

西藏地区藏族群体 α_1 -抗胰蛋白酶的遗传多态性及一种新的 Pi 变异型^①

苟清 侯一平 陈国弟 吴梅筠

(华西医科大学法医系, 成都 610044)

作者用超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦技术, 调查了 204 名西藏地区无血缘关系藏族个体血清 α_1 -抗胰蛋白酶 (Pi) 的表型, 除检出 6 种常见 PiM 亚型外, 还检出了 4 种变异型。其中, 1 种是国内外尚未见报道的新的 Pi 变异型, 1 种是缺陷型, 其血清 Pi 相对含量为 69.51%。推算出 Pi 等位基因频率为: $Pi^{M1} = 0.7624$, $Pi^{M2} = 0.1634$, $Pi^{M3} = 0.0668$ 和 $Pi^V = 0.0074$ 。

关键词 α_1 -抗胰蛋白酶, 遗传多态性, 等电聚焦, 藏族

Genetic Polymorphism of α_1 -Antitrypsin in Tibetan Population in Tibet with a New Pi Variant

Gou Qing Hou Yiping Chen Guodi Wu Meiyun

(Department of Forensic Medicine, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610044)

The distribution of subtypes and gene frequencies of α_1 -antitrypsin were studied in 204 unrelated healthy blood donors in Tibetan population in Tibet using ULPAGIF. Besides six common PiM subtypes, four kinds of Pi variants were detected. They were as follows: PiM_JL, R, M₁- and a new variant. The relative concentration of M₁- was 69.51%. The gene frequencies of Pi alleles were $Pi^{M1} = 0.7624$, $Pi^{M2} = 0.1634$, $Pi^{M3} = 0.0668$, $Pi^V = 0.0074$.

Key words α_1 -antitrypsin, Genetic polymorphism, Isoelectric focusing, Tibetan population

α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -antitrypsin), 又叫蛋白酶抑制物 (protein inhibitor, 简称 Pi), 是存在于人血清中的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。Fagerhol 和 Laurell⁽⁵⁾ 首次用酸性淀粉凝胶电泳结合免疫电泳发现并证实了它的遗传多态性。Allen⁽³⁾ 等人首次将等电聚焦技术用于 Pi 分型。迄今为止, 共发现了 50 多个 Pi 共显性等位基因。国内一些学者已对我国某些地区 Pi 表型频率作了调查^(1,7,8)。我们首次用窄 pH 范围两性电解质超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦 (Ultra thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing, 简称 ULPAGIF) 调查了西藏地区藏族群体 Pi 的遗传多态性, 发现了 4 例变异型, 其中 1 例国内外尚未见报道, 并发现藏族群体中存在有 Pi 缺陷型基因。

材料和方法

(一) 材料

1. 样本及参考血清 204 份不抗凝全血标本取自西藏拉萨、昌都等地藏族无血缘关系的健康男女青年, 其 3 代无与外族人通婚的历史, 24 小时内分离血清, 置 -20℃ 备用。M₁M₁、M₂M₂、

①纽约中华医学基金部分资助。

M₁M₂、M₂M₃ 标准 Pi 分型血清由日本鸟取大学 Yuasa 博士馈赠。

2. 主要试剂 Pharmalyte pH 4.2—4.9 (Pharmacia), 丙烯酰胺 (Fluka), 双甲基丙烯酰胺 (LKB), 羊抗人 α_1 -AT 血清 (上海生物制品研究所), 考马斯亮蓝 R250 (B.D.H.)。

3. 主要仪器 等电聚焦电泳系统 (LKB) 包括 2117 Multiphor II 型电泳槽, 2119 Multitempt II 型恒温循环水装置和 Macrodrive 5 constant power supply。

(二) 方法

1. ULPAGIF 按文献〔2〕方法进行, 凝胶 T=4.8%, C=2.6%, Pharmalyte pH 4.2—4.9, 胶板大小 120×80×0.4mm, 阳极液为 0.04 mol/L 谷氨酸, 阴极液为 0.1mol/L 氢氧化钠。预聚焦 30 分钟后, 将血清加至距阴极 2cm 凝胶表面, 将电压从 1500V 逐渐增高至 2300V, 共聚焦 3.5 小时, 电泳结束后按常规方法用考马斯亮蓝 R250 将凝胶染色。按照 1978 年在法国里昂举行的国际 Pi 系统命名原则判型^{〔4〕}。

2. 免疫固定技术 待测血清用双蒸水稀释 1 倍, 按上述方法进行等电聚焦, 电泳完毕后, 立即将浸有 α_1 -AT 抗血清的醋纤膜覆于距阳极 2.5—7.5 cm 的凝胶表面。室温放 30 分钟后取下醋纤膜, 用生理盐水清洗 2 小时后用考马斯亮蓝 R250 染色。

3. 琼脂单向扩散试验 据方阵滴定结果羊抗人 α_1 -AT 血清稀释 20 倍, 待测血清稀释 5 倍, 每份血清测 2 孔, 室温扩散 24 小时后测量环直径。

结 果

(一) Pi 分型

ULPAGIF Pi 分型结果见图 1, 除显示 6 种常见 M 亚型外, 可见 3 种变异型 (No.13, 14, 15)。对变异型样本进一步用免疫固定技术加以识别, 结果见图 2。由图 1 和图 2 可见, No.13 除了 M₁ 带外, 在 4 区和 6 区 M₁ 带阳极侧各出现了一条带; No.15 仅在 4 区和 6 区 M₁ 带阴极侧各有一条主带, 对照标准 Pi 分型图谱分别初步定为 M₁L 和 R。No.14 在图 1 中无蛋白带, 在图 2 中 4 区和 6 区出现了很弱的 M₁ 带, 提示是一种 Pi 缺陷型 M₁-。另有一样本 No.16 在 ULPAGIF 凝胶上的情形同 No.14, 即无蛋白带, 但在图 2 中却出现了许多异常蛋白带, 主要分布在 6 区至相当于 Z 带位置, 查现有资料未见报道这种稀有型, 说明它是一种新的 Pi 变异型。

(二) 变异型血清 Pi 相对含量测定结果

6 个正常 M 型环直径的均数为 1.3063cm, 标准差为 0.0574cm。变异型 No.14 两个孔直径均数为 0.9080cm, 与正常 M 型环直径差别显著 ($t=9.7945$, $df=1$, $P<0.05$)。以正常 M 型 Pi 含量为 100%, 求得变异型 No.14 Pi 相对含量为 69.51%。变异型 No.16 两个孔环直径均数为 1.3795cm, 与正常 M 型环直径无显著差别 ($t=0.1895$, $df=1$, $P>0.05$)。

(三) 西藏地区藏族群体 Pi 基因频率分布

本次调查共检出 PiM 型 200 例, Pi 变异型 4 例。PiM 亚型的分布是: M₁M₁ 124 例, M₂M₂ 8 例, M₃M₃ 2 例, M₁M₂ 43 例, M₁M₃ 16 例, M₂M₃ 7 例。4 例变异型中, M₁L、R、M₁- 和新的 Pi 变异型各 1 例。由于后 2 例的基因型不能确定, 故在计算 Pi 基因频率时从 204 份血清中剔出。由此计算出 Pi 基因频率为: $Pi^{M1}=0.7624$, $Pi^{M2}=0.1634$, $Pi^{M3}=0.0668$, $Pi^V=0.0074$, 其中 Pi^V 是将 R 和 M₁L 变异型基因合并而来。Pi 表型分布的观察值与期望值吻合良好, $P>0.10$ (见表 1), 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

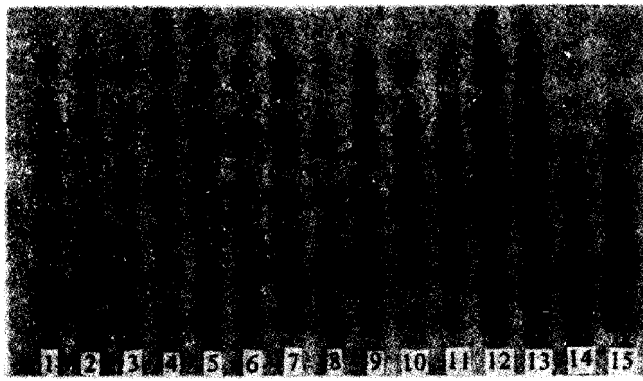


图1 ULPAGIF 血清 Pi 分型结果, 上为正极

样本号	1	2	3	4	5	6	7	8
Pi 分型	M ₁	M ₂	M ₁	M ₁ M ₃	M ₁	M ₁	M ₁ M ₂	M ₃
样本号	9	10	11	12	13	14	15	
Pi 分型	M ₂ M ₃	M ₁ M ₃	M ₂ M ₃	M ₁ M ₂	M ₁ L	M ₁ -	R	



图2 Pi 变异型免疫固定结果, 上为正极

样本号	对照	13	16	14	15
Pi 分型	M ₁ M ₂	M ₁ L	新变异型	M ₁ -	R

表1 西藏地区藏族人群 Pi 基因频率

	PiM 型						PiM 变异型				
	M ₁ M ₁	M ₂ M ₂	M ₃ M ₃	M ₁ M ₂	M ₁ M ₃	M ₂ M ₃	M ₁ L*	R*	M ₁ -**	新变异型**	其他***
观察值	124	8	2	43	16	7	1	1	1	1	0
期望值	117.41	5.39	0.9	50.33	20.58	4.41	2.29	2.29	/	/	0.69
基因率: $Pi^{M1} = 0.7624$ $\chi^2 = 7.3437$				$Pi^{M2} = 0.1634$ $df = 4, P > 0.10$			$Pi^{M3} = 0.0668$		$Pi^V = 0.0074$		

* 系按标准图谱定的型; ** 在计算基因频率时未计入; *** 包括 M₂V, M₃V.

讨 论

本次调查结果发现, 藏族群体 Pi 基因频率分布有以下特点:

1. 存在有 Pi 缺陷型基因 据报道, Pi 缺陷基因有 Pi^{null} , Pi^Z , Pi^S , Pi^P , Pi^I 等, 本文发现的 1

例 P_i 缺陷型, P_i 相对含量为 69.51%, ULPAGIF 免疫固定法除发现有很弱的 M_1 带外, 未见任何其他蛋白带, 故我们倾向于它是 P_i^{M1} 和 P_i^{null} 基因的产物, 但有待于家系调查进一步研究。 P_i^{null} 是一种罕见的无效基因, Talamo⁽⁶⁾ 首次在一青年肺气肿患者血中发现, 国内尚未见报道。

2. 藏族群体中存在一种新的 P_i 变异型, 单扩测定 P_i 含量正常, 在 ULPAGIF 凝胶上却不显带, 免疫固定后出现许多异常蛋白带, 国内外未见类似报道, 说明它是一种新的变异型, 是否是一种新的 P_i 稀有基因产物, 有待于进一步研究。

3. 藏族群体中存在有 P_i^L 和 P_i^R 两种稀有基因。

4. 与我国其他 5 个少数民族 P_i 基因频率比较结果发现 (表 2), 除黎族之外, 藏族与维吾尔族、朝鲜族、蒙古族、壮族的基因频率分布无显著差别 ($\chi^2=17.62$, $df=20$, $P>0.05$)。与我国不同地区的汉族群体比较 (表 3), 藏族除与北京和牡丹江有差别外, 与其他 5 个地区汉族的基因频率无显著差别 ($\chi^2=36.55$ $df=25$, $P>0.05$)。

表 2 藏族与其他 5 个少数民族 P_i 基因频率的比较

民族	样本数	$P_i * M_1$	$P_i * M_2$	$P_i * M_3$	$P_i * V$	参考文献
维吾尔族	204	0.7500	0.1691	0.0613	0.0197	(8)
朝鲜族	296	0.7584	0.1841	0.0490	0.0051	同上
蒙古族	122	0.7254	0.1885	0.0738	0.0123	同上
壮族	216	0.6680	0.2500	0.0764	0.0046	同上
黎族	172	0.6192	0.2703	0.1105	0	同上
藏族	202	0.7624	0.1634	0.0668	0.0074	本文

$\chi^2=40.19$; $V=25$; $0.01 < P < 0.05$; $\chi^2=17.62$; $V=20$; $P > 0.05$ (*); * 不包括黎族。

表 3 藏族与不同地区汉族 P_i 基因频率的比较

地区	样本数	$P_i * M_1$	$P_i * M_2$	$P_i * M_3$	$P_i * V$	参考文献
牡丹江	202	0.7302	0.1856	0.0644	0.0199	(7)
北京	274	0.7372	0.1624	0.0912	0.0009	同上
郑州	191	0.7487	0.1623	0.0785	0.0104	同上
成都	510	0.7049	0.2137	0.0667	0.0148	(1)
西藏	202	0.7624	0.1634	0.0668	0.0074	本文
武汉	214	0.7009	0.2196	0.0724	0.0007	(7)
南宁	206	0.6820	0.2427	0.0704	0.0049	同上
海口	227	0.6542	0.2709	0.0705	0.0004	同上

$\chi^2=50.53$; $V=35$; $0.01 < P < 0.05$; $\chi^2=36.55$; $V=25$; $P > 0.05$ (*); * 不包括牡丹江、北京。

参 考 文 献

- (1) 曹志敏, 吴梅筠: 1989, 遗传与疾病, 4:235.
- (2) 侯一平等: 1991. 华西医科大学学报, 4:348.
- (3) Allen, et al.: 1974. *Am. J. Clin. Pathol.*, 62:732.
- (4) Cox, D.W. et al.: 1980. *Hum. Genet.*, 53:429.
- (5) Fagerhol, M.K. and C.B. Laurell: 1967. *Clinica Acta*, 16:199(in Chinese).
- (6) Talamo, R.C. et al.: 1973. *Science*, 4094:70.
- (7) Ying, Q.L. et al.: 1985. *Hum. Genet.*, 69:184.
- (8) Ying, Q.L. et al.: 1985. *Hum. Genet.*, 71:225.

本文于 1991 年 9 月 28 日收到。