

• 论 著 •

血细胞线粒体 DNA 拷贝数变化与高原红细胞增多症易感性的关联研究*

罗勇军,刘福玉,陈 丽,后显华,周其全,蒋春华,廖卫公,高钰琪[△]

(第三军医大学高原军事医学系高原疾病学教研室/高原医学教育部重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨血细胞线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数的变化与高原红细胞增多症易感性的关联性。方法 分别采集年龄、职业等相匹配的高原红细胞增多症患者 37 例及对照组 42 例的静脉血 2 mL,提取总 DNA,通过定量 PCR 法(染料法)检测白细胞的 mtDNA 相对拷贝数。结果 高原红细胞增多症患者中,mtDNA 拷贝数显著低于对照组($P<0.05$)。通过线性回归分析显示,在对照组中,随血红蛋白浓度的增加 mtDNA 拷贝数增加($P<0.05$);然而在高原红细胞增多症病例组中,随着血红蛋白浓度的增加,mtDNA 拷贝数降低($P<0.05$)。结论 高原红细胞增多症患者中,mtDNA 拷贝数较低,可能作为该病的分子标记。

关键词:DNA,线粒体; 红细胞增多症; 拷贝数

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.013 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2011)11-1176-02

The association between mitochondrial DNA copy number variation and high altitude polycythemia*

Luo Yongjun, Liu Fuyu, Chen Li, Hou Xianhua, Zhou Qiquan, Jiang Chunhua, Liao Weigong, Gao Yuqi[△]

(Department of High Altitude Disease, Key Laboratory of High Altitude Medicine of Ministry of Education, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate mitochondrial DNA(mtDNA) copy number variation in high altitude polycythemia. **Methods** The relative copy numbers of mtDNA were detected in the high altitude polycythemia($n=37$) and controls($n=42$) by the real-time PCR(SYBR). **Results** mtDNA copy number in the case group was significantly lower than the control group ($P<0.05$). Linear regression analysis showed that Hb in the control group value with the increase in mtDNA copy number increase ($P<0.05$); however, in the case group with the increase of Hb values lower mtDNA copy number($P<0.05$). **Conclusion** The patients in the high altitude polycythemia with lower mtDNA copy number may be used as genetics markers.

Key words: DNA, mitochondrial; polycythemia; copy number

长期慢性缺氧会引起红细胞增多,这有利于提高血流的携氧能力,改善组织氧供,是机体适应高原低氧环境有效的代偿性反应^[1]。当高原低压性缺氧引起的红细胞过度代偿性增生,男性血红蛋白浓度超过 210 g/L,此时就称为高原红细胞增多症^[2]。高原红细胞增多症由于全血容量绝对增加,再加上缺氧红细胞变形性降低,使得血液黏滞度增高,血流阻力加大,流动缓慢,血液高凝状态进一步加重组织器官淤血、缺氧,导致恶性循环。临床表现为多器官缺氧性损伤,尤以氧耗量较多的脏器,如脑、心、肺、肝等受累为重。高原红细胞增多症在海拔 3 000 m 以上高原发病率为 2.43%,并随海拔高度增加发病明显增多,是高原地区危害健康的常见病,该病有明显的易感性,但是目前对其易感性研究较少。线粒体是动物细胞内惟一含有 DNA 和蛋白质合成系统的细胞器,是氧传送链的生理终点站,是细胞氧耗的主要位点,其在低氧习服和适应中发挥着重要作用。高原红细胞增多症是 1 种低氧习服不良的慢性高原病,因而,线粒体在该病的发生中起着重要作用。线粒体呼吸链氧化磷酸化不但与线粒体 DNA(mtDNA)的序列变化密切相关,还与其拷贝数相关。mtDNA 拷贝数增加被认为是总线粒体呼吸功能的代偿,目前已经发现许多疾病的易感性与 mtDNA 拷贝数相关,本文探讨全血细胞 mtDNA 拷贝数变化

与高原红细胞增多症易感性的关联性^[3-4],并报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 高原红细胞增多症病例组标本为从平原移居 5 000 m 以上高原 1 年的成年男性,按照“青海标准”血红蛋白浓度超过 210 g/L 的个体,排除其他疾病可以诊断为高原红细胞增多症患者^[2]。对照组标本为从平原移居 5 000 m 以上高原 1 年血红蛋白浓度未超过 210 g/L 的个体,标本资料见表 1。样本收集过程遵循“赫尔辛基”宣言,得到收集对象知情同意,采集静脉血 2 mL(EDTA 抗凝)。

表 1 标本的基本资料

项目	病例组	对照组
总数(n)	37	42
年龄(岁)	21±1.67	19.86±1.53
血红蛋白浓度(g/L)	233±10.10	188.46±11.30

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与定量 采用全血基因组 DNA 抽提试剂盒提取血液基因组总 DNA,并用 Nanodrop 分光光度仪对 DNA 进行定量。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 mtDNA 的拷贝数 通过

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971426);国家科技支撑计划项目(2009BAI85B01)。 [△] 通讯作者,E-mail: gaoy66@yahoo.com。

NADH 脱氢酶亚基 1(ND1)来确定 mtDNA 的数量,选用 β -actin 作为本实验的看家基因,实时荧光定量 PCR 标准品为本室保存的人 β -actin 质粒。ND1 以及 β -actin 引物序列如表 2,实时荧光定量 PCR 反应体系为:SYRB 的 PCR 混合液(含 dNTP, Mg^{2+} , Taq 酶, PCR 缓冲液等)12.5 μ L, 灭菌水 10.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 10 pmol/L 的上、下游引物共 1 μ L。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s 读板, 40 个循环。温度从 50 $^{\circ}$ C 升高到 95 $^{\circ}$ C, 温度每升高 0.2 $^{\circ}$ C 读板 1 s, 进行融解曲线分析。分别通过计算目的基因与 β -actin 拷贝数的比值, 得出 mtDNA 的相对拷贝数^[5]。

表 2 实时荧光定量 PCR 扩增引物	
基因名称	引物序列(5'→3')
ND1	F: ATACAAC TACGCAAAGGCCCA
	R: AATAGGAGGCCTAGGTTGAGGT
β -actin	F: CGGGAAATCGTGC GTGACAT
	R: GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG

1.3 统计学处理 结果以数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 并通过 SPSS 12.0 统计软件进行独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 所得的统计检验均为双侧概率。

2 结 果

高原红细胞增多症组中, mtDNA 拷贝数为 0.1984 ± 0.1178 , 非常显著低于对照组的 0.4025 ± 0.1766 ($P < 0.05$)。通过线性回归分析发现, 在对照组中, 随 Hb 浓度的增加 mtDNA 拷贝数增加 ($P < 0.05$), 见图 1; 然而在高原红细胞增多症病例组中随 Hb 浓度的增加线粒体拷贝数降低 ($P < 0.05$), 见图 2。

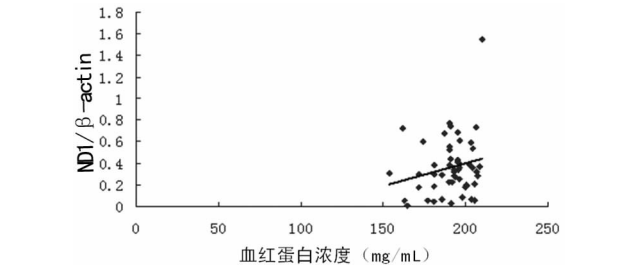


图 1 在对照组中 mtDNA 拷贝数与血红蛋白浓度的相关性分析

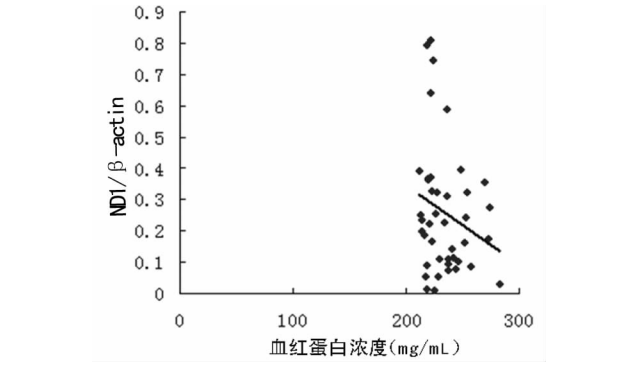


图 2 在高原红细胞增多症患者中 mtDNA 拷贝数与血红蛋白浓度的相关性分析

3 讨 论

中国是世界上高原面积最大、海拔最高、居住人口最多的国家, 海拔 3 000 m 以上的高原占国土面积的 1/4, 大约 7 000 万人口居住在海拔 2 500 m 以上的高原和高山地区。高原低压缺氧严重影响人体健康, 并可引起一类高原特发性疾病——高原病, 包括急性高原病和慢性高原病。高原红细胞增多症是高原居民中发病率最高、危害最大的慢性高原病。研究表明, 高原红细胞增多症发病具有明显的种族差异和个体易感倾向。欧洲人比安第斯山世居者更易患高原红细胞增多症, 世居高原的藏族人高原红细胞增多症的发病率也显著低于生活在相同海拔高度的世居安第斯人和移居高原的汉族人^[6]。目前普遍认为低氧引起促红细胞生成素合成与释放增多、刺激骨髓红系造血增强是高原红细胞增多症发病的关键环节^[7]。促红细胞生成素的合成与释放受多种因素调控, 其中组织供氧不足引起缺氧诱导因子-1(HIF-1)蛋白水平增加, 后者与缺氧反应元件结合引起促红细胞生成素 mRNA 表达增多, 促进促红细胞生成素的合成与释放, 是缺氧时促红细胞生成素生成增多的最重要因素^[8]。活性氧(ROS)可通过抑制脯氨酸羟化酶的活性增加 HIF-1 α 的蛋白水平, 这是细胞内调节 HIF-1 α 蛋白水平的一个重要机制。细胞内 90% 以上的 ROS 来自线粒体, 线粒体内膜呼吸链的复合体 I 和复合体 III 是线粒体生成 ROS 的最主要位点。提示线粒体功能异常在高原红细胞增多症的发病中发挥着重要的作用, 线粒体的功能实现不但与其结构完整性相关, 还与其 mtDNA 拷贝数有关, mtDNA 拷贝数增加被认为是总线粒体呼吸功能的代偿。本文发现在高原红细胞增多症的患者中 mtDNA 的数量较低, 这种低拷贝数的 mtDNA 可能导致线粒体的功能障碍, 当他们从平原移居高原时, 在高原习服适应的过程中出现高原习服不良, 进而发生高原红细胞增多症^[9]。

参考文献

[1] 罗勇军, 周其全. 玉树地震灾后救援过程中高原病防治的思考和思考[J]. 西南军医, 2010, 12(5): 952-954.

[2] 中华医学会高原医学分会. 关于统一使用慢性高原(山)病“青海标准”的决定[J]. 高原医学杂志, 2007, 17(1): 1-2.

[3] 周云丽. 乳腺癌线粒体 DNA 拷贝数改变的研究及意义[J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(5): 525-527.

[4] 许洪波. 喉癌线粒体 DNA 拷贝数的临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2006, 13(4): 219-222.

[5] 罗勇军, 刘昕. 定量 PCR 的标准品的制备及应用[J]. 重庆医学, 2005, 34(3): 414-415.

[6] 高钰琪. 高原军事医学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2005: 276-285.

[7] Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, et al. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene[J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88(13): 5680-5684.

[8] 罗勇军, 刘福玉, 张青, 等. 移居高原早期血浆同型半胱氨酸和多巴胺浓度的变化规律[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 313-314.