文章编号:1000-5404(2011)23-2537-02

短篇论著

线粒体基因组 4 977 bp 异质性缺失与高原肺水肿易感性无关

罗勇军[1,3],陈 郁[2,3],高钰琪[2,3] (400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系:高原疾病学教研室[1],病理生理学教研室[2],高原医学教育部重点实验室[3])

[摘要] **目的** 研究线粒体基因组 4 977 bp 大片段异质性缺失与高原肺水肿(high altitude pulmonary edema,HAPE)易感性的关系。**方法** 选择本室收集的 HAPE 标本 36 例及与其匹配的健康对照标本 36 例,采用定量 PCR (SYBR)的方法研究线粒体基因组 4 977 bp 大片段异质性缺失与高原肺水肿易感性的关系。**结果** 在高原肺水肿的病例组及对照组中均没有发现 4 977 bp 异质性缺失。**结论** 线粒体基因组 4 977 bp 异质性缺失与高原肺水肿易感性无关。

[关键词] 线粒体 DNA;4 977 bp 缺失;高原肺水肿;异质性
[中图法分类号] R541.63; R339.54; R363.25 [文献标志码] A

高原肺水肿(high altitude pulmonary edema,HAPE)是一种常见的高原特发病,起病急、进展快、危害大[1-3]。近年的调查表明,在快速进入海拔 3 700 m 高原的人群中,HAPE 的发病率高达 0.4% ~2%[4]。在 2010 年的青海玉树地震中,军队 9 家医院共接收青海玉树 726 例地震伤病员,其中高原肺水肿 31 例,占总患者数的 4.3%[5]。线粒体基因组(mitochondrion DNA,mtDNA)序列改变可能影响线粒体的功能,进而与高原习服适应密切相关[6-8]。HAPE 是一种低氧习服不良的急性高原病,其发病可能与 mtDNA 的序列改变有关,本室前期研究发现了 mtDNA 3010、mtDNA 3970 等位点的变异,mtDNA 拷贝数变化与高原肺水肿易感性密切相关[9-14]。近年来的研究发现 mtDNA 4 977 bp 大片段缺失与肿瘤细胞辐射敏感性、休克发生密切相关[15-16],本研究探讨线粒体基因组 4 977 bp 异质性缺失与高原肺水肿易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

在高原地区采集 36 例高原肺水肿男性患者,年龄 18 ~30 岁,标本的纳入标准根据 1995 年中华医学会公布的高原肺水肿诊断标准[17]。同时在拉萨采集来自同一地区,乘飞机进入拉萨,且在拉萨 1 周内未发生高原肺水肿的健康男性 36 例标本作为对照,年龄 18 ~30 岁。所有标本均排除目前已知与线粒体明确相关的疾病和 3 代内与不同民族结婚的个体。研究对象签署知情同意书,并上报校伦理委员会同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及样本 DNA 提取 取患者和对照组静脉血 2 ml,EDTA 抗凝,-20 ℃运回重庆进行后续实验。采用全血基因组 DNA 提取试剂盒(OMEGA,美国)提取样本总 DNA,并用分光光度仪(Nanodrop,美国)检测其浓度,-80 ℃保存备用。

1.2.2 定量 PCR 扩增 分别在 mtDNA 4 977 bp 缺失的上游和下游设计 1 对基因扩增引物(F1 和 R1),当存在 4 977 bp 缺失时,所扩增的 PCR 产物长度 151 bp。同时在跨 mtDNA 8 470 bp 设计 1 对特异性引物(F2 合 R2),当没有 4 977 bp 缺失时,所扩增的 PCR 产物片段是 150 bp。引物序列如下[18]:mt-F1(8 406 ~8 431)5′-ACCCCCATACTCCTTACACTATTCCT-3′,mt-R1(13 559 ~13 581)5′-CGGTTTCGATGATGTGGTCTTT-3′。mt-F2(8 409 ~8 435)5′-CCCATACTCCTTACACTATTCCT-CATC-3′,mt-R2(8 585 ~8 607)5′-GCAATGAATGAAGCGAA-CAGATT-3′。实时荧光定量 PCR 反应体系为:SYRB(含 dNTP、Mg^{2+}、*Taq* 酶、PCR buffer 等)12.5 μl,灭菌水 10.5 μl,模板 DNA 1 μl,10 pmol/L 的上下游引物共 1 μl。PCR 扩增条件为:95 ℃ 10 s,(95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s 读板)×40 循环。温度从 50 ℃ 升高到 95 ℃,温度每升高 0.2 ℃读板 1 s,进行融解曲线分析。

2 结果

在 HAPE 病例和对照组中均没有发现 4 977 bp 大片段缺失(图 1)。

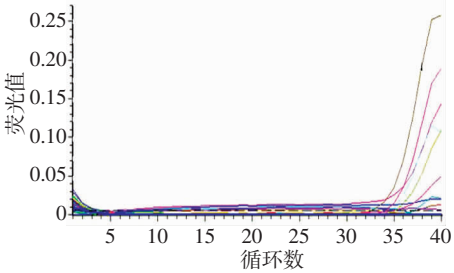


图 1 mtDNA 4 977 bp 缺失荧光定量 PCR 扩增曲线图

3 讨论

mtDNA 是存在细胞核 DNA 外的双链环状 DNA,

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(30900715);"十一五"国家科技支撑计划(2009BAI85B01)
[通信作者] 高钰琪,E-mail:gaoy66@yahoo.com

呈严格的母系遗传,全长为16 569 bp,分为编码区和非编码区。编码区包括13个氧化磷酸化相关的多肽(复合体Ⅰ的7个NADH脱氢酶复合体亚基ND1、ND2、ND3、ND4L、ND4、ND5和ND6,复合体Ⅲ的细胞色素b亚基cytb,复合体Ⅳ的3个细胞色素C氧化酶亚基COⅠ、COⅡ、COⅢ,复合体Ⅴ的2个ATP合成酶亚基ATPase6和ATPase8),2组rRNA(编码12SrRNA和16SrRNA)和22个tRNA(编码20种tRNA)[19]。与核DNA(nuclear DNA, nDNA)相比,线粒体DNA在结构和功能上有着自己独特的特点:①mtDNA是裸露的,缺乏组蛋白和DNA结合蛋白的保护;②mtDNA与氧化磷酸化场所(线粒体内膜)相距甚近,又直接暴露于氧化磷酸化过程中产生的高反应性氧中,因此极易受到自由基的攻击;③mtDNA复制速度很快且催化复制的DNA聚合酶C不具有校读功能,复制错误率高;④mtDNA与nDNA相比其修复机制不完善;⑤每个细胞中含有数百个线粒体,每个线粒体又含多个DNA分子,所以细胞中可同时存在正常mtDNA和突变mtDNA,即异质性;⑥突变mtDNA是否在组织产生表型效应,这要依突变mtDNA与正常mtDNA相对比例和该组织的能量消耗程度而定。mtDNA 4 977 bp缺失突变有可能发生于mtDNA序列8 470~13 477之间,4 977 bp缺失区的两端为13个碱基的重复序列,即8 470~8 484和13 447~13 459。缺失的mtDNA区域含有5个tRNA基因,7个编码复合体Ⅰ、复合体Ⅳ及细胞色素C氧化酶亚单位的基因。当mtDNA受到氧化物损伤或亲电子基团攻击时,mtDNA链断裂,在修复延伸过程中这种直接重复序列可能发生错误结合,而形成片段缺失的mtDNA分子。戴纪刚等[20]采用长距离PCR方法对37例肺癌组织、37例相应的癌旁肺组织和20例正常肺组织mtDNA 4 977 bp片段缺失进行了检测,发现肺癌组织、癌旁正常组织及正常肺组织的mtDNA 4 977 bp缺失率均有随年龄增大而增高的趋势,mtDNA 4 977 bp缺失的发生频率和吸烟因素亦密切相关。

在本实验中,当人体快速从平原进入高原,由于高原低氧导致活性氧的生成增加,可能导致mtDNA 4 977 bp受到氧攻击而发生缺失,进一步导致线粒体的功能异常,很容易发生高原肺水肿。本实验采用定量PCR的方法,在HAPE患者血细胞mtDNA无4 977 bp缺失,说明其mtDNA的结构是基本完整的,推测线粒体基因组4 977 bp异质性缺失与HAPE易感性无关。

参考文献:

[1] 张雪峰, 叶平安, 陈晓峰. 高原施工人群急性重型高原病患病率调查[J]. 高原医学杂志, 2005, 15(3): 7-9.

[2] 罗勇军, 高钰琪. 高原肺水肿遗传易感性机制的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(2): 135-137.

[3] 罗勇军, 周其全, 高钰琪. 新型药物对高原肺水肿的防治作用[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(12): 1502-1503.

[4] 高钰琪. 高原肺水肿的发病机制及防治[J]. 人民军医, 2005, 48(2): 108-111.

[5] 麻晓林, 金榕兵, 张晓华, 等. 军队医院接收青海玉树726例地震伤病员救治情况分析[J]. 创伤外科杂志, 2010, 12(4): 339-343.

[6] 高文祥, 柳君泽, 吴利平, 等. 低氧大鼠脑线粒体体外转录活性的研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(4): 323-326.

[7] 赵秀欣, 高文祥, 高钰琪, 等. 高原世居藏族人胎盘线粒体呼吸功能的初步研究[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(13): 894-897.

[8] Luo Y, Gao W, Gao Y, *et al*. Mitochondrial genome analysis of Ochotona curzoniae and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation[J]. Mitochondrion, 2008, 8(5/6): 352-357.

[9] 罗勇军, 高文祥, 高钰琪, 等. 基于线粒体DNA G3010A单核苷酸多态性检测高原肺水肿易感性的试剂盒: 中国, 200710092823.1[P]. 2008-03-05.

[10] 罗勇军, 高文祥, 刘福玉, 等. 基于线粒体DNA C3970T单核苷酸多态性检测高原肺水肿易感性的试剂盒: 中国, 200710092822.7[P]. 2008-03-05.

[11] 高文祥, 罗勇军, 高钰琪, 等. 基于线粒体DNA T6680C单核苷酸多态性检测高原肺水肿易感性的试剂盒: 中国, 200710092817.6[P]. 2008-03-05.

[12] 高钰琪, 罗勇军, 高文祥, 等. 基于线粒体DNA G709A单核苷酸多态性检测高原肺水肿易感性的试剂盒: 中国, 200710092814.2[P]. 2009-07-01.

[13] 罗勇军, 高文祥, 刘福玉, 等. 线粒体单倍群M中mtDNA 5351G和6680C基因型与高原肺水肿易感性的关联[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011, 10(1): 51-53.

[14] 罗勇军, 刘福玉, 陈丽, 等. 高原习服适应中白细胞线粒体DNA拷贝数的变化规律[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 359, 375.

[15] 荣庆林, 赵欣然, 王芹, 等. mtDNA4977bp缺失预测肿瘤细胞辐射敏感性的体外研究[J]. 中国辐射卫生, 2008, 17(4): 389-391.

[16] 李晓东, 陆松敏, 何怡, 等. 线粒体DNA4977bp大片段基因缺失与失血性休克的关系初探[J]. 中国现代实用医学杂志, 2006, 5(11): 11-16.

[17] 中华医学会第三次全国高原医学学术讨论会. 我国高原病命名、分型及诊断标准[J]. 高原医学杂志, 1996, 6(1): 2-4.

[18] 陈晓培, 王平, 赵阳辉, 等. 实时定量PCR分析健康人外周血线粒体DNA 4 977 bp缺失[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1186-1188, 1209.

[19] 罗勇军, 高钰琪. 线粒体基因组变异与高原环境适应相关性的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2011, 34(1): 27-30.

[20] 戴纪刚, 肖颖彬, 闵家新, 等. 肺癌组织中线粒体基因组4977bp大片段缺失状况分析[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(12): 804-805.

(**收稿**:2011-07-04;**修回**:2011-08-29)

(编辑 邓强庭)