

论著·临床研究

内皮型一氧化氮合酶基因多态性在直立不耐受患儿核心家系中传递情况的研究

熊振宇¹ 韩紫岩² 憨贞慧¹ 张曦¹ 高喜琴¹ 盖勇¹ 廉婕¹

(1. 开封市儿童医院心内科,河南 开封 475000; 2. 河南大学药学院,河南 开封 475004)

[摘要] 目的 近年研究发现内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)基因启动子区 T786C 和第7外显子上的 G894T 变异与心血管疾病发病有关,本研究通过对等位基因 T786C 及 G894T 与直立不耐受(orthostatic intolerance,OI)患儿连锁不平衡传递情况分析,探讨 eNOS 基因多态性与 OI 发病可能的相关性。方法 采用聚合酶链反应(PCR)扩增、酶切等分子生物学技术,对符合 OI 诊断标准的 60 例先证者及其生物学父母组成的核心家系,测定 eNOS/T786C、G894T 的基因型,进行 eNOS 基因多态性 T786C、G894T 与 OI 相关性分析和传递不平衡检验(transmission disequilibrium test,TDT)。结果 eNOS/T786C 及 G894T 多态性与 OI 患儿均存在连锁不平衡传递(均 $P < 0.05$)。结论 eNOS/T786C 及 G894T 与 OI 的发病存在相关性。[中国当代儿科杂志,2012,14(12):960-963]

[关键词] 一氧化氮合酶;基因多态性;直立不耐受;儿童

[中图分类号] R596 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)12-0960-04

A family-based transmission disequilibrium test of polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in children with orthostatic intolerance

XIONG Zhen-Yu, HAN Zi-Yan, HAN Zhen-Hui, ZHANG Xi, GAO Xi-Qing, GAI Yong, LIAN Jie. Department of Cardiology, Kaifeng Children's Hospital, Kaifeng, Henan 475000, China (Email: kfxzhy@126.com)

Abstract: Objective Recent studies have found that the variation of G894T on the region of T786C and 7th exon promoted by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene is associated with cardiovascular disease. This research explored possible correlations between eNOS gene polymorphisms and orthostatic intolerance (OI) in children through linkage disequilibrium analysis between eNOS genes T786C and G894T and OI. **Methods** PCR, Macrorestriction Map and other molecular biotechnology were used to determine the genotypes of eNOS/T786C and G894T in 60 OI probands and their parents. Correlation analysis and transmission disequilibrium test (TDT) between T786C, G894T and OI were performed. **Results** There was linkage disequilibrium of eNOS/T786C and G894T gene polymorphisms in the occurrence of childhood OI ($P < 0.05$). **Conclusions** eNOS genes T786C and G894T may be associated with the pathogenesis of OI. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(12):960-963]

Key words: Endothelial nitric oxide synthase; Gene polymorphism; Orthostatic intolerance; Child

直立不耐受(orthostatic intolerance,OI)是指直立而生的一系列症状,当平卧后症状可以缓解,在欧美称为直立不耐受,日本学者则称其为直立调节障碍(orthostatic dysregulation)^[1],该病在儿童期发病并不少见,可导致患儿精力不集中,记忆力减退而影响学习,还可造成身体伤害,反复发生的 OI 症状对患儿的身心健康将产生严重影响^[2],但是该病常被临床医师误诊为慢性焦虑或恐慌性疾病。关于该病的发病机理尚不清楚。据其血流动力学反应模式将 OI 分为血管迷走性晕厥(vasovagal syncope,VVS)、体位性心动过速综合征(postural orthostatic tachycardia syndrome,POTS)和直立性低血压(orthostatic hypotension,OH)^[3],POTS 是 OI 的主要类型^[4-5],而儿童晕厥的绝大多数(约 80% 左右)为 VVS^[6]。研究发现,OI 存在家族聚集现象,并受社会、心理因素的影响^[7-10],因此寻找在 OI 核心家系中传递的基因多态性,对疾病的诊断将有重要意义。

内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)基因多态性的一种亚型,近年来人们发

[收稿日期]2012-05-16;[修回日期]2012-06-30
[基金项目]河南省开封市科学技术攻关项目(编号:080349)
[作者简介]熊振宇,男,大学,主任医师。

现 eNOS 基因启动子区 T786C 和第 7 外显子上的 G894T 变异与成人 POTS 有关^[5,11-12],石赟等^[13]研究了 eNOS 基因 G894T 多态性与儿童 VVS 发病的关系。但关于 OI 患儿核心家系的 eNOS 基因多态性研究国内未见报道。本研究对 eNOS/T786C 及 G894T 在 OI 患儿核心家系中传递情况进行研究,旨在探讨这些遗传多态因子与 OI 之间可能的相关性,以期为该病的早期诊断和风险评估提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2009 年 2 月至 2010 年 10 月在我院就诊的 OI 患儿(OI 的诊断符合 2009 年中华医学会儿科分会心血管学组制定的儿童晕厥诊断指南^[3])60 例及其生物学父母 120 例(父、母各 60 例),收集 60 个核心家系共 180 人。将所有核心家系成员分成两组,即 OI 组:男 28 例,女 32 例,平均年龄 10.3 ± 2.5 岁;父母组:平均年龄 37.0 ± 4.3 岁,每例患儿家长均被告知研究的目的,同意配合并提供相关信息。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 的提取 采集静脉血 5 mL,经溶膜液/蛋白酶 K 消化,常规提取 DNA。

1.2.2 引物的制备 利用 primer 5.0 软件设计 eNOS 基因的引物,由北京赛百盛生物技术公司合成,序列如下:T768C 基因片段的上游引物:5'-AAG-GCAGGAGACAGTGGATGGA-3',下游引物:5'-CCCAGTCAATCCTTTGGTGCTCA-3';G894T 基因片段的上游引物:5'-CAGATGACACAGAACTACAA-3',下游引物:5'-GAGTCTGACATYAGGGTATCC-3'。

1.2.3 PCR 反应 采用聚合酶链反应(PCR)扩增基因片段,PCR 反应体系为 PCR 反应液共 40.0 μ L,PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环,再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将 PCR 产物置于 2% 琼脂糖凝胶中电泳分离,DNA 酶切反应:T786C 扩增物以限制性内切酶 NaeI 酶切;G894T 扩增物以限制性内切酶 Ban II 酶切。酶切产物通过溴乙锭染色法染色,在紫外灯下进行基因分型,T786C 基因型:受检者 DNA 经 PCR 扩增产物为 338 bp 的片段,若在此片段中存在 786T $\rightarrow$ C 位点突变,则产生限制性内切酶 NaeI 的酶切位点,酶切后得到大小为 195 bp 和

143 bp 的两个片段,基因型为 CC 型;若不含 C 位点突变,则无限制性内切酶 NaeI 的酶切位点,酶切后只得到 1 个大小为 338 bp 的片段,基因型为 TT 型;若酶切后既得到 338 bp,又得到 195 bp 和 143 bp 片段者,基因型为 TC 型。G894T 基因型:野生 GG 基因型用限制性内切酶 Ban II 酶切 PCR 阳性产物后,得到 163 bp、85 bp 两条片段;突变杂合子 TG 基因型含有 894G $\rightarrow$ T 点突变,酶切 PCR 阳性产物后,得到 248 bp、163 bp、85 bp 共 3 条片段;突变纯合子 TT 基因型经酶切后仅有 248 bp 1 条片段。

1.2.4 Hardy-Weinberg 平衡法则的吻合度检测

OI 患儿组与其生物学父母组 eNOS 基因多态性 T786C、G894T 的基因型频率总体分布比较差异是否有统计学意义,以判断选择的个体是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。

1.2.5 eNOS 基因多态性与 OI 的 TDT 分析 为避免因不同分层人群、遗传背景不同的人群混杂而造成的虚假联系,保证遗传背景完全相同,本研究采用传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT)以考察杂合子基因型父母资料,舍弃患儿基因型与父母基因型一致的家系资料,以免引入偏差。用配对四格表 McNemar 检验做独立判断^[14] $\chi^2 = (b-c)^2 / (b+c)$, $V=1$,其中 b 表示含有标记基因的杂合子父母传递标记基因的例数,c 表示含有标记基因的杂合子父母未传递标记基因的例数,V 表示自由度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件处理,遗传学资料采用 TDT 检验,用 Hardy-Weinberg 平衡检验分析基因型频率。计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡法则的吻合度检测

患儿组与父母组 eNOS/T786C 的基因型频率总体分布差异无统计学意义($\chi^2 = 3.634$, $P > 0.05$);同样,患儿组与父母组 eNOS/G894T 的基因型频率总体分布差异亦无统计学意义($\chi^2 = 0.496$, $P > 0.05$)。提示选择的个体符合 Hardy-Weinberg 平衡。见表 1,表 2。

表 1 OI 患儿组及父母组 eNOS/T786C 等位基因频率分布 [n(%)]

组别	例数	基因型频率			χ^2 值	P 值
		TT	TC	CC		
父母组	120	14(11.7)	62(51.7)	44(36.6)	3.634	>0.05
患儿组	60	9(15.0)	22(36.7)	29(48.3)		

表 2 OI 患儿组及父母组 eNOS/G894T 等位基因频率分布 [n(%)]

组别	例数	基因型频率			χ^2 值	P 值
		TT	TG	GG		
父母组	120	25(20.8)	61(50.8)	34(28.4)	0.496	>0.05
患儿组	60	11(18.3)	29(48.4)	20(33.3)		

2.2 eNOS 基因多态性与 OI 的 TDT 分析

从 60 个完整家系中排除不能提供信息的纯合子家系,携带 T786C 剩下 54 个杂合子父母家系,共 75 个杂合子亲代,其中有 48 个 T 等位基因和 27 个 C 等位基因传给了患病的子女($\chi^2 = 5.880, P < 0.05$);携带 G894T 剩下 49 个杂合子父母家系,共 68 个杂合子亲代,其中有 43 个 G 等位基因和 25 个 T 等位基因传给了患病的子女($\chi^2 = 4.765, P < 0.05$)。提示 eNOS/T786C 及 G894T 多态性与 OI 患儿均存在连锁不平衡传递,从而推测等位基因 T786C、G894T 与 OI 患儿核心家系存在相关性。见表 3。

表 3 eNOS/T786C、G894T 与 OI 的 TDT 分析

	含杂合子的 完整家系数	杂合子 亲代数	传递	观测的 传递数	χ^2 值	P 值
T786C	54	75	T	69 (48)	5.880	<0.05
			C	39 (27)		
G894T	49	68	G	56 (43)	4.765	<0.05
			T	42 (25)		

3 讨论

OI 有急性 OI 和慢性 OI 两种,急性 OI 通常表现为晕厥,即因急性脑血流灌注不足引起的短暂意识丧失,不能维持站立位而跌倒,有时也可表现为晕厥先兆,并不出现意识的完全丧失;慢性 OI 的主要症状有:经常性的头晕、头痛、乏力、视物模糊、眼前发黑、心悸、胸闷、长出气、颤抖、面色苍白、出冷汗、焦虑、晕车晕船,直立时腹痛、指端紫绀,因直立而致头痛、脸红、意识改变和睡眠障碍等,有些患儿坐位时也会出现上述症状^[15]。OI 的发病可能与直立后

的生理性血流调节障碍有关^[15],直立体位对人体是一种基础的刺激,需要足够的血容和迅速有效的血管和神经的代偿调节来维持正常的血压和意识,肌肉泵及腿部和臀部的肌肉收缩可使淤积在静脉系统的血液回流心脏,这是机体对抗静脉淤血的基础机制,神经血管的调节和体液因素也是血流调节的重要因素。

在众多候选基因中,eNOS 基因由于对血管调节的重要作用而倍受重视,人类 eNOS 基因定位于 7q35-36 区域,长约 21 kb,Morsy 等^[16]研究了 eNOS 基因第 4 内含子中可变串联重复序列(VNTR)多态性 4a/b,这段可变串联重复序列长 27 bp,为非编码序列,在基因调控中起一定作用,eNOS 基因 T786C、G894T 多态性与内皮细胞合成 NO、血压调节均密切相关,被认为与心血管疾病有关。近年人们发现 eNOS 基因启动子区 T786C 和第 7 外显子上的 G894T 变异与儿童 VVS、成人 POTS、高血压等心血管疾病发病有关^[13,17-18],多数学者认为,eNOS 基因多态性是影响 eNOS 合成 NO 的重要因素,直接决定体内内皮细胞合成 NO,从而影响动脉血压。G894T 被认为是与心血管疾病有关的 eNOS 基因多态性位点,由于 894 位碱基 G 突变成 T,导致相应蛋白产物第 298 位上的谷氨酸被替换成天冬氨酸(Glu298Asp)^[19],从而限制了内皮细胞合成 NO,影响体内 NO 水平。

Hyndman 等^[18]发现 eNOS/T786C 变异与高血压有明显相关性,携带 C/C 基因型人群有更高的收缩压水平,且患高血压的危险性亦增高,国内华琦等^[20]认为 T786C 的 C 等位基因与中国汉族人高血压相关,C 等位基因携带者可能通过减少内皮 NO 的释放而影响 eNOS 基因活性和 NO 水平。但也有相反报道,Garland 等^[17]2005 年在对美国成人 POTS 病人 eNOS 基因启动子 786T-C 及第 7 外显子 894G-T 基因多态性的研究发现,POTS 病人 eNOS 基因启动子 786T-C 的 C 等位基因及第 7 外显子 894G-T 的 T 等位基因突变频率明显少于正常对照。Yoon 等^[19]报道在 eNOS 基因外显子 7 处 894G-T 多态性中,携带 T 等位基因者血浆中 NO 和 NOS 的水平显著高于没有携带 T 等位基因者。

染色体上遗传位标与疾病位点间的距离较近,在传递过程中一起传递给子代,表现为共分离,即连锁不平衡(linkage disequilibrium),由于群体相关分析可能产生因群体分层而导致假阳性,近年来提倡用患者核心家系成员(双亲及同胞)作为相关分析对照,即 Spielman 创立的传递-连锁不平衡检验

(TDT)。在群体遗传学中,用于检验致病基因的方法很多,由于遗传异质的存在,遗传调查设计的不同,对研究结果的影响不容忽视,故本课题对 60 个核心家系中 eNOS/T786C、G894T 基因多态性的研究采用 TDT 检验,TDT 是基于寻找假定的致病等位基因由杂合子父母传递给患病子女的不平衡传递性,从而推测致病基因是否存在。本研究结果显示等位基因 C(786C)及 T(894T)与 OI 患儿均存在连锁不平衡传递,推测等位基因 T786C 与 G894T 与 OI 患儿核心家系存在相关性,突变基因 C(786C)及 T(894T)可能是 OI 的发病机制之一。

最近有研究发现^[9,21],β1 肾上腺素受体基因 Arg389Gly 与 VVS 有相关性,且与 VVS 临床分型中心脏抑制型更密切相关,G 蛋白 β3 亚型基因多态性 C825T 与 VVS 亦有相关性,进一步研究发现,位于 18 号染色体的 NEDD4L 基因的一个译码基因突变与高血压患者的体位性低血压发病危险有关^[22-23],说明 OI 的发病机制比较复杂,且与多种基因有关,要揭示 OI 的发病机制,还需要大样本、多中心的研究。相信随着集约化基因芯片的大规模应用,使同时对大样本和大批候选基因的筛选分型及其之间的相关分析成为可能,且在今后直接对临床的基因诊断及风险预测,甚而是基因治疗都会带来很好的前景。

[参 考 文 献]

[1] 田中英高. 起立性调节障碍[J]. 小儿科诊疗,2001,64(2): 160.
[2] 张凤文,廖莹,李雪迎,陈丽,金红芳,杜军保. 儿童体位性心动过速综合征美托洛尔和盐酸米多君治疗 118 例报告[J]. 中华儿科杂志,2011,49(6):428-432.
[3] 中华医学会儿科分会心血管学组,中华儿科杂志编辑委员会. 儿童晕厥诊断指南[J]. 中华儿科杂志,2009,47(2):99-100.
[4] 张清友,杜军保,李万镇. 体位性心动过速综合征的临床研究进展[J]. 中华儿科杂志,2010,48(1):36-38.
[5] Stewart JM, Medow MS, Minson CT, Taneja I. Cutaneous neuronal nitric oxide is specifically decreased in postural tachycardia syndrome[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(4): H2161-H2167.
[6] 张清友,杜军保,齐建光,韩玲,李万镇. 小儿心源性晕厥的临床特征分析[J]. 中华儿科杂志,2009,47(1):44-47.
[7] 熊振宇. 直立调节障碍的家族遗传特征[J]. 白求恩医学院学报,2008,6(2): 90-91.

[8] 熊振宇,韩紫岩,宋晨红. 直立调节障碍儿童心理因素的分析[J]. 河南大学学报医学版,2008,27(3): 64-66.
[9] 黄玉娟,包黎明,王健怡,黄敏. GNB3C825T 基因多态性与儿童血管迷走性晕厥相关性的初步研究[J]. 中华儿科杂志,2010,48(12):896-899.
[10] 袁鹤立,王成. 直立性低血压研究进展[J]. 国际儿科学杂志,2011,38(1):10-12.
[11] Keller NR, Robertson D. Familial orthostatic tachycardia[J]. Curr Opin Cardiol, 2006, 21(3): 173-179.
[12] Nussinovitch N, Nussinovitch M, Peleg E, Rosenthal T. 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in children with familial dysautonomia[J]. Pediatr Nephrol, 2005, 20(4): 507-511.
[13] 石赞,田宏,桂永浩,何岚. 一氧化氮和内皮型一氧化氮合酶与血管迷走性晕厥发病的关系[J]. 中国当代儿科杂志,2008,10(4):478-480.
[14] Spielman RS, McGinnis RE, Evens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)[J]. Am J Hum Genet, 1993, 52(3): 506-516.
[15] 杜军保,张清友. 儿童直立不耐受研究进展[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(4):241-244.
[16] Morsy MF, Kobayashi J, Nagasaka H, Kobayashi T, Senzaki H, Sasaki N, et al. Endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism and Kawasaki disease: a preliminary study[J]. Int Pediatr, 2003, 18(1): 36-40.
[17] Garland EM, Winker R, Williams SM, Jiang L, Stanton K, Byrne DW, et al. Endothelial NO synthase polymorphisms and postural tachycardia syndrome[J]. Hypertension, 2005, 46(5): 1103-1110.
[18] Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, et al. The T-786→C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension[J]. Hypertension, 2002, 39: 919-922.
[19] Yoon S, Shin C, Park HY, Moon J, Kim E, Kim HT, et al. Endothelial nitric oxide synthase genes associated with vessel stenosis in Korean population[J]. Clin Chim Acta, 2005, 353(1-2): 177-185.
[20] 华琦,李冬宝,皮林,陈海翎. 内皮型一氧化氮合酶基因 T786C 多态性与缬沙坦降压疗效的关系[J]. 高血压杂志,2004,12(4):331-334.
[21] 黄玉娟,王健怡,李锦康,沈捷,徐萌,黄敏. β1 肾上腺素受体基因多态性与小儿血管迷走性晕厥的相关性研究[J]. 临床儿科杂志,2010,28(2):156-159.
[22] 樊晓寒,王虎,吴海英,周宪梁,惠汝太. 内皮素-1 基因 5'非翻译区多态性与体位性低血压相关性研究[J]. 中国分子心脏病学杂志,2010,9(5):277-280.
[23] Luo F, Wang Y, Wang X, Sun K, Zhou X, Hui R. A functional variant of NEDD4L is associated with hypotension, antihypertensive response, and orthostatic hypotension [J]. Hypotension, 2009, 54(4): 796-801.

(本文编辑:邓芳明)