基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1183-04

重庆地区汉族人群穿孔素和颗粒酶 B 基因多态性分析

文旖旎,安云飞,赵晓东
(重庆医科大学附属儿童医院 P2 实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究重庆地区汉族人群穿孔素(Perforin,PRF1)和颗粒酶 B(Granzyme B,GZMB)基因多态性分布特征及连锁不平衡,为研究 PRF1 和 GZMB 基因多态性与疾病相关性提供前期实验依据。方法:采用直接测序法对 100 名重庆地区健康儿童的 PRF1 和 GZMB 基因单核苷酸多态性(SNPs)进行分析。结果:①在重庆地区汉族儿童 PRF1 基因外显子 3 发现多态性 3877C>T 和 3955C>T。在 GZMB 外显子 2、外显子 3、外显子 5 分别发现多态性 1273G>A,1804A>G 及 1815C>G,3151T>C 及 3186A>G,其中 1815C>G 和 3186A>G 是本研究新发现的多态性位点。②不同种族和地区 PRF1 及 GZMB 基因 SNPs 分布不同。PRF1 基因两个多态性位点在重庆地区人群中呈现强烈的连锁不平衡(D'=0.996)。GZMB 基因的 5 个多态性位点两两连锁不平衡。结论:在重庆地区汉族人群 PRF1 和 GZMB 基因中共发现 7 个多态性位点,其中 2 个为首次发现。PRF1 和 GZMB 基因多态性在重庆地区汉族人群中均存在显著连锁不平衡。

【关键词】穿孔素;颗粒酶 B;单核苷酸多态性;连锁不平衡
【中国图书分类法分类号】R392 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-18

Analysis of perforin and granzyme B gene single nucleotide polymorphisms in Han population of Chongqing.

WEN Yi-ni, et al
(*P2 Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the distribution characters and linkage disequilibrium of PRF1 and GZMB gene polymorphisms in Han population of Chongqing. *Methods*: The single nucleotide polymorphisms(SNPs) in PRF1 and GZMB gene of 100 normal subjects in Han population of Chongqing were detected by DNA sequencing analysis. *Results*: Two SNPs in exon 3 of PRF1 as well as one SNP in exon 2, two SNPs in exon 3, two SNPs in exon 5 of GZMB were identified, but no SNPs were detected in exon 2 of PRF1. Among them, two novel SNPs were identified in GZMB gene. The frequency distribution of these SNPs was different among different races and territory. In addition, linkage disequilibrium in the SNPs of 3877C>T and 3955C>T of PRF1 gene was found. There was a strong linkage disequilibrium among the SNPs of GZMB. *Conclusion*: 7 SNPs were detected in PRF1 and GZMB genes all together, two of which were first identified. There is apparent linkage disequilibrium among SNPs of PRF1and GZMB gene in Han population of Chongqing.

【Key words】Perforin; Granzyme B; Single nucleotide polymorphism; Linkage disequilibrium

穿孔素(Perforin,PRF1)和颗粒酶 B(Granzyme B,GZMB)是在细胞凋亡途径中发挥重要作用的分子,穿孔素也叫孔形成蛋白,是位于 NK 细胞和 CTL 细胞胞浆中的细胞毒颗粒,它是一种糖蛋白[1]。人类的 PRF1 基因定位于 10q22, DNA 全长 5 428 bp,有 3 个外显子 2 个内含子,编码区位于外显子 2 和外显子 3 的部分区域,编码 555 个氨基酸。颗粒酶是一组丝氨酸蛋白酶,也是存在于 NK 细胞和 CTL 细胞胞浆的细胞毒颗粒,人颗粒酶有多种,如颗粒酶 A、颗粒酶 B、颗粒酶 H、颗粒酶 K、颗粒酶 M 等,其中颗粒酶 B 的作用最为强大[2]。人 GZMB 基因位于 14q11.2,DNA 全长 3 273 bp,有 5 个外显子,4 个内含子,编码区位于外显子 2、外显子 3、外显子 5 以及外显子 1 和外显子 5 的部分区域,编码 247 个氨基酸。目前,文献对 PRF1 和 GZMB 基因多态性的报道非常少见,在中国人中尚未见文献报道,在 NCBI 的 dbSNP 数据库中也仅发现一个样本量为 40 余人的北京地区人群的资料。在本研究中我们采用 PCR 扩增和基因组 DNA 直接测序的方法对中国重庆地区汉族人群的 PRF1 和 GZMB 基因单核苷酸多态性进行分析,以探讨 PRF1 和 GZMB 基因多态性特点,为研究 PRF1 和 GZMB 基因多态性与疾病相关性提供前期实验依据。

作者介绍:文旖旎(1981-),女,硕士,
研究方向:小儿免疫学。
通讯作者:赵晓东,男,教授, E-mail:Zhaoxd530@yahoo.com.cn。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集我院健康体检儿童血液标本 100 例,男 66 例,女34 例。均为汉族。无心、脑、肺、肝、肾、血液疾病、自身免疫性疾病和感染性疾病史。

1.2 研究方法

1.2.1 全血细胞 DNA 的提取 所有成员由外周静脉抽取抗凝血 1 ml,采用德国 QIAamp DNA Mini Kits 试剂盒,按照说明书操作提取基因组 DNA,-20℃ 保存备用。

1.2.2 引物序列 扩增 PRF1 基因的外显子 2 和外显子 3 的引物序列来自参考文献[3],扩增 GZMB 基因的外显子 2、外显子 3 及外显子 5 的引物根据 GZMB 序列(NC_000014)自行设计,由英骏生物技术有限公司合成,各引物序列见表 1。

1.2.3 PCR 扩增 产物总体系为 25 μl,其中 2 × Master-Mix 12.5 μl,正反向引物各 0.5 μl(10 μmol/L),DNA 为 3 μl,其余用去离子水补至 25 μl。

1.2.4 电泳 取 PCR 产物 4 μl 和 1 μl 6 × Loading Bufffer 混合加入含 0.1%Goldview DNA 染料的 1.5% 琼脂糖凝胶上样孔中,130 V 电压电泳 40 min,紫外透射仪下观察判断结果,凝胶图像分析仪拍照保存。

1.2.5 PCR 产物测序 将所有样本的 PCR 产物送至重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室进行序列测定,测序结果与人基因组 PRF1 序列(NC_000010)和人基因组 GZMB 序列(NC_000014)比对。

1.3 统计学处理

采用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对,明确多态性位点,对各多态性位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,若 $P \geq 0.05$,表明样本具有人群代表性,对该位点基因型和等位基因频率进行分析,若 $P<0.05$,表明样本不具有人群代表性,舍弃这个位点。用 SPSS11.5 分析多态性位点的基因型和等位基因频率,用 SHEsis[4]分析连锁不平衡和单倍型。

2 结 果

2.1 PRF1 基因外显子 2 和外显子 3 的 PCR 产物测序结果

用 DNAMAN 软件将测序结果与 PRF1 基因序列(NC_000010)进行比对,在外显子 3 发现 2 个多态性 3877C>T 及 3955C>T,在外显子 2 没有发现多态性位点(测序图见 1-1,1-2,1-3,以 3877C>T 为例,分别为纯合子 3877CC,纯合子 3877TT 及杂合子 3877CT)。

2.2 GZMB 基因外显子 2、外显子 3 及外显子 5 的 PCR 产物测序结果

用同样的方法,在 GZMB 基因外显子 2 发现多态性 1273G>A,外显子 3 发现多态性 1804A>G 及 1815C>G,外显子 5 发现多态性 3151T>C 及 3186A>G,其中 1815C>G 及 3186A>G 为新发现的多态性位点(测序图见 2-1,2-2,2-3,以 1273G>A 为例,分别为纯合子 1273AA,纯合子 1273GG 及杂合子 1273G>A)。

2.3 重庆汉族人群与其它人种 PRF1 和 GZMB 基因 SNP 的比较

经检验各多态性位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P \geq 0.05$),表明样本具有人群代表性。对 100 名中国重庆地区汉族人群 PRF1 和 GZMB 基因型多态性进行分析并与其它人种(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html)进行比较。结果见表 2。

2.4 重庆汉族人群 PRF1 和 GZMB 基因多态性位点的连锁不平衡分析

PRF1 基因 3877C>T 和 3955C>T 多态性呈现强烈的连锁不平衡(D'=0.996)。GZMB 基因 5 个多态性中除 1273G>A 和 1804A>G 呈较强的连锁不平衡外(D'=0.68),其余多态性两两之间均呈强烈的连锁不平衡 (D'>0.7),3151T>C 和 3186A>G 则为完全连锁不平衡(D'=1)[5]。见表 3。

2.5 PRF1 和 GZMB 多态性构建的单倍型分析

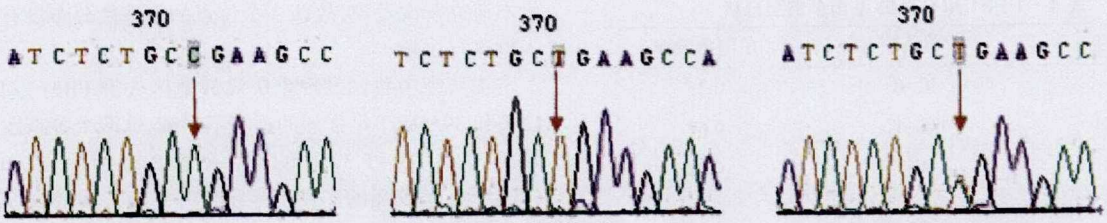
PRF1 基因 3877C>T 和 3955C>T 构建了 3 种主要单倍型 C-C、C-T、T-T。GZMB 基因的 5 个多态性构建了 4 种主要单倍型 A-A-C-T-A、A-A-G-T-A、A-G-G-T-A、G-G-G-C-G。见表 4 。当单倍型频率均小于 3%时,数据自动删除。PRF1 多态性位点排列顺序为 3877~3955,GZMB 多态性位点排列顺序为 1273-1804-1815-3151-3186。

3 讨 论

SNPs 是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异引起的

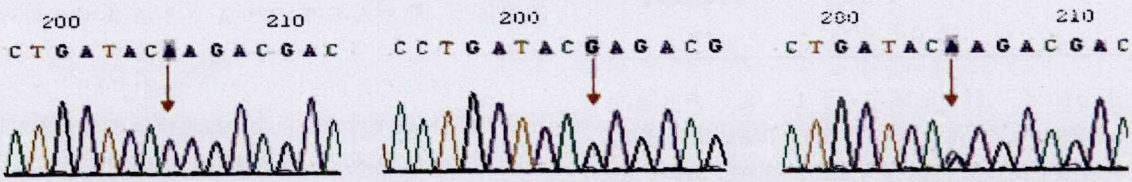
表 1 PRF1 和 GZMB 各引物序列

基因	外显子	引物序列 5'-3'	片段大小(bp)	退火温度
PRF1	外显子 2	ccctccatgtgccctgataatc agcagcctccaagtttgattgg	755	63℃ 1 min
	外显子 3	ccagtcctagttctgcccacttac gaaccccttcagtccaagcatac	1 289	62℃ 1 min
GZMB	外显子 2	cactcccaactccaggctat aaggagacctcctggcatgt	379	57.1℃ 30 s
	外显子 3	cagctgtcacctgctcttca	337	55℃ 30 s
	外显子 5	tgtaggctgtgcaagttggc aaccagcttttccactcagc	370	55℃ 30 s



A 基因型为 CC　　B 基因型为 TT　　C 基因型为 CT

图 1　基因 3 877C>T 多态性测序图，基因型分别为 CC,TT,CT



A 基因型为 AA　　B 基因型为 GG　　C 基因型为 AG

图 2　GZMB 基因 1273G>A 多态性测序图，基因型分别为 GG,AA,AG

表 2　重庆汉族人群 PRF1 和 GZMB 基因多态性与其它人种的比较

位点	种族	例数	基因型(频率)		*P* 值	等位基因(频率)		*P* 值
			CC	CT+TT		C	T	
	中国	99	84(0.85)	14+1(0.15)		182(0.92)	16(0.08)	
3877C>T	欧洲	24	12(0.50)	10+2(0.50)*	0	34(0.71)	14(0.29)*	0
	美非	23	18(0.78)	5+0(0.22)	0.44	41(0.89)	5(0.11)	0.54
	日本	44	37(0.84)	7+0(0.16)	0.91	81(0.92)	7(0.08)	0.97
			TT	CT+CC		C	T	
	中国	99	54(0.55)	40+5(0.45)		50(0.25)	148(0.75)	
3955C>T	欧洲	24	12(0.50)	7+5(0.50)	0.69	17(0.35)	31(0.65)	0.16
	美非	23	14(0.61)	8+1(0.49)	0.58	10(0.22)	36(0.78)	0.62
	日本	44	25(0.57)	16+3(0.43)	0.80	22(0.25)	66(0.75)	0.96
			AA	AG+GG		A	G	
	中国	99	51(0.52)	41+7(0.48)		143(0.72)	55(0.28)	
1273G>A	欧洲	24	17(0.71)	5+2(0.29)	0.09	39(0.81)	9(0.19)	0.20
	美非	23	5(0.21)	15+3(0.79)*	0.01	25(0.54)	21(0.45)*	0.02
	日本	44	27(0.61)	13+4(0.39)	0.28	67(0.76)	21(0.24)	0.49
			AA	AG+GG		A	G	
	中国	100	45(0.45)	48+7(0.55)		138(0.69)	62(0.31)	
1804A>G	欧洲	60	41(0.68)	16+3(0.32)*	0.004	98(0.82)	22(0.18)*	0.01
	美非	28	25(0.89)	0+3(0.11)*	0	50(0.89)	6(0.11)*	0.002
	日本	45	28(0.62)	13+4(0.38)	0.06	69(0.77)	21(0.23)	0.18

注：* 基因型和等位基因频率差异有统计学意义

表 3　GZMB 位点间的连锁不平衡分析

D'	1804A>G	1815C>G	3151T>C	3186A>G
1273G>A	0.68	0.73	0.84	0.84
1804A>G	–	0.92	0.75	0.75
1815C>G	–	–	0.81	0.81
3151T>C	–	–	–	1.00

表 4 PRF1 和 GZMB 基因单倍型分析

基因	单倍型	单倍型频率
PRF1	C-C	0.25
	C-T	0.67
	T-T	0.08
GZMB	A-A-C-T-A	0.60
	A-A-G-T-A	0.04
	A-G-G-T-A	0.05
	G-G-G-C-G	0.19

DNA 序列多态性，在人群中的频率大于 1%，是人类可遗传变异中最常见的一种，占所有已知多态性的 90% 以上[6]。SNPs 按照其在基因组中的位置可以分为 3 类：存在于编码区的 SNPs、5' 和 3' 非编码区的 SNPs 及内含子和基因拼接区的 SNPs。由于遗传的选择压力，导致 SNPs 在单个基因及整个基因组中的分布是不均匀的，在非编码区的 SNPs 要多于编码区的 SNPs。存在于编码区及其紧邻上下游序列的 SNPs（也叫 cSNPs）可能改变基因的表达水平和表达产物，改变氨基酸残基的种类，从而使蛋白质的结构和功能发生变化，直接导致疾病的易感性。cSNPs 虽然比较少，但在遗传性疾病的研究中却具有重要意义，近年来其研究倍受关注[7]。因此本实验主要是对两个基因编码区的 SNPs 进行研究。

我们对 100 名中国重庆地区汉族人群的 PRF1 和 GZMB 基因多态性进行分析，通过直接测序在 PRF1 基因外显子 3 发现 3877C>T 和 3955C>T 多态性，在外显子 2 没有发现多态性。在 GZMB 基因的外显子 2 发现多态性 1273A>G，在外显子 3 发现多态性 1804A>G 及 1815C>G，在外显子 5 发现多态性 3151T>C 及 3186A>G。PRF1 基因的 3877C>T 多态性在中国、欧洲、美国非洲以及日本人中均以 CC 基因型为主，中国人与欧洲人基因型及等位基因频率有明显差异性（$P<0.05$），美国非洲及日本人中均未发现有 TT 基因型，与美国非洲及日本人比较，基因型和等位基因频率均无显著性差异（$P>0.05$）。PRF1 基因的 3955C>T 多态性在中国、欧洲、美国非洲以及日本人中均以 TT 基因型为主，这几个人种的 3955C>T 基因型和等位基因频率均无显著差异性（$P>0.05$）。GZMB 基因的 1273G>A 位点在中国、欧洲、日本以 GG 基因型为主，但是在美国非洲人中 GG 型所占比例则较少，与之相比，基因型和等位基因频率有统计学意义。GZMB 基因的 1804A>G 在中国、欧洲、美国非洲及日本人中的分布有较大的差异性，与欧洲人相比基因型和等位基因频率有明显差异性，在美国非洲人中只有 AA 和 GG 2 种基因型，且以 AA 基因型为主，中国人与其相比较，基因型和等位基因频率也有统计学意义。以上研究表明 PRF1 和 GZMB 基因多态性存在种族和地区的差异。3151T>C 多态性虽有文献报道[8]，但文献中无人群分布的详细信息，数据库中也无相应信息，1815C>G 及 3186A>G 为本研究首次发现，故这 3 个位点的多态性分布没有同其它人群进行比较。

本研究中我们发现重庆汉族地区人群 PRF1 基因 3877C>T 和 3955C>T 呈强烈的连锁不平衡，这两个多态性位点构建 C-C、C-T、T-T 3 种单倍型，GZMB 基因除 1273G>A 和 1804A>G 呈较强的连锁不平衡（D'=0.68），其余位点两两间均呈强烈的连锁不平衡（D'>0.7），而 3151T>C 和3186A>G 则为完全连锁不平衡（D'=1）。5 个多态性位点构建了 4 种主要的单倍型，即 A-A-C-T-A、A-A-G-T-A、A-G-G-T-A、G-G-G-C-G。

已有研究表明 PRF1 和 GZMB 基因协同作用在抗感染，肿瘤免疫，移植排斥及在自身免疫性疾病中有着重要作用[9]。本研究对重庆地区汉族人群 PRF1 和 GZMB 基因多态性进行研究，明确了重庆地区汉族人群基因多态性的分布特点，发现了 2 个可能为汉族人群所特有的新的多态性位点，对研究重庆地区汉族人群 PRF1 和 GZMB 基因多态性和疾病相关性有较大的价值，同时对多态性位点的连锁不平衡和构建的单倍型进行了分析，为下一步研究 PRF1 和 GZMB 基因多态性与疾病的相关性奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 李秀英，朱振宇.穿孔素和颗粒酶的研究进展[J].国外医学分子生物学分册，2004，24(5)：292-294.

[2] Cullen S P，Martin S J.Mechanisms of granule-dependent killing[J].Cell Death Differ，2008，15(2)：251-262.

[3] Stepp S E，Dufourcq-Lagelouse R，Le Deist F.Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis[J].Science，1999，286(5446)：1957-1959.

[4] Shi Y Y，He L. Shesi's，a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium，haplotype construction，and genetic association at polymorphism loci[J].Cell Res，2005，15(2)：97-98.

[5] Reich D E，Cargill M，Bolk S，et al.Linkage disequilibrium in the human genome[J].Nature，2001，411(6834)：199-204.

[6] Collins F S，Brooks L D，Chakravarti A，et al.A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation[J].Genome Res，1998，8(12)：1229.

[7] 席素雅，韩雅玲.单核苷酸多肽性的特点及其在医学中的应用[J].辽宁医学杂志，2007，21(1)：36-39.

[8] Ericson K G，Fadeel B，Andersson M，et al. Sequence analysis of the granulysin and granzyme B genes in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Hum Genet，2003，112(1)：98-99.

[9] Trapani J A，Smyth M J.Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway[J].Nat Rev Immunol，2002，2(10)：735-747.

（责任编辑：冉明会）