维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)05-0591-03

中国西南地区汉族人群 NOS2 基因(CCTTT)n 微卫星多态性研究

张 政,彭惠民,郭凤劲,晏 宁

(重庆医科大学基础医学院生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 NOS2 基因(CCTTT)n 微卫星多态性在中国西南地区汉族人群中的分布,并比较不同种族及同一种族但不同地域人群基因频率的差异。方法:柱层析法提取血细胞基因组 DNA,应用 PCR、PAGE 及银染和 DNA 测序技术,对 205 例中国西南地区汉族人进行了 NOS2 基因多态性分析。结果:(1)共检出 9 种等位基因和 30 种基因型。(2)$(CCTTT)_9$、$(CCTTT)_{10}$、$(CCTTT)_{12}$、$(CCTTT)_{13}$等位基因频率在中国西南地区与华北地区汉族人群间差异有显著性。(3)$(CCTTT)_9$、$(CCTTT)_{10}$、$(CCTTT)_{11}$、$(CCTTT)_{15}$、$(CCTTT)_{16}$等位基因频率在中国西南地区汉族人群与英国高加索人群间差异有显著性。结论:NOS2 基因(CCTTT)n 微卫星多态性在不同种族间存在差异,在同一种族不同地区也存在着差异,进一步为研究 NOS2 基因多态性与疾病的关系提供了基础资料。

【关键词】一氧化氮合酶;基因多态性;聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】Q347 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-02-27

The (CCTTT)n microsatellite polymorphism of NOS2 gene in Han nationality in the southwest of China

ZHANG Zheng, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate genotypes and alleles' distributions of inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene (CCTTT)n polymorphism in Han nationality in the southwest of China, and make comparisons with different race or the same race in different areas. *Methods*: The (CCTTT)n polymorphisms of NOS2 gene were analyzed in a total of 205 southwestern Chinese healthy subjects by polymerase chain reaction (PCR) - 8% denature polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) - silver staining and DNA sequencing. *Results*: (1)Nine alleles and thirty genotypes were identified. (2)$(CCTTT)_9$, $(CCTTT)_{10}$, $(CCTTT)_{12}$, $(CCTTT)_{13}$ alleles frequencies of NOS2 gene in Chinese Han population in southwestern area differed significantly from those in northern area. (3)$(CCTTT)_9$, $(CCTTT)_{10}$, $(CCTTT)_{11}$, $(CCTTT)_{15}$, $(CCTTT)_{16}$ alleles frequencies of NOS2 gene in Han population of the southwest of China differed significantly from those of Caucasians in England. *Conclusion*: The (CCTTT)n microsatellite polymorphisms of NOS2 gene are different not only among different ethnic populations but also within the same population of different areas, which may be of significance in the studies on relationship between genetics and disease.

【Key words】Nitric oxide synthase; Genetic polymorphism; PCR

一氧化氮(NO)作为一种可在细胞间自由扩展的信使分子,在神经递质传递和血管舒张调节等生理与病理过程中起重要作用[1]。NO 系通过一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸反应生成。目前发现三种人 NOS 基因:NOS1、NOS2 和 NOS3 基因,其中 NOS2 基因在细胞因子、内毒素等诱导下可产生大量 NO,参与疾病的病理生理过程。最新研究表明 NOS2 基因转录启动区域的(CCTTT)n 微卫星多态性与糖尿病、遗传性过敏症、痴呆等有关,但该微卫星多态性人群中的分布报道较少。因此本研究着重探讨 NOS2 基因(CCTTT)n 微卫星多态性在中国西南地区汉族人群中的分布,并比较不同种族及同一种族但不同地域人群基因频率的差异,为在不同人群中进行相关疾病的 NOS2 基因研究奠定基础。

作者介绍:张 政(1976-),女,助教,
主要研究方向:多基因遗传病分子遗传学研究。

基金项目:渝教科(1999),16 号-50。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 研究对象

205 名西南地区汉族体检健康个体，无心、脑、肝、肾及内分泌代谢疾病，其中男 110 人，女 95 人，年龄(38±14)岁。

1.2 DNA 制备

取 EDTA 抗凝血 1ml，采用小量血液基因组 DNA 提取试剂盒(上海华舜公司)，柱层析法提取血细胞基因组 DNA，TE 溶解后置 -20℃保存。

1.3 PCR 扩增反应

引物序列参照 Xu W[2] 等设计，由上海 Sangon 生物工程公司合成。引物序列为：5' - ACCCCTGGAAGCCTACAACTGCAT - 3' 和 5' - GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA - 3'。特异性扩增 NOS2 基因 5'启动子区域(CCTTT)n 五核苷酸串联重复序列，产物片段范围为 181 - 221bp。30μl 扩增体系包括基因组 DNA50 - 200ng，1×PCR 缓冲液，$MgCl_2$ 1.5mmol/L，dNTP200μmol/L，Taq 酶 1.5U，引物各 0.2μmol/L。PCR 循环参数：95℃ 预变性 5min，按 94℃变性 1min，62℃复性 1min，72℃延伸 1min，循环 30 次，最后一个循环结束后于 72℃再延伸 10min。取产物 10μl，进行 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。

1.4 PCR 产物检测和等位基因的确定

PCR 产物行 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染，以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[3])作为标准对照，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。

1.5 DNA 测序

纯合子的 PCR 产物经纯化后行 DNA 全自动测序，以进一步证实个体基因型。

1.6 统计学处理

采用 SAS8.4 软件包作统计分析。NOS2 基因(CCTTT)n 基因型与等位基因频率用基因记数法计算；按文献[4]方法对群体数据作 Hardy - Weinberg 平衡吻合度检验；按文献[5]方法计算杂合度(heterozygosity，H)、多态信息含量(polymorphism information content，PIC)；组间基因型与等位基因频率比较用 Kruskal - Wallis 秩和检验及多个样本间两两比较的 q 检验。检验标准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 共检出 9 种等位基因和 30 种基因型(图 1～4)

等位基因分别(CCTTT)$_9$～(CCTTT)$_{17}$，基因型分别为 9/10、9/12、9/13、9/15、10/10、10/11、10/12、10/13、10/14、10/15、10/16、11/11、11/12、11/13、11/14、11/15、11/16、12/12、12/13、12/14、12/15、12/16、12/17、13/13、13/14、13/15、13/17、14/14、14/15 和 16/16。(CCTTT)n 基因型频率分布符合 Hardy - Weinberg 平衡($\chi^2=37.52$，$P>0.1$)，实际检出基因型频数与预期基因型频数基本一致，具有群体代表性，且 H=0.81、PIC=0.78。

2.2 基因型频率分布

中国西南地区人群 NOS2 基因 11/12 基因型出现频率最高，11/11、11/13、12/14、13/13、12/13 基因型次之。

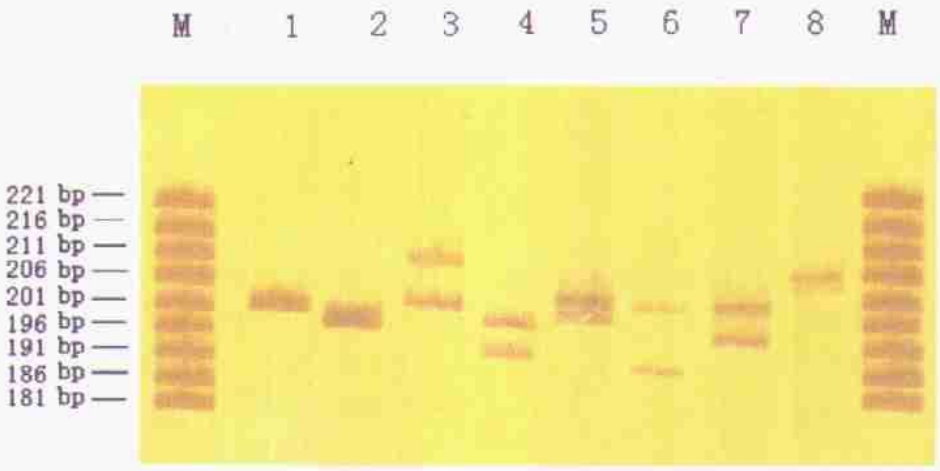


图 1 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色分型结果

M：为分子量标准；1～8 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，分别为 13/13、12/12、13/15、11/12、13/13、10/13、11/13 和 14/14 基因型

维普资讯 http://www.cqvip.com

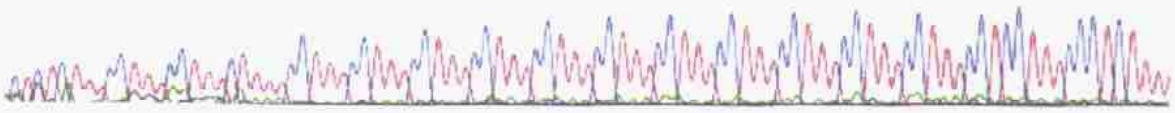


图 2 11/11 基因型测序图

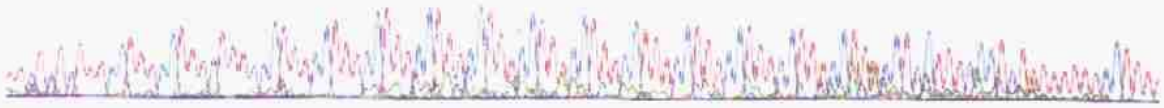


图 3 12/12 基因型测序图

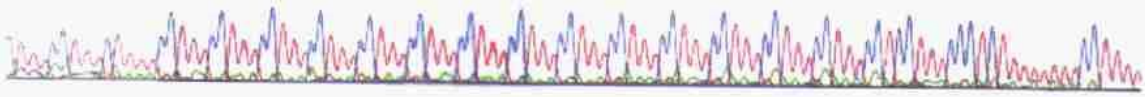


图 4 14/14 基因型测序图

2.3 等位基因频率分布

表 1 可见，中国西南地区人群中 NOS2 基因 $(CCTTT)_{12}$ 出现频率最高，$(CCTTT)_{13}$、$(CCTTT)_{10}$、$(CCTTT)_{11}$、$(CCTTT)_{14}$ 次之，$(CCTTT)_{15}$、$(CCTTT)_{16}$、$(CCTTT)_{17}$ 和 $(CCTTT)_9$ 出现频率较低，其中 $(CCTTT)_9$ 出现频率最低。

表 1 NOS2 基因(CCTTT)n 微卫星位点等位基因频率分布

等位基因	频率		
	中国西南地区人群	中国华北地区人群	英国人群
$(CCTTT)_8$	—	0.0017(1)	0.0025(1)
$(CCTTT)_9$	0.0098(4)	0.0759(46)**	0.0328(13)*△
$(CCTTT)_{10}$	0.1902(78)	0.2558(155)*	0.1136(45)**△△
$(CCTTT)_{11}$	0.1366(56)	0.1386(84)	0.2374(94)*,△△
$(CCTTT)_{12}$	0.2585(106)	0.1865(113)**	0.3131(124)△△
$(CCTTT)_{13}$	0.1976(81)	0.1122(68)**	0.1743(69)
$(CCTTT)_{14}$	0.0878(36)	0.0890(49)	0.0985(39)
$(CCTTT)_{15}$	0.0683(28)	0.0512(31)	0.0227(9)**△
$(CCTTT)_{16}$	0.0366(15)	0.0611(37)	0.0051(2)**△△
$(CCTTT)_{17}$	0.0146(6)	0.0198(12)	—
$(CCTTT)_{18}$	—	0.0149(9)	—
$(CCTTT)_{19}$	—	0.0017(1)	—
合计	1.0000(410)	1.0000(606)	1.0000(396)

注：与西南地区人群比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与华北地区人群比较，△ $P<0.05$，△△ $P<0.01$

3 讨 论

人 NOS2 基因位于第 17 号染色体长臂(17cen-q12)，全长约 37kb，含 26 个外显子，具启动子区域含有多个转录因子结合位点，是细胞因子诱导启动子活性所必需的。该基因的变异主要发生在启动子区域。Xu 等学者发现 NOS2 基因启动子区域上游 2.5kb 的 S_1 敏感区域内存在一个(CCTTT)n 微卫星位点[2]。微卫星 DNA(microsatellite DNA)是一种可遗传的具有高度多态性的短核苷酸重复序列，广泛存在于人类基因组，以 1～6 个碱基为重复单位。目前，这种多态性标志已广泛用于构建人类遗传连锁图谱、基因定位、遗传病诊断、肿瘤细胞染色体分离与重组以及亲子鉴定等法医学检查[6]。

本研究采用聚合酶链反应、聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色以及 DNA 测序等技术，检测了中国西南地区健康汉族人 205 名，检出 NOS2 基因 5' 端(CCTTT)n 微卫星存在 9 个等位基因，经等位基因频率、基因型频率计算及 χ^2 检验，确认该基因在中国汉族人群中的遗传方式符合 Hardy－Weinberg 平衡，且 H 和 PIC 分别为 0.81 和 0.78，因此 NOS2 基因(CCTTT)n 微卫星可被看作是一个含有高度遗传信息的 DNA 标志。

结果显示，中国西南地区人群 NOS2 基因 11/12 基因型出现频率最高，11/11、11/13、12/14、13/13、12/13 基因型次之，但中国华北地(下转第 611 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

49.

[4] Hahn D, Simak R, SteinerGE, et al. Expression of the VEGF - receptor Flt - 1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues[J]. J Urol, 2000; 164(2): 506 - 510.

[5] Doll JA, Reiher FK, Crawford SE, et al. Thrombospondin - 1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor - 2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate[J]. Prostate, 2001; 49(4): 293 - 305.

[6] Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, et al. Exprression of vascular endothelial growth factor receptor in human prostate cancer[J]. J Urol, 1999; 54: 567 - 572.

[7] Deering ME, Bigler SA, Brown M, et al. Microvascularity in benign prostatic hyperplasia[J]. Prostate, 1995; 26: 111 - 115.

[8] Weingartner K, Ben Sasson SA, Stewart R, et al. Endothelial cell proliferstion activity in BPH and prostate cancer, an in vitro model for assessment[J]. J Urol, 1998; 159: 465 - 470.

[9] Barleon B, Sieister G, Martiny - Baron G, et al. Vascular endothelial growth factor up - regulates its receptor fims - like tyrosine linase(Flt - 1) and a soluble variant of Flt - 1 in human vascular endothelial cells[J]. Cancer Res, 1997; 57(23): 5421 - 5425.

(上接第 593 页)区人群[7] 10/10 和 10/12 基因型出现频率最高，10/11、10/13、11/13、12/12、12/13 次之，其中 10/10、10/16、11/11、11/12、12/14 和 13/13 基因型在西南地区和华北地区汉族之间差异有显著性，提示不同地域的中国汉族人群 NOS2 基因型存在一定差异，进一步的研究尚需扩大样本进行探讨。

与中国华北地区人群[7]和英国人群[8]比较，中国西南地区人群 $(CCTTT)_{11}$、$(CCTTT)_{15}$ 和 $(CCTTT)_{16}$等位基因频率与华北人群差异不显著，而与英国人群差异有显著性；$(CCTTT)_{9}$、$(CCTTT)_{10}$等位基因频率与华北人群和英国人群差异均有显著性；$(CCTTT)_{12}$、$(CCTTT)_{13}$等位基因频率与英国人群差异不显著，而与华北人群差异有显著性；$(CCTTT)_{14}$等位基因频率与华北人群和英国人群差异均无显著性。以上均提示，NOS2 基因 (CCTTT)n 微卫星多态性在不同种族间存在差异，且在同一种族不同地区也存在着差异，因此，对该多态性与相关疾病的研究，应该在不同种族、不同地区中分别进行。不同微卫星多态性是否均存在此种地域差异，需要进一步的研究。

本研究发现了 NOS2 基因 9 个等位基因，未发现华北地区人群和英国人群均出现的 8 等位基因及华北地区人群中出现的 18、19 等位基因，可能与地域差异有关，但也可能是样本不足所致，因此有待于增加样本进行研究。

参 考 文 献

[1] Rudic RD, Sheseley EG, Maeda N, et al. Direct evidence for the importance of endothelium - derived nitric oxide in vascular remodeling[J]. J. Clin. Invest, 1998; 101: 731 - 736.

[2] Xu W, Liu L, Emson PC, et al. Evolution of a homopurine - homopyrimidine pentanucleotide repeat sequence upstream of the human inducible nitric oxide synthase gene[J]. Gene, 1997; 204: 165 - 170.

[3] 孙宏玉，郭景元. STR 基因等位基因阶梯制备方法尝试[J]. 中国法医学杂志，2000; 15(s): 33 - 34.

[4] Hou Y, Prinz M, Staak M. Comparison of different tests for deviation from Hardy - Weinberg equilibrium of AMFLP population data[M]. In: Bar W, Fiori A, Rossi U. eds. Advances in forensic haemogenetics 5. Berlin, Heideberg, New York: Springer - Verlag, 1994; 511 - 514.

[5] Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups[J]. Genomics, 1992; 12: 141 - 153.

[6] Jin L, Chakraborty R. Population dynamics of DNA fingerprint patterns within and between populations[J]. Genet Res, 1994; 63(1): 1 - 9.

[7] 吕 星，路 萍，刑瑞云，等. 中国人诱导型一氧化氮合酶基因 STR 多态性研究[J]. 遗传学报，2002; 29: 290 - 293.

[8] Warpeha KM, Xu W, Lin L, et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT) n repeat of NOS2A in diabetic retinopathy[J]. FASEB J, 1999; 13: 1825 - 1832.