用 Chromas 2.3 进行分析,以 NCBI 数据库中 *FLG* 基因标准序列(序列号 NM002016.1)为参照,经 BLAST 软件进行序列比对分析,以寻找突变,后对病例组与对照组的突变率进行统计学分析,使用 SPSS 22.0 软件中的四格表卡方检验检测其差异是否有统计学意义。

2 结果

在进行测序的 48 例鼻息肉标本中,有 2 例(4.17%)出现碱基序列第 3321 位上碱基 A 的缺失,导致后方 *FLG* 基因未成熟终止密码子的形成。进一步使用克隆测序进行验证 3321delA,将待测测序标本克隆到载体上进行测序,可以显示引物序列。其突变检测均为杂合子突变,对照组 30 例未检测到此突变。在测序过程中发现新的突变位点,碱基序列第 1711 位碱基 C→A,导致翻译的氨基酸发生改变,使用 BLASTX 软件比对分析(序列号 NP_002007.1),氨基酸由组氨酸变为天冬酰胺,病例组出现 12 例(25.00%),其中 4.17%(2/48)是纯合突变,对照组出现 2 例,占 6.67%(2/30),其

中 1 例是纯合突变,占 3.33%(1/30),对病例组与对照组碱基序列 c.1711C>A 进行统计学分析,结果提示病例组与对照组的突变率差异有统计学意义($P<0.05$)。具体突变见图 1。

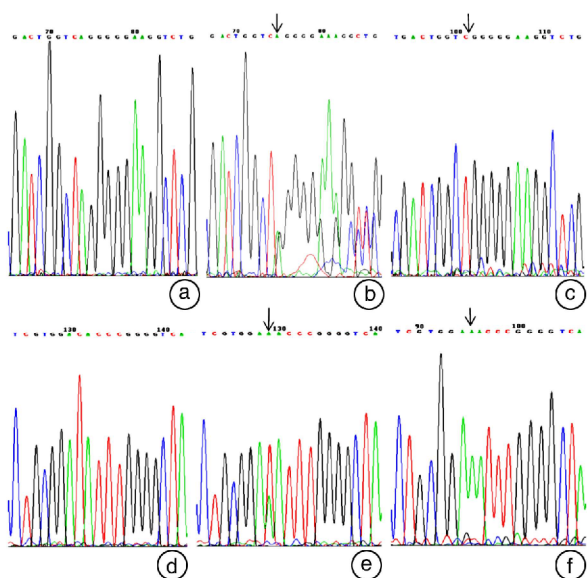
3 讨论

鼻息肉是一种炎症性疾病,超过 4% 的年轻人受其严重影响,导致工作效率降低,生活质量受到影响,每年在世界范围内进行外科干预次数明显增多^[2];而且鼻息肉术后复发率高,再次手术的可能性大,鼻息肉发生后大部分患者出现鼻塞、流涕、嗅觉减退,对外界化学气体识别能力下降,有害气体吸入人体导致其他疾病的发生。虽然鼻息肉是最常见的疾病之一,但其发病机制尚不完全清楚。大多数研究认为变态反应发挥了重要作用,其可导致局部鼻息肉的发生。在变态反应中参与炎症反应的细胞多种多样,其中嗜酸粒细胞是主要的炎性细胞,在大部分的鼻息肉组织中,有研究表明黏膜和外周嗜酸症可以作为预测鼻息肉严重程度的一个指标^[3],同时嗜酸性特征仍然是哮喘和其他嗜酸性疾病的主要特征^[4],其主要特征也是嗜酸粒细胞增多。由于既往对鼻息肉的相关研究均基于基因调控与表达方面,而鼻息肉基因突变方面的研究极少,因此本研究在此基础上进行鼻息肉相关基因的研究,而 *FLG* 基因是近几年研究较多的基因,大部分研究都是关于身体其他疾病的,比如哮喘和特异性皮炎,既往已经报道此基因突变与变应性鼻炎及哮喘有一定的关系,而鼻息肉与哮喘和变应性鼻炎关系密切,是同一呼吸道疾病,并且相互影响。鼻息肉与 *FLG* 基因突变的关系未见研究,本实验对其基因突变进行研究,以期对鼻息肉基因方面的治疗提供帮助。

FLG 基因突变位点主要位于 *FLG* 基因的 3 号外显子,3 号外显子是 *FLG* 基因的主要功能域,*FLG* 基因 3 号外显子(12.7~14.7 Kb)是能够翻译为蛋白质的 DNA 片段,其主要由 10~12 个的丝聚蛋白重复序列组成,这些重复单元同源性很高,相似性接近 100%^[5]。*FLG* 的突变形式复杂多样,在欧洲和亚洲人口中已发现 60 多种 *FLG* 突变形式^[6]。突变形式包括无义突变、插入或缺失等突变,并且这些突变都可导致 *FLG* 翻译的蛋白质功能下降,同时突变具有一定的种族特异性及地域特异性。Akiyama^[7]报道,大多数学者认为 *FLG* 基因突变都是针对群体的,比如日本及新加坡华人和台湾,同时中国人和日本人之间的 *FLG* 突变差异

表 1 引物序列及退火温度

基因位点	引物序列	扩增产物	温度/℃
R501X	F 5'-ACAGCCTGACTCTGCCCATG-3'	273bp	51.9
	R 5'-GCACTTCTGGATCCTGACTG-3'		
3321delA	F 5'-AGTGAGGGACATTCAGAGGAG-3'	173bp	62.2
	R 5'-ATGAGTGCTCACCTGGTAGAT-3'		



a: 3321 正常序列; b: 3321 位点的杂合突变(箭头所指); c: 3321 克隆测序 A 的缺失(箭头所指); d: c1711 正常序列; e: c1711 位点的杂合突变(箭头所指); f: c1711 位点的纯合突变(箭头所指)。

图 1 病例组与对照组的突变图

比欧洲人要大得多^[8],在欧洲与亚洲人群中具有不同的突变形式,欧洲最常见的突变形式是 R501X 与 2282del4^[9],亚洲最常见的突变形式是 3321delA^[10]。既往对 *FLG* 的研究基本上都是针对寻常型鱼鳞病及特异性皮炎,而对其他疾病的研究较少。*FLG* 基因是近几年来新发现的哮喘易感因素^[11],与哮喘的发病有一定的关系。Poninska 等(2011)曾对波兰 3 802 例变应性疾病患者进行 *FLG* 基因 2282del4 与 R501X 的检测,结果显示 *FLG* 基因突变与不伴有特异性皮炎的变应性哮喘存在关联,说明 *FLG* 基因突变与哮喘的关系密切。变应性鼻炎、鼻息肉、支气管哮喘是 3 种常见的呼吸道疾病,这 3 种疾病之间存在一定的联系,并且往往表现为伴随发生或彼此转化。既往有研究表明 *FLG* 基因突变与哮喘变应性鼻炎有关,*FLG* 基因突变是否与鼻息肉的发生有关,目前笔者尚未见报道。本研究结果显示,所检测的标本未发现基因 R501X 突变,可能是鼻息肉与此基因位点突变无关,也可能与标本量过少有关,有待进一步研究。同时基因 3321delA 位点改变,这一突变导致读码框的改变并在该突变所在密码子下游的第 41 位产生一个终止密码子,从而产生一个较短的丝聚蛋白,导致未成熟终止密码子的形成,*FLG* 蛋白合成提前终止,导致 *FLG* 的功能异常,丝聚蛋白合成减少,局部防御功能下降^[12],病原菌入侵,促进炎症反应,启动机体免疫应答,其缺失可导致过敏症和哮喘的发生^[13],也有可能引起鼻息肉的发生,但由于只有 2 例鼻息肉患者发生突变,突变率较低,有待进一步扩大样本量进行研究。在进行测序时,发现新的基因突变位点 c. 1711C>A,经统计学分析提

示病例组与对照组的突变率差异有统计学意义($P<0.05$),提示鼻息肉的发生与 *FLG* 基因的第 1711 位突变有关,其突变导致翻译氨基酸发生改变,氨基酸由组氨酸转变成天冬酰胺,引起组成蛋白质氨基酸的改变,进而引起蛋白质结构的改变,导致功能改变,引起上述结构及功能改变的真正原因有待我们深入研究。

参考文献

- [1] WOZNIAK M, KACZMAREK-SKAMIRA E, ROMANSKA-GOCKA K, et al. The prevalence of mutations in the gene encoding filaggrin in the population of Polish patients with atopic dermatitis[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2016, 33: 128–133.
- [2] SCHLEIMER R P. Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis[J]. Annu Rev Pathol, 2017, 12: 331–357.
- [3] ASLAN F, ALTUN E, PAKSOY S, et al. Could Eosinophilia predict clinical severity in nasal polyps[J]? Multidiscip Respir Med, 2017, 12: 21–21.
- [4] DORAN E, CAI F, HOLWEG C T J, et al. Interleukin-13 in Asthma and Other Eosinophilic Disorders[J]. Front Med (Lausanne), 2017, 4: 139–139.
- [5] BROWN S J, KROBOTH K, SANDILANDS A, et al. Intragenic copy number variation within filaggrin contributes to the risk of atopic dermatitis with a dose-dependent effect[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132: 98–104.
- [6] IRVINE A D, MCLEAN W H, LEUNG D Y. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases[J]. N Engl J Med, 2011, 365: 1315–1327.
- [7] AKIYAMA M. *FLG* mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics[J]. Br J Dermatol, 2010, 162: 472–477.
- [8] PARK J, JEKARL D W, KIM Y, et al. Novel *FLG* null mutations in Korean patients with atopic dermatitis and comparison of the mutational spectra in Asian populations[J]. J Dermatol, 2015, 42: 867–873.
- [9] CARLSEN B C, MELDGAARD M, JOHANSEN J D, et al. Filaggrin compound heterozygous patients carry mutations in transposition[J]. Clin Exp Dermatol, 2013, 22: 572–575.
- [10] LI M, LIU Q, LIU J, et al. Mutations analysis in filaggrin gene in northern China patients with atopic dermatitis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013, 27: 169–174.
- [11] MUKHERJEE A B, ZHANG Z. Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors[J]. J Biol Chem, 2011, 286: 32883–32889.
- [12] THYSEN J P, KEZIC S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 134: 792–799.
- [13] VAN DEN OORD R A, SHEIKH A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis[J]. BMJ, 2009, 339: b2433.

(收稿日期: 2017-11-22)