DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.023
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1278 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1278-03

6号染色体微卫星标记与哮喘表型的连锁不平衡研究

桂 芹,钱桂生,黄桂君 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探索6号染色体的有关微卫星标记与哮喘表型的关系。方法 对20个哮喘同胞及核心家系成员分别测定支气管反应性、总IgE、皮肤挑刺试验和外周血嗜酸性粒细胞的测定,并以此为哮喘的表型,与分布于6号染色体的16个微卫星标记进行连锁不平衡分析。用ETDT软件软件系统完成所有连锁不平衡分析。结果 在4种不同表型下,只有D6S1610位点与特应症的皮肤挑刺试验的连锁不平衡关系具有显著性意义。结论 6号染色体短臂D6S1610附近可能存在特应症的易感基因。

关键词:哮喘;6号染色体;连锁不平衡
中图法分类号:R394.5;R562.2+50.2 文献标识码:A

Linkage disequilibrium of microsatellite markers on chromosome 6 and its relationship with asthma

GUI Qin, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the microsatellite markers on chromosome 6 and the phenotypes of atopy. Methods Sixteen microsatellite markers on chromosome 6 were evaluated in 20 affected-sib-pair and trios families. Linkage disequilibrium analysis was conducted according to asthmatic phenotypes (total IgE, skin prick test, bronchial hyper-responsiveness and eosinophil) by ETDT software system. Results Significant P value($P<0.05$) was only found in skin prick test with the locus of D6S1610. Conclusion The area around D6S1610 in short arm of chromosome 6 may contain susceptibility gene of atopy.

Key words: asthma; chromosome 6; linkage disequilibrium

群体遗传学研究结果表明哮喘属于多基因遗传性疾病,其遗传度大约为60%~80%。目前分子遗传学研究提示,最有可能包括哮喘易感基因的区域分别为6号染色体短臂、5号染色体长臂和11号染色体长臂[1~3]。并且,有研究发现6号染色体短臂可能有与特应症有关的基因位点[4]。为此,我们进行了哮喘和特应症表型与分布在6号染色体全长的16个微卫星标记的多态性之间的连锁不平衡研究,从而探讨这些位点及其附近区域是否可能包含与哮喘表型有关的遗传易感基因。

1 资料与方法

1.1 对象

居住在重庆市哮喘家系20个,其中同胞家系11个,核心家系19个。根据支气管哮喘防治指南[5]的哮喘诊断标准进行诊断,对家系成员做总IgE测定、皮肤挑刺试验、支气管激发试验或支气管舒张试验和外周血嗜酸性粒细胞。并以此四种表型与6号染色体上的标记做连锁不平衡分析。

1.2 基因组DNA的提取

采用酚/氯仿抽提法。抽取3 ml外周静脉血,分别用于生化检测和DNA抽提,可获得DNA 100 μg左右。所得DNA用0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定,确认无RNA污染,DNA分子量完整。检测A_{260}/A_{280}在1.8~1.9。-20 ℃冷藏保存。

1.3 哮喘家系微卫星标志的基因分型

1.3.1 荧光标记引物 采用美国Perkin Elmer公司产品,共16对(Linkage mapping set version 2.5)。平均杂合度在0.79。分布于6号染色体。每对引物的正义链末端(5′端)标记荧光染料(FAM, HEX, NED),通过激光扫描,3者分别显示蓝、绿、黄色。6号染色体的微卫星DNA标记位点的有关资料见表1。

1.3.2 多重PCR反应 在96孔微量反应板上进行。根据引物多少、颜色、产物长度将每组引物分1到2次扩增。反应体系包括基因组DNA 1.0 μl, Golden *Taq* 聚合酶0.04 μl, Mg^{2+} 0.6 μl, 每对引物各0.04 μl, 10× buffer 0.5 μl, ddH_2O 2.60 μl, dNTP 0.1 μl, 总反应体积5 μl。用Touch-down PCR优化最佳反应条件。

1.3.3 毛细管微列阵电泳 将稀释后的PCR产物与含有去

作者简介:桂 芹(1964-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事哮喘遗传学在其发病中的作用方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68755320

收稿日期:2003-02-25;修回日期:2003-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

离子甲酰胺的内部分子量标准按一定比例混合，94 ℃变性2 min，在毛细管微列阵电泳仪 Megabace1000 上进行电泳 1～2 h，系统软件进行图像扫描及信息收集。不同荧光标记的 PCR 产物或同种荧光标记但扩增片段相差 50 bp 以上可以混合在同一毛细管中电泳。

1.3.4　基因分型　应用 Genetic Profiler2.1 软件分析收集到的信息，并对每个成员的每个微卫星位点进行基因分型，以及家系内遗传关系的鉴定。所有数据以 Excel 表形式保存。

表1　6号染色体微卫星 DNA 标记位点的资料

Tab 1　Data of microsatelite DNA loci on chromosome 6

Loci labeled	Fluoresence	Length of product	Number of alleles
D6S309	NED	307-333	9
D6S44	NED	160-200	8
D6S262	HEX	171-191	9
D6S1574	FAM	150-176	9
D6S1581	FAM	261-275	6
D6S1610	FAM	204-218	7
D6S264	FAM	113-135	8
D6S276	FAM	205-237	10
D6S287	HEX	110-114	10
D6S289	FAM	163-185	9
D6S308	FAM	328-356	5
D6S309	NED	307-333	9
D6S422	FAM	300-322	12
D6S434	HEX	206-250	10
D6S446	NED	222-234	5
D6S460	FAM	283-307	10
D6S462	HEX	108-124	8

1.4　统计学分析

采用 ETDT(version2.2)软件进行 χ^2 检验。

2　结果

同时扩增16个微卫星位点，并分别在4中不同的表型分类范围下，对所有16个微卫星位点进行 ETDT 检验。结果显示 D6S1610 与皮肤挑刺试验 P 值达到显著性水平，ETDT-P 值经 Monte Carlo 逼真法 10 000 次重复校正后的经验 P 值小于 0.05 具有统计学意义，显示 D6S1610 与特应症的易感基因存在连锁不平衡，其他 D6S1574、D6S262、D6S309、D6S441、D6S264、D6S276、D6S422、D6S1581、D6S287、D6S289、D6S308、D6S462、D6S460、D6S446、D6S434，$P>0.05$，均不存在连锁不平衡。

3　讨论

连锁不平衡方法(Transmission disequilibrium test，TDT)是遗传统计学研究发展起来的介于连锁和关联分析的一种新方法，以患病子代与其与父母组成的核心小家系为研究对象，把父母作为患者的"内对照"，这在比较分析两组人群遗传背景完全相同，有效地消除了在群体关联研究中难以避免的群体分层等因素所导致的假阳性，因而具有明显的优越性[6]。并且具有 TDT 分析不受遗传模式影响，如果阳性，暗示一个非常小的区域的优点。我们在哮喘的同胞对核心家系中采用了 TDT 分析方法，在所选用的16个标记位点中，发现 D6S1610 有统计学意义($P<0.01$)，提示 D6S1610 位点与哮喘病人的特应症易感基因存在连锁不平衡。因为微卫星 DNA 序列本身并不编码蛋白质，它只作为遗传标记，因此该结果提示该位点不仅可作为哮喘的重要遗传标记，更重要的是表明其附近可能存在与哮喘相关的基因。与国外常用的连锁分析相比较，连锁不平衡检验具有能检验较弱的连锁位点，因而其在遗传定位方面具有优势，目前有学者认为关联分析是未来复杂遗传性疾病定位的最有用的工具。目前国内还未见哮喘相关方面的报道。

D6S1610 位点位于 6p22.1～6q25.3 区域，其中组织相容性白细胞抗原(HLA)基因位点位于 6q22。HLA 的Ⅱ类抗原(包括 DP、DQ、DR)在抗原提呈过程中起关键作用，因而影响免疫反应的特异性。以往人们对Ⅱ类抗原等位基因与某些特殊抗原的 IgE 高反应性之间的关系进行了研究。在染色体 6q21 的标记和花粉特异性 IgE 存在连锁[7]并且 HLA-Derp1 *1101，DQA1 *0501，DQB1 *0301 与过敏性哮喘有很强的相关性[8]。也有报道 MHC 与特应症没有相关性，在最早的报道中 Maryland 组研究，20 个家系在 8 岁时期疾病表型是气道高反应性，用高度多态性标记定位人类基因组 11 与 HLA-DR 非常靠近，显示这些位点与特应性和气道高反应性没有关联[9]；在德国、新西兰和西班牙的进一步研究，也没有发现 HLA Ⅱ类座位与对屋尘螨反应有显著关联[10～12]。在中国北方汉族发现 HLA-DQ 和 HLA-DR 与支气管哮喘的易感性有关[13～14]。而本研究用 TDT 检验哮喘遗传家系的四个表型，仅发现抗原特异性的皮肤挑刺试验与 D6S1610 有关，提示在 D6S1610 附近可能存在有特应症的易感基因。至于是否是 HLA 或其它基因还需要进一步的研究。

参考文献：

[1] Daniels S E, Bhattacharrya S, James A, *et al*. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma[J]. Nature, 1996, 383(6597): 247－250.

[2] Ober C, Cox N J, Abney M, *et al*. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. Collaborative Study on the Genetics of Asthma[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(3): 1393－1398.

[3] Green S L, Gaillard M C, Song E, *et al*. Polymorphisms of the beta chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (Fcepsilon RI-beta) in South African black and white ashmatic and nonasthmatic individuals[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(5 Pt 1): 1487－1492.

[4] Albuquerque R V, Hayden C M, Palmer L J, *et al*. Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma[J]. Clin Exp Allergy, 1998, 28(5): 578－584.

[5] 支气管哮喘防治指南：支气管哮喘的定义、诊断、治疗、疗效判断标

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

准及教育和管理方案[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(5): 261—267.
[6] ShamPC, Curtis D. An extended transmission/disequilibrium test(TDT) for multi-allele marker loci[J]. Ann Hum Genet, 1995, 59(Pt 3): 323—336.
[7] Hizawa N, Collins G, Rafnar T, *et al*. Linkage analysis of Dermatophagoides pteronyssinus-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by the transmission/disequilibrium test. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA)[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 102(3): 443—448.
[8] Lara-Marquez M L, Yunis J J, Layrisse Z, *et al*. Immunogenetics of atopic asthma: association of DRB1 *1101 DQA1 *0501 DQB1 *0301 haplotype with Dermatophagoides spp-sensitive asthma in a sample of the Venezuelan population[J]. Clin Exp Allergy, 1999, 29(1): 60—71.
[9] Amelung P J, Panhuysen C I, Postma D S, *et al*. Atopy and bronchial hyperresponsiveness: exclusion of linkage to markers on chromosomes 11q and 6q[J]. Cli Exp Allergy, 1992, 22(5): 1077—1084.
[10] Stephan V, Schmid V, Frischer T, *et al*. Mite allergy, clinical atopy, and restriction by HLA class II immune response genes[J]. Pediatr Allergy Immunol, 1996, 7(1): 28—34.
[11] Holloway J W, Doull I, Begishvili B, *et al*. Lack of evidence of a significant association between HLA-DA, DQ and DP genotypes and atopy in families with HDM allergy[J]. Clin Exp Allergy, 1996, 26(10): 1142—1149.
[12] Torres-Galvan M J, Quiralte J, Blanco C, *et al*. Linkage of house dust mite allergy with HLA region[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 1999, 82(2): 198—203.
[13] 高金明, 林耀广, 邱长春, 等. 中国北方汉族人群人类白细胞抗原-DQA1, -DQB1 基因多态性与支气管哮喘遗传易感性的关系[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(6): 379—383.
[14] 李凤荣, 刘云霞, 李凤玲, 等. 支气管哮喘 HLA-DRB1 等位基因分析[J]. 中国民政医学杂志, 2001, 13(5): 269—270.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)14-1280-01

急性毒鼠强中毒抢救 34 例

Emergent treatment of acute poisonous patients by tetramine: a report of 34 cases

孙 鸿[1], 胡良平[2] ([1] 涪陵中心医院儿科, 重庆 408000; [2] 武汉空军长征医院门诊部, 武汉 430079)

近年来, 毒鼠强中毒呈上升趋势。毒鼠强为国家禁止生产销售及使用的剧毒杀鼠剂, 因其生产成本低廉, 不法商贩为牟取暴利而导致毒鼠强在市场上销售屡禁不止, 其中毒事件屡有发生。由于临床上人们对毒鼠强中毒的认识有限, 目前尚无有效的降毒药, 人中毒后病情变化快, 若救治不及时, 往往造成严重的后果。我院自 2001 年 4 月至 2002 年 5 月急救治疗毒鼠强中毒 34 例, 取得满意疗效。现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

男 16 例, 女 18 例, 年龄最小 10 个月, 最大 68 岁; 中毒途径均为胃肠道中毒; 16 岁以下 19 例, 其中 15 岁 2 男 1 女, 16 岁以上 15 例, 年龄在 20 与 30 之间的女性 6 例, 男性 1 例为自服外, 其余均为误服。就医时间最短 5 min, 最长 4 d。临床表现: 全部病例均以头昏、乏力、腹痛、呕吐为首发症状; 短时间内出现抽搐、昏迷 21 例; 13 例出现精神症状, 表现为兴奋、躁动, 肢体肌阵挛; 消化道、皮下出血 1 例; 恢复期部分病例出现头昏、心慌、失眠、记忆力减退等神经系统功能失调症状。辅助检查: 对二起群体中毒成人 7 例、儿童 3 例, 均从血、呕吐物检测出毒鼠强, 其余中毒病例以剩余鼠药检测认定; 心肌酶谱升高 14 例, 肝功能损害 8 例, WBC、Bun 改变不明显; 2 例脑脊液检查正常; 脑电图检查 1 例异常。

1.2 救治措施

1.2.1 急诊处理 催吐洗胃。除 1 例在院外已治疗 4 d 后就诊外, 其余均插胃管, 洗胃机反复洗胃。

1.2.2 抗惊厥 对反复惊厥、阵挛病例给予安定、苯巴比妥静脉缓推, 止惊效果不好, 2 h 重复; 频繁发作惊厥对安定、苯巴比妥使用 2~3 次以上效果不好的儿童病例, 用硫喷妥钠每次以 10 mg/kg 肌注, 止惊效果明显。

1.2.3 防止脑水肿 抽搐昏迷者给予快速静脉滴注 20% 甘露醇, 成人每 4~6 h 滴注 125~250 ml, 儿童每次 1~2 g/kg。部分病人用甘油氯化钠。

1.2.4 血液透析 一次性集体就餐中毒的 7 例病人采用血液透析。

1.2.5 二巯基丙磺酸钠的应用 成人每次 250 mg 肌注每日 2 次; 儿童 5~10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 肌注。

2 结果

34 例病人中, 除 1 例 10 月男婴因抽搐昏迷 3 d, 家长丧失信心放弃治疗外, 其余均治愈。

3 讨论

毒鼠强(化学名称为四亚甲基二砜四胺), 为白色粉末状, 无嗅无味, 分子式为 $C_4H_8O_4N_4S_2$, 是分子质量为 284 的小分子有机氮化合物, 毒鼠强为国家禁止生产、销售及使用的剧毒杀鼠

(下转 1284 页)

作者简介: 孙 鸿(1946—), 男, 河南省郑州市人, 副主任医师, 主要从事儿童意外伤害及急救处理方面的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023) 72231504

收稿日期: 2003-02-19; 修回日期: 2003-03-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net