

HUMARA 多态性与男性动脉粥样硬化的关系*

舒 青, 冯 蕾, 张素珍

(第四军医大学 医学遗传学和发育生物学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘 要] 应用多聚酶链式反应对 96 例老年 AS 患者及 92 例非 AS 老年人 HUMARA-STR 位点进行多态性分析。结果表明: ① 在 HUMARA 位点重复单位 CAG, 对照群体片段大小 280~445 bp, 重复次数为 $N = 23 \sim 77$, 杂合度为 83%, 多态信息量为 0.76。② AS 人群中 HUMARA 位点片段大小 220~445 bp, 重复次数为 $N = 2 \sim 77$, 杂合度为 89%, 多态信息量为 0.80。③ 将男性的 AS 组与对照比较差异显著; AS 组男性与女性比较差异显著。

[关键词] HUMARA 基因; 动脉粥样硬化; 遗传标记

[中图分类号] Q 75

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0083-04

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 导致的心脑血管疾病是当今人类死亡的首位原因, 是环境与遗传共同作用的结果, 属于多基因遗传。目前已从癌基因、抗癌基因、载脂蛋白、血管紧张素原基因等多个方面对动脉粥样硬化发病的遗传因素进行了分析^[1]。但是男性人群心血管发病率较绝经前同龄阶段女性明显为高, 即使考虑其他发病危险后, 男性性别仍是一个独立的心血管疾病发病的危险因子, 至今为止原因不清。那么 AS 是否由于雄性激素受体敏感性差异所致? 迄今为止未见相关报道。本研究应用 PCR-STR 技术, 比较了陕西地区男性老年动脉粥样硬化人群与非动脉粥样硬化人群 HUMARA 位点等位基因多态性分布, 试图阐明 HUMARA 成为动脉粥样硬化群体中理想遗传易感性标准的可能性。

1 材料和方法

1.1 材 料

无血缘关系的动脉粥样硬化的陕西中老年人外周血样 96 例, 年龄 60~50 岁 (男 74 人, 女 22 人), 其中心肌梗死 64 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。无血缘关系的非 AS 老年人外周血样 92 例, 年龄 62~74 岁 (男 53 人, 女 39 人), 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, 标本均

为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'-GTGCGCGAA GTGA TCCA GAA-3' 及 5'-TGTGGGACGCAACCTCTCTC-3' (西安美联公司合成)。总反应体积为 30 μ L, 内含 dNTP 200 mmol/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 ng, 3 μ L Buffer 缓冲液, Mg^{2+} 1.8 μ L, 石蜡油 30 μ L。PCR 程序: 97 $^{\circ}$ C 变性 7 min, 95 $^{\circ}$ C 4 min (加 Taq 酶), 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 进入循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 30 次后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min (PCR 仪为 PE 公司 480 型)。扩增产物在 8 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 160 V 电泳 4 h, 在紫外检测仪下观察并照相, 以 PBR 322/M SP I 为 Marker。

1.3 数据处理

基因型及等位基因频率用直接算法, 并按 Hardy-Weinberg 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 (PIC), 按下列公式计算:

$$PIC = 1 - \sum x_{i0}^2$$

* [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。

2 结果与分析

2.1 老年人群 HUMARA 基因多态性

测序确定该位点的 STR 的重复单位 CA G, 检测 92 例陕西正常老年人群 HUMARA 的片段大小 280~445 bp, 重复次数 23~77, 高峰在 310 bp, 将其男女组进行比较差异不显著 ($\chi^2 = 14.583, P = 0.148$)。

2.2 AS 人群 HUMARA 基因多态性

对 96 例陕西动脉粥样硬化老年人群的检测发现, HUMARA 的片段大小 220~445 bp, 重复次数

2~77, 高峰在 310~320 bp, 将其男女组进行比较发现差异显著 ($\chi^2 = 17.235, P = 0.028$)。

2.3 非 AS 人群与 AS 人群 HUMARA 基因多态性比较

男性动脉粥样硬化人群与男性对照人群的基因频率分布比较差异显著 ($\chi^2 = 21.907, P = 0.005$)。女性动脉粥样硬化人群与女性对照人群的基因频率分布差异不显著 ($\chi^2 = 6.772, P = 0.661$) (图 1)。而 AS 组男性与女性比较差异显著 ($\chi^2 = 17.235, P = 0.028$) (图 2), 正常组男性与女性比较差异不显著。

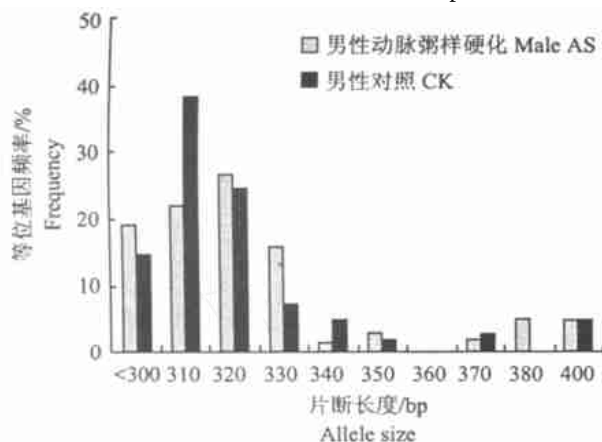


图1 男性动脉粥样硬化与对照 HUMARA 位点的多态分布

Fig 1 Polymorphism distribution of HUMARA gene STR in male AS and control

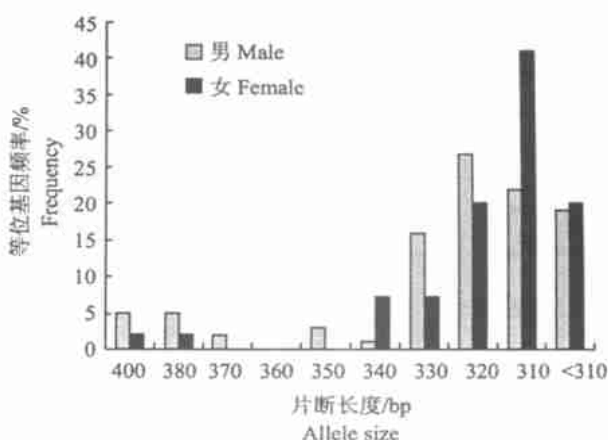


图2 动脉粥样硬化男性与女性的 HUMARA 位点的多态分布

Fig 2 Polymorphism distribution of HUMARA gene STR in male AS and female AS

3 讨论

动脉粥样硬化发生发展过程中包含许多病理环节, 如内皮损伤、脂质沉积、单核及淋巴细胞浸润、免疫反应、平滑肌细胞及细胞外基质增殖、血栓形成等。至今对其原发因素和发病机制仍不十分清楚, 但普遍认为病因不止 1 个, 而是由多因素共同作用引起的。近几年, 国内外对此进行了研究^[2], 发现在男性人群中内源性血浆睾酮水平和血浆高密度脂蛋白 (HDL) 浓度成反比; 外源性睾酮可引起脂蛋白代谢异常, 低密度脂蛋白 (LDL) 水平升高, HDL 水平降低, 血小板和主动脉血栓素 A₂ 受体密度增加, 促进血小板聚集和血管收缩, 这些都是 AS 产生的促进因素。在细胞培养和动物试验中发现^[3], 睾酮具有促进 AS 形成的作用, 但是临床研究^[4]发现, 男性冠心病发病与个体间血浆睾酮水平的差异无关。两种研究结果产生了矛盾, 这是否是由于 AS 病例选取不

够严格所致。因为 AS 可由多种因素引发, 如原发高血脂、原发高血压、糖尿病等, 因此在病例选取时应把这些因素排除。其次是否是由于 AS 患者的雄性激素受体对睾酮的敏感度不同所致, 而与睾酮水平无关, 这还需进一步研究。

雄性激素受体为一种配体依赖性调节蛋白, 它由 1 条肽链组成, 其分子从 N 端至 C 端分为 N 端区、DNA 结合区及雄激素结合区 3 个结构域。HUMARA 与雄激素结合后, 通过与核中特定 DNA 序列——雄激素反应成分调节靶基因的表达产生生物效应^[5,6]。HUMARA 是介导雄激素作用的关键大分子, 雄激素—受体复合物与 DNA 结合, 雄激素才可发挥其生理作用^[7]。雄性激素受体基因 (HUMARA) 位于 Xq11-12, 在外显子 1 存在两个微卫星位点: (CA G)_n 和 (CCN)_n N:A 或 G^[8]。微卫星 DNA 是指 2~3 个核苷酸的串联重复序列, 这类重复序列具有高度的变异性, 并且倾向于不稳定, 其重

复次数的改变可导致这些基因的表达变异, 往往会引起细胞的癌变(称之为动态突变), 是一类新的遗传标记^[9, 10]。研究结果发现^[11~13], 在前列腺癌的 HUMARA 的微卫星多态发生了改变。Quade 等^[14]在散布的腹平滑肌瘤中也发现有 HUMARA 基因的甲基化出现。Park 等^[15]和 Gonzalez 等^[16]在研究早期与晚期的双侧卵巢癌和膀胱癌的雄性激素受体基因中发现其微卫星的不稳定性。

本文对 AS 群体及对照群体 HUMARA 基因的多态性进行检测, 发现老年群体中该位点的重复单位 CAG 重复次数 $N = 23 \sim 77$, 片段大小 280~445 bp, 杂合度为 83%, PIC 为 0.76, 表明该位点可提供信息量较高, 是理想的遗传标记。男性 AS 群体 HU-

MARA 基因的多态性分布与对照比较, 分布峰值右移(重复次数增多), 分布范围增宽; 男性 AS 群体与女性 AS 群体多态性分布比较, 男性峰值增大, 大片段的分布增多, 重复次数的偏低或偏高可导致基因不稳定, 使其表达功能受影响, 由此推测该位点的基因频率分布改变可能对男性易患 AS 具有一定的作用。女性 AS 群体 HUMARA 基因的多态性与对照比较, 无显著性差异; 正常男性与女性 HUMARA 基因的多态性分布比较, 差异不显著, 推测女性患动脉粥样硬化的原因与男性不同, 与 HUMARA 基因的多态性无关, 因此雄性激素受体在男性动脉粥样硬化形成中的作用值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Khaw K T, Barrett-Connor E. Endogenous sex hormones, high density lipoprotein cholesterol, and other lipoprotein fractions in men[J]. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11(3): 489- 494
- [2] Matusda K, Ruff A, Morinelli T A, et al. Testosterone increases thromboxane A₂ receptor density in rat aortas and platelets[J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(3): H887- 893
- [3] Adam M R, William S J K, Kaplan J R. Effects of androgen on coronary artery atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(5): 562- 570
- [4] Hautanen A, Mänttari M, Manninen V, et al. Adrenal androgens and testosterone as coronary risk factors in the Helsinki Heart Study[J]. *Atherosclerosis*, 1994, 105(1): 191- 200
- [5] Jenster G, Vander K H, Van C D. The human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localization[J]. *Mol Endocrinol*, 1991, 5(10): 1396- 1404
- [6] Simental J A, Sar M, Lane M V. Transcriptional activation and nuclear targeting signal of the human androgen receptor[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(1): 510- 518
- [7] Lu Jian, Wu Jia-yu, Zhang Jin-shan, et al. Studies on the androgen receptors in external genital skin fibroblasts from patients with testicular feminization syndrome[J]. *Chin J Med Genet*, 1995, 12(5): 275- 278
- [8] Donnelly A, Kozman H, Gedeon A K, et al. A linkage map of microsatellite markers on the human X chromosome[J]. *Genomics*, 1994, 20(3): 363- 370
- [9] Chamberlain N L, Driver E D, Miesfeld R L. The length and location of CGA trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(15): 3181- 3186
- [10] Komori S, Tanaka H, Sakata K, et al. Shortage of glutamine (CAG) homopolymeric repeats suppresses the expression of the androgen receptor in familial cases with complete androgen insensitivity syndrome[J]. *Gynecol Endocrinol*, 1998, 12(1): 1- 8
- [11] Platz E A, Giovannucci E, Dahi D M, et al. The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998, 7(5): 379- 384
- [12] Schoenberg M P, Hakim i J M, Wang S P, et al. Microsatellite mutation (CGA₂₄₋₁₈) in the androgen receptor gene in human prostate cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 198(1): 74- 80
- [13] Irvine R A, Yu M C, Ross R K, et al. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(10): 1937- 1940
- [14] Quade B J, McClachlin C M, Wright V S, et al. Disseminated peritoneal leiomyomatosis[J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(6): 2153- 2166
- [15] Park T W, Felix J C, Wright T C. X chromosome inactivation and microsatellite instability in early and advanced bilateral ovarian carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(21): 4793- 4796
- [16] Gonzalez Z M, Ruppert J M, Tokino K, et al. Microsatellite instability in bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(23): 5620- 5623

Relationship between HUMARA polymorphism and atherosclerosis

SHU Qing, FENG Lei, ZHANG Su-zhen

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

Abstract: The polymorphism at HUMARA-STR locus was studied by PCR in 96 cases of atherosclerosis and 92 cases of normal old people of Shaanxi. The result shows that: ① Repeat base of HUMARA loci is CAG. Many A alleles ranging from 280 bp to 445 bp were revealed in normal old people of Shaanxi. The number of repeat base is range from 23 to 77. The heterozygosity of HUMARA was 83%, $P < 0.05$; ② Many A alleles ranging from 220 bp to 445 bp were revealed in AS. The number of repeat base is range from 2 to 77. The heterozygosity of HUMARA was 89%, $P < 0.05$; ③ There are obviously difference in distribution of allele frequency between male AS and male control. There are obviously differences in distribution of allele frequency between male AS and female AS.

Key words: HUMARA gene; atherosclerosis; genetic marker

“猕猴桃新品种选育及栽培贮藏技术研究” 获 2002 年陕西省科技进步二等奖

由西北农林科技大学园艺学院刘旭峰副研究员率领的课题组完成的“猕猴桃新品种选育及栽培贮藏技术研究”项目获 2002 年陕西省科技进步二等奖。该项目针对猕猴桃主栽品种风味偏酸、货架期较短、品种结构单一、缺乏早熟品种以及生产栽培和贮藏保鲜中存在的诸多问题,经过 8 年的艰苦工作,取得了以下主要成果: (1) 选育出过风楼 3 号等 3 个优良品系,其中过风楼 3 号成熟早、品质优、耐贮藏、货架期长、外形美观、综合性状好,填补了陕西缺乏优质早熟美味猕猴桃品种的空白,实现了猕猴桃品种的早、晚搭配。(2) 从引进品种中筛选出海瓦德等 4 个有望在陕西应用的品种,其中海瓦德品种栽培研究突破了国内结果迟、产量低、果个小的问题,解决了该品种实现优质、丰产的关键技术,使陕西调整猕猴桃品种结构,继续保持竞争优势有了可靠的品种保障。(3) 在平衡施肥、科学灌水、合理修剪、人工授粉、合理负载、贮藏技术等单项研究的基础上,结合陕西猕猴桃生产实践提出高产优质综合栽培技术方案和低温贮藏技术方案,在产区建成高标准优质示范基地 950 多公顷,成龄园产量超过 $30\,000\text{ kg/hm}^2$,比普通园增产 30%,优质果率达 80%,带动了陕西省猕猴桃产业水平的提高,历年累计增产鲜果 162 170 t,应用低温贮藏技术,累计贮藏猕猴桃果实 192 738 t。(4) 建成种质资源圃 33.3 hm^2 ,收集国内外优良品种、品系 55 个,有经济价值的种类 11 个,收集的种类、品种数量在全国各省区中居于前列,成为陕西新品种培育的原始材料库。

该项目经专家鉴定后一致认为总体研究达到国内领先水平。其创新点如下: (1) 早熟美味猕猴桃品种选育填补了我国目前缺乏优质早熟美味猕猴桃品种的空白; (2) 海瓦德品种的栽培技术研究在国内有所突破,为陕西猕猴桃品种更新换代找到了品种基础。

围绕该项目共发表研究论文 7 篇,出版专著 2 部,协助制定地方标准综合体(含标准 9 个)1 套。

(屈李纯 供稿)