

· 临床研究 ·

贵州 3 个地域苗族人群 mtDNA 9 bp 序列缺失频率*

任凌雁, 何燕[△], 张婷, 王婵娟, 王欢, 官志忠, 单可人

(贵阳医学院分子生物学重点实验室, 贵阳 550004)

摘要:目的 分析贵州 3 个地域苗族人群线粒体 DNA COII/tRNA^{Lys}基因间小非编码 V 区串联重复序列 9 bp 缺失频率。方法 采用聚合酶链反应-聚丙烯酰胺凝胶法(PCR-PAGE)及 DNA 序列分析法进行检测。结果 从江邑沙、黔西沙井、威宁龙街等 3 个地域苗族人群缺失频率分别为 19.15%(9/47)、42.5%(17/40)和 29.55%(13/43); 邑沙苗族人群与沙井苗族人群 9 bp 缺失频率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 3 个地域苗族人群 mtDNA 9 bp 缺失基因频率较高, 不同地域苗族人群间缺失频率有一定差异。

关键词:线粒体 DNA; 遗传多态性; 苗族; 贵州

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)22-2586-02

Analysis on frequency of 9 bp deletion of mitochondrial DNA in Miao population in three geographical regions of Guizhou*

Ren Linyan, He Yan[△], Zhang Ting, Wang Chanjuan, Wang Huan, Guan Zhizhong, Shan Keren

(the Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To analysis the frequency of 9 bp deletion polymorphism of mitochondrial DNA(mt DNA) among Miao population in three geographical regions of Guizhou. **Methods** Polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis (PCR-PAGE) were used in the study of mtDNA 9 bp deletion polymorphism, DNA sequence was used to verify the results. **Results**

Each group who come from Basa, Shajin, Longjie in Guizhou, the frequency of 9 bp deletion of mtDNA value as 19.15%(9/47), 42.5%(17/40) and 29.55%(13/43). Short polymorphic frequency difference was statistically significant between Basa and Shajin groups($P < 0.05$). **Conclusion** The frequencies of 9 bp deletion of mtDNA are relatively high in Miao ethnic group in Guizhou. There are certain differences of the delegation frequencies among these groups.

Key words: mitochondrial DNA; genetic polymorphism; Miao ethnic group; Guizhou

贵州是一个多民族聚居的地区, 有 17 个世居少数民族, 其中苗族人口最多, 占全国苗族总人口的 50% 左右。苗族人群线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA) 9 bp 序列缺失标记可能对追踪该民族人群的亲缘关系和迁移路线有所帮助。因为 mtDNA 9 bp 缺失是一个非常价值的多态性位点, 其标准序列是 2 个串联重复的 9 bp 序列(CCC CCT CTA)^[1], 有 3 种突变型: 长型(标准序列前有 4 个 C 加入), 短型(仅有单拷贝 9 bp 序列, 即 9 bp 缺失), 3 型(有 3 拷贝 9 bp 重复)^[2]。研究发现, mtDNA 9 bp 缺失是亚洲人及起源于亚洲的人种的特征^[3], 其缺失频率呈现的地理趋势能很好地与史前该地区人类迁移路线相符, 现将贵州 3 个地域苗族人群 131 例男性的 mtDNA 9 bp 缺失频率的检测分析结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集来自贵州从江邑沙、黔西沙井、威宁龙街等 3 个地域苗族人群 131 例男性个体血样, 详见表 1。所选对象均为当地健康居民, 家系 3 代内为同一民族, 彼此之间无亲缘关系。采样符合知情同意原则。血样均为 EDTA-K₂ 抗凝, -70℃ 暂存至提取基因组 DNA。

1.2 DNA 提取、定量及标化 按常规酚-氯仿法抽提基因组 DNA, 溶于 TE; 紫外吸收法定量后取少量统一标化浓度为 50 ng/ μ L, -20℃ 保存备用。

1.3 mtDNA 9 bp 的 PCR 扩增及 PAGE 检测 依据 mtDNA

修订的剑桥标准序列(revised cambridge reference sequence, rCRS)^[4], 用软件 Primer Premier 5.0 设计引物 P₁/P₂(序列见表 2)进行 PCR 扩增。25 μ L PCR 反应体系组成为: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 4 \times dNTP(每种 2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.4 μ L, DNA 聚合酶 1.0 U, 模板 DNA 50 ng。PCR 循环条件: 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 30 次。PCR 产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染后观察结果。

表 1 3 个苗族人群样本概况

人群	n	采样地点	语系	语族
邑沙苗族	47	从江邑沙	汉藏语系	苗瑶语族
沙井苗族	40	黔西沙井	汉藏语系	苗瑶语族
龙街苗族	44	威宁龙街	汉藏语系	苗瑶语族

1.4 mtDNA 9 bp 分型结果测序验证 随机选取经 PCR-PAGE 技术检测为标准型和 9 bp 缺失短型的样本各 5 例, 用引物 P₃/P₄(序列见表 2)进行 PCR 扩增, 产物由北京鼎国昌盛生物技术公司完成序列测定。

2 结果

2.1 PCR 检测结果 经过 PCR-PAGE 检测, 131 例样本的 PCR 反应产物的电泳图谱中只检测到 2 种基因型, 分别为 109

* 基金项目: 贵州省科技厅社会发展攻关项目[黔科合 SY(2010)3001 号]; 贵州省科技厅基金项目[黔科合 J 字(2011)2119 号]; 贵州省科技厅基金项目[黔科合 SY(2012)3135 号]。作者简介: 任凌雁(1987~), 硕士研究生, 主要从事少数民族遗传多态性研究。△ 通讯作者, Tel: 13984878712; E-mail: annieheyan@gmc.edu.cn。

bp 和 100 bp(图 1), 分别对应标准型和 9 bp 缺失的短型。

表 2 引物序列及其他参数

引物	序列	温度 (°C)	产物片段 大小(bp)
P ₁	5'-GCC CGT ATT TAC CCT ATA-3'	58	109/100
P ₂	5'-GTA AAG AGG TGT TGG TTC-3'		
P ₃	5'-ACT TTC ACC GCT ACA CGA-3'	58	258/249
P ₄	5'-ATT TAG TTG GGG CAT TTC-3'		

产物片段大小分别为标准型、9 bp 缺失短型。

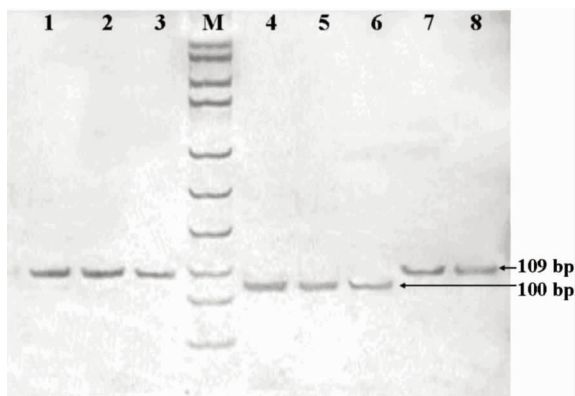
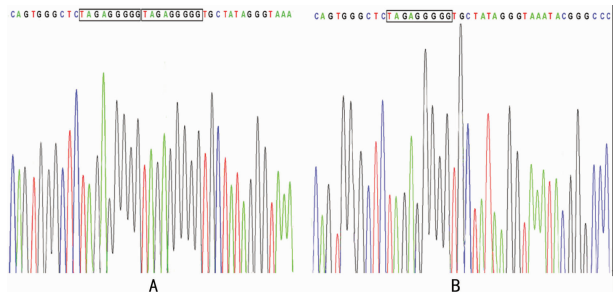


图 1 mtDNA region V PCR 产物的 PAGE 电泳图
M: DNA 标准分质量参照物, pUC18 DNA/MspI (501, 489, 404, 353, 242, 190, 147, 110, 89 bp); 1~3, 7~8: 标准型扩增产物; 4~6: 短型扩增产物。

图 1 mtDNA region V PCR 产物的 PAGE 电泳图

2.2 序列测定结果 结果显示: 标准型扩增产物的核苷酸序列与相对应的剑桥序列一致, 即存在 2 个串联正向重复的 9 bp 序列(CCC CCT CTA CCC CCT CTA), 而 9 bp 缺失短型扩增产物只有 1 个拷贝的 9 bp 序列, 即存在 9 bp 缺失。见图 2(A、B 均为反向测序图)。



A: 标准型(双拷贝 9 bp 重复); B: 短型(单拷贝 9 bp 重复)。

图 2 mtDNA Region V 区序列分析结果(反向测序)

2.3 mtDNA 9 bp 缺失频率 贵州岷沙、沙井、龙街 3 个地域苗族人群 mtDNA 9 bp 缺失频率见表 3。

表 3 贵州 3 个地域苗族人群 mtDNA 9 bp 缺失频率分布情况

地域	n	缺失个体	缺失频率(%)
从江岷沙	47	9	19.15*
黔西沙井	40	17	42.5
威宁龙街	44	13	29.55
总数	131	39	29.77

*: $P < 0.05$, 与黔西沙井苗族人群 mtDNA 9bp 缺失频率比较。

3 讨论

姚永刚等^[5]对中国多民族群体的研究发现, 其缺失频率由南向北、沿海向内陆呈现递减的梯度分布。不同地区不同民族的 mtDNA 9 bp 缺失频率是各异的。本研究的 3 个苗族人群的缺失频率与台湾的高山族(41.46%)^[5]相比较低, 与广州汉族的缺失频率相近(20.8%)^[6], 而较中原民族如河南汉族的缺失频率高(15.88%)^[7]。北方的一些少数民族, 如现代罗布人(8.3%)^[8]、维吾尔族(3.3%)^[9]、塔吉克族(1.43%)^[10] 缺失频率均比本研究的这 3 个民族低, 差异经统计学分析已达到显著水平($\chi^2 = 8.845, \chi^2 = 9.499, \chi^2 = 23.324, P < 0.05$), 同一地区的不同民族其 mtDNA 9 bp 缺失频率是有区别的, 如前期本课题研究贵州地区蒙古族(9.6%)、羌族(7.7%)^[11] 都低于本研究, 并且差异有统计学意义($\chi^2 = 8.280, \chi^2 = 10.094, P < 0.05$), 水族^[12] 与本研究的苗族平均缺失率相近, 而瑶族的缺失频率高达 58.2%^[13], 高于本文的苗族平均缺失频率, 差异有统计学意义($\chi^2 = 17.972, P < 0.05$); 不同地区的同一民族其 mtDNA 9 bp 缺失频率也各异, 广西苗族缺失频率为 33.01%^[14], 高于本研究, 但差异无统计学意义。而贵州不同地区的苗族缺失频率也是有所差别, 本文 3 个地区的苗族缺失频率就有所差异, 其中从江岷沙苗族与黔西沙井苗族的差异有统计学意义($\chi^2 = 5.623, P < 0.05$)。苗族历史悠久, 由于战争、政治、经济等原因, 历史上曾经历过大幅度、远距离、长时期的迁徙。自秦、汉时期有苗族先民进入贵州, 经过唐、宋、元、明、清千余年的流动和迁徙, 苗族的分布初步形成了今天的格局^[15]。世居苗族主要分布在黔、湘、滇、川、桂、鄂、渝等 10 个省区, 而贵州省已成为苗族的主要聚居区, 人口占全国苗族总人口数的 51.3%, 是全省少数民族中人口最多的民族。苗族有自己的语言, 属汉藏语系苗瑶语族苗语支。苗语分 3 大方言, 即东部方言、中部方言、西部方言。不同方言的人, 语言互不相通。贵州从江属中部方言的南部土语分支, 贵州黔西属西部方言川黔滇次方言, 贵州威宁属西部方言滇东北次方言, 因此方言的隔离可能导致遗传结构有所差异。此外, 从江县所在的黔东南苗族侗族自治州有众多的苗族、壮族, 而贵州的少数民族有着大杂居、小聚居的特点, 所以从江苗族与黔西苗族、威宁苗族有差异, 并且与黔西苗族的差异有统计学意义, 推测可能是黔东南苗族与本课题前期研究的当地侗族(13.54%)(数据另行报道)有基因交流所致。总之, 本次对贵州苗族人群 mtDNA 9 bp 缺失频率的研究有助于贵州苗族人群遗传结构的组成, 并进一步为贵州苗族的起源、迁徙过程奠定基础。

参考文献:

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290(5806): 457-465.
- Alves-Silva J, Guimaraes PE, Rocha J, et al. Identification in portuguese brauil of a mtDNA lineage containing a 9 bp triplication of the intergenic CO/tRNA^{Lys} region[J]. Hum Hered, 1999, 49(1): 56-58.
- Horai S, Marogama K, Hayaska K, et al. mtDNA polymorphism in east Asian population with special reference to the people of Japan[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(3): 579-590.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, (下转第 2590 页)

的释放。

综上所述,术中泵入右美托咪啶可有效地调节 CPB 瓣膜置换术中炎症介质的释放,从而抑制由此引起的炎症反应的程度。进一步探讨在 CPB 时右美托咪啶的抗炎机制及由此产生的器官保护作用均为今后值得研究的课题。

参考文献:

- [1] Baehner T, Boehm O, Probst C, et al. Cardiopulmonary bypass in cardiac surgery [J]. *Anaesthesist*, 2012, 61 (10):846-856.
- [2] 全承炫, 欧阳文. 右旋美托咪啶的抗炎作用研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2011, 27(11):1665-1666.
- [3] 李叙, 范士志, 李志平, 等. 体外循环围手术期白细胞、中性粒细胞与细胞因子变化关系研究[J]. *重庆医学*, 2005, 34(8):1167-1170.
- [4] Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75 (2): S715-720.
- [5] Jouan J, Golmard L, Benhamouda N, et al. Gene polymorphisms and cytokine plasma levels as predictive factors of complications after cardiopulmonary bypass[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2012, 144(2):467-473.
- [6] Xie GQ, Jiang JX, Chen YH, et al. Induction of acute hepatic injury by endotoxin in mice [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, 1(4):558-564.
- [7] Li T, Luo N, Du L, et al. Early and marked up-regulation of TNF- α in acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass [J]. *Front Med*, 2012, 6 (3): 296-301.
- [8] Mojciak CF, Levy JH. Aprotinin and the systemic inflam-

matory response after cardiopulmonary bypass [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71(2):745-754.

- [9] Pandharipande PP, Sanders RD, Girard TD, et al. Effect of dexmedetomidine versus lorazepam on outcome in patients with sepsis: an a priori-designed analysis of the MENDS randomized controlled trial [J]. *Crit Care*, 2010, 14 (2): R38.
- [10] Hofer S, Steppan J. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis [J]. *Critical Care*, 2009, 13 (1):R11.
- [11] Can M, Gul S, Bektas S, et al. Effects of dexmedetomidine or methylprednisolone on inflammatory responses in spinal cord injury [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2009, 53(8): 1068-1072.
- [12] 尹光明, 喻田, 余志豪. 核因子 Kappa B 与体外循环炎症反应 [J]. *国外医学:麻醉与复苏分册*, 2004, 25(6):353-356.
- [13] Ueki M, Kawasaki T, Sata T, et al. Elevation of HMGB1 level during cardiac surgery using cardiopulmonary bypass [C]. *American Society of Anesthesiologists annual meeting 2010. USA: American Society of Anesthesiologists*, 2010.
- [14] Ueki M, Kawasaki T, Hamada K, et al. Dexmedetomidine reduces HMGB1 level during cardiac surgery using cardiopulmonary bypass [C]. *American Society of Anesthesiologists annual meeting 2011. USA: American Society of Anesthesiologists*, 2011.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)

(上接第 2587 页)

- et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA [J]. *Nat Genet*, 1999, 23(2):147-156.
- [5] 姚永刚, 袁志刚, 周曾娣, 等. 中国民族线粒体 DNA 9 bp 序列缺失的分布 [J]. *自然科学进展*, 2001, 11(4):353-359.
- [6] 李彬彬, 龙燕, 罗世英, 等. 广东地区汉族群体线粒体 DNA 9 bp 序列缺失频率研究 [J]. *生物技术通报*, 2009, 5 (12):112-114.
- [7] 武红艳, 王克杰, 郭利伟, 等. 河南汉族群体线粒体 Region V 的遗传多态性 [J]. *新乡医学院院报*, 2009, 6(2):132-134.
- [8] 塔吉古丽·阿布里克木, 吐尔孙江·努尔麦麦提, 阿迪力江·卡地尔, 等. 现代罗布人 mtDNA 9 bp 序列缺失频率与 DYS287 位点多态性研究 [J]. *生物技术*, 2008, 18(6):9-10.
- [9] 木耶塞尔·伊斯马依力, 古丽娜·艾山, 马合木提·哈力克. 新疆 8 个地域维吾尔族群 DNA V 区 9 bp 缺失频率与

Y-染色体 DYS287 位点多态性研究 [J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2011, 50(4):100-104.

- [10] 于恩艳, 张艺, 董晓宇, 等. 新疆两个民族人群线粒体 DNA V 区缺失多态性 [J]. *生物技术*, 2008, 18(3):18-20.
- [11] 任凌雁, 何燕, 王婵娟, 等. 贵州 6 个少数民族线粒体 DNA 9 bp 序列缺失频率研究 [J]. *生物技术*, 2012, 22(5):51-54.
- [12] 何燕, 张婷, 单可人, 等. 贵州省苗族、水族线粒体 Region V 遗传多态性分析 [J]. *贵阳医学院学报*, 2007, 32(6):583-585.
- [13] 褚迅, 单可人, 文波, 等. 贵州瑶族 3 支系 Y-DNA 及线粒体 DNA 序列多态性分析 [J]. *遗传*, 2006, 28(2):153-158.
- [14] 方玲, 胡启平, 潘尚邻, 等. 广西壮、苗族和越南京族人线粒体 DNA 9 bp 缺失频率分析 [J]. *国际遗传学杂志*, 2007, 30(5):329-331.
- [15] 贵州省地方志编纂委员会编. *贵州省志民族志(上)* [M]. 贵阳:贵州民族出版社, 2002:1-359.

(收稿日期:2013-02-08 修回日期:2013-05-22)