人 2 号染色体一个高血压病易感基因的精细定位*

何 鑫[①] 朱鼎良[①**] 庄启南[②] 刘晓明[②③]
熊墨淼[④] 王谷亮[①] 赵 彦[②] 周怀发[①]
张伟忠[①] 茅守玉[①] 黄 薇[②]

(①上海第二医科大学附属瑞金医院, 上海市高血压研究所, 上海 200025; ②国家人类基因组南方研究中心, 上海 201203; ③复旦大学遗传学研究所, 上海 200433; ④ Human Genetic Center, The University Texas-Houston, Health Science Center, Houston, TX7722, USA)

摘要 运用荧光标记-半自动基因扫描分型技术, 在中国上海人群中对一个高血压病易感基因位点进行精细定位. 结果显示: 2 号染色体从 157.16 ~ 162.46 cM 这一 5.3 cM 的范围内, 出现了一个持续的 LOD 值高峰. 该范围内所有 LOD 值均在 2.0 以上, 对应 *P* 值均小于 0.001. 最大 LOD 值为 2.24 (*P* = 0.00067, 160.52 cM). 单点分析峰值在 D2S151(LOD = 1.86, NPL Z = 2.60). 另外, 有多个位点存在传递不平衡. 最终, 将该易感基因定位于 2q14-q23(D2S151-D2S2370), 这与 Stoll 等人用比较基因组法将大鼠数量性状位点(QTL)定位于人类基因组所得结果一致. 以上结果提示, 在中国上海人群中, 2 号染色体 2q14-q23 这一区域值得进一步研究.

关键词 高血压 遗传 基因

利用微卫星多态性进行全基因组扫描或染色体局部区域的精细定位, 是寻找疾病基因的一种常用方法[1]. 近年来, 由于该项技术的日趋成熟和不断完善, 单基因疾病的基因定位进展迅速, 迄今已有 1000 多种疾病基因被定位, 100 多种疾病基因被克隆[2], 同时, 也使多基因疾病易感基因的定位成为可能. 目前, 多色荧光标记微卫星引物已经商品化, 用 300 多对覆盖整个基因组的微卫星引物, 选择大样本的家系或同胞对, 对高血压病(essential hypertension, EH)进行连锁分析, 有可能将 EH 相关基因位点定位到某一染色体区域内, 分辨率可达 10 cM. 进一步用区域内多态标记进行精细定位, 如能将范围缩小到 1 cM 以内, 则可直接大规模 DNA 测序, 分离并克隆出高血压相关基因[3].

在以前的研究中, 通过全基因组扫描和染色体局部扫描, 已经初步将一个高血压病相关基因定位在 2 号染色体 D2S112-D2S2370 这一约 25 cM 的范围内[4,5]. 本研究选择该区域内的 14 个微卫星 DNA 位点作为遗传标记, 在中国上海人群中进行遗传连锁分析, 探求该区域与中国人 EH 发病的关系.

2000-08-10 收稿, 2000-11-14 收修改稿
* 国家"863"高科技资助项目(批准号: 102-10-02-03 和 Z19-01-03-01A)
** 联系人(E-mail: f97075@guomai.sh.cn)

1 对象与方法

1.1 研究对象

所有研究对象均为长期居住在上海地区的汉族居民. 由上海市高血压研究所 DNA 库提供标本, 包括 106 个 EH 核心家系共 474 例, 其中 EH 患者 417 例, 受累同胞对共 777 对. 先证者的入选标准为: (ⅰ) 偶测血压(取 3 次非同日坐位血压的平均值)收缩压≥150 mmHg (1 mmHg = 1.33322×10^2 Pa)和/或舒张压≥95 mmHg, 或接受降压药物治疗至少 1 年; (ⅱ) 发病年龄在 20 岁以后、60 岁以前; (ⅲ) 经过详细临床检查, 排除继发性高血压; (ⅳ) 至少还有一个同胞受累.

1.2 方法

1.2.1 临床及生化检查 取清晨空腹静脉血 10 mL, 加 2% EDTA 抗凝液 1 mL 混匀. 常规生化方法测定空腹血糖和血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、血浆尿素氮(BUN)、血肌酐(Cr)水平. 用低渗法分离白细胞. 基因组 DNA 的抽提参见文献[6].

1.2.2 微卫星 DNA 的选择 在 2 号染色体 D2S112-D2S2370 这一约 25 cM 的范围内, 选择 14 个微卫星 DNA 标记进行遗传连锁分析. 所有微卫星引物及其序列均选自 Genome Database(http://gdbwww.gdb.org/)以及 Marshmed Genetics(http://www.marshmed.org/genetics/), 引物由上海生工公司合成, 并在每个上游引物的 5′端标记荧光. 各微卫星位点之间的平均距离小于 2 cM.

1.2.3 荧光标记 PCR 技术扩增各微卫星多态性位点 反应在 PE-9700 扩增仪上进行. 反应体系 5 μL, 含基因组 DNA 20 ng, 3.0 mmol/L $MgCl_2$, dNTP 各 200 mmol/L, 引物各 0.2 pmol, 0.5 μL 10 × Buffer, hotstart Taq 酶 0.2 U. 95℃初变性 15 min 后, 进行以下 15 个循环: 94℃变性 0.5 min, 63℃复性 1 min(以后每个循环降低 0.5℃), 72℃延伸 1.5 min. 然后再做以下 23 个循环: 94℃变性 0.5 min, 63℃复性 1 min, 72℃延伸 1.5 min.

1.2.4 应用 Genescan 和 Genotyper 软件进行基因型分析 取 0.5 μL PCR 产物, 0.15 μL 内标 GenScan-350 及 0.7 μL 甲酰胺混匀, 94℃变性 3 min 后迅速置冰上, 在 ABI377 测序仪上进行电泳. 所用凝胶为 5%变性聚丙烯酰胺凝胶. 最后用 Genescan 2.1 和 Genotyper 2.0 软件, 对电泳产物进行基因型分析.

1.2.5 统计学分析 由于是多基因疾病的研究, 其遗传模式不清楚, 因此, 我们采用 GENEHUNTER 软件对各家系作两点和多点非参数连锁分析, 同时也采用参数连锁分析和传递不平衡检验(TDT)加以验证. 根据 Lander 和 Kruglyak 提出的标准, $P < 0.0001$ 为明显连锁, $0.0001 < P < 0.01$ 为提示连锁, 而 $0.01 < P < 0.05$ 为名义上发现连锁[7].

2 结果

2.1 两点参数和非参数连锁分析(表 1)

D2S112, D2S151, D2S2324, D2S2299, D2S142, D2S284 这 6 个位点的 LOD 值都大于 1.0, 其对应 P 值均小于 0.01, 达到了提示连锁的标准. D2S114, D2S151 这 2 个位点 NPL Z 值均在 2.4 以上, 其对应 P 值均小于 0.01, 其中 D2S151 这 1 个位点, LOD 值达到 1.86($P = 0.0017$), NPL Z 值达到 2.60($P = 0.0059$).

表 1　精细定位各位点情况及单点分析结果

位点	位置/cM	单点连锁分析结果			
		LOD 值	*P* 值	NPL Z 值	*P* 值
D2S112	141.62	1.38	0.0058	1.86	0.034
D2S114	142.83	0.78	0.029	2.46	0.0084
D2S1334	145.08	− 0.56	–	1.83	0.036
D2S2196	146.15	0.08	0.26	1.45	0.075
D2S2385	147.40	− 0.60	–	0.76	0.22
D2S127	149.89	0.57	0.052	2.16	0.017
D2S132	150.96	0.74	0.032	1.95	0.028
D2S2313	151.50	0.70	0.036	1.87	0.033
D2S151	152.04	1.86	0.0017	2.60	0.0059
D2S2324	153.66	1.73	0.0024	2.21	0.015
D2S2299	157.55	1.42	0.0053	1.83	0.036
D2S142	161.26	1.15	0.01	1.61	0.056
D2S284	161.81	1.35	0.0063	1.69	0.048
D2S2370	165.06	−0.57	–	0.29	0.38

2.2　多点参数和非参数连锁分析(图 1)

由图 1 可见, 在从 157.16 ~ 162.46 cM 这一 5.3 cM 的染色体范围内, 出现了一个连续的 LOD 值高峰, 该范围内 LOD 值均在 2.0 以上, 对应 *P* 值均小于 0.001. 在 160.52 cM 处, 有一最大 LOD 值, 为 2.24(*P* = 0.00067).

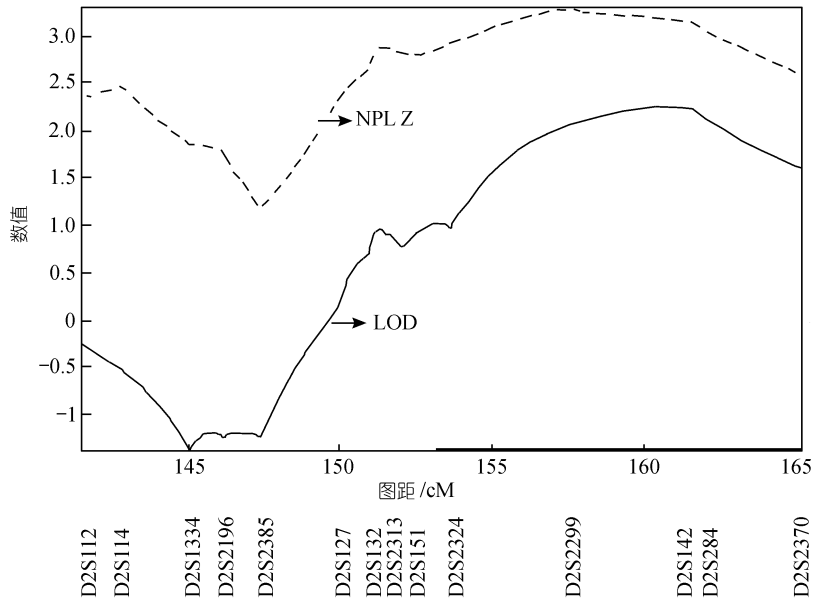

图 1　多点参数和非参数连锁分析结果

虚线部分为 NPL-Z 值曲线, 实线为 LOD 值曲线. 横坐标轴上的粗线部分(D2S151-D2S2370)为 Stoll 等人[8]用比较基因组学定位的区域, 与本实验定位的区域有 13 cM 的重合

从 154.44 ~ 162.14 cM 这一 7.7 cM 的染色体范围内, 出现了一个连续的 NPL Z 值高峰, 该范围内 NPL Z 值均在 3.0 以上. 在 157.55 cM 处有一最大 NPL Z 值, 为 3.27(*P* = 0.00086).

2.3 TDT 检验

TDT 检验是一种传递不平衡检验, 其前提条件是: 对一个相关等位基因 A1 和无关等位基因 A2 的杂合子双亲而言, 把 A1 传递给受累子代的可能性要大于 A2. 当两位点连锁不平衡的程度较高时, 用该法检验连锁的效能也较高[9,10]. 由表 2 可以看出, 有多个位点存在传递不平衡($P < 0.05$), 其中 D2S2324 这一位点离 D2S151 仅 1.62 cM, TDT 检验的 P 值为 0.00006.

表 2 TDT 检验结果

位点	等位基因	传递	不传递	χ^2	P 值
D2S112	2	28	13	5.49	0.019
D2S114	4	11	22	3.67	0.056
D2S1334	7	17	3	9.80	0.002
D2S2196	12	3	0	3.00	0.083
D2S2385	10	0	8	8.00	0.005
D2S127	12	30	14	5.82	0.016
D2S132	12	10	18	2.29	0.13
D2S2313	16	13	4	4.76	0.029
D2S151	14	23	10	5.12	0.024
D2S2324	5	1	19	16.2	0.00006
D2S2299	6	1	6	3.57	0.059
D2S142	4	31	11	9.52	0.002
D2S284	4	2	0	2.00	0.16
D2S2370	9	11	4	3.27	0.071

3 讨论

随着“人类基因组计划”的迅猛发展, 多基因疾病易感基因的定位与克隆已经成为可能. 国际上已有学者开始致力于高血压病易感基因或血压调节基因的研究, 并取得可喜进展. Krushkal 等人[11]采用不一致同胞对法, 对美国人群中 55 个家系的 472 个个体进行全基因组扫描, 发现多个位点与血压调节有关. 其中 D2S1334(145.08 cM 处)这一位点与收缩压连锁($P = 0.0353$). Xu 等人[12]采用类似方法, 在中国安徽人群中进行全基因组扫描, 发现有 5 个位点的最大 LOD 值超过 2.0, 但未能在 2 号染色体上发现阳性位点.

本研究选择的 14 个遗传标记, 平均距离小于 2 cM, 而单点连锁分析的峰值为遗传标记 D2S151, $LOD_{D2S151} = 1.86$($P = 0.0017$); 多点连锁分析的峰值在 160.52 cM 处, LOD 值为 2.24($P = 0.00067$). 美国人群中的 D2S1334 这一位点在我国的人群中也得到了证实, NPL Z 值为 1.83 ($P = 0.036$), TDT P 值为 0.002. 我们的多点分析结果, 从 157.16 ~ 162.46 cM 这一 5.3 cM 的染色体范围内, 出现了一个连续的 LOD 值高峰, 该范围内 LOD 值均在 2.0 以上, 对应 P 值均小于 0.001. 因此, 推断 2q14-q23 这一染色体区域(D2S151-D2S2370)可能有一个或多个基因参与了中国上海人群 EH 的发病过程.

最近, Stoll 等人[8]将人类基因组与大鼠相比较, 将大鼠基因组中与血压调节有关的数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)定位于人类基因组的相应位置, 其中有一个区域就定位在 2q14-q23, 该区域与我们最后定位的区域有 13 个 cM 的重合(D2S151-D2S2370).

在 2q14-q23 这一染色体区域, 有多个基因参与物质代谢、膜信号传导、细胞生长分化等过程, 我们认为可能是 EH 的易感基因之一, 包括 3-磷酸甘油脱氢酶、电压依赖性钠通道蛋

白、钠钾 ATP 酶 γ 亚单位、高血糖素等基因. 有些文献已经报道了这些物质或其基因多态性与血压调控的关系[13~15]. 我们也正在开展对这些候选基因单核苷酸多态性(SNPs)的研究, 预计在不久的将来, 这一 EH 易感基因必将被识别出来.

致谢　感谢国家人类基因组南方研究中心陈竺教授对本课题的关心和大力帮助.

参　考　文　献

1 Edwards A, Civitello A, Hammond H A, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrametric tandem repeats. Am J Hum Genet, 1991, 49(4): 746 ~ 756

2 Collins F S, Guyer M S, Chakravarti A. Variations on a theme: Cataloging human DNA sequence variation. Science, 1997, 278 (5343): 1580 ~ 1581

3 朱鼎良. 高血压基因研究进展. 中华医学杂志, 1999, 79(9): 650 ~ 651

4 Zhu D L, Xiong M M, Chu S L, et al. Genome-wide scanning for loci linked to essential hypertension in Chinese families. Am J Hum Genet (Supplement), 1999, 65: A455

5 Wang H Y, Xiong M M, Chu S L, et al. Fine scale mapping confirming the linkage of a region on chromosome 2 with essential hypertension in China. Am J Hum Genet (Supplement), 1999, 65: A16

6 Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. Biotechniques, 1991, 11(3): 298 ~ 300

7 Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nature Genet, 1995, 11(3): 241 ~ 247

8 Stoll M, Kwitek-Black A E, Cowley J, et al. New target regions for human hypertension via comparative genomics. Genome Research, 2000, 10 (4): 473 ~ 482

9 Spielman R S, McGinnis R E, Ewens W J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet, 1993, 52(3): 506 ~ 516

10 顾鸣敏. 多基因遗传病遗传分析的研究进展. 国外医学遗传学分册, 1998, 21: 60 ~ 65

11 Krushkal J, Ferrell R, Mockrin S C, et al. Genome-wide linkage analyses of systolic blood pressure using highly discordant siblings. Circulation, 1999, 99(11): 1407 ~ 1410

12 Xu X, Rogus J J, Terwedow H A, et al. An extreme-sib-pair genome scan for genes regulating blood pressure. Am J Hum Genet, 1999, 64(6): 1694 ~ 1701

13 Feldman R D, Tan C M, Chorazyczewski J. G protein alterations in hypertension and aging. Hypertension, 1995, 26(5): 725 ~ 732

14 Fuh M M T, Shidh S M, Wu D A, et al. Abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in patients with hypertension. Arch Intern Med, 1987, 147(6): 1035 ~ 1038

15 Ferrandi M, Tripodi G, Salardi S, et al. Renal Na^+, K^+ ATPase in genetic hypertension. Hypertension, 1996, 28(6): 1018 ~ 1025