

陕西老年人群与青年人群YNZ22位点多态性分布的对比分析*

舒 青, 张思河, 张素珍, 李军林

(第四军医大学医学遗传学与发育生物学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘 要] 应用PCR-Amp-FLP技术对75例陕西正常老年人群、94例老年动脉粥样硬化(AS)患者与71例陕西正常青年人群的YNZ22-VNTR(可变数目串联重复序列 variable number tandem repeats)位点进行多态性分析。结果显示,在正常青年人群中YNZ22位点共检测出29种基因型,10个等位基因,其片段大小在168~938 bp,杂合度为70.4%,多态信息量(polymorphism information content, PIC)为0.84;老年人群中YNZ22基因点共检测出20种基因型,9个等位基因,其片段大小在168~798 bp,杂合度为24%,多态信息量(PIC)为0.84,与青年群体的基因频率分布有显著差异;动脉粥样硬化(AS)人群中YNZ22基因点共检测出23种基因型,9个等位基因,其片段大小在168~728 bp,杂合度为24.47%,多态信息量为0.81。表明老年群体杂合度显著降低,最主要的是在基因型数目与大基因片段上老年群体与青年群体差异显著。YNZ22位点多态性改变或不稳定可能是引起衰老的原因之一。

[关键词] YNZ22基因; 老年人群; 衰老; 数目可变串联重复序列

[中图分类号] Q75

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0198-03

YNZ22位于17p13.3,与P53基因紧密连锁,是17p末端杂合性较高的多态标记位点,Wolf等^[1]发现该点是由70 bp重复单位多拷贝组成,其核心序列为TGGA GTCTCTGGGTGTCGTCTCA GAGT,呈现高度的可变数目串联重复多态性^[2]。可变数目串联重复序列(VNTR)与肿瘤之间研究较多的是YNZ22-VNTR位点,该位点常常被用作标记肿瘤杂合性丢失(Loss of heterozygosity, LOH)的研究,在各种肿瘤的研究中都发现YNZ22-VNTR和p53是常见的缺失区域,不同肿瘤的VNTR的缺失情况不一致,乳腺癌有60%在YNZ22-VNTR缺失,喉鳞癌被发现有15%的YNZ22-VNTR位点缺失。迄今国内外尚未见到关于VNTR-YNZ22位点多态性分布与衰老的相关性研究报道。本研究应用PCR-VNTR技术比较了陕西地区老年人群与青年人群YNZ22位点的基因多态性分布(由于动脉粥样硬化患者在老年人群中占有相当大的比例,所以将其单独列出),试图阐明青年群体与老年群体YNZ22位点可能存在的差异,以及这种遗传标记的不稳定性可能是衰老的原因之一。

无血缘关系的陕西老年人群外周血样75例(年龄64~74岁,均经冠状动脉造影或血管多普勒超声查证无狭窄或粥样斑块);无血缘关系的动脉粥样硬化的陕西中老年人群外周血样94例(年龄50~60岁,其中心肌梗死62例,余32例均经冠状动脉造影证实有狭窄或血管多普勒超声发现有粥样斑块);无血缘关系的青年人群外周血样71例(年龄18~30岁)。标本由西京医院血库和唐都医院心内科提供。

1.2 方 法

常规酚/氯仿法提取外周血白细胞DNA。PCR引物:5'-CGAAGA GTGAA GTGCA CAGG-3'和5'-CACA GTCTTTA TTCTTCA GCG-3'(赛百盛公司)。总反应体积为30 μ L,内含dNTP 200 μ mol/L,引物各25 pmol/L, Taq DNA聚合酶(华美生物工程公司)2 U,模板DNA约5 μ g, 5 μ L Buffer缓冲液, Mg²⁺ 1.8 μ L,石蜡油30 μ L。PCR程序:97 变性7 min, 95 4 min中加Taq酶, 55 退火1

* [收稿日期] 2002-12-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39700165)

[作者简介] 舒 青(1962-),女,河北唐山人,副教授,主要从事动脉粥样硬化的分子生物学研究。

m in, 72 延伸 2 m in, 然后循环 30 次(循环条件为 94 变性 45 s, 55 退火 45 s, 72 延伸 60 s), 循环后 72 延伸 10 m in (PCR 仪为 PE 公司 480 型)。扩增产物在 2 % 琼脂糖凝胶电泳后, 以 100 bp DNA Ladder(华美生物工程公司)为标准判型。在紫外检测仪下观察并照像。

1.3 数据处理统计

基因型及等位基因频率用直接算法, 并按 Hardy-W einberg 平衡原理确认样本的群体代表性; 组间基因型及等位基因频率差异用 χ^2 检测; 观察杂合度(heterozygosity observed, HO)和多态信息量(polymorphism information content, PIC), 按 Cooper 等^[3]的公式计算。

2 结果与分析

2.1 陕西正常老年人群 YN Z22 位点等位基因的多态性

75 例陕西正常老年人群中检测出 YN Z22 位点 9 个等位基因, 20 种基因型。片段大小在 168~ 798 bp, 依据重复单位重复次数不同将等位基因依次命名为 A 1, A 2, A 3... (A 为 allele 缩写)。基因频率在 0.013 3~ 0.260 0, 最常见的等位基因是 A 4, 未见的是 A 9, A 11, A 12(表 1)。检测出的 20 种基因型中, 最常见的是 A 4/A 4, 其次是 A 1/A 1、A 2/A 2, 杂合度为 24.0%, 多态信息量(PIC)为 0.84。图 1 中 5~ 8 为老年标本的扩增产物。

表 1 陕西正常青年人群、老年人群及老年动脉粥样硬化群体的 YN Z22 位点等位基因频率

等位基因 A llele	长度/bp Length	老年人群 Old		青年人群 Youth		动脉粥样硬化群体 AS	
		条带数 NOR	频率 Frequency	条带数 NOR	频率 Frequency	条带数 NOR	频率 Frequency
A 1	168	26	0.173 3	21	0.147 9	61	0.320
A 2	238	23	0.153 3	17	0.119 7	32	0.170
A 3	308	21	0.140 0	11	0.077 5	24	0.130
A 4	378	39	0.260 0	40	0.281 7	31	0.160
A 5	448	16	0.106 7	19	0.133 8	18	0.100
A 6	518	14	0.093 3	5	0.035 2	14	0.070
A 7	588	5	0.033 3	10	0.070 4	5	0.030
A 8	658	2	0.013 3	3	0.021 1	2	0.010
A 9	728	0	0.000 0	0	0.000 0	1	0.005
A 10	798	4	0.026 7	0	0.000 0	0	0.000
A 11	868	0	0.000 0	2	0.014 1	0	0.000
A 12	938	0	0.000 0	14	0.098 6	0	0.000
HO		0.240		0.704		0.245	
PIC		0.84		0.84		0.81	

2.2 陕西动脉粥样硬化老年人群 YN Z22 位点等位基因的多态性

94 例陕西动脉粥样硬化老年人群中检测出 YN Z22 位点 9 个等位基因。片段大小在 168~ 728 bp, 基因频率在 0.005 3~ 0.324 5, 最常见的等位基因是 A 1, 少见的是 A 9(表 1)。检测出的 23 种基因型中, 最常见的是 A 1/A 1, 其次是 A 2/A 2、A 4/A 4, 杂合度为 24.5%, 多态信息量为 0.81。

2.3 陕西青年人群 YN Z22 位点等位基因的多态性

71 例陕西青年人群中检测出 YN Z22 位点 10 个等位基因。片段大小在 168~ 938 bp, 基因频率在 0.014 1~ 0.281 7, 最常见的等位基因是 A 4, 未见的是 A 9, A 10(表 1)。检测出的 29 种基因型中, 最常见的是 A 4/A 4, 其次是 A 1/A 4、A 4/A 5, 杂合度为 70.4%, 多态信息量为 0.84。图 1 中 1~ 4 为青年标

本扩增产物。

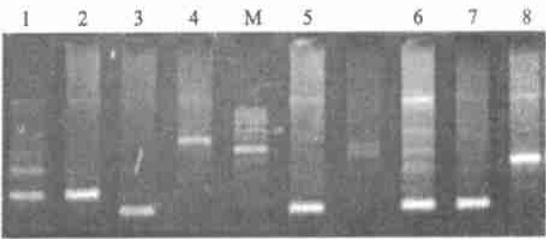


图 1 YN Z22-VN TR 位点 PCR 扩增产物

M. Marker; 1~ 8 PCR 扩增产物

Fig. 1 Products of PCR of YN Z22-VN TR locus

M. Marker; 1~ 8 Products of PCR

2.4 陕西正常老年人群与青年人群 YN Z22 位点等位基因的多态性分布比较

对检测出的对应的等位基因的频率分布统计分

析表明,正常老年人群与青年人群之间有极显著差异($\chi^2=30.76, P<0.01$, 利用NOSA 软件计算)。老年群体杂合度显著降低,在基因型数目与大基因片段方面老年群体与青年群体差异极显著。正常老年人群与动脉粥样硬化老年人群之间有显著差异($\chi^2=17.7371, P<0.05$)。

3 讨 论

数目可变的串联重复序列是人类基因组内具有高度多态的遗传标记,重复序列拷贝数通常有一定的范围,超过这个范围,基因将变得不稳定,表现出病症。拷贝数改变可发生在减数分裂过程中,不稳定性表现在世代间的拷贝数改变;或拷贝数改变发生在有丝分裂过程中,不稳定性表现在同一个体不同组织DNA 呈现长度不同的多条杂交带。近年来,在多种肿瘤中均发现有DNA 不稳定现象的存在,有研究认为与肿瘤的产生有关^[4,5]。YN Z22 基因是17p 末端杂合性较高的多态遗传标记位点,并与Miller-Dieker 综合症密切相关。由于其位于抑癌基因p53 近侧,并与之连锁,故常用于肿瘤杂合性丢失的研究,间接提示抑癌基因p53 的突变情况。

Deka 等^[6]在印度的Kachari 人、加拿大Dogrib 地区的印第安人、巴布亚新几内亚的高地人及德国北部的高加索人中,共检测出YN Z22 位点15 种不

同等位基因,杂合度从54%到89%。Gene 等^[7]在西班牙加泰罗尼亚人中检测出14 种不同的等位基因,56 种基因型,杂合度为81.35%。Harashima 等^[2]在日本人中检测出10 个不同的等位基因,杂合度为83.5%。Laszik 等^[7]在来自布达佩斯的高加索人中检测出13 个不同的等位基因,51 种基因型,杂合度为80%。

本研究对陕西地区71 例青年汉族人群YN Z22 VNTR 多态分布的分析结果表明,该位点高度多态性,共检出10 种等位基因片段,基因型有29 种,PIC 为0.84,可提供信息量大,与其他种族比较有一定的差异。与老年群体比较发现,老年群体等位基因及基因型种类减少,分布范围缩小,杂合度显著降低,未见大等位基因A11 和A12 的出现。基因频率分布与青年组比较,差异显著。老年动脉粥样硬化群体与一般老年群体基因分布差异更为显著,其峰值左移,A4→A1,重复片段降低。这种改变可能会随着年龄的增加而逐渐增多,某些人由此患上所谓的老年性疾病。根据衰老学说中的“差错灾难学说”:在DNA-RNA-蛋白质遗传信息传递的每一步骤上,一旦发生错误,都可形成具有缺陷的蛋白质或酶分子,日积月累,使细胞功能明显降低,导致细胞衰老和死亡,这个结果可能为衰老的“差错灾难学说”提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Wolf P K, Nakamura Y, White R. Molecular characterization of a spontaneously generated new allele at a VNTR locus: no exchange of flanking DNA sequence[J]. *Genomics*, 1998, 3: 347.
- [2] Harashima N, Ota M, Katsuyama Y, et al. The allele frequency distribution at VNTR locus D17S5 (YN Z22) in a Japanese population sample[J]. *Nippon Hoigaku Zasshi*, 1996, 50(4): 237- 240.
- [3] Cooper D N, Schmidtke J. DNA restriction fragment length polymorphism and heterozygosity in the human genome[J]. *Hum Genet*, 1984, 66(1): 1- 16.
- [4] Halling K C, Harper J, Moskaluk C A, et al. Origin of microsatellite instability in gastric cancer[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(1): 205- 216.
- [5] Vassilakis D A, Sourvinos G, Markatos M, et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160: 1729- 1762.
- [6] Deka R, De Croo S, Yu L M, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YN Z22) in four ethnically defined human populations[J]. *Hum Genet*, 1992, 90(1- 2): 86- 90.
- [7] Gene M, Huguet E, Sanchez Garcia C, et al. Suitability of the YN Z22 (D17S5) VNTR polymorphism for legal medicine investigations in the population of Catalonia (Spain) [J]. *Int J Legal Med*, 1995, 107(4): 222- 224.
- [8] Laszik A, Weisser H, Keresztray L, et al. Allele frequencies for the VNTR locus D17S5 (YN Z22) in Hungary [J]. *Int Legal Med*, 1999, 112(5): 336.

(下转第 204 页)

- [3] 徐卫东, 王成焘. 新型人工骨盆的研制与临床应用的初步报告[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(7): 422- 424
- [4] 李涤尘, 吴永辉. 人工生物活性骨骼的快速制造方法研究[J]. 中国机械工程, 2000, 11(增刊): 102- 104
- [5] 钱西汉, 王成焘. 一种特种假体的 CAD/CAM 系统[A]. 卢秉恒, 唐一平. 21 世纪新产品快速开发技术[C]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2000. 266- 279
- [6] 黄信新, 王秀媛. 实时图像轮廓抽取算法研究[J]. 计算机应用, 2001, 2(3): 46- 50
- [7] 赵荣椿. 数字图像处理导论[M]. 西安: 西北工业大学出版社, 2000. 195- 200
- [8] 张旭丽. 两种基于空间域聚类分析的彩色图像分割方法比较[J]. 贵州工业大学学报, 2000, 30(2): 75- 88
- [9] 王怀群. 二值图像的细化[J]. 无锡轻工业大学学报, 2001, 20(3): 315- 318
- [10] 吕凤军. 数字图像处理编程[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999. 132- 135

Research on RP-oriented bone CT image processing

L I Zhan-li, YAO Guo-peng, NI Jun-feng

(Department of Computer Science and Technology, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054, China)

Abstract: The extraction of bone's contours is the base of bone's 3D-reconstruction and RP prototype. According to the features of bone's CT images and the demand of RP, the paper gives a method in which the filtration, binarization, bone's contour extraction and vectorization is done orderly. Theoretical analysis and experimental study have been done for each step. In bone's CT image processing, the media-filter method is feasible, and the Ostu's method with maximum variance between two classes is more suitable for binary image processing.

Key words: image processing; CT image; contour extraction; rapid prototyping

(上接第 200 页)

Analysis on genetic polymorphism of YN Z22 VN TR in old and youth population

SHU Qing, ZHANG Si-he, ZHANG Su-zhen, L I Jun-ling

(Department of Medical Genetics, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: The polymorphism at YN Z22-VN TR locus was studied by PCR-Amp-FLP in 71 cases of Youth, 94 cases of atherosclerosis and 75 cases of normal old people of Shaanxi. Results show that: 29 genotypes and 10 alleles ranging from 168 bp to 938 bp were detected in the 71 normal youth subjects; 20 genotypes, 9 alleles ranging from 168bp to 798bp were revealed in normal old people of Shaanxi. The heterozygosity of YN Z22 was 0.24, P < 0.04; 23 genotypes, 9 alleles ranging from 168 bp to 728 bp were revealed in atherosclerosis cases. The heterozygosity of YN Z22 was 0.24, P < 0.081. There is obvious difference in distribution of allele frequency in two groups (Old and Youth); and the heterozygosity of old people decreases obviously. There is obvious difference in the number of genotypes and large alleles in two groups. Our results suggest that instability of YN Z22 locus can be related to senility.

Key words: YN Z22 gene; old population; senility; variable number tandem repetition