

- 3 葛坚, 郭彦, 刘亦志, 等. 超声乳化白内障吸出术治疗闭角青光眼的初步临床观察. 中华眼科杂志, 2001, 37: 355 - 358
- 4 Kubota T, Toguri I, Onizuka N, *et al.* Phacoemulsification and intraocular lens implantation for angle - closure glaucoma after the relief of papillary block. *Ophthalmologica*, 2003, 217: 325 - 328
- 5 Di Staso S, Sabetti L, Taverniti L, *et al.* Phacoemulsification and intraocular lens implantation in eyes with primary angle - closure glaucoma: our experience. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*, 2002, 236: 17 - 18
- 6 Hayashi K, Hayashi H, Nakao F, *et al.* Effect of cataract surgery on intraocular pressure control in glaucoma patients. *J Cataract Refract Surg*, 2001, 27: 1779 - 1786
- 7 乔利亚, 梁远波, 王宁利, 等. 晶状体摘除术治疗原发性闭角型青光眼合并白内障的循证评价. 眼科, 2005, 14(2): 93 - 98
- 8 Lai JS, Tham CC, Lam DS. The efficacy and safety of combined phaco emulsification, intraocular lens implantation, and limited goniosynechialysis, followed by diode laser peripheral iridoplasty, in the treatment of cataract and chronic angle - closure glaucoma. *J Glaucoma*, 2001, 10(4): 309 - 315
- 9 Pohjalainen T, Vesti E, Usitalo RJ. Phacoemulsification and intraocular lens implantation in eyes with open - angle glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand*, 2001, 79: 313 - 316
- 10 Shingleton BJ, Gamell LS, O'Donoghue MW, *et al.* Long - term changes in intraocular pressure after clear corneal phacoemulsification; normal patients versus glaucoma suspect and glaucoma patients. *J Cataract Refract Surg*, 1999, 25: 885 - 890
- 11 Swamynathan K, Capistrano AP, Cantor LB, *et al.* Effect of temporal corneal phacoemulsification on intraocular pressure in eyes with prior trabeculectomy with an antimetabolite. *Ophthalmology*, 2004, 111: 674 - 678
- 12 Rebolleda G, Munoz - Negrete FJ. Phacoemulsification in eyes with functioning filtering blebs; a prospective study. *Ophthalmology*, 2002, 109: 2248 - 2255
- 13 Lai JS, Tham CC, Chan JC. The clinical outcomes of cataract extraction by phacoemulsification in eyes with primary angle - closure glaucoma (PACG) and co - existing cataract. *J Glaucoma*, 2006, 15: 47 - 52
- 14 Kurimoto Y, Park M, Sakaue H, *et al.* Changes in the anterior chamber configuration after small - incision cataract surgery with posterior chamber intraocular lens implantation. *Am J Ophthalmol*, 1997, 124: 775 - 780
- 15 Mathalone N, Hyams M, Neiman S, *et al.* Long - term intraocular pressure control after clear corneal phacoemulsification in glaucoma patients. *J Cataract Refract Surg*, 2005, 31: 479 - 483

(收稿: 2009 - 12 - 03)

(修回: 2009 - 01 - 08)

解偶联蛋白 2 基因多态性与维吾尔族自然长寿的关联研究

孙 凌 乌甫尔·玛依拉 方鸣武 程祖亨 李 峰 周文郁 邱长春

摘 要 目的 探讨解偶联蛋白 2 (UCP2) 基因 - 866 G/A、A55V 和 3'非翻译区 (UTR) 插入/缺失 (I/D) 多态性与维吾尔族自然长寿的关联。方法 以新疆和田地区 191 名维吾尔族自然长寿个体为研究对象, 以 53 名 75 岁前自然死亡的同地区、同民族个体作为对照。采用 PCR - 限制长度片段多态性 (PCR - RFLP) 和 PCR - 直接测序法对 UCP2 基因 - 866 G/A、A55V 和 3' - UTR I/D 多态性进行分型。结果 启动子 - 866G/A 变异 AA 基因型与长寿相关, A55V 多态性和 3' - UTR I/D 多态性基因型、等位基因分布在长寿组和对照组之间无差异。结论 UCP2 基因启动子 - 866G/A 多态性与长寿相关。

关键词 解偶联蛋白 2 多态性 长寿 维吾尔族

Correlation between UCP2 Gene and Natural Longevity in Uyur Population. Sun Ling, Wu Puer · Ma Yila, Fang Mingwu, Cheng Zuheng, Li Feng, Zhou Wenyu, Qiu Changchun. Key National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Science, CAMS&PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the relationship between three polymorphisms within the Uncoupling protein - 2 (UCP2) gene (promoter region - 866 G/A, A55V and 3'untranslated region (3' - UTR I/D) and natural longevity in the Uyur population. **Methods** 191 healthy individuals over 90 years old and 53 control individuals who died in their 65 to 70 years were recruited. The polymorphisms

基金项目: 国家自然科学基金 (30160089), CMB 基金 (96 - 657), 北京市自然科学基金重点项目 (7001004)

作者单位: 100005 北京, 中国医学科学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室 (孙凌、方鸣武、李峰、周文郁、邱长春); 830054 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院心脏中心 (乌甫尔·玛依拉、程祖亨)

通讯作者: 程祖亨, 电子信箱: chengzuheng@yahoo.com.cn; 邱长春, 电子信箱: dr.qiu@163.com

within UCP2 gene, -866 G/A, A55V and 3'untranslated region I/D were genotyped by PCR - restriction fraction length polymorphism (PCR - RFLP) and PCR - Sequencing. Linkage disequilibrium and haplotype characteristics among the polymorphisms were analyzed.

Results -866 G/A variation was related to the longevity. There was no difference in the genotypes and alleles distribution of the polymorphisms of A55V and 3' - UTR I/D between longevity group and control group. **Conclusion** There was correlation between the polymorphism -866G/A of UCP2 gene and longevity.

Key words Uncoupling protein - 2; Polymorphism; Longevity; Uygur population

衰老是以时间依赖性的最佳功能下降和线粒体突变积累为特征的生命过程,延缓衰老可使人长寿^[1,2]。线粒体理论认为电子传递链(ETC)中生成的活性氧(ROS)所致的氧化应激可引起 ETC 组分和线粒体 DNA(mtDNA)损伤。mtDNA 损伤和突变逐渐积累,引起氧化磷酸化缺陷,导致 ROS 产物增多,从而进一步引起 mtDNA 损伤和突变率增高,形成氧化损伤增加和功能下降的恶性循环,并最终引起死亡^[3]。研究已证实,ROS 损伤血管内皮和平滑肌细胞,与动脉粥样硬化相关^[4,5]。

ETC 氧化反应与 ADP 生成 ATP 的磷酸化作用相偶联。UCPs 是一类线粒体内膜蛋白,参与解偶联并调节 ROS 生成,轻微解偶联可减少线粒体 ROS 生成,防止细胞受损^[6]。UCP2 是较近发现的线粒体家族新成员,其基因突变可能影响能量代谢和动脉粥样硬化发生^[4,5],因此推测 UCP2 基因及其蛋白可能参与衰老和长寿过程。但至今对 UCP2 与人类衰老或长寿相关的研究仍然少见。

本研究以新疆和田地区的维吾尔族自然长寿老人为研究对象,分析 UCP2 基因启动子区 -866G/A、第 4 外显子 A55V 和 3' - UTR 45bpI/D 多态性频率分布及其与长寿的关联。

对象与方法

1. 研究对象:所有研究对象均来自新疆和田地区的维吾尔族人群。实验分为两组:长寿组为 191 名年龄超过 90 岁的老人(男性 131 名,女性 60 名),平均年龄 97 ± 3 岁,其中包括 52 名年龄超过 100 岁的老人。长寿老人年龄界定按 5 步法确认:①人寿保险公司提供的 300 名百岁老人名单;②问卷调查:逐村逐户走访,以家庭内至少有 4 代人为基础;③按该地区历史上发生的 4 次重大事件推算年龄,一般为 6 岁无记忆,12 岁开始记忆,结婚年龄不小于 15 岁,参军年龄不小于 18 岁。以此推断,并与 1981 年户籍对照,误差不超过 5 岁;④三查三对:通过 3 位医师进行核实,结论基本一致;⑤实际年龄计算参考公式 = $0.45 \times$ 自报年龄 + 50 岁,与上述 4 项参考标准比较,之间的年龄误差不超过 3 岁。对照组为同一地区没有血缘关系,在 65 ~ 70 岁自然死亡的 53 人,家族史中至少近两代中无寿命大于 70 岁者,他们的血样已于 8 年前采集,并经多年随访证实。其中男性 29 名,女性 24 名,平均年龄 $67 \pm$

3 岁。

该研究经过新疆医科大学医学伦理委员会批准,并获得受试者的知情同意以及签署的知情同意书。

2. 现场与临床资料收集:本研究的所有资料都是通过现场问卷调查和身体检查获得。通过问卷调查收集被研究人群的家族史、现病史和吸烟、饮酒情况等相关资料并绘制家系图。体格检查,测量身高、体重、腰臀围、血压、心率和静态心电图等。征得个人同意并填写知情同意书后,抽取每人 5ml 静脉血,用于生化指标测定和基因分析。应用全自动生化分析仪测定血脂(TG、TC、HDL、LDL、ApoA、ApoB)和血糖水平。

3. 基因多态性分析:(1)基因组 DNA 提取:抽取静脉血 5ml,2% EDTA 抗凝,低渗法破红细胞分离白细胞,采用酚/氯仿法抽提基因组 DNA,其纯度为 A260:A280 ≥ 1.8 。(2)基因分型:①引物设计:3'非翻译区(3' - UTR)45bp 插入/缺失多态性分析,参照文献[7]设计引物 F:5'CAG TGA GGG AAG TGG 3',R:5'GGG GCA GGA CGA AGA TTC 3'。第 4 外显子多态性(A55V)分析参照文献[8],设计错配引物,F:5'TAC TGC TAA AGT CCG GTT ACA G 3',R:5'CAT CAC ACC GCG GTA CTG GGC GTT G 3'。启动子 -866G/A 多态性分析参照文献[9]设计如下引物 F:5'CAC GCT GCT TCT GCC AGG AC 3',R:5'AGG CGT CAG GAG ATG GAC CG 3'(所有引物均由上海英骏公司合成);②目的片段的扩增:应用美国 PIC100 型 PCR 扩增仪,扩增所需各目的片段。总反应体系 25 μ l,含 DNA 模板 1 μ l(约 0.1 ~ 0.2 μ g),上、下游引物各 2pmol,10mmol/L Tris - HCl(pH 值 8.0),10mmol/L MgCl₂,50mmol/L KCl,Taq 酶 0.5U。扩增程序:94℃ 预变性 300s 后,按 94℃ 变性 30s,对 3' - UTR I/D, -866G/A 和 A55V 多态性分析,退火条件分别为 65℃、30s,62℃、30s 和 61℃、30s,72℃ 延伸 30s,共 30 个循环后,72℃ 再延伸 300s。反应结束后,取 5 μ l 反应产物,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色,于紫外灯下观察并记录结果;③基因分型与结果判定:应用 PCR 产物的限制性片段长度分析(PCR/RFLP)完成 -866G/A 和 A55V 的基因分型。鉴定 -866G/A 变异用 Mlu I 内切酶;A55V 用 Hinc II 内切酶。酶切产物经 3% 琼脂糖电泳,紫外灯观察。对 A55V 位点,仅出现 241bp 一条区带者为 AA 纯合基因型;显示 241bp/217bp/24bp 三条区带者为 AV 杂合基因型;显示 217bp/24bp 两条区带者为 VV 纯合基因型。对于 -866G/A 位点类型判定,仅显示 363bp 一条区带者为 AA 基因纯合型;仅显示 291bp/72bp 两条区带者为 GG 纯合基因型;显示 363bp/291bp/72bp 三条区

带者为 AG 杂合基因型;④PCR 产物直接测序:为验证 PCR/RFLP 分型的准确性,取已经 PCR/RFLP 分型的每种基因型标本各 10 例,将其 PCR 产物直接测序,进一步确定突变部位并证实 PCR/RFLP 分型的准确性和实用性。

4. 统计学分析:数据处理和统计学分析采用 SAS8.1 软件。基因频率用直接基因计数法计算。Hardy - Weinberg 平衡用 χ^2 检验。连续性变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示。基因多态性分布,组

间基因型及等位基因频率比较用 $R \times C$ 表 χ^2 检验,并以 95% 可信区间(CI)和相对危险度(OR)表示。

结 果

1. 长寿组 and 对照组临床特征:如表 1 所示,两组间除年龄存在显著差异外($P < 0.05$),其余各项指标均无统计学差异。

表 1 长寿组和对照组临床特征($\bar{x} \pm s$)			
项目	长寿组($n = 191$)	对照组($n = 53$)	P
性别(男性/女性)	131/60	29/24	
年龄(岁)	97 $\pm$ 3	67 $\pm$ 3	<0.05
SBP(mmHg)	116.23 $\pm$ 9.65	116.82 $\pm$ 8.31	NS
DBP(mmHg)	77.48 $\pm$ 11.13	70.62 $\pm$ 5.36	NS
BMI(kg/m ²)	20.64 $\pm$ 2.34	21.29 $\pm$ 2.49	NS
TC(mmol/L)	4.81 $\pm$ 1.02	4.76 $\pm$ 0.97	NS
HDL(mmol/L)	1.07 $\pm$ 0.25	1.10 $\pm$ 0.27	NS
LDL(mmol/L)	3.22 $\pm$ 0.90	2.95 $\pm$ 0.95	NS
ApoA(g/L)	1.28 $\pm$ 0.19	1.32 $\pm$ 0.17	NS
ApoB(g/L)	1.01 $\pm$ 0.27	1.15 $\pm$ 0.52	NS
TG(mmol/L)	1.66 $\pm$ 0.72	1.81 $\pm$ 0.75	NS
Glu(mmol/L)	5.92 $\pm$ 2.13	5.71 $\pm$ 1.17	NS

2. 样本群体代表性:以 Hardy - Weinberg 平衡评估样本群体代表性。结果显示,A55V 多态性基因型在长寿组,启动子 - 866G/A 位点多态性基因型在长寿组和对照组分布偏离 Hardy - Weinberg 平衡(P 分别为 0.000158、0.000314 及 0.001183);UCP2/3' - UTR 多态性基因型在对照组及长寿组,A55V 多态性基因型在对照组的分布符合 Hardy - Weinberg 平衡。

3. 长寿与对照组个基因型和等位基因频率分布:表 2 显示,长寿组与对照组比较,3' - UTR 及 A55V 多态性位点各基因型及等位基因频率分布无统计学差异。启动子 - 866G/A 多态性位点 AA 基因型频率分布在长寿组和对照组之间存在差异,长寿组 AA 基因型频率较对照组显著升高,而 GA 与 GG 基因型频率降低($P = 0.047$)。

表 2 UCP2 基因 3 种多态性基因型和等位基因在长寿组 and 对照组的分布 [$n(\%)$]						
		长寿组	对照组	P	OR	$OR95\% CI$
启动子 - 866A/G						
基因型	GG	41 (21.46)	15 (28.30)	0.047	1.470	0.946 ~ 2.285
	GA	120 (62.83)	36 (67.92)			
	AA	30 (15.71)	2 (3.77)			
等位基因	G	202 (52.88)	66 (62.26)	0.086		
	A	180 (47.12)	40 (37.74)			
A55V						
基因型	AA	58 (30.37)	23 (43.40)	0.138	0.669	0.421 ~ 1.062
	AV	116 (60.73)	28 (52.83)			
	VV	17 (8.90)	2 (3.77)			
等位基因	A	232 (60.73)	74 (69.81)	0.087		
	V	150 (39.27)	32 (30.19)			
A55V3' - UTR						
基因型	II	3 (1.57)	0 (0)	0.707	1.347	0.723 ~ 2.511
	ID	59 (30.89)	14 (26.42)			
	DD	129 (67.54)	39 (73.58)			
等位基因	I	65 (17.02)	14 (13.21)	0.346		
	D	317 (82.98)	92 (86.79)			

讨 论

本文首次报告线粒体解偶联蛋白 2(UCP2)基因

多态性与新疆维吾尔族人长寿的关系,其科学价值旨在从能量代谢和自由基对人体损伤的角度探索人类

长寿的机制。

在此,将重点讨论以下问题。(1)被鉴定位点偏离 Hardy - Weinberg 平衡问题。众所周知,Hardy - Weinberg 平衡指在随机人群中,某一基因型或等位基因的分布规律。而本研究中的研究对象是特别选择 90 岁以上或仅在 65 ~ 70 岁的个体,并不是随机人群。因此,本文出现的启动子 - 866G/A 多态性基因型在长寿组和对照组中均偏离 Hardy - Weinberg 平衡的现象,可能与样本选择有关。(2)本研究仅发现 UCP2 的 - 866G/A 基因多态性与长寿相关,UCP2 是线粒体内膜蛋白,其功能是通过线粒体内膜质子传递使氧化磷酸解偶联,其结果可调控活性氧(ROS)的产生,减少细胞、分子损伤,从而可延缓衰老过程^[11]。

本研究结果显示,维吾尔族人群 A55V 和 - 866G/A 多态性位点的基因型和等位基因频率与已有文献报道的其他种族结果相似^[5,8,12]。但长寿组和对照组中 3' - UTR 插入/缺失多态性的 I 等位基因和 II 纯合基因型的频率低于文献报告数据^[13],推测 3' - UTR 插入基因型在维吾尔族中为少见基因型,与长寿无关。本文结果也提示,长寿组 - 866G/A 多态性位点的 AA 基因型频率明显高于对照组(15.71% vs 3.77%, $P = 0.047$)。据报告,- 866G/A 位点的 AA 基因型与动脉粥样硬化和冠心病相关。本研究发现 AA 与长寿相关,表明 AA 是长寿的保护基因。文献报告认为,启动子 - 866A 可增加 UCP2 转录水平^[14]和之后的蛋白翻译水平,导致 UCP2 蛋白量增加,增强解偶联活性,减少 ROS 生成及其对器官损伤作用,从而延缓衰老,延长寿命。

本研究的局限性在于:①由于难以寻找 65 ~ 70 岁自然死亡人群,致使对照样本较少;②因采集的长寿和对照样本均属特殊人群,故多位点偏离 Hardy - Weinberg 平衡,所得数据不宜作为单倍型分析。期望在未来研究中获得更多的样本,深入研究 UCP2 功能及与长寿的关系。

参考文献

- 1 Harman D. Aging. *Ann N Y Acad Sci*, 2001,928:1 - 21
- 2 Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci*, 2004,27(10):

595 - 600

- 3 Alexeyev MF, Lecloux SP, Wilson GL. Mitochondrial DNA and aging. *Clinical Science*, 2004,107:355 - 364
- 4 Oberkofler H, Iglseider B, Klein K, *et al.* Associations of the UCP2 gene locus with asymptomatic carotid atherosclerosis in middle - aged women. *Arterioscler, Thromb, and Vasc Biol*, 2005,25:604 - 610
- 5 Dhamrait SS, Stephens JW, Cooper JA, *et al.* Cardiovascular risk in healthy men and markers of oxidative stress in diabetic men are associated with common variation in the gene for uncoupling protein 2. *European Heart Journal*, 2004,25:468 - 475
- 6 Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, 2005,2(2):85 - 93
- 7 Yanovski JA, Diamant AL, Sovik KN, *et al.* Associations between uncoupling protein 2, body composition, and resting energy expenditure in lean and obese African American, white, and Asian children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000,6(71):1405 - 1420
- 8 Klannemark I M, Orho I M, Groop L. No relationship between identified variants in the uncoupling protein 2 gene and energy expenditure. *European Journal of Endocrinology*, 1998,139:217 - 223
- 9 Sesti G, Cardellini M, Marini MA, *et al.* A common polymorphism in the promoter of UCP2 contributes to the variation in insulin secretion in glucose - tolerant subjects. *Diabetes*, 2003,52:1280 - 1283
- 10 Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*, 2005,15(2):97 - 98
- 11 Criscuolo F, Gonzalez - Barroso MM, Maho YL, *et al.* Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc R Soc B*, 2005,272:803 - 810
- 12 Kubota T, Mori H, Tamori Y, *et al.* Molecular screening of uncoupling protein 2 gene in patients with noninsulin - dependent diabetes mellitus or obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998,83(8):2800 - 2804
- 13 Dalgaard LT, Sorensen TIA, Andersen T, *et al.* An untranslated insertion variant in the uncoupling protein 2 gene is not related to body mass index and changes in body weight during a 26 - year follow - up in Danish Caucasian men. *Diabetologia*, 1999,42:1413 - 1416
- 14 Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, *et al.* A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle - aged humans. *Nat Genet*, 2001,28:178 - 183

(收稿:2009 - 12 - 17)

(修回:2010 - 01 - 08)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统启事

自 2010 年起,《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统,请各位作者登陆《医学研究杂志》网站: <http://www.yxyjzz.cn>,注册登陆投稿系统,填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话:010 - 52328679(单政)。

《医学研究杂志》编辑部