维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0034-05

汉族人群 NOS2 C-1173T、G-954C 单核苷酸多态性及其等位基因频率与组合分布特征研究

马厚勋[1], 谢正祥[2], 牛永红[2], 李章勇[2]

(1.重庆医科大学临床学院老年病科,重庆 400016;2.重庆医科大学基础学院生物医学工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:分析中国汉族人群诱导型一氧化氮合酶(NOS2)基因启动子区 C-1173T、G-954C 单核苷酸多态性及其等位基因频率与组合分布特征。方法:获取选择自然人群个体 565 人(男 314 例,女 251 例)血白细胞基因组 DNA,利用嵌套式等位基因特异性引物 PCR 技术检测 NOS2 C-1173T、NOS2 G-954C SNP。结果:NOS2 C-1173T SNP 基因型分布 CC、CT、TT 分别为 66.73%、26.37%、6.90%,C、T 等位基因频率分别为 79.88%、20.12%。NOS2 G-954C SNP 基因型分布 GG、GC、CC 分别为 61.77%、37.88%、0.35%,G、C 等位基因频率分别为 80.71%、19.29%。研究发现了 NOS2 基因在 2 位点的 SNP 前 5 种组合基因型分布:NOS2 C-1173C+G-954G 233 例(41.24%),NOS2 C-1173C+G-954C 143 例(25.31%),NOS2 C-1173T+G-954G 89 例(15.75%),NOS2 C-1173T+G-954C 59 例(10.44%),NOS2 T-1173T+G-954G 27 例(4.78%)。结论:本研究揭示了中国汉族人群 NOS2 基因的 2 位点的 SNP 基因型及其组合分布特征,为研究该基因 SNP 与其生理功能和疾病的关系提供实验基础。

【关键词】诱导型一氧化氮合酶;单核苷酸多态性(SNP);组合分布;单倍体型;嵌套式等位基因特异性引物 PCR 技术

【中国图书分类法分类号】R349.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-09-02

Genetype combination distribution and allele frequency distribution of single nucleotide polymorphisms of NOS2 C-1173T and G-954C in the Han Chinese population

MA Houxun, et al

(*Department of Geriatrics, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study genetype combination distribution and allele frequency distribution of NOS2 C-1173T and G-954C single nucleotide polymorphisms (SNP) of inducible nitric oxide synthase(NOS2) in the Chinese Han nationality population. *Methods*: Genomic DNA of leukocytes in venous blood was obtained from 565 Han Chinese people(female 251 and male 314). The NOS2 G-954C and NOS2 C-1173T SNPs were genotyped by nested allele-specific primer (NASP)PCR. *Results*: The genotype frequencies of CC, CT and TT were 66.73%, 26.37% and 6.90% respectively in the NOS2 C-1173T SNP. C and T allele haplotype frequencies of NOS2 C-1173T SNP was 79.88% and 20.12% respectively. The genotype frequencies of NOS2 GG, GC and CC were 61.77%, 37.88% and 0.35% respectively in the NOS2 G-954C SNP. G and C allele haplotype frequencies was 80.71% and 19.29% respectively in the NOS2 G-954C SNP. The preceding 5 combinations in the natural combination distribution of two sites of NOS2 SNP were found as follows: (1)The genotype combination of 233 subjects was NOS2 C-1173C+G-954G, its probability being 41.24%. (2)The genotype combination of 143 subjects was NOS2 C-1173C+G-954C, its probability being 25.31%. (3)The genotype combination of 89 subjects was NOS2 C-1173T+G-954G, the probability being 15.75%. (4)The genotype combination of 59 subjects was NOS2 C-1173T+G-954C, the probability being 10.44%. (5)The genotype combination of 27 subjects was NOS2 T-1173T+G-954G, the probability being 4.78%. *Conclusion*: This study shows the features of combination distribution and frequency distribuion of NOS2 SNPs and provides the basic laboratory data for the further study relationships among NOS2 SNPs, its physiological function and diseases.

【Key words】Inducible nitric oxide synthase; Single nucleotide polymorphisms(SNP); Combination distribution; Haplotype; Nested allele-specific primer(NASP)PCR technique

作者介绍:马厚勋(1966-),男,副主任医师,博士生,主要研究方向:老年心血管疾病基础与临床研究.

目前关于基因多态性与整体生理和疾病表现型的联系的研究,多数仅局限于单个基因,甚至是单个

维普资讯 http://www.cqvip.com

位点的多态性[1]。诱导性一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS, NOS2)作为 NO 生物合成的关键酶(限速酶)的同功酶之一,其活性的高低必然影响 NO 的合成及其生物学功能。已有研究发现位于第 17 号染色体上的 NOS2A 基因可能在人类高血压发病中起着重要作用[2];还有研究发现在 NOS2(iNOS)启动区上游 0.7kb 处的 AAAT/AAAAT 重复序列多态性与冠心病人的胰岛素抵抗及其心绞痛严重程度有关[3]。鉴于上述现况,本文就中国汉族人群的 NOS2 基因启动子区的 C-1173T、G-954C 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNP)等位基因频率及其组合分布特征进行研究,以揭示其分布规律性特征,为人类疾病发生的基因分子生物学基础研究提供依据。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

随机选择自然人群个体 565 人作为研究对象,男 314 例,女 251 例,男女之比为 1.25:1。年龄范围在 23~89 岁,平均年龄 62±3.5 岁。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取

EDTA 抗凝外周静脉全血 1ml,用试剂盒法(上海华舜生物工程有限公司)抽提白细胞染色体 DNA。

1.2.2 NOS3 基因 SNP 检测

1.2.2.1 引物序列选取及设计

根据研究需要通过美国 NCBI(美国国家生物信息中心)的 genBank 获取 NOS2 基因序列及其相应位点的 SNP 信息(NOS2)基因序列来自 genBank NO. AF017634. Homo sapiens indu...[gi:3421050])。利用 Primer 5.0 软件设计符合研究需要的引物。本研究所设计引物序列情况及其参数等,见表 1。在实际工作中,结合本研究的实验室条件进行优选,获得了符合实际条件的运行温度(melting temperature in operation, Tmo)。所用引物均由中国大连宝生生物技术有限公司合成。

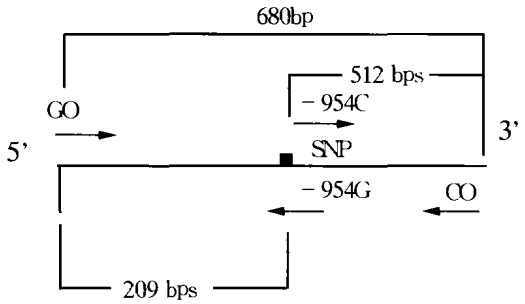
1.2.2.2 利用套式等位基因特异性引物(nested allele-specific primer)(NASP-PCR)PCR 技术[4]检测 NOS2 G-954C SNP 与 NOS2 C-1173 T SNP。

本文以 NOS2 G-954C SNP 为例说明 NASP-PCR 技术原理。诱导性一氧化氮合酶(NOS2)基因启动区 G-954C SNP 等位基因特异引物(上游引物匹配反义链,下游引物匹配正义链)设计,如下图所示:

等位基因特异上游引物(突变型)NOS2-954C:5'-GCT TCA GAG TTC GAG ACC A<u>C</u>-3'

等位基因特异下游引物(突变型)NOS2-954G:5'-GTT TCA CCT TGT TGT CCT TG<u>C</u>-3'

有背景及下划线的字母表示等位基因特异性引物(3'端)设计的 SNP 位点。



等位基因特异性引物 PCR 技术分析 NOS2 G-954C SNP 原理图

限制片段长度锚定(嵌套式)引物

嵌套式上游引物 C_0:5'-CTC AAC TTC TCC CTA ATG TAG TTG-3'

嵌套式下游引物 C_0:5'-TGC CCA GGT TCC AGA AGG CCA G-3'

1.2.2.3 PCR 反应体系及条件

本文 NOS2 基因 2 个位点扩增的目标片段的 GC 比均在 60%以下,检测 NOS2 G-954C、NOS2 C-1173 T SNP 的 PCR 反应体系中所用 Hot start Taq 酶由中国天为时代(Times)生物有限公司提供。运用 SPRT001 型扩增仪(美国 Thermo Hybaid 公司)进行 PCR 扩增分析。PCR 反应变性温主芭及其产物长度如表 2 所示,PCR 反应具体条件如表 3 所示。PCR 反应体系组成如表 3 所示,全部试剂(包括缓冲体系、$MgCl_2$、dNIP)皆由中国天为时代生物有限公司提供。

表 1 引物及其退火参数

genotype	primer	LP(bps)	GC(bp)	AT(bp)	Tat(℃)	Ta(℃)	Tao(℃)	Da(S)
NOS2-G954C	NOS2 C_0:CTC AAC TTC TCC CTA ATG TAG TTG	24	10	14	68	63	60	60
	NOS2 G_0:TGC CCA GGT TCC AGA AGG CCA G	21	14	7	70	65		
	NOS2-954G:GCTTCAGAGTTCGAG ACCAG	20	11	9	62	57		
	NOS2-954C:GTT TCA CCT TGT TGT CT TGG	21	10	11	62	57		
NOS2-C1173T	NOS2 T_0:GAC AAA GTT AAT ATA TTA TGC TG	20	6	17	58	53	54	59
	NOS2 C_0:CCC ATA CAT ATG CAT TTT TCC	20	8	13	58	53		
	NOS2-1173C:TGG TAG CAA AGT GTT GGG AC	20	10	10	60	55		
	NOS2-1173T:AGT CAC CCT TGA TCT CAC CA	20	10	10	60	55		

注:genetype:基因型 primer 引物 LP:引物长度 G-鸟嘌呤核苷酸 C-胞嘧啶核苷酸 A-腺嘌呤核苷酸 T-胸腺嘧啶核苷酸 Tat:理论退火温度 Ta:退火温度 Tao:运行温度 Da:退火时间,引物序列加框有下画线字母代表等位基因位点。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 变性温度

Genotype	Production length	Production GC%	Productior TaT℃	Productior Tma℃	Taq Promerase
NOS2G－954C	680bps(C:5126bp,G:209bp)	41.32	86.24	94°	0.5U Hot start Taq 酶
NOS2 C－1173T	331bps(C:268bp,T102bp):	36.5	84.25	94°	0.5U Hot start Taq 酶

Production length:产物长度 GC%:产物中鸟嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸总计百分比 Tma:理论上熔点温度

表 3 PCR 条件

Genotype	Predenaturation	denaturation	Annealing	Extension	Cycle number
NOS2 G－954C	95℃ 5min	94℃ 30s	60℃ 30s	72℃ 30	40
NOS2 C－1173T	95℃ 5min	94℃ 30s	57℃ 30s	72℃ 30	40

Genotype:基因型 predenaturation:预变性 denaturation:变性 Annealing:退火 Extension:延伸 Cycle number:循环数

表 4 PCR 反应体系

Genotype	ddH_2O (uL)	Buffer (μl)	$Mgcl_2$ (mM)	dNIP (μM)	P1 (μmol/L)	P2 (μmol/L)	P－wild (μmol/L)	P－mutated (μmol/L)	Hot start Taq polymerase(U)	Temlate DNA(ng)
NOS2 G－954C	*	2	15	200	0.125	0.125	0.5	0.5	0.5	100
NOS2 C－1173T	*	2	15	200	0.125	0.125	0.5	0.5	05	100

注:*:加至 20 微升,P1:上游引物,P2 下游引物,P－wild:野生型等位基因特异性引物,P－mutated:突变型等位基因特异性引物 Template DNA:模板 DNA

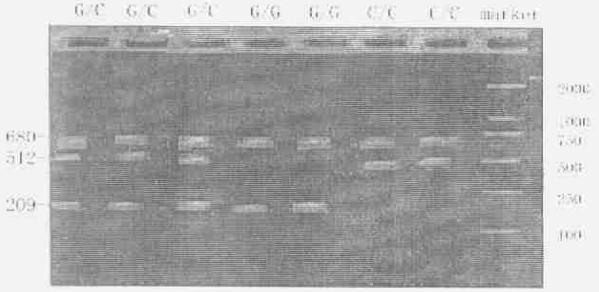


图 2 NOS2 G－954C SNP 电泳图

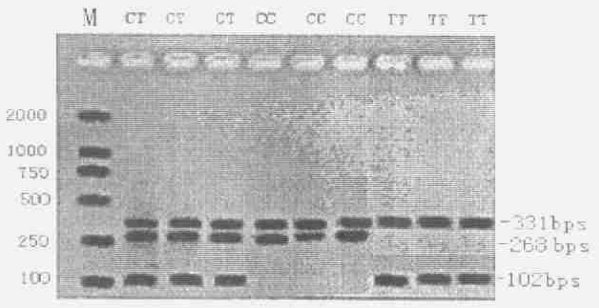


图 3 NOS2 C－1173T SNP 电泳图

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳(电泳仪为 DYY－11 电脑三恒我用电泳仪,北京六一仪器厂),琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色(琼脂糖和 EB 皆为大连宝生生物有限公司产品),WD－9403D)型紫外分析仪(北京六一仪器厂)检测证实 PCR 结果。

1.2.2.4 NOS2 G－954C、NOS2 C－1173 T SNP 的 PCR 反应产物分析

取 PCR 产物 10μl,制作 2% 琼脂糖凝胶,在电压为 100V,功率 5W 条件下电泳 1h,电泳结束后,凝胶置于 0.5μg/L 溴乙锭溶液中染色 15min,将凝胶置于紫外灯下观察或照像。

(1)NOS2 G－954C SNP 电泳结果分析:除 680bps 的公共条带外,若还出现单一的 209bps 条带者,即判断为野生型 G/G 纯合子;若还出现单一的 512bps 的条带者,即判断为突变型 C/C 纯合子;若还同时出现有 209bps 与 512bps 的条带者,即判断为 G/C 纯合子。其电泳结果如图 2 所示:

(2)NOS2 C－1173T SNP 的电泳结果分析:除 331bps 的公共条带外,若还出现单一的 268bps 的条带者,即判断为野生型 C/C 纯合子;若还出现单一的 102bps 的条带者,即判断为突变型 T/T 纯合子;若同时还出现 268bps 与 102bps 的条带者,即判断为 C/T 纯合子。其电泳结果如图 3 所示:

1.2.2.5 数据分析

(1)聚类分析

对每个 SNP 位点的等位基因,分别进行聚类分析,获得每个等位基因的分布频数、频率及其单倍型分布。在对性别资料进行分析时,先对每个 SNP 位点的等位基因进行组内聚类,再分男女进行聚类分析。

(2)数据处理主要在 MS－OFFICE2000 的 EXEL 软件下完成。

2 结 果

2.1 NOS2 C－1173T SNP 与 NOS2 G－954C SNP 的基因型及其单倍型频率分布情况

NOS2 C－1173T SNP 基因型分布 CC、CT、TT 分别为 66.73%、26.37%、6.90%,C、T 等位基因频率分别为 79.88%、20.12%。

NOS2 G－954C SNP 基因型分布 GG、GC、CC 分别为 61.77%、37.88%、0.35%,G、C 等位基因频

维普资讯 http://www.cqvip.com

率分别为 80.71%、19.29%。

2.2 NOS2 C-1173T SNP 与 NOS2 G-954C SNP 的组合基因型分布情况

本组资料显示上述 NOS2 基因的 2 位点 SNP 组合类型仅有 8 种，未发现 NOS2 T-1173T+C-954C 组合基因型。前 5 种组合基因型分别为：NOS2 C-1173C+G-954G 233 例(41.24%)，其中男性 128 例(40.76%)；NOS2 C-1173C+G-954C 143 例(25.31%)，其中男性 76 例(24.20%)；NOS2 C-1173T+G-954G 89 例(15.75%)，其中男性 53 例(16.88%)；NOS2 C-1173T+G-954C59 例(10.44%)，其中男性 32 例(10.19%)；NOS2 T-1173T+G-954G 27 例(4.78%)其中男性 17 例(5.41%)。其余见下表 5。

表 5 NOS2-C-1173T 与 NOS2-G-954C SNP 组合分布

	NOS2 C-1173T	NOS2 G-954C	Total 565	TFREQ(%)	F/T(251)	FFREQ(%)	M/T(314)	MFREQ(%)
1	CC	GG	233	41.24	105	41.83	128	40.76
2	CC	GC	143	25.31	67	26.69	76	24.20
3	CT	GG	89	15.75	36	14.34	53	16.88
4	CT	GC	59	10.44	27	10.76	32	10.19
5	TT	GG	27	4.78	10	3.98	17	5.41
6	TT	GC	12	2.12	5	1.99	7	2.23
7	CC	CC	1	0.18	1	0.39	0	0
8	CT	CC	1	0.18	0	0	1	0.32
合计			565		251		314	

注：TFREQ：全样本频率 FFREQ：女亚组频率 MFREQ：男亚组频率 F/T：样本中的女亚组 M/T：样本中的男亚组

3 讨 论

一氧化氮合酶(NOS)是一种催化 L-精氨酸生成的具有多种生物学活性的小分子物质-一氧化氮(NO)的限速酶。一氧化氮(NO)作为外周与中枢神经系统的神经递质；在心血管系统具有维持血管张力、调节血压，抑制血管平滑肌细胞迁移、增生，抑制血小板聚集与白细胞对血管壁的粘附、调节心肌收缩与舒张功能的作用，并在心率变异性与心脏重塑调节方面起重要作用[5,6]；在免疫防御机制方面具有杀菌与抑制肿瘤细胞生长等作用。已有研究证实由内毒素、细胞因子诱导产生的诱导性一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase，iNOS，NOS2)通过催化一氧化氮(nitric oxide，NO)的生成，参与了包括感染、肿瘤、糖尿病、骨关节炎等疾病以及病毒性心肌炎、心肌病、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生、发展过程。

当前报导的关于 NOS2 基因多态性研究主要集中在该基因前导区的重复序列[如$(CCTTT)_n$重复序列、$(TAAA)_n/(AAAAT)_n$重复序列]或单核苷酸多态性以及其对感染性疾病(如疟疾)、自身免疫性疾病、恶性肿瘤、糖尿病以及冠心病等易感性的影响[6~9]，并发现 NOS2 基因多态性与发生上述疾病有一定的相关性。国内学者吕星等[10]研究中国人群诱导性一氧化氮合酶基因前导区 NOS2 $(CCTTT)_n$ 重复序列多态性时，新发现了 NOS2 $(CCTTT)_{17}$、NOS2 $(CCTTT)_{18}$、NOS2 $(CCTTT)_{19}$ 重复序列三种等位基因，并发现某 NOS2$(CCTTT)_n$ 重复序列等位基因分布频率与西方人群相比有明显差异。

目前关于 NOS2 前导区的 G-954C、NOS2-C1173T SNP 与疾病相关性研究较少。国外学者 Kun 等[11]、Hobbs 等[12]研究报导 NOS2G-954C、NOS2-C1173T SNP 两个位点突变等位基因对非洲坦桑尼亚与肯尼亚儿童这一特定人群患疟疾的有保护作用，而在其他自然人群目前尚无有关 NOS2G-954C、NOS2-C1173T SNP 与疾病相关性研究的报导，也尚无有关上述位点 SNP 等位基因组合分布特征的研究报导。

本研究首次报道中国汉族人群 NOS2 G-954C SNP 等位基因分布频率 G-954G 为 61.77%、G-954C 为 37.88%、C-954C 为 0.35%；NOS2-954G 等位基因单倍型频率为 80.71%，NOS2-954C 等位基因单倍型频率为 19.29%。NOS2 C-1173T SNP 等位基因分布频率 C-1173C 66.73%、C-1173T 26.37%、T-1173T 6.90%；NOS2-1173T 等位基因单倍型频率为 79.88%，NOS2-1173 T 等位基因单倍型频率为 20.12%。

本组资料显示中国汉族人群 NOS2 C-1173T、

维普资讯 http://www.cqvip.com

NOS2 G－954C SNP 等位基因组合分布类型仅有 8 种，尚未发现 NOS2 T－1173T＋C－954C 组合基因型。其前 5 种组合基因型分别为：NOS2 C－1173C＋G－954G 233 例(41.24%)、NOS2 C－1173C＋G－954C 143 例(25.31%)、NOS2 C－1173T＋G－954G 89 例(15.75%)、NOS2 C－1173T＋G－954C 59 例(10.44%)、NOS2 T－1173T＋G－954G 27 例(4.78%)，且其组合基因型分布并不存在男、女性别的差异性。这种分布特征是人类发展中长期与环境相互作用(或称为自然选择或遗传压力)的结果，这对研究 NOS2 基因 SNP 及其组合分布和单倍体基因型分布在整体生理与疾病机制中的作用具有极其重要意义。但鉴于上述研究人群的样本量有限，尚需再扩大研究群体的样本量来加以证实。

参 考 文 献

[1] 谢正祥，牛永红，马厚勋，等. Beta 肾上腺素能受体 3 种亚型基因的 5 位点 SNP 的基因型分布[J]. 重庆医科大学学报，2003；28(6)：707－711.

[2] Rutherford S, Johnson MP, Curtain RP, et al. Chromosome 17 and the inducible nitric oxide synthase gene in human essential hypertension[J]. Hum Genet, 2001; 109(4): 408－415.

[3] Morris B J, Glenn C L., Wiicken D E. L., et al. Infuence of an inducible nitric oxide synthase promoter variant on clinical variables in patients with coronary artery disease[J]. Clinical Science, 2001; 100: 551－556.

[4] Shampa Nasreen, Toru Nabika, Hiroshi Shibata, et al. T－786C Polymorphism in Endothelial NO Synthase Gene Affects Cerebral Circulation in Smokers Possible Gene－Environmental Interaction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002; 22: 605－610.

[5] CHOWDHARY. S, G Andre NG, NUTTALL. S. L, et al. Nitric oxide and cardiac parasympathetic control in human heart failure[J]. Clinical Science, 2002; 102: 397－402.

[6] Yun－He Liu, Jiang Xu, Xiao－Ping Yang, et al. Effect of ACE Inhibitors and Angiotensin Ⅱ Type Ⅰ Receptor Antagonists on Endothelial NO Synthase Knockout Mice With Heart Failure[J]. Hypertension, 2002; 39: 375.

[7] Morris B J, Markus A, Glenn CL, et al. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes[J]. J Mol Med, 2002; 80(2): 96－104.

[8] Kumaramanickavel G, Sripriya S, Vellanki RN, et al. Inducible nitric oxide synthase gene and diabetic retinopathy in Asian Indian patients[J]. Clin Genet, 2002; 61(5): 344－348.

[9] Oates JC, Levesque MC, Hobbs MR, et al. Nitric oxide synthase 2 promoter polymorphisms and systemic lupus erythematosus in african－americans[J]. J Rheumatol, 2003; 30(1): 60－67.

[10] Lu X, Lu P, Xing RY, et al. A short tandem repeat polymorphism in the inducible nitric oxide synthase gene in Chinese population. Yi Chuan Xue Bao, 2002; 29(4): 290－293.

[11] Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, et al. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G－954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria[J]. J Infect Dis, 2001; 184(3): 330－336.

[12] Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, et al. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children[J]. Lancet, 2002; 360(9344): 1468－1475.

(上接第 29 页)

[8] Soker S, Machado M, Atala A. Systems for therapeutic angiogensis in tissue engineering[J]. World J Urol, 2000; 18(1): 10－18.

[9] Johan Street, Min Bao, Leode Guzman, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repaier by promoting angiogenese and bone[J], turnover. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002; 19(15)9656－9661.

[10] Claffey K P, Abrams S C, Brown L F, et al. 2001; Lab. Invest. 81, 61－75.

[11] Decders M M, van Bezooijen R L, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast－derived vascular endothelial growth factor. (2002) Endocrinology 143(4): 1545－1553.