

• 临床检验研究论著 •

新疆阿克苏地区维族人群 DNA 酶 I 基因多态性及其与血脂、血糖的相关性研究^{*}

许 翔,李 莉,高 玮[△],李 佳

(上海交通大学附属第一人民医院,上海 200080)

摘 要:目的 探讨 DNA 酶 I (DNase I) 基因多态性在新疆阿克苏地区维族人群中的分布及其与血脂、血糖的关系。方法 选取新疆阿克苏地区维族健康体检者 148 例,提取外周血基因组 DNA,通过高温连接酶检测法(PCR-LDR)检测 DNase I 基因 A2317G(rs1053874)位点的基因型。酶法检测血清 TC、TG 及 FPG 水平;选择性遮蔽法测定 LDL-C、HDL-C 水平。结果 A2317G 位点 AA、AG、GG 基因型在新疆阿克苏地区维族健康人群中分布频率分别为 20.95%、54.05%和 25.00%,A、G 等位基因频率分别 47.97%、52.03%,这与其在中国汉族人群中的分布频率相似($P>0.05$),与蒙古人、日本人、韩国人、土耳其人、纳米比亚人、德国人明显不同($P<0.05$)。3 组基因型(AA/AG/GG)的血清 TC、TG、LDL-C、FPG 水平无统计学差异($P>0.05$),而 HDL-C 水平差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 DNase I 基因多态性具有种族异质性;在新疆阿克苏地区维族人群中其多态性与 HDL-C 水平有相关性。

关键词:脱氧核糖核酸酶 I; 多态现象,遗传; 血糖; 脂类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)22-2701-02

The study of deoxyribonuclease I gene polymorphism in uygur nationality of Aksu area in Xinjiang and effect on blood glucose and lipid^{*}

Xu Xiang, Li Li, Gao Wei[△], Li Jia

(Shanghai Jiaotong University Affiliated First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

Abstract:Objective To investigate the frequency of deoxyribonuclease I gene polymorphism in Uygur Nationality of Aksu area in Xinjiang and it's association with blood glucose and lipid. **Methods** Blood samples of 148 healthy Uygur Nationality of Aksu area in Xinjiang were collected. Genomic DNA were extracted from all blood samples, PCR-LDR reaction was employed to detect the A2317G(rs1053874) mutation of deoxyribonuclease I gene, genotype and allele distribution were analyzed. Meantime, blood glucose and lipid were measured in fasting state by biochemical methods. **Results** Three genotypes of A2317G, including AA, AG and GG, were detected in Uygur Nationality of Aksu area in Xinjiang, the frequencies were 20.95%, 54.05%, 25.00% respectively. The allele frequencies of A and G were 47.97% and 52.03% respectively, which were similar to the distribution frequency in the Chinese Han population($P>0.05$) and different from Mongolian, Japanese, Korean, Turks, Namibia and German($P<0.05$). Genotypes of A2317G were not associated with serum total cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein-cholesterol and fasting glucose, but were closely related to high-density lipoprotein cholesterol($P<0.05$). **Conclusion** The frequency of deoxyribonuclease I gene polymorphism could vary from different races, in Uygur Nationality of Aksu area in Xinjiang the genotypes were associated with high-density lipoprotein cholesterol.

Key words: Deoxyribonuclease I; polymorphism, genetic; blood glucose; lipids

DNA 酶 I (DNase I) 是一种核酸内切酶,能够以 Ca^{2+} 依赖的方式水解双链 DNA 生成 5' 磷酸末端和 3' 羟基末端^[1-3]。目前,已有多项研究证明 DNase I 参与细胞凋亡过程中核小体内的 DNA 降解^[1-3]。在人的 16 号染色体上已发现 6 个决定 DNase I 多态性的共显性等位基因(分别为 DNASE1 * 1, DNASE1 * 2, DNASE1 * 3, DNASE1 * 4, DNASE1 * 5 和 DNASE1 * 6)^[4]。其中, DNASE1 * 1 (A2317) 和 DNASE1 * 2 (G2317) 导致成熟 DNase I 第 222 位氨基酸在谷氨酰胺和精氨酸之间的转换,这种转换可能造成 DNase I 活性的改变^[5]。同时, DNase I 基因多态性具有显著的种族异质性^[6],中国汉族人群 A2317、G2317 等位基因分布频率与韩国人、土耳其人、纳米比亚人及德国人明显不同。本文应用高温连接酶检测法

(PCR-LDR) 检测新疆阿克苏地区维族人群 DNase I 基因 A2317G 位点的基因型,与文献中报道的其他种族比较,并分析不同基因型与血脂、血糖的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 7~12 月在新疆阿克苏地区第一人民医院体检中心体检的维族健康者 148 例,年龄(58.18±13.36)岁,男性占 67%,女性占 33%,均经过相关检查排除高血压、糖尿病、冠心病、高脂血症。入选者原籍分布于新疆阿克苏地区,彼此间无血缘关系且三代之内无与其他种族混血情况。由新疆阿克苏地区第一人民医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用 AxyPrep 血基因组 DNA 小量

^{*} 基金项目:上海市科委西部合作项目(0849580190)。 [△] 通讯作者, E-mail: gaowei1108@hotmail.com。

试剂盒提取外周血基因组 DNA,溶于 TE 缓冲液,−20 ℃ 保存。

1.2.2 引物及探针设计与合成 根据 Genebank 公布的 DNase I 基因序列(NT_010393.16),设计 A2317G 位点引物和 LDR 探针序列,由 Invitrogene 生物公司合成。

1.2.3 多态性位点基因型检测 采用 PCR-LDR 检测样本 DNA 目的序列。PCR 体系为 20 μL,包含 DNA 模板 1 μL(50 ng),缓冲液 2 μL,Mg²⁺ 0.6 μL(3 mmol/L),dNTP 2 μL(每种 2 mmol/L),Taq 酶 0.3 μL(1 U),H₂O 9.7 μL,Q 1 μL,引物 0.4 μL。反应的参数为:95 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 90 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 次循环,最后 72 ℃ 延伸 7 min。3%的琼脂糖凝胶电泳检测,观察 PCR 产物的效果,确定其作为模板在 LDR 反应中加入的量。LDR 反应体系为 10 μL,包含缓冲液 1 μL,探针混合物 1 μL(每种 12.5 pmol/μL),连接酶 0.05 μL(2 U),H₂O 6.95 μL,PCR 产物 1 μL(100 ng/μL)。反应循环参数为:95 ℃ 预变性 1 min,94 ℃ 变性 15 s,50 ℃ 反应 45 s,共 35 次循环。产物经测序电泳,结果运用 Gene-mapper 软件进行数据分析。

1.2.4 血脂、血糖检测 酶法检测血清 TC、TG 及 FPG 水平;选择性遮蔽法测定 LDL-C、HDL-C 水平。

1.3 统计学处理 全部数据采用 SAS(Version 8.0)软件进行统计分析。基因型和等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,种族间等位基因频率比较采用 χ^2 检验,各基因型血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C、FPG 比较采用 Kruskal Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DNase I 基因型在新疆阿克苏地区维族人群中的分布 DNase I 基因 A2317G 位点基因型和等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,具有群体代表性。AA、AG、GG 基因型分别占 20.95%、54.05%、25.00%,A 和 G 等位基因频率分别为 47.97%和 52.03%。

2.2 各种族 A2317G 位点等位基因频率比较 新疆阿克苏地区维族人群中 A2317G 位点等位基因频率分别为 0.48、0.52,与中国汉族人群分布频率无明显差异($P > 0.05$),与蒙古人、日本人、韩国人、土耳其人、纳米比亚人、德国人(数据来源于文献[11])比较,有统计学差异($P < 0.05$),见表 1。

表 1 新疆阿克苏地区维族人群 A2317G 位点等位基因频率与其他种族比较

种族	<i>n</i>	等位基因频率		<i>P</i> 值*
		A	G	
新疆阿克苏地区维族	296	0.48	0.52	—
中国汉族	804	0.53	0.47	0.140 0
蒙古人	440	0.57	0.43	0.016 0
日本人	228	0.58	0.42	0.024 0
韩国人	758	0.60	0.40	0.000 4
土耳其人	216	0.21	0.79	<0.000 1
纳米比亚	208	0.91	0.09	<0.000 1
德国人	798	0.30	0.70	<0.000 1

*:与新疆阿克苏地区维族人群 A、G 等位基因频率比较;—:无数据。

2.3 DNase I 基因基因多态性与血脂、血糖的相关性 A2317G 位点 3 组基因型(AA/AG/GG)的血清 TC、TG、LDL-C、FPG 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),而 HDL-C 水平差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 新疆维族人群 A2317G 位点不同基因型血脂、血糖比较($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

指标	AA	AG	GG	<i>P</i> 值
TC	4.13±1.09	3.66±0.94	3.83±0.68	0.052
TG	1.65±0.69	1.51±1.06	1.39±0.71	0.150
HDL	0.88±0.23	0.89±0.24	1.04±0.27	0.024
LDL	2.50±0.93	2.13±0.57	2.17±0.60	0.113
FPG	4.83±0.46	5.68±2.16	6.01±3.48	0.278

3 讨 论

DNase I 是一种最早发现于牛胰腺的核酸内切酶,参与细胞凋亡及坏死细胞染色质降解,并且与结直肠癌、胃癌、系统性红斑狼疮的发生密切相关^[7-9]。目前已发现 6 个决定 DNase I 多态性的共显性等位基因^[4]。其中,最近的研究报道,与其他心脏病(如心绞痛、心力衰竭、心脏瓣膜病)相比,携带 DNaseI * 2 者发生心肌梗死的比例明显升高^[10]。

本文应用 PCR-LDR 法检测新疆阿克苏地区维族人群 DNase I 基因 A2317G 位点的基因型,计算各基因型分布频率。结果显示,新疆阿克苏地区维族人群中 DNase I 基因 A2317G 位点主要基因型为 AG(54.05%),主要等位基因为 G2317(52.03%)。

将计算得到的等位基因分布频率与文献中报道的其他种族数据比较发现,新疆阿克苏地区维族人群中 A2317G 位点等位基因频率与中国汉族人群分布频率无统计学差异($P > 0.05$),与蒙古人、日本人、韩国人、土耳其人、纳米比亚人、德国人明显不同($P < 0.05$),说明 DNase I 基因多态性具有显著的种族异质性^[11]。

研究证实血清中 DNase I 活性的检测能够为不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高型心肌梗死的诊断提供有力依据^[12],且 DNase I 基因多态性与急性心肌梗死易感性存在相关性^[10,13],故本研究对该酶基因多态性与心肌梗死危险因素血脂、血糖的相关性进行分析。A2317G 位点 3 组基因型(AA/AG/GG)的血清 TC、TG、LDL-C、FPG 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),而 HDL-C 水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。HDL-C 是血清中的一组不均一的脂蛋白,主要由肝脏合成^[14],血清中低水平的 HDL-C 会增加冠状动脉疾病和心肌梗死的风险。研究证实,HDL-C 具有抗动脉粥样硬化的特性^[15],故 DNase I 可能通过调节 HDL-C 水平从而影响冠状动脉疾病和心肌梗死的发生、发展,这为 DNase I 导致心肌梗死的发病机制研究提供了线索。同时,也说明 DNase I 多态性与血清非 HDL-C 之间可能具有相关性。血清非 HDL-C 作为一个新的脂蛋白指标,尚未在临床中引起足够的重视,其包含了除 HDL-C 以外所有脂蛋白中的胆固醇颗粒,包括 LDL-C、中密度脂蛋白脂固醇(IDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C),对评价血脂代谢具有重要意义,能更全面地反映胆固醇的致动脉粥样硬化作用^[16]。

目前,DNase I 基因多态性在中国人群中的研究较少,本研究对新疆阿克苏地区维族人群 DNase I 基(下转第 2705 页)

CD3⁺ T 细胞增高和 CD4⁺ T 细胞减低,同时还伴有 CD8⁺ 增高。因此,导致其 CD4⁺/CD8⁺ 比值比 CMV、H1N1 感染患者下降得更明显,从而显示外周血异型淋巴细胞越高,其 T 胞亚群反应越强烈。由此说明外周血异型淋巴细胞增高与机体免疫功能反应具有一定的相关性。综合本研究的几项实验观察,尽管 H1N1 病毒是一种新型病毒,一度引起世界大流行,但它对机体免疫系统的影响与其他呼吸道病毒感染基本类似^[8-10]。由于本文所涉及的实验有一定的局限性,对 H1N1 病毒的认识还有待于进一步观察和研究。

参考文献

[1] 田文侠,姚忠强,邢雪梅,等. 异型淋巴细胞比例与 EB 病毒现症感染相关性分析[J]. 航空航天医药,2009,20(1):31.

[2] Yamashita N, Kimura H, Morishima T. Virological aspects of Epstein-Barr virus infections[J]. Acta Med Okayama, 2005, 59(6): 239.

[3] Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection-Mexico, March-April 2009 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009, 58(17):467-470.

[4] Centers for Disease Control and Prevention. Update: infections with a swine origin influenza A(H1N1) virus-United States and other countries[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009, 58

(16):431-433.

[5] Ho A, Fox R, Seaton RA, et al. Hospitalised adult patients with suspected 2009 H1N1 infection at regional infectious diseases units in Scotland e most had alternative final diagnoses[J]. J Infect, 2010, 60(1):83-85.

[6] 王玉兰,段连宁,刘晓莉,等. 异型淋巴细胞在感染性疾病中的观察[J]. 中国实验诊断学,2007,11(6):833-834.

[7] 刘莹,曹军皓,容东宁,等. 传染性单核细胞增多症异型淋巴细胞数量与 EB 病毒浓度的关系[J]. 实用医学杂志,2008,24(20):3582-3583.

[8] Cunha BA, Syed U, Mickail N, et al. Rapid clinical diagnosis in fatal swine influenza(H1N1) pneumonia in an adult with negative rapid influenza diagnostic tests(RIDTs):diagnostic swine influenza triad[J]. Heart Lung, 2010, 39(1):78-86.

[9] Ellis J, Iturriaza M, Allen R, et al. Evaluation of four real-time PCR assays for detection of influenza A(H1N1) v viruses[J]. Euro Surveill, 2009, 14(22):45-47.

[10] Cunha BA, Perez FM, Schoch P. Diagnostic importance of relative lymphopenia as a marker of swine influenza(H1N1) in adults [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(9):1454-1456.

(收稿日期:2012-05-09)

(上接第 2702 页)

因多态性的分析丰富了国内群体遗传学的资料,同时基因型与 HDL-C 水平相关性的发现为阐明 DNase I 导致心肌梗死的发病机制研究提供了线索。

参考文献

[1] Eulitz D, Mannherz HG. Inhibition of deoxyribonuclease I by actin is to protect cells from premature cell death[J]. Apoptosis, 2007, 12(8):1511-1521.

[2] Mannherz H, Peitsch MC, Zanotti S, et al. A new function for an old enzyme; the role of DNase I in apoptosis[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1995, 12(4):198-161.

[3] Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human deoxyribonucleases[J]. Biochemistry(Mosc), 2004, 69(6):587-601.

[4] Junko F, Hisakasu T, Kaori K, et al. Two deoxyribonuclease I gene polymorphisms and correlation between genotype and its activity in Japanese population[J]. Leg Med, 2007, 9(5):233-236.

[5] Fujihara J, Hieda Y, Takayama K, et al. Analysis of genetic polymorphism of deoxyribonuclease I in Ovambo and Turk populations using a genotyping method[J]. Biochem Genet, 2005, 43(11/12):629-635.

[6] Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K, et al. Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2004, 109(20):2398-2400.

[7] Yasuda T, Nadano D, Tenjo E, et al. Survey of the association of deoxyribonuclease I polymorphism with disease [J]. Hum Hered, 1993, 43(4):205-208.

[8] Tsutsumi S, Asao T, Nagamachi Y, et al. Phenotype 2 of deoxyribonuclease I may be used as a risk factor for gastric carcinoma

[J]. Cancer, 1998, 82(9):1621-1625.

[9] Tsutsumi S, Takeshita H, Yasuda T, et al. Association of DNase I phenotype 2 with colorectal carcinoma risk in Japanese populations[J]. Cancer Lett, 2000, 159(1):109-112.

[10] Kumamoto T, Kawai Y, Arakawa K, et al. Association of Gln222Arg polymorphism in the deoxyribonuclease I(DNase I) gene with myocardial infarction in Japanese patients[J]. Eur Heart J, 2006, 27(17):2081-2087.

[11] Fujihara J, Yasuda T, Shiwaku K, et al. Frequency of a single nucleotide(A2317G) and 56-bp variable number of tandem repeat polymorphisms within the deoxyribonuclease I gene in five ethnic populations [J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(10):1188-1191.

[12] Kousuke F, Yasuyuki K, Michihiko K, et al. Serum deoxyribonuclease I activity can be a useful diagnostic marker for the early diagnosis of unstable angina pectoris or non-ST-segment elevation myocardial infarction[J]. J Cardiol, 2012, 143(8):78-79.

[13] Kuribara J, Tada H, Kawai Y, et al. Levels of serum deoxyribonuclease I activity on admission in patients with acute myocardial infarction can be useful in predicting left ventricular enlargement due to remodeling[J]. J Cardiol, 2009, 53(2):196-203.

[14] 徐晓萍,王震炜,徐磊. 冠心病患者血浆高密度脂蛋白及其亚型的变化分析[J]. 检验医学,2006,21(4):320-323.

[15] Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of high-density lipoprotein; alterations in cardiovascular disease[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(4):251-268.

[16] 吴炯,郭玮,潘柏申,等. 冠状动脉病变时非高密度脂蛋白胆固醇的临床应用[J]. 检验医学,2006,21(4):316-319.

(收稿日期:2012-05-09)