维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)03-0279-05

中国汉族人内皮细胞型一氧化氮合酶基因多态性研究

郭风劲,彭惠民,张 政,晏 宁

(重庆医科大学基础医学院生物教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨内皮细胞型一氧化氮合酶(eNOS)基因(CA)n二核苷酸重复序列基因多态性在中国汉族人群中的分布。方法:应用聚合酶链反应结合聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色,对291名中国汉族人的eNOS基因(CA)n多态性进行研究。结果:eNOS基因(CA)n存在23种等位基因和93种基因型,基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$)。PCR扩增片段长度范围为144bp~188bp,所含CA重复次数分别为19~41,分布频率介于0.34%~14.1%。该位点杂合度为0.85,多态信息量(PIC)为0.83。中国人群与高加索人群差异显著的11个等位基因分别为$(CA)_{22}$、$(CA)_{23}$、$(CA)_{26}$、$(CA)_{27}$、$(CA)_{28}$、$(CA)_{30}$、$(CA)_{31}$、$(CA)_{32}$、$(CA)_{33}$、$(CA)_{34}$、$(CA)_{35}$,χ^2检验P均<0.05。结论:该基因位点是1个含有高度遗传信息的DNA标志,其等位基因频率分布存在种族差异。

【关键词】内皮细胞型一氧化氮合酶;基因多态性;等位基因;基因型

【中国图书分类法分类号】Q987 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-09-29

Study on the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in Chinese han nationality

GUO Fengjin, et al

(*Department of Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the distribution of the (CA) n dinucleotide repeats polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene in Chinese han nationality. *Methods*: (CA) n repeats polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene from 291 Chinese healthy subjects were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) - denature polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) - silver stain. *Results*: Ninety - three genotypes and twenty - three different alleles were identified in 291 Chinese healthy subjects. The distribution of genotypes was in accordance with the Hardy - Weinberg equilibrium ($P>0.05$). The size of PCR fragments ranged from 144 to 188bp containing 19~41 CA repeats and the frequency of (CA)n ranged from 0.34% ~ 14.1%. The heterozygosity (H) and polymorphism information content (PIC) were 0.85 and 0.83 respectively. Significant differences were found in frequencies of eleven alleles including 22 - repeats, 23 - repeats, 26 - repeats, 27 - repeats, 28 - repeats, 30 - repeats, 31 - repeats, 32 - repeats, 33 - repeats, 34 - repeats and 35 - repeats between Chinese and Caucasians. *Conclusion*: This site is referred to as a genetic marker with high polymorphism information content. And the distribution of this genetic marker is different in different ethnic groups.

【Key words】Endothelial nitric oxide synthase; Gene polymorphism; Allele; Genotype

一氧化氮(nitric oxide,NO)作为生物体内一种结构简单、可在细胞间自由穿梭的多功能信号分子,在神经递质传递和血管舒张调节等生理过程中发挥着重要作用。NO由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)催化左旋精氨酸(L—Arg)和分子氧反应生成[1]。目前在哺乳动物体内已经发现三种不同细胞来源及表达活性的NOS同工酶,分别为诱导型NOS(inducible NOS,iNOS)、内皮细胞型NOS(endothelial NOS,eNOS)和神经原型NOS(neuronal NOS,nNOS)。三种NOS分别由不同染色体上的基因编码。人eNOS基因位于7q35-36,长约21kb,有26个外显子和25个内含子,相应的mRNA约4.1kb,翻译生成含1203个氨基酸的蛋白产物[2]。文献报道eNOS基因第13内含子存在一个(CA)n二核苷酸串联重复序列多态性位点,该位点已在高加索人群

作者介绍:郭风劲(1972-),女,讲师,博士生,主要研究方向:分子遗传学。

基金项目:重庆市教委资助项目(编号:1999,16-5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

中证实与冠心病相关[3];在日本人群中证实与原发性高血压相关[4]。最近研究表明 eNOS 基因(CA)n 可被看作一个不寻常的剪切增强子,eNOS 基因 mRNA 前体的剪切过程依赖于 13 内含子 CA 重复次数,不同的 CA 重复次数可通过调控 eNOS 基因 mRNA 前体的剪切过程来影响 eNOS 基因的表达[5,6]。目前在东方人群中有关 eNOS 基因 CA 串联重复多态性尚未见报道。本研究通过对 291 例中国汉族人基因组 DNA 进行 eNOS 基因 CA 二核苷酸重复序列多态性分析,旨在发现不同地区、不同种族间 eNOS 基因的遗传特点,从而为进一步研究该基因变异与疾病发生的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集

在四川省和重庆市随机选取汉族无亲缘关系个体 291 名,所有个体肘前静脉采血 2~3ml,EDTA 抗凝,EP 管分装,-20℃储存。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取 EDTA 抗凝全血 2ml,采用柱层析法提取 DNA,TE 溶解后置-20℃储存。

1.2.2 PCR 扩增 引物参照 Stangl 等设计,由上海 Sangon 公司合成。引物序列为:5'-TGAGGAGAGACTCAGAATTGGA-3'和 5'-GCTTGTGTGGGGTTTCAGGCT-3'[3]。PCR 反应体积 25μl,含有 10×PCR 缓冲液 2.5μl,0.2mmol/LdNTP 1.4μl,3mmol/L$MgCl_2$ 2.0μl,2U/μl Taq 聚合酶 0.1μl,50ng/μl 模板 DNA 1.0μl,上、下游引物(5pmol/μl)各 1.0μl。扩增条件为 95℃预变性 4min 后,94℃变性 30s,58℃退火 40s,72℃延伸 30s,共 35 个循环后,72℃延伸 7min 后冷却至 4℃。取产物 10μl,经 2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观察扩增结果。

1.2.3 扩增产物的检测 按丙烯酰胺:N,N'-甲叉双丙烯酰胺为 38:2 的比例配制 8%的变性凝胶,胶版中含 4mol/L 的尿素。取 1μlPCR 产物、1μl 上样缓冲液点样于相应的上样孔,低温(200V)电泳 2.5h 结束。用银染法染色并照相记录。以 pUC19DNA/MspI(HpaII)DNA 片段和本室自制的等位基因分型标准物(采用扩增产物混合-纯化-重扩增法)[7]作为标准对照,结合 Quality one 软件分析系统,确定样本的基因型,以微卫星位点的核心序列重复次数命名等位基因。

1.2.4 统计学处理 统计分析用 SAS 6.12 软件,eNOS(CA)n 基因型与等位基因频率采用直接基因计数法计算,研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度及组间的等位基因频率的比较采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 为有显著性差异。杂合度(H)和多态信息含量(PIC)分别按 Nei[8]和 Schur[9]方法计算。

2 结 果

2.1 PCR 产物电泳结果

图 1 为该多态性位点常见的几种基因型 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳银染图谱,人群中共检出 23 种等位基因,这 23 种等位基因所含 CA 重复次数分别为 19~41,扩增片段长度范围 144bp~188bp。频率分布介于 0.34%~14.1%,以长度为 166bp 的 $(CA)_{30}$等位基因最常见,188bp 的 $(CA)_{41}$等位基因分布频率最低。CA 重复次数与相应分子量关系可通过公式(CA)$n = 1/2$(fragment length - 106)计算[3]。该位点杂合度为 0.85,多态信息量为 0.83,是一个含有较高遗传信息的 DNA 标志。

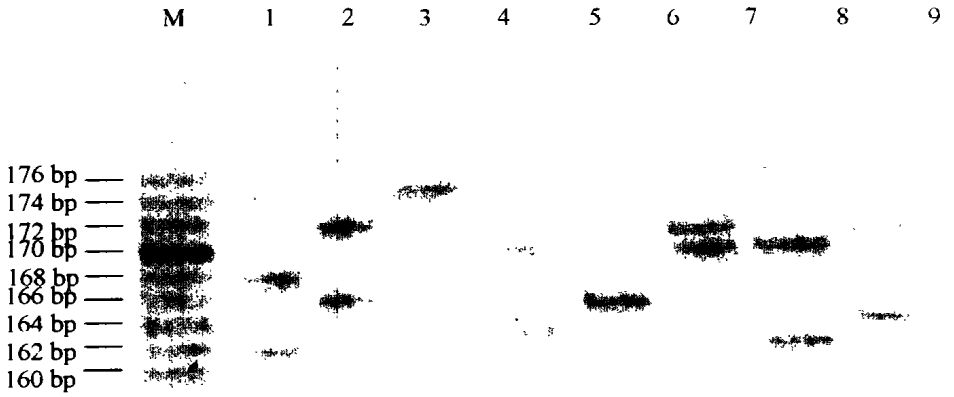


图 1 eNOS 基因(CA)n 重复序列 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色分型结果

M:分子量标准;1~9 分别为不同个体 DNA 经 PCR 扩增后行 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色结果,1~9 不同个体的基因型分别为 28/31、30/33、34/34、29/32、30/30、32/33、28/32、29/33、29/31

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 eNOS 基因(CA)n 微卫星位点等位基因及基因型频率分布($n=291$)

Allele	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	Number	
																								Allele	Genotype
19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
20		0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3
21			0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	4
22				0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	4
23					0	0	0	0	0	2	2	3	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	11	5
24						1	0	0	1	1	1	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	10	6
25							2	0	0	2	3	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	6
26								4	0	0	4	7	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	5
27									4	0	2	3	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	21	5
28										5	0	8	4	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	35	6
29											7	2	9	9	4	4	0	0	0	0	0	0	0	63	6
30												9	2	3	4	5	4	4	5	3	0	0	0	82	9
31													7	0	3	6	0	5	0	2	2	0	0	61	6
32														5	4	5	6	0	0	3	1	0	0	49	6
33															4	3	5	4	2	0	0	2	0	44	6
34																6	0	0	2	2	1	0	0	47	4
35																	5	0	0	2	2	2	1	32	5
36																		2	0	0	3	1	0	21	3
37																			2	0	0	0	1	14	2
38																				0	0	0	0	12	0
39																					0	0	0	9	0
40																						0	0	5	0
41																							0	2	0
Total																								582	93

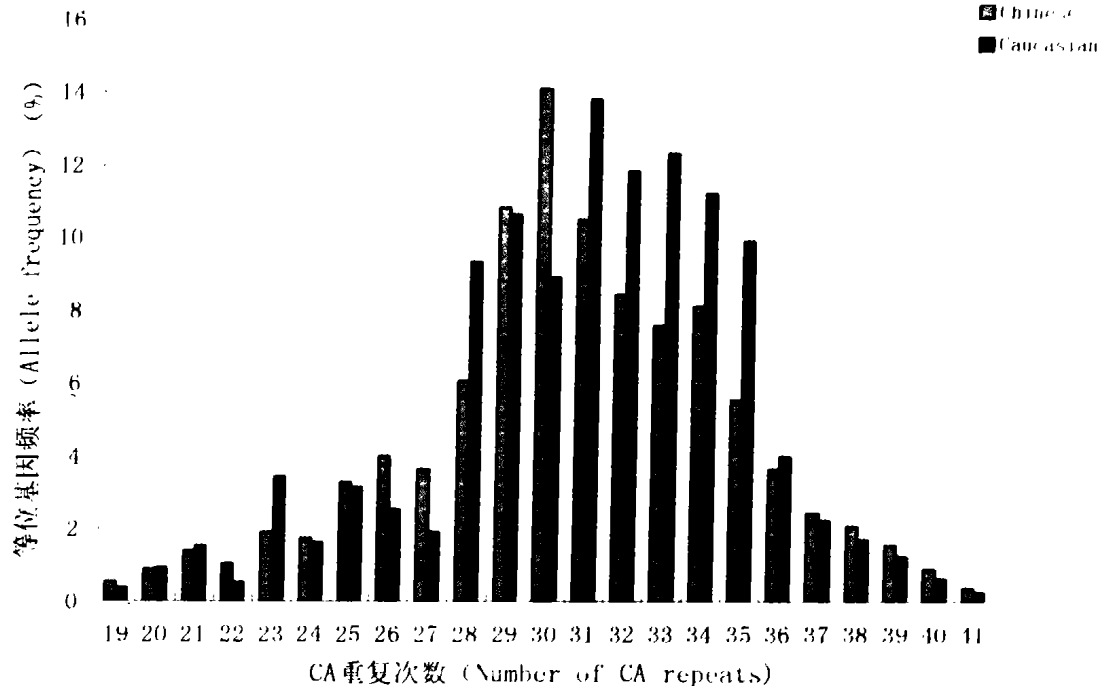


图 2 中国人群与高加索人群 eNOS 基因(CA)n 微卫星位点等位基因分布比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 中国汉族人群中等位基因及基因型的分布

eNOS基因(CA)n微卫星位点在中国人群中的分布情况见表1,23种等位基因在人群中的分布频率如下:$(CA)_{30}$ 14.1%、$(CA)_{29}$ 10.8%、$(CA)_{31}$ 10.5%、$(CA)_{32}$ 8.4%、$(CA)_{34}$ 8.1%、$(CA)_{33}$ 7.6%、$(CA)_{28}$ 6.0%、$(CA)_{35}$ 5.5%、$(CA)_{26}$ 3.95%、$(CA)_{27}$ 和 $(CA)_{36}$ 均为 3.6%、$(CA)_{25}$ 3.3%、$(CA)_{37}$ 2.4%、$(CA)_{38}$ 2.1%、$(CA)_{23}$ 1.9%、$(CA)_{24}$ 1.7%、$(CA)_{39}$ 1.5%、$(CA)_{21}$ 1.4%、$(CA)_{22}$ 1.0%、$(CA)_{20}$ 和 $(CA)_{40}$ 均为 0.8%、$(CA)_{19}$ 0.52%、$(CA)_{41}$ 0.34%。人群中共检出93种基因型,经检验基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡($\chi^2=98.75$, $P>0.05$)。

2.3 中国人群与高加索人群等位基因分布比较

图2显示了eNOS基因(CA)n各等位基因在中国人群和高加索人群[3]中的分布情况,二者相比基因分布在总体上基本一致,但某些等位基因频率有一定差异,统计学检验和比较表明中国人群与高加索人群差异显著的11个等位基因频率分别为$(CA)_{22}$(1.03% vs. 0.5%)、$(CA)_{23}$(1.9% vs. 3.4%)、$(CA)_{26}$(3.95% vs. 2.5%)、$(CA)_{27}$(3.6% vs. 1.9%)、$(CA)_{28}$(6.0% vs. 9.3%)、$(CA)_{30}$(14.1% vs. 8.9%)、$(CA)_{31}$(10.5% vs. 13.8%)、$(CA)_{32}$(8.4% vs. 11.8%)、$(CA)_{33}$(7.6% vs. 12.3%)、$(CA)_{34}$(8.1% vs. 11.2%)、$(CA)_{35}$(5.5% vs. 9.9%),χ^2 检验 P 均<0.05。在高加索人群中分布频率最高的等位基因是$(CA)_{31}$(13.8%),其次是$(CA)_{33}$(12.3%)、$(CA)_{32}$(11.8%)、$(CA)_{34}$(11.2%)、$(CA)_{29}$(10.2%)、$(CA)_{35}$(9.9%)、$(CA)_{28}$(9.3%),而中国人群中分布频率最高的等位基因是$(CA)_{30}$(14.1%),其次是$(CA)_{29}$、$(CA)_{31}$、$(CA)_{32}$、$(CA)_{34}$、$(CA)_{33}$、$(CA)_{28}$、$(CA)_{35}$等。

3 讨 论

Hardy和Weinberg在上世纪初证明,一个群体如果满足四个条件,即群体无限大、随机交(婚)配、没有突变、没有自然选择,则群体的基因型频率从一代到另一代保持不变,即实现遗传平衡。这一理论,奠定了现代群体遗传学的基础,被尊称为Hardy—Weinberg定律。以上条件中,突变和自然选择作用的方向相反,通常相互抵消。而一个群体是否足够大,是否随机婚配,则需要进行遗传平衡检验。我们研究的样本符合Hardy—Weinberg遗传平衡,则表明样本群体足够大,随机婚配,选样具有代表性。

遗传标记是一类能够区分不同的个体和群体,同时又能稳定遗传的物质。它是遗传分析的基础。遗传标记的多态性程度及其应用价值一般可用杂合度(H)、多态信息含量(PIC)等指标来衡量,其中H能客观反映群体的遗传变异水平。复等位基因越多,群体中杂合体越多,杂合度越高,群体中任意二人相同的概率越小,越有利于基因的连锁分析。PIC反映一个遗传标记所包含或所能提供的遗传信息容量,即可以利用某一多态性位点作为遗传标记进行基因连锁分析的概率。本研究中eNOS基因(CA)n二核苷酸重复序列基因多态性位点共检测出23种等位基因和93种基因型,其中H与PIC分别为0.85和0.83,说明该位点是一个含有较高遗传信息的DNA标记,而且实验结果可靠,具有较高应用价值,可用于人类群体遗传学等研究。

本研究检测出的等位基因和基因型的数量和频率分布,与国外报道的高加索人群相比,基因分布总体上基本一致,但有11种等位基因频率差异显著,分别为:$(CA)_{22}$、$(CA)_{23}$、$(CA)_{26}$、$(CA)_{27}$、$(CA)_{28}$、$(CA)_{30}$、$(CA)_{31}$、$(CA)_{32}$、$(CA)_{33}$、$(CA)_{34}$、$(CA)_{35}$(P均<0.05)。另外,中国人群中没有发现$(CA)_{17}$、$(CA)_{18}$、$(CA)_{42}$、$(CA)_{43}$、$(CA)_{44}$等5种等位基因。从基因型的分布看,中国汉族人群以$(CA)_{30}$ $(CA)_{30}$、$(CA)_{28}$ $(CA)_{30}$、$(CA)_{29}$ $(CA)_{31}$、$(CA)_{29}$ $(CA)_{32}$等基因型分布频率较高,而高加索人群以$(CA)_{31}(CA)_{32}$、$(CA)_{32}(CA)_{33}$、$(CA)_{31}(CA)_{35}$等基因型更为多见。这些差别可能与种族差异有关,因此,了解不同民族、不同地区人群中eNOS基因的多态性位点的遗传特点,是研究该基因变异与疾病发生关系的基础与前提。

eNOS基因的多态性应用于疾病的研究,近年来有所报道。Stangl[3]等人研究了冠状动脉造影明确的冠心病患者和正常对照,发现高加索人群中eNOS基因第13内含子CA重复序列较多(≥$(CA)_{34}$)时,冠心病危险性增加,认为该多态性是冠心病的独立危险因素之一。Nakayama T[4]等在研究日本人群eNOS基因第13内含子(CA)n与原发性高血压的相关性时发现$(CA)_{33}$与不伴随左心室肥大的原发性高血压相关,并进一步提出$(CA)_{33}$可看作日本人群原发性高血压的遗传标志。Li C[10]等在中国人群中发现eNOS基因第7外显子894G-T突变和第4内含子27bp串联重复序列与糖尿病肾病相关,携带第7外显子T等位基因和第4内含子a等位基因时,糖尿病肾病患病率显著高于其它等位基因;黄惠彬[11]等发现eNOS基因27bpVNTR

维普资讯 http://www.cqvip.com

多态性与中国汉族人原发性高血压(essential hypertension)及 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus)发生有关。由于基因及基因型的分布具有种族差异性,在中国正常人群中获得 eNOS 基因各多态性位点的统计资料,对于进一步研究多态性基因座与各类疾病的相关性将有重要应用价值。

参 考 文 献

[1] Moncada S, Higgs A. The L - arginine - nitric oxide pathway[J]. N. Engl. J. Med, 1993; 329: 2002 - 2012.

[2] Nadaud S, Bonnardeaux, Lathrop M, et al. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994; 198: 1027 - 1033.

[3] Stangl K, Cascorbi I, Laule M, et al. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease[J]. Pharmacogenetics, 2000; 10: 133 - 140.

[4] Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, et al. Association analysis of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese[J]. Clin Genet, 1997; 51(1): 26 - 30.

[5] Hui J, Reither G, Bindereif A. Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability[J]. RNA, 2003; 9(8): 931 - 936.

[6] Hui J, Stangl K, Lane WS, et al. HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable - length CA repeats[J]. Nat Struct Biol, 2003; 10(1): 33 - 37.

[7] Sun HY, Guo JY. Study on the preparation of locus specific allelic ladder[J]. China J Forensic Med, 2000; 15(Supply): 33 - 34.

[8] Nei M. Molecular evolutionary genetics[J]. New York: Columbia Univ. Press, 1987; 177 - 179.

[9] Schur PH, Marcus - Bagley D, Awdeh Z, et al. The effect of ethnicity on major histocompatibility complex complement allotypes and extended haplotypes in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1990; 33: 985 - 992.

[10] Li C, Dong Y, Lu W. The association between polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and diabetic nephropathy[J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 2001, 40(11): 729 - 732.

[11] 黄惠彬,林丽香,陈鸣钦. 内皮型一氧化氮合酶基因多态性与原发性高血压、2 型糖尿病的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18: 16 - 19.

一起误服灭鼠药中毒事件的调查报告

苏 瑛, 冯 垚, 侯 剑, 刘建民

(重庆市渝中区卫生局卫生监督所,重庆 400010)

2003 年 12 月 17 日晚 9:30h 重庆市渝中区卫生局卫生监督所接到市卫生监督所转市长公开电话通知(误服鼠药的 9 名学前班家长电话投诉到市长公开电话),渝中区某小学学前班数名学生误服灭鼠药在某医院门诊救治,我所立即前往医院和学校进行调查,现将情况报告如下。

17 日上午 9 时街道社区杀虫灭鼠站在该校投放某全国灭鼠药物基地生产的 0.0375% 灭鼠醚毒饵,投放点 3 个,分别投放毒饵 50g。14 时左右该校教师发现有学生在玩灭鼠药,经追问 1 名学生在 16 时左右承认将毒饵当做巧克力服食,并和另一同学一起分给了其他 7 位同学同时服食,学校于当日 16 时 30 分至 18 日 5 时对所有服食过灭鼠药毒饵的 9 名学生全部找到并送往同一医院救治。当时,9 名学生均无明显症状及体征。

1 临床资料

该次鼠药中毒事件共累及 9 名学前班学生,其中男生 8 名,女生 1 名,年龄 5 至 6 岁,自称服食数量 1 至 10 颗不等,其中女生自称尝了 1 颗,因口感麻木当即吐出。医院接诊后立即对声称服食过 10 颗毒饵的学生进行洗胃治疗,并对全部学生给予 VK_1 进行解毒治疗,其后症状逐渐缓解。服食较少的女生恢复较好,症状较轻,复查凝血功能正常,于次日出院。

另 8 名男生留院治疗,误服后约 10h 调查,一般情况良好,无特别的症状和体征,1 人于第 2 天出现窦性心动过缓和窦性心律不齐,2 至 5 天后 8 人开始不同程度出现皮肤瘀斑。经过进一步的 VK_1 解毒治疗和对症治疗,分别于 20 至 42 天后全部检验指标正常出院。

2 实验室检查

住院期间 8 名学生的血常规、血小板计数指标均正常。1 人第 2 天粪便隐血弱阳性,第 3 天转阴。8 名学生均出现

(下转第 321 页)