

• 论 著 •

## 西北汉族女性 ACTN3 基因多态性频率分布特征

张志明<sup>1</sup>, 高鹏华<sup>2</sup>

(1. 陕西省西安市中心医院检验科 710003; 2. 西北大学体育教研部, 陕西 西安 710069)

**摘要:**目的 调查汉族普通女性人群 ACTN3 基因多态性频率分布特征。方法 选择 18~22 岁西北籍汉族健康女学生 226 例作为研究对象, 用荧光实时定量 PCR 法分析 ACTN3 基因的多态性频率分布特点。结果 ACTN3 基因 R577X 多态位点分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡, ACTN3 基因 R577X 杂合子 RX 基因型频率为 22.1%, 纯合子 RR 为 40.4%, XX 为 37.5%, RX 基因型频率多于 XX 基因型 ( $P < 0.05$ ), ACTN3 基因 R577X 多态位点 R 等位基因频率为 51.3%, 高于 X 等位基因频率 48.7% ( $P < 0.05$ )。结论 从种族单一性、样本数量和年龄段的选择等因素考虑, 本研究结果可以作为西北籍汉族女性 ACTN3 基因 R577X 多态性频率分布的代表。

关键词: 辅肌动蛋白; 基因; 多态现象, 遗传

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0437-02

## The Frequency Distribution Characteristics of the ACTN3 Gene Polymorphism of Northwest Han women

Zhang Zhiming<sup>1</sup>, Gao Penghua<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, China;

2. Department of Physical Education, Northwestern University, Xi'an, Shanxi 710069, China)

**Abstract: Objective** To investigate gene ACTN3 polymorphism frequency distribution characteristics of the Han general female population. **Methods** Choose 226 healthy Han northwest female student 18 to 22 years old as the object of study, using fluorescent real time quantitative PCR to analyze ACTN3 gene polymorphism frequency distribution characteristics. **Results** ACTN3 gene R577X frequency distribution of polymorphic loci meets Hardy-Weinberg equilibrium. ACTN3 gene R577X heterozygous RX genotype frequency was 22.1%, homozygous R/R of 40.4%, XX of 37.5%. RX genotype was significantly more than XX genotype ( $P < 0.05$ ). ACTN3 gene R577X polymorphism loci R allele frequency was 51.3%, which was significantly higher than the X allele frequency of 48.7% ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** From the sample selection of race, number, age and other factors considered, the results can be used for representing the Northwest Chinese women ACTN3 gene R577X polymorphism frequency distribution representative.

Key words: actinin; genes; polymorphism, genetic

$\alpha$ -辅肌动蛋白(ACTN)是肌动蛋白的结合蛋白,在骨骼肌中主要分布于 Z 线,类似于致密体,其作用是固定肌原纤维肌动蛋白微丝的排列顺序。ACTN 有 3 种存在形式: ACTN1、ACTN2 和 ACTN3。人类只有 ACTN2(1q422q43) 和 ACTN3(11q132q14),其中 ACTN2 存在于骨骼肌和心肌的所有肌纤维类型中,而 ACTN3 仅存在于骨骼肌的快肌纤维中<sup>[1-3]</sup>。国外研究证实 ACTN3 16 号外显子的第 1747 位 C/T 核苷酸基因多态性与某些爆发力项目如短跑、举重的选取可能有关<sup>[4-5]</sup>,考虑到这些结果可能与种族、样本量和年龄段的选择有关,本研究旨在了解我国西北汉族女性 ACTN3 基因多态性,以便为我国爆发力项目中的基因选材研究提供相关人群对照,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 对象** 选择我国西北籍的西北大学生命科学学院的本科生 226 例作为研究对象,均为健康女性,年龄在 18~22 岁;全部为汉族,并且双亲、祖辈双亲均为汉族;未经任何专业训练。所有的研究对象均知情同意。

**1.2 方法** (1) 实验内容:通过对 226 例西北汉族 18~22 岁普通女性大学生 ACTN3 基因多态性的频率分布分析,并比较国内外相关研究结果,得出与爆发力项目如短跑、举重女运动员中选取的年龄段相适应的西北汉族 18~22 岁人群 ACTN3

基因多态性频率分布特征。(2) 样本采集和基因组 DNA 提取<sup>[6]</sup>:常规方法抽取外周静脉血 1.5 mL,置入 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝试管冷藏待用。DNA 提取采用试剂盒,提取 1 mL 血样经红细胞裂解液 I 去除红细胞后,再加入白细胞裂解液 II(蛋白酶 K)60 °C 水浴 1 h,经高浓度 NaCl(5 mol/L)沉淀,加入冰无水乙醇后析出 DNA,然后经 75% 乙醇洗涤 2 次,再用双蒸水溶解,测出浓度后,将 DNA 稀释为 100 ng/ $\mu$ L。所提取 DNA 样本在 -20 °C 条件下保存备用。(3) PCR 引物设计与合成:依据 NCBI 网站公布的人类 ACTN3 基因序列,以 Primer5.0 软件自行设计 PCR 引物及探针。引物序列为正向 5'-TGA CAG CGC ACG ATC AGT TCA-3',反向 5'-GAT GTA GGG ATT GGT GGA GCA-3',探针 I (Fam 探针) 5'-GAG GCT GAC CAG GAG CGA G-3',探针 II (JOE 探针) 5'-CGA GGC TGA CTG AGA GCG AG-3'。以上引物和探针均由上海生工公司合成。(4) 基因多态性检测:应用实时定量(real-time)PCR Taq-Man 荧光探针技术进行测定。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,包括双蒸水 34.15  $\mu$ L, 20 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, 5.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5.0  $\mu$ L, dNTP 各 0.5  $\mu$ L, Taq 酶 0.55  $\mu$ L (1 U),正、反向引物各 0.6  $\mu$ L, 探针 I 0.6  $\mu$ L, 探针 II 0.6  $\mu$ L, 模板 DNA 5.0  $\mu$ L。PCR 条件为 37 °C 预变性 2 min; 94 °C 15 s, 58 °C 60 s, 共 40 个循环。每次检测至少设置 3 个空白对照。根据 ABI 5700 高

通量荧光定量 PCR 仪自带的软件分析结果及进行基因型判定。为了确认荧光 PCR 测试的结果,取每种基因型各 5 份标本 PCR 产物进行序列分析,由上海生工公司检测,结果与荧光 PCR 分析结果一致。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。基因计数法计算基因频率、基因型频率,  $\chi^2$  检验计算基因型频率是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,  $r \times c$  列联表  $\chi^2$  检验比较不同种族基因型分布的差异。检验显著性水平定为  $P < 0.05$ 。

**2 结 果**

**2.1 西北汉族女性与其他人群 ACTN3 基因多态性频率比较,见表 1。**

**表 1 西北汉族女性与其他人群 ACTN3 基因多态性频率比较**

组别	n	基因型频率[n(%)]			等位基因频率	
		RR	RX	XX	R	X
西北汉族女性	226	91(40.4)	50(22.1)	85(37.5)	0.513	0.487
亚洲女性	213	83(39.1)	46(21.7)	83(39.1)	0.500	0.500
国外男性	247	68(27.5)	114(46.2)	65(26.3)	0.506	0.493
美洲女性	202	37(18.2)	46(22.7)	119(59.1)	0.297	0.703
欧洲女性	255	39(15.4)	60(23.7)	155(60.9)	0.272	0.728

经 Hardy-Weinberg 平衡检验,226 例年龄为 18~22 岁的汉族普通女性大学生人群卡方值为 0.51,则  $P > 0.05$ ,基因频率分布达到遗传平衡。结果表明,本研究所选择的受试对象具有群体代表性。

**2.2 与亚洲女性 ACTN3 基因多态频率分布特点比较** 本研究 ACTN3 基因多态频率分布与亚洲相关研究结果比较从种族、地域、年龄和样本量等因素综合考虑,本研究选择了较具代表性的亚洲普通对照人群研究结果,与本研究结果进行比较。表中显示,R 等位基因频率为 51.3%,X 等位基因的频率为 48.7%,经 Hardy-Weinberg 平衡检验,基因频率分布达到遗传平衡( $\chi^2 = 0.51, P > 0.05$ ),表明所选择的受试对象具有群体代表性。从上述比较结果清楚看出,本研究与亚洲 RX 基因型频率明显低于 RR、XX 基因型频率,所以本研究的 ACTN3 基因 R577X 多态性与国外亚洲人群研究结果呈现较高的一致性。

**2.3 与国外男性 ACTN3 基因多态频率分布特点** 从表中可以看出,西北汉族女性 R577X 多态位点与国外男性相比杂合子 RX、纯合子 RR、XX 基因型频率差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.4 本研究与欧美女性 ACTN3 基因多态频率分布特点** 本研究 ACTN3 基因多态频率分布与国外相关研究结果比较依据种族、年龄和样本量,本研究选择较具代表性的美洲和欧洲 2 个研究对象,与本研究的结果进行对比观察,显示出美洲与欧洲的 2 个实验研究的一致性相当高。相关趋势是:R 等位基因频率低于 X 等位基因;杂合子 RX 基因型频率最低,XX 基因型纯合子频率高于 RR 基因型纯合子。这一趋势明显与中国汉族人群的趋势相异。卡方检验结果显示,与欧美相反,汉族 R 等位基因频率高于 X 等位基因( $P < 0.01$ );汉族人群 RR 基因型纯合子频率高于欧美人群( $P < 0.01$ ),而 XX 基因型纯合子频率低于欧美人群( $P < 0.01$ )。结果清楚地表明,汉族人群的 ACTN3 基因 R577X 多态频率分布与欧美人群有显著性

差异。

**3 讨 论**

基因携带着大量的遗传信息在亲代和子代间传递,使物种具有多样性和个体差异性<sup>[7]</sup>。近年来,分子生物学取得了超乎寻常的发展,在人体科学领域快速而全面的渗透,体育科学也将学科的研究深入到分子水平,一方面解决竞技体育中早期选材的难题,另一方面从基因水平探索未能解释的运动机制。从表 1 中可以看出,本研究结果与亚洲女性的 XX、RR、RX 基因型频率的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。从上述比较结果清楚看出,除去与亚洲女性的纯合子 XX 基因型频率的差异外,本研究的 ACTN3 基因 R577X 多态频率分布与国内研究结果呈现较高的一致性,可能是被研究对象均为黄色人种,环境因素和生活方式以及基因与环境的相互作用差别不是很大。从表中可以看出,本研究结果与欧美女性 ACTN3 基因 R577X 多态性存在显著性差异,可能是由于 ACTN3 基因多态性在种族之间存在差异性,不同的国家、地区和种族之间的等位基因频率分布不尽相同。Barly 等<sup>[8]</sup>1994 年对黑人、白人、日本人测定了 ACTN3 基因多态性,发现种族之间无论是等位基因频率还是基因型频率均存在差异。Rankinen 和 Wolfarth 等<sup>[9]</sup>的研究对象尽管来自同一国家(加拿大、澳大利亚),但这些国家的种族多元化历史使得受试对象为混合种族。因此,其研究结果中的种族差异因素的影响显而易见。本研究严格限制研究对象为汉族,并且要求双亲、祖辈双亲均为汉族。由此,本研究的结果支持“不同的国家、地区和种族之间的等位基因频率分布是不尽相同的”这一观点<sup>[10]</sup>。同时,本研究结果能够进一步丰富 Barly1994 年对白人、黑人和日本人的研究结果<sup>[11]</sup>。本研究对象的 ACTN3 基因 R577X 多态频率分布与亚洲人群的相关研究结果基本一致。并且,无论是种族单一性和样本数量,还是年龄段的选择,本研究结果不仅可以作为西北女性青年 18~22 岁人群 ACTN3 基因 R577X 多态频率分布的代表,而且对于爆发力项目(短跑、举重)的多态性标记研究来讲是理想的对照群体。

**参考文献**

- [1] 李立青. 运动与训练能力相关基因研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(8): 720-721.
- [2] Moran CN, Yang N, Bailey ME, et al. Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks [J]. Eur J Hum Genet, 2007, 15(1): 88-93.
- [3] 尚旭亚, 黄昌林. 中国汉族男性军人辅助肌蛋白 3 (ACTN3) 基因多态性研究[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(12): 1236-1237.
- [4] Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance [J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(3): 627-631.
- [5] MacArthur DG, North KN. ACTN3: a genetic influence on muscle function and athletic performance [J]. Exerc Sport Sci Rev, 2007, 35(1): 30-34.
- [6] 张志明. 甘肃汉族人群白细胞介素 1 $\alpha$  启动子(-889 C/T) 基因型与冠心病的关系[J]. 检验医学, 2007, 22(6): 703-706.
- [7] 石燕昆. 血管紧张素转化酶基因多态性与冠心病及冠状动脉狭窄程度的关系[J]. 重庆医学, 2008, 23(37): 2660-2661.
- [8] Barly J, Blackwood A, Carter ND, et al. ACE insertion/deletion polymorphism, association with ethnic origin [J]. (下转第 441 页)

学意义,120 h 开始显著下降,与 4 h 内检测结果比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),这与 Gene 等<sup>[4]</sup>报道 WBC 仍然高于即刻检测结果不符;PLT 随标本保存时间延长逐渐减少,于 96 h 开始与 4 h 内检测结果比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。偏差分析显示,标本不论室温或冷藏保存,96 h 内 WBC 的结果差异为临床基本可接受;而标本放置室温 96 h 内或冷藏 48 h 内 PLT 的结果差异为临床基本可接受。标本冷藏放置 72 h,PLT 在统计学上虽无差异,但个别标本的 PLT 结果显著下降,偏差已超出允许误差范围,且随时间延长,差异逐渐增大,超出允许误差的标本数逐渐增多。分析原因,可能与低温保存时更易使细胞黏附、聚集、激活,尤其是 PLT 聚集成较大颗粒时,使 PLT 数量较室温下降快,而仪器检测 WBC 是根据血细胞通过微孔时电阻变化产生的脉冲大小计数,可能将聚集的 PLT 误计为 WBC,使得 WBC 在 24~96 h 测定结果稍有升高,但无统计学意义。说明 WBC 的稳定性在 96 h 内受环境因素影响较小,而 PLT 不易冷藏保存,标本室温保存,PLT 的稳定性较好。

标本不论室温或冷藏保存,血小板的体积参数 MPV、PDW 稳定性最差,于 24 h 开始发生显著变化( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),且随时间的延长逐渐增大<sup>[5]</sup>。这可能与血小板结构和生理特点有关,血液离开体内正常环境后,由于渗透压的影响,以及玻璃抗凝管诱使血小板结构发生变化,随着时间的延长,血小板肿胀导致构型发生改变,使 MPV 增大,血小板体积大小的异质性参数 PDW 随之增大<sup>[5]</sup>。所以,血小板的体积参数成为临床血液分析的时限性因素。MPV 应在 4 h 内测定,才能正确反映机体内血小板的状况<sup>[5-7]</sup>。

研究表明,标本在室温或冷藏条件下,Hb 的稳定性最好,可稳定 96~120 h。在室温下,RBC、MCH 只稳定 24~48 h,与 Gene 等<sup>[4]</sup>报道“标本保存在室温时,RBC、Hb、MCH 至少可以稳定 7 天”不符。而 HCT、MCV、RDW 3 项红细胞体积参数于 24 h 开始升高,MCHC 随之降低,与 4 h 内检测结果比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),与文献报道一致<sup>[1]</sup>。可能与室温长时间放置,红细胞代谢增快,红细胞本身的结构发生较大改变;也可能与抗凝血标本渗透压有关,EDTA 抗凝血的渗透压比未加抗凝剂的血标本增加了 60 mOsm/kg H<sub>2</sub>O,抗凝血红细胞停留在一个高渗透压环境中,细胞内水分子与细胞外溶质相互交换,使细胞内渗透压升高,细胞体积缩小。当进行标本检测时,红细胞遇到渗透压相对较低的稀释液,水分进入红细胞内,使其 MCV 明显增大,RDW 明显增宽,部分红细胞膜破裂,形成的脉冲电流减少,引起 RBC 减少<sup>[8-10]</sup>。而在冷藏下,HCT、MCV、RDW、MCHC 可稳定 48~72 h,红细胞其他参数可稳定 96 h。偏差分析显示,标本冷藏保存 120 h 内,RBC、Hb、HCT 结果差异为临床基本可接受;室温条件下,RBC 于 48 h 内、Hb 于 96 h 内检测结果差异才能为临床基本可接受,120 h Hb 在统计学上虽无差异,但个别标本的偏差已超出允

许误差范围,而 HCT 于 24 h 起有 7%(3/43)标本的检测结果差异已超出允许误差范围,随时间延长结果差异逐渐增大,超出允许误差的标本数逐渐增多。说明标本冷藏保存,红细胞参数的稳定性较好。

综上所述,抗凝全血标本采集后,应及时送检,尽量在 4 h 内检测完毕后,建议放置 2~8 °C 冰箱保存。如遇特殊原因,标本不能及时送检,也应在 4 h 内制备合格的血涂片后<sup>[11]</sup>,放置 2~8 °C 冰箱保存,48 h 内检测结果基本可满足除 MPV、PDW 外的临床血液常规需要。这样可以保证部分血细胞计数结果的可靠性,同时以备临床和患者对检验结果有疑惑时进行复查核对。此外,还可利用保存的新鲜抗凝血标本建立多台血细胞分析仪间的质控体系,可实时监控仪器波动,即经济实惠,又达到室内质控的预期效果<sup>[12]</sup>。

参考文献

- [1] 陈国强,潘立勇,施明月,等. XE-2100 血液分析仪常用参数稳定性研究[J]. 检验医学,2005,20(3):192-194.
- [2] US Department of Health and Human Services. Medicare, Medicaid and CLIA programs: Regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA). Final rule[J]. Federal Register,1992,57(10):7002-7186.
- [3] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:136-140.
- [4] Gene L, Gulati PhD, Lawrence J, et al. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature[J]. Archives of Pathology and Laboratory Medicine,2002,126(8):336-342.
- [5] 郝崇华,刘建红. 关于血液标本放置时间的长短对血常规检测的影响[J]. 实用医技杂志,2002,9(9):666-667.
- [6] 骆科允,汪彦屿,冯进. 时间、温度对全血细胞检测结果的影响[J]. 《中国保健》医学研究版,2007,15(2):119-120.
- [7] 王文工,王丽,王望东. 血液标本保存温度和时间对血小板系统检测指标的影响[J]. 微循环学杂志,2005,15(3):74,77.
- [8] 杨佳,罗舜菁,颜萧,等. 温度对全血细胞计数(CBC)结果的影响[J]. 江西医学检验,1999,17(4):203-205.
- [9] 丁颖,王正芳,丛玉隆,等. 血液保存温度和时间对激光法检测红细胞系统参数的影响[J]. 临床检验杂志,1996,14(3):150.
- [10] 马俊龙,杨崇萍,丛玉隆. 红细胞体积及测定的影响因素[J]. 军医进修学院学报,1992,13(1):86.
- [11] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2008:140-143.
- [12] 安邦权,周湘红,凌晓午,等. 全自动血细胞分析仪 HGB 测定多种室内质控方法应用研究[J]. 江西医学检验,2007,25(5):483-484.

(收稿日期:2010-05-10)

(上接第 438 页)

Hypertens,1994,12(3):955-977.

- [9] Rankinen T, Wolfarth B, Simoneau JA. No association between the angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and elite endurance athlete status[J]. J Appl Physiol,2000,88(5):1571-1575.
- [10] North KN, Beggs AH. Deficiency of a skeletal muscle isoform of

alpha-actinin ( alpha-actinin-3 ) in merosin-positive congenital muscular dystrophy[J]. Neuromuscul Disord,1996,6(4):229-235.

- [11] 席冀,张秀丽. 中国北方汉族青年 ACE 基因 I/D 多态性频率分布特征[J]. 天津体育学院学报,2006,21(3):205-208.

(收稿日期:2010-05-04)