

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01291

中国汉族高原肺水肿易感基因的全基因组关联研究

杨应忠, 王亚平, 马兰, 杜洋, 格日力

青海大学医学院高原医学研究中心, 西宁 810001

摘要: 高原肺水肿(High-altitude pulmonary edema, HAPE)是一种特发于高原低氧环境的肺水肿, 是遗传和环境因素共同作用的结果。为了寻找与中国汉族高原肺水肿相关的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)位点及易感基因, 文章利用 Affymetrix SNP Array 6.0 芯片, 对2010年5月至2012年7月在青海省玉树地区执行援建任务时来自平原地区的40例HAPE患者和33例健康对照进行全基因组SNP分型, 通过PLINK软件对芯片结果进行全基因组关联分析(Genome-wide association study, GWAS), 筛选出在病例组和对照组中间有显著差异($P < 10E-7$)的SNP位点57个, 通过对57个SNP位点附近74个基因进行GO与Pathway富集分析, 发现这些基因与“前列腺素代谢”、“四烯酸代谢”、“氮代谢”显著相关($\text{adjust } P < 0.05$), 以上代谢过程与HAPE病理生理机制相关。结果表明, 高原肺水肿受遗传多态性影响, 与多个基因以及位点相关。

关键词: 高原肺水肿; 单核苷酸多态性; 全基因组关联分析; 易感基因

Genome-wide association study of high-altitude pulmonary edema in Han Chinese

YANG Ying-Zhong, WANG Ya-Ping, MA Lan, DU Yang, GE Ri-Li

Research Center for High Altitude Medical Sciences, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China

Abstract: High-altitude pulmonary edema (HAPE) is a non-cardiogenic pulmonary edema that is always found among unacclimatized persons after rapid ascent to high altitude, and HAPE is caused by the interaction of genetic and environmental factors. To screen and analyze the susceptibility genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of HAPE in Han Chinese, the DNA samples of 40 patients with HAPE and 33 healthy controls, who performed the reconstruction tasks from the plain region in Yushu area of Qinghai province during May of 2010 to July of 2012, were scanned by Affymetrix SNP Array 6.0 Chips in this study. Genome-wide association study (GWAS, by PLINK software) was used to screen the susceptibility genes and genetic markers, and a total of 57 SNPs were found to be significantly different between case and control groups ($\text{adjust } P < 0.05$). GO and Pathway enrichment analysis of 74 genes around the 57 SNPs indicated that these genes were significantly correlated with prostanoid metabolic process, arachidonic acid metabolism and nitrogen metabo-

收稿日期: 2000-00-00; 修回日期: 2000-00-00

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31160232), 国家重点基础研究发展规划项目(编号: 2012CB518200), 国家国际科技合作与交流项目(编号: 2011DFA32720)和青海省自然科学基金青年项目(编号: 2011-Z-919Q)资助

作者简介: 杨应忠, 硕士, 副教授, 研究方向: 高原低氧适应与损伤。Tel: 0971-6108394; E-mail: yyz77921@hotmail.com

通讯作者: 格日力, 博士, 教授, 研究方向: 高原医学。E-mail: geriligao@hotmail.com

致谢: 感谢上海敏芯信息科技有限公司在数据处理过程中给予的帮助。

网络出版时间: 2013-9-17 14:41:19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130917.1441.003.html>

lism (adjust $P < 0.05$), which were involved in the physiopathologic mechanism of HAPE. Our studies suggest that these genetic polymorphisms and genes were associated with HAPE.

Keywords: high-altitude pulmonary edema (HAPE); single nucleotide polymorphisms (SNPs); genome wide association analysis (GWAS); susceptibility gene

高原肺水肿 (High-altitude pulmonary edema, HAPE) 是一种特发于高原低氧环境的肺水肿, 多发生于平原人群初次进入高原或高原居民进入更高海拔地区者, 发病率为 0.4% ~ 2%^[1], 因其起病急、进展快、对机体的危害大, 如果不及时救治, 可在较短的时间发展至昏迷, 甚至死亡, 严重威胁生命健康^[2]。

在 2010 年“玉树 4.14 地震”抢险救灾中, 本课题组在灾区进行医疗救助的同时进行了调研, 发现在急进高原人群中, 约有 3% 的人员发展成为 HAPE、高原脑水肿。目前 HAPE 发病机制仍然不清楚, 有研究显示 HAPE 是遗传和环境因素共同作用的结果, 而机体对环境的易感性受遗传因素的影响^[3]。本研究通过全基因组 SNP 芯片对样本 DNA 进行 SNP 扫描分型, 对芯片结果进行全基因组关联研究 (Genome-wide association study, GWAS), 以期筛选出与 HAPE 发病相关的易感基因, 为后期的分子病理学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象

采用 1995 年中华医学会公布的 HAPE 诊断标准^[4], 收集 2010 年 5 月~2012 年 7 月在青海省玉树地区执行援建任务时的 HAPE 患者 40 例 (34.33 ± 6.74 岁), 均为无亲缘关系的平原汉族居民, 平时体健, 无心血管及呼吸系统疾病, 且发病前从未来过高原, 全部患者在玉树州人民医院进行抢救和恢复治疗。期间抽取静脉血 5 mL, EDTA 钠抗凝, 分离血浆和有核细胞, 置液氮保存备用。进行健康体检时, 收集对照组 33 例 (34.48 ± 5.27 岁), 来自 HAPE 患者工作的工地, 年龄和性别与病例组相匹配, 居住区域和海拔与病例组相近的平原居民, 且到达高原后 3 个月未发生过急性高原病, 劳动强度相当。采用临床资料调查表收集一般情况, 并抽取静脉血 5 mL, EDTA 钠抗凝, 分离血浆和有核细胞, 置液氮保存备用。该项

研究获得青海大学医学院伦理委员会审核批准。

1.2 全基因组 SNP 分型实验

使用 Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, 158467, Germany) 提取基因组 DNA。全基因组 SNP 分型采用 Affymetrix SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 芯片套装。使用 *Sty* 或 *Nsp* 酶消化 250 ng DNA 样本后, 对消化后的小片段 DNA 进行连接反应, 再使用通用引物对连接产物进行 PCR 扩增; 对扩增产物进行片段化, 并用生物素对片段进行标记, 再与芯片杂交; 最后, 采用 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G 检测杂交信号荧光强度, 读取数据。

1.3 数据分析

应用 Affymetrix Genotyping Console™, 采用 Birdseed v2 分型算法^[5], 对芯片进行 SNP 分型, 分型结果应用 PLINK v1.07 软件^[6]进行质控、关联分析、Logistic 回归分析, 使用 Haploveiw 软件绘制关联分析结果的曼哈顿图, R 软件绘制 QQ plot 图。使用 Bonferroni Correction 矫正^[7]降低卡方检验的假阳性率 (adjust $P < 0.05$)。通过 UCSC genome browser 对得出的 SNP 位点进行基因定位并找出这些 SNP 位点所处的基因以及其附近的基因 (± 100 kb 范围以内)。将得到的 SNP 富集基因进行 GO 与 pathway 富集分析 (adjust $P < 0.05$), GO 富集分析使用 bingo 软件^[8], Pathway 富集分析使用 MAS 3.0 (<http://bioinfo. capitalbio.com/mas3/>)。

2 结果与分析

2.1 芯片数据质控结果

Affymetrix SNP6.0 芯片共检测 906 660 个 SNP 位点, 使用 PLINK 软件对全部检测的 SNP 位点进行质控: (1) 删除检出率 (call rate) 低的 SNP 基因型和样本 (call rate < 90%); (2) 删除远离 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) 的 SNP 基因型 ($P < 0.001$); (3) 删除

MAF(minor allele frequency) < 0.01 的 SNP 基因型。共得到 73 个样本中 699 782 个 SNP 分型结果。

2.2 全基因组关联分析筛选差异位点

使用plink软件对 699 782 个SNP位点进行关联分析, 卡方检验计算SNP与疾病的关联显著性, QQ plot分析显示病例与对照样本总体分布一致(图 1)。通过Bonferroni Correction矫正^[7]降低统计分析的假阳性率(adjust $P < 0.05$)。共获得 57 个显著性差异的 SNP(图 2, 表 1), 通过UCSC genome browser对得出的位点进行基因定位并找出这些SNP位点所处的基因以及其附近的基因(± 100 kb范围以内), 通过NCBI数据库对这些基因进行了功能注释和功能学分类, 筛选出 57 个SNP位点分别处于 74 个基因内或上下游区域(表 1), 分析发现这些基因与血管内皮功能、肺脏发育、炎症损伤等相关。

2.3 57 个 SNP 位点相关基因功能 GO 与 Pathway 富集分析

将 74 个显著SNP附近的基因分别进行GO与KEGG Pathway富集分析(adjust $P < 0.05$)。GO富集分析使用bingo软件^[8], Pathway分析使用MAS 3.0 功能注释系统。富集结果如表 2 所示, 其中AKRIC3(rs4572038)、AKRIC2(rs4572038)、EDN2(rs11581271)等基因属于“前列腺素代谢过程(Prostanoid metabolic process)”, Jones等^[9]研究发现前列腺素可通过

影响氧化应激反应对肺部造成伤害。AKRIC3(rs4572038)、GGTI(rs2017869)属于“花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)过程”, Schoene等^[10]通过分析HAPE患者肺部积液发现患者肺部积液中大量的花生四烯酸代谢的产物。CA12(rs4984295)属于“氮代谢(Nitrogen metabolism)过程”, 而氮代谢过程与HAPE的发生发展有着密切的关系^[11~18]。

其中伽马谷氨酰转移酶 1(GGT1)是“花生四烯酸代谢过程”中重要的一种酶类, Biljak等^[19]发现在慢性肺梗阻(COPD)病人中GGTI 表达量的变化可直接引起肺部的炎症反应。而显著关联的rs2017869($P = 3.37E-11$)处于其内含子当中, Melzer等^[20]研究发现GGTI 基因内含子中另外一个多态性位点rs5751901可影响GGTI 基因的表达量。因此, 我们

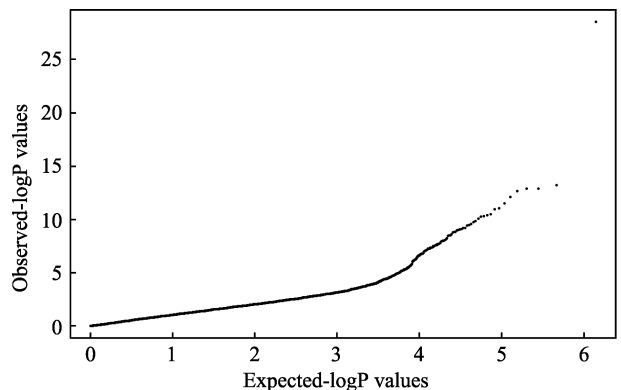


图 1 SNP 的全基因组关联研究 QQ plot

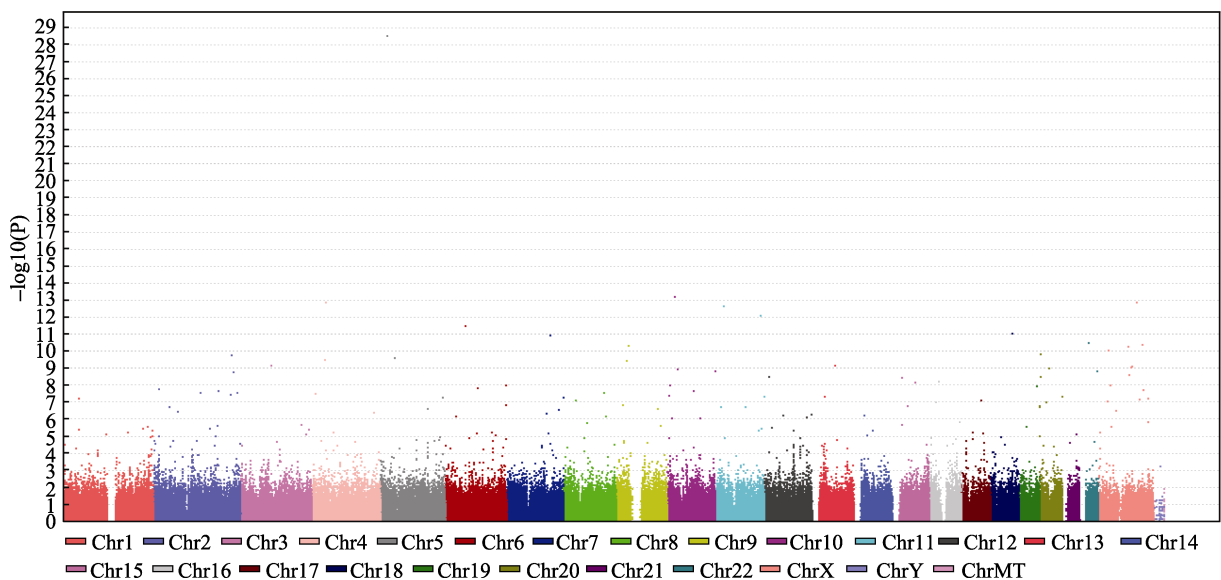


图 2 SNP 的全基因组关联研究曼哈顿图

表 1 与 HAPE 发病相关的差异 SNP 位点和基因列表

SNP 编号	基因	邻近基因	所在区域	风险等位基因	风险等位基因频率 (病例/对照)	OR(95%CI)	p-obs
rs11581271	FOXO6		内含子	C	0.25/0.7031	0.1407(0.06733-0.2942)	5.65E-08
		EDN2	下游				
rs4072318	//	//		T	0.6486/0.1774	8.559(3.817-19.2)	3.34E-08
rs10932688		TNP1	上游	C	0.1875/0.7121	0.09329(0.04302-0.2023)	1.74E-10
		DIRC3	下游				
rs6715605		ACSL3	上游	G	0.675/0.1719	10.01(4.495-22.28)	1.65E-09
		MOGAT1	下游				
rs1059524	//	//		T	0.6923/0.2273	7.65(3.613-16.2)	2.61E-08
rs6531084		FAM49A	下游	G	0.675/0.1897	8.874(3.963-19.87)	1.72E-08
rs2592121	NGEF		内含子	T	0.09211/0.5152	0.09548(0.03824-0.2384)	2.89E-08
rs12471246		SESTD1	上游	A	0.6053/0.1406	9.37(4.039-21.74)	2.05E-08
		ZNF385B	下游				
rs1991872	CADM2		内含子	G	0.6316/0.1034	14.86(5.66-39)	6.6E-10
rs13129566	TMEM156		内含子	A	0.025/0.5893	0.01787(0.003983-0.08018)	1.28E-13
rs12649142		TBC1D1	下游	T	0.225/0.75	0.09677(0.04473-0.2094)	3.32E-10
rs16890905	SLC2A9		内含子	T	0.6375/0.1818	7.914(3.65-17.16)	3.15E-08
rs1908704		CDH18	下游	C	0/0.9643	0(0-nan)	3.1E-29
rs17052028		STC2	上游	G	0.2051/0.6562	0.1352(0.06361-0.2872)	5.28E-08
rs12655827		PTGER4	上游	C	0.6389/0.1094	14.41(5.738-36.17)	2.61E-10
rs7774693	//	//		G	0.175/0.6452	0.1167(0.05366-0.2537)	1.04E-08
rs7770302	BACH2		内含子	A	0.625/0.1515	9.333(4.091-21.29)	1.39E-08
rs2397218	COL21A1		内含子	C	0.575/0	NA(NA-NA)	3.05E-12
		DST	下游				
rs2037632	//	//		G	0.1125/0.6613	0.06493(0.02719-0.155)	1.12E-11
rs10949682	PTPRN2		内含子	T	0.6625/0.2121	7.291(3.443-15.44)	5.47E-08
rs13264220		CSMD3	下游	C	0.2125/0.6719	0.1318(0.06239-0.2784)	2.76E-08
rs12684453		ACO1	上游	T	0/0.4355	0(0-nan)	3.7E-10
		MIR873	上游				
rs4333695		APTX	下游	T	0.02857/0.5303	0.02605(0.005889-0.1152)	4.99E-11
		TMEM215	下游				
rs12240999		MPP7	上游	C	0.5417/0.06061	18.32(6.023-55.71)	1.09E-09
		ARMC4	下游				
rs1064134	TAF3		内含子	A	0.2368/0.7258	0.1172(0.05435-0.2529)	9.69E-09
rs5025116		INPP5A	上游	C	0.1625/0.6515	0.1038(0.04755-0.2265)	1.47E-09
rs3009568		CCDC109A	上游	T	0.1184/0.5645	0.1036(0.04394-0.2444)	2.23E-08
		CBARA1	上游				
rs7898954		Hsp40	上游	T	0.05128/0.6364	0.03089(0.01004-0.09506)	6.25E-14
rs4572038		AKR1C2	上游	G	0.275/0.7344	0.1372(0.06542-0.2877)	4.18E-08
		AKR1C3	上游				
rs7926263		PANX3	上游	G	0.6026/0.01667	89.45(11.77-679.6)	7.85E-13
		OR8A1	下游				
rs1454014	//	//		C	0.0125/0.55	0.01036(0.001351-0.0794)	2.14E-13

续表 1

SNP 编号	基因	邻近基因	所在区域	风险等位基因	风险等位基因频率 (病例/对照)	OR(95%CI)	p-obs
rs3019644	//	//		C	0.5946/0.1406	8.963(3.855–20.84)	4.55E-08
rs7969849	LOH12CR1		杂合性缺失	A	0.25/0.7424	0.1156(0.0547–0.2445)	0.000000003
rs9592406		NBEA	上游	T	0.3625/0	NA(NA–NA)	4.66E-08
		RFC3	下游				
rs9570755		OR7E156P	上游	A	0.2564/0.7727	0.1014(0.04706–0.2186)	6.62E-10
		PCDH20	下游				
rs4906864		ATP10A	上游	T	0/0.4091	0(0–nan)	3.58E-09
		GABRB3	下游				
rs4984295		USP3	上游	T	0.6/0.1212	10.88(4.509–26.23)	7.14E-09
		CA12	上游				
rs938355	GSG1L		内含子	T	0.5128/0.05	20(5.77–69.32)	5.91E-09
rs5000698		SERPINB5	上游	T	0.1125/0.6724	0.06176(0.02551–0.1495)	9.31E-12
		VPS4B	上游				
rs7359910	SYT3		内含子	C	0.175/0.6364	0.1212(0.05644–0.2603)	1.16E-08
rs6110226		SIRPB2	上游	G	0.225/0.7188	0.1136(0.05332–0.2421)	3.12E-09
		SIRPD	下游				
rs6122447	KCNQ2		内含子	T	0.5128/0.06897	14.21(4.691–43.05)	4.45E-08
rs6138362		CST7	上游	A	0.1944/0.7121	0.09758(0.04427–0.2151)	9.55E-10
		TMEM90B	下游				
rs6137010	STK35		内含子	C	0.175/0.7031	0.08956(0.04075–0.1968)	1.52E-10
rs2017869	SNRPD3		内含子	G	0.725/0.1346	16.95(6.651–43.19)	3.37E-11
	GGT1		内含子				
rs2688172		FAM19A5	下游	G	0.175/0.6667	0.1061(0.04906–0.2293)	1.52E-09
rs363766	POF1B		错义	A	0/0.6944	0(0–nan)	5.69E-11
rs5931057		DCAF12L2	上游	T	0.6389/0.02632	65.46(8.02–534.3)	1.84E-08
		DCAF12L1	下游				
rs7473282		KLHL13	下游	A	0.119/0.7692	0.04054(0.01099–0.1496)	6.53E-08
rs5941560		CPXCR1	上游	T	0/0.65	0(0–nan)	2.46E-09
		KLHL4	下游				
rs12393285	FRMPD3		内含子	T	0.881/0.05263	133.2(24.27–731.2)	1.34E-13
rs5939828		FAM133A	下游	A	0/0.625	0(0–nan)	7.99E-10
rs5971167		DCAF8L1	上游	T	0.1429/0.8684	0.02525(0.00704–0.09058)	8.96E-11
rs5927307		FAM47B	上游	A	0.675/0	NA(NA–NA)	9.38E-09
rs5974802	FGF13		内含子	T	0/0.5263	0(0–nan)	5.67E-08
rs5958425		SH2D1A	上游	T	0/0.7353	0(0–nan)	4E-11
		STAG2	下游				
rs990373		PCDH11X	下游	A	0/0.6667	0(0–nan)	9.17E-10
		NAP1L3	下游				

表 2 相关基因的 GO 与 Pathway 富集分析结果

功能	P 值	adjust P 值	基因
3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (A-specific) activity	1.31E-05	1.39E-02	AKRIC3 AKRIC2
Prostaglandin metabolic process	5.91E-05	2.07E-02	AKRIC3 AKRIC2 EDN2
Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase activity	7.85E-05	2.07E-02	AKRIC3 AKRIC2
Single strand break repair	2.73E-04	4.80E-02	TNPI APTX
Chromatin assembly complex	2.73E-04	4.80E-02	MPP7 NAP1L3
通路	P 值	adjust P 值	基因
Arachidonic acid metabolism	1.21E-03	9.89E-03	AKRIC3 GGT1
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1.82E-03	1.17E-02	AKRIC2 AKRIC3
Cyanoamino acid metabolism	7.14E-03	2.48E-02	GGT1
Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation)	8.92E-03	2.59E-02	ACO1
Taurine and hypotaurine metabolism	8.92E-03	2.59E-02	GGT1
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1.33E-02	3.34E-02	ACO1
Mismatch repair	2.04E-02	3.75E-02	RFC3
Nitrogen metabolism	2.13E-02	3.83E-02	CA12
Neuroactive ligand-receptor interaction	2.21E-02	3.90E-02	PTGER4 GABRB3
Selenoamino acid metabolism	2.30E-02	3.98E-02	GGT1
Citrate cycle (TCA cycle)	2.91E-02	4.68E-02	ACO1

猜测 rs2017869($P = 3.37E-11$)可能也与 *GGT1* 的表达量存在联系。

3 讨论

HAPE 是一种特发于高原环境的肺水肿, 由高原低压低氧所诱发, 发病机制尚不明确, 目前, 学者们提出高原肺水肿是遗传和环境因素共同作用的结果, 具有遗传易感性^[3,12]。近几年, 世界各个研究小组分别对血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, *ACE*)^[12, 21~23]、内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, *eNOS*)^[13~18, 24, 25]、血管紧张素(Angiotensin, *AGT*)及其受体(Angiotensin II receptor I, *AGRI*)^[3, 24]、热休克蛋白 70(Heat shock protein 70, *HSP70*)^[25]、人白细胞抗原(Human leukocyte antigen, *HLA*)^[26]、线粒体基因组(Mitochondrion DNA, *mtDNA*)^[27]、醛固酮合成酶(Aldosterone synthase) *CYP11B2*^[28, 29]、内皮素(Endothelin-1, *ET-1*)^[21]、肺表面活性剂蛋白 A1(Pulmonary surfactant-associated protein A1, *SP-A1*)和 A2(Pulmonary surfactant-associated protein A2, *SP-A2*)^[30]、 β_2 肾上腺素能受体(β_2 -adrenergic receptor, *ADRB2*)^[31]等基因的众多多态性位点与 HAPE 的易感性进行了相关性研究, 由于研究的人群各不相同, 所受环境影响

也不一致, 报道的研究结果不同, 因此仍需要进一步的研究确认。

通过 NCBI 数据库进行的功能注释研究, 本研究发现 74 个相关基因主要与转录调控和信号转导、调节免疫和炎症、参与脂质代谢、维持胞内葡萄糖平衡、维持钾通道、钙转运、维持细胞连接等相关。我们通过文献挖掘发现, 其中已报道 8 个基因与 HAPE 的发生相关(表 3)。rs11581271 下游 *EDN2*(内皮素 2)基因, 内皮素是一种由血管内皮细胞合成的 21 个氨基酸组成的活性多肽, 是迄今所知最强的缩血管物质, 是调节心血管功能的重要因子, 对维持基础血管张力与心血管系统稳态起重要作用。诸多

表 3 HAPE 相关基因

dbSNP ID	P 值	上下游基因	位置	与 HAPE 相关文献
rs11581271	5.65E-08	<i>EDN2</i>	下游	[32]
rs10932688	1.74E-10	<i>DIRC3</i>	下游	[33]
rs6715605	1.65E-09	<i>ACSL3</i>	上游	[34]
rs17052028	5.28E-08	<i>STC2</i>	上游	[37]
rs12655827	2.61E-10	<i>PTGER4</i>	上游	[9]
rs3009568	2.23E-08	<i>CCDC109A</i>	上游	[38]
rs3009568	2.23E-08	<i>CBARA1</i>	上游	[38]
rs4906864	3.58E-09	<i>GABRB3</i>	下游	[39]

因素影响内皮素的释放,当缺血、缺氧和再灌注损伤时,可以促进血管内皮细胞内皮素基因表达,分泌增加。在心血管系统,尤其在肺脏血管,有较多的内皮素受体,当内皮素与受体相结合时会使肺血管尤其是肺小血管强烈收缩从而造成肺动脉压增高^[32]。rs10932688 上游 *DIRC3* 基因,在 2003 年被 Bodmer 等^[33]发现其两个外显子可以通过与热休克蛋白 *HSPBAP1* 的第二个外显子相拼接形成融合基因转录子,从而影响肾脏功能。低氧血症可以激活肾素-血管紧张素系统,血液中的血管紧张素原在由肾脏分泌的肾素的作用下水解,形成血管紧张素 I;在血浆和组织中,特别是在肺循环血管内皮表面存在血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, *ACE*),*ACE*将 Ang I 降解为 Ang II,引发强烈的血管收缩,导致肺动脉压升高,继而引发形成 HAPE。rs6715605 上游 *ACSL3* 基因(酰基辅酶 A 合成酶长链家族基因 3)主要参与脂代谢,其中催化酯化辅酶 A 与脂肪酸形成酰基辅酶 A,酰基辅酶 A 是脂类代谢的重要中间产物,而辅酶 A 对糖、脂类和蛋白质等代谢都起着重要的作用^[34]。目前研究发现,儿童哮喘可能与胚胎期暴露于多环芳烃类化合物环境时 *ACSL3* 基因甲基化有关^[35]。rs12655827 上游 *PTGER4* 基因(前列腺素受体 4)主要编码前列腺素 E2 受体,该受体与前列腺素 E2 结合,调节血管功能和张力;同时在调节呼吸道平滑肌舒缩功能和炎症反应中起到重要作用^[9]。在以往的研究中线粒体基因组被认为与 HAPE 的发生有一定的联系^[27, 36],rs17052028 附近的 *STC2* 基因(斯钙素 2)主要编码一种糖蛋白激素斯钙素 2^[37],而 rs3009568 附近的两个基因 *CCDC109A* 和 *CBARA1* 则分别编码线粒体钙吸收蛋白和线粒体钙单向转运体蛋白^[38],这 3 个基因产物主要都是作用于线粒体,通过调节 Ca^{2+} 离子通道,控制线粒体对 Ca^{2+} 离子的摄取,防止线粒体 Ca^{2+} 水平失衡。rs4906864 位于编码 γ -氨基丁酸 A 受体 $\beta 3$ 亚基的基因 *GABRB3* 下游, γ -氨基丁酸是一种天然存在的非蛋白组成氨基酸,具有极其重要的生理功能, γ -氨基丁酸 A 受体是一个氯离子通道,通过离子通道的开闭,调节血压和中枢神经系统功能^[39]。rs2017869 位于伽马谷氨酰转移酶 1(*GGT1*)基因内含子中,该酶是“花生四烯酸代谢过程”中重要的酶之一,既往研究发现,在慢性肺梗阻(COPD)病人中 *GGT1* 表达量的变

化可直接引起肺部的炎症反应^[19];*GGT1* 基因内含子中另外一个多态性位点 rs5751901 可影响 *GGT1* 基因的表达量^[20]。据此推测 rs2017869 可能也与 *GGT1* 的表达量存在联系。我们将继续积累样本,验证 rs2017869 位点与 HAPE 的关联,并考证 rs2017869 位点与 *GGT1* 基因表达量之间的关系。

本文通过收集在“玉树 4.14 地震”抢险救灾和援建中急进高原人群罹患 HAPE 与健康对照样本共 77 例,对所有样本全基因组 SNP 进行关联分析,通过对 SNP 位点进行基因定位发现其处于 74 个基因内或者上下游。通过 GO 与 Pathway 功能富集分析及文献挖掘表明绝大多数基因与 HAPE 的发生都有着一定的联系,与之前的诸多报道相符合。本研究主要着重于对 HAPE 易感基因以及遗传标记的初步筛查,为下一步验证这些遗传标记的生物学功能奠定了理论基础。

得到与 HAPE 关联性最强的 57 个显著性差异的 SNP 位点,其中有 17 个是位于基因内部内含子区域,其余均位于基因区域之外。尽管 57 个 SNP 位点均位于基因功能区域之外,我们猜测其中某些 SNP 可能通过影响基因的转录继而调控基因的表达量。Freedman 等^[40]在对“后 GWAS 时代”的思考中提到,eQTL 可以位于基因附近甚至与基因存在一定的距离。因此,我们下一步的工作主要在于扩大样本量验证差异位点,并尝试寻找影响基因表达的 eQTL。

参考文献(References):

- [1] 高钰琪,高文祥.高原卫生防护手册.北京:人民军医出版社,2009:34-57. [\[DOI\]](#)
- [2] 高钰琪.高原军事医学.重庆:重庆出版社,2005:1-4. [\[DOI\]](#)
- [3] Hotta J, Hanaoka M, Droma Y, Katsuyama Y, Ota M, Kobayashi T. Polymorphisms of renin-angiotensin system genes with high-altitude pulmonary edema in Japanese subjects. *Chest*, 2004, 126(3): 825-830. [\[DOI\]](#)
- [4] 中华医学会第三次全国高原医学学术讨论会推荐稿.我国高原病命名、分型及诊断标准.高原医学杂志,2010,20(1):9-11. [\[DOI\]](#)
- [5] Smith JG, Newton-Cheh C. Genome-wide association study in humans. *Methods Mol Biol*, 2009, 573(2): 231-258. [\[DOI\]](#)
- [6] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ,

- Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(3): 559–575. [\[DOI\]](#)
- [7] Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc*, 1955, 50(272): 1096–1121. [\[DOI\]](#)
- [8] Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 2005, 21(16): 3448–3449. [\[DOI\]](#)
- [9] Jones CL, Li TS, Cowley EA. The prostaglandin E₂ type 4 receptor participates in the response to acute oxidant stress in airway epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(2): 552–563. [\[DOI\]](#)
- [10] Schoene RB, Hackett PH, Henderson WR, Sage EH, Chow M, Roach RC, Mills WJ Jr, Martin TR. High-altitude pulmonary edema. Characteristics of lung lavage fluid. *JAMA*, 1986, 256(1): 63–69. [\[DOI\]](#)
- [11] Zhu XF, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen GJ, Elston RC, Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(5): 1139–1148. [\[DOI\]](#)
- [12] Gaillard S, Dellasanta P, Loutan L, Kayser B. Awareness, prevalence, medication use, and risk factors of acute mountain sickness in tourists trekking around the Annapurnas in Nepal: a 12-year follow-up. *High Alt Med Biol*, 2004, 5(4): 410–419. [\[DOI\]](#)
- [13] Droma Y, Hanaoka M, Ota M, Katsuyama Y, Koizumi T, Fujimoto K, Kobayashi T, Kubo K. Positive association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with high-altitude pulmonary edema. *Circulation*, 2002, 106(7): 826–830. [\[DOI\]](#)
- [14] Wang P, Koehle MS, Rupert JL. Genotype at the missense G894T polymorphism (Glu298Asp) in the *NOS3* gene is associated with susceptibility to acute mountain sickness. *High Alt Med Biol*, 2009, 10(3): 261–267. [\[DOI\]](#)
- [15] Ahsan A, Norboo T, Baig MA, Qadar Pasha MA. Simultaneous selection of the wild-type genotypes of the G894T and 4B/4A polymorphisms of *NOS3* associate with high-altitude adaptation. *Ann Hum Genet*, 2005, 69(Pt 3): 260–267. [\[DOI\]](#)
- [16] 周文婷, 胡扬, 徐飞, 邢亚卫, 衣龙彦. eNOS基因多态性与急性高山病低氧运动习服效果的关联研究. *体育科学*, 2010, 30(6): 72–75. [\[DOI\]](#)
- [17] Sun YJ, Fang MW, Niu WQ, Li GP, Liu JL, Ding SQ, Xu Y, Yu GS, Dong JQ, Pan YJ, Dong WY, Wang T, Cao JW, Li XB, Wang ZX, Yu GX, Sun HC, Jia ZH, Liu J, Wang XM, Si Q, Wu QX, Zhou WY, Zhu TC, Qiu CC. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms associated with susceptibility to high altitude pulmonary edema in Chinese railway construction workers at Qinghai-Tibet over 4 500 meters above sea level. *Chin Med Sci J*, 2010, 25(4): 215–221. [\[DOI\]](#)
- [18] Luo YJ, Chen Y, Zhang Y, Zhou QQ, Gao YQ. Association of endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) G894T polymorphism with high altitude pulmonary edema susceptibility: A meta-analysis. *Wilderness Environ Med*, 2012, 23(3): 270–274. [\[DOI\]](#)
- [19] Biljak VR, Rumora L, Cepelak I, Pancirov D, Popović-Grle S, Sorić J, Stjepanović G, Grubišić TZ. Gamma-glutamyl-transferase and C-reactive protein in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Coll Antropol*, 2013, 37(1): 221–227. [\[DOI\]](#)
- [20] Melzer D, Perry JR, Hernandez D, Corsi AM, Stevens K, Rafferty I, Lauretani F, Murray A, Gibbs JR, Paolisso G, Rafiq S, Simon-Sanchez J, Lango H, Scholz S, Weedon MN, Arepalli S, Rice N, Washecka N, Hurst A, Britton A, Henley W, van de Leemput J, Li R, Newman AB, Tranah G, Harris T, Panicker V, Dayan C, Bennett A, McCarthy MI, Ruukonen A, Jarvelin MR, Guralnik J, Bandinelli S, Frayling TM, Singleton A, Ferrucci L. A genome-wide association study identifies protein quantitative trait loci (pQTLs). *PLoS Genet*, 2008, 4(5): e1000072. [\[DOI\]](#)
- [21] Charu R, Stobdan T, Ram RB, Khan AP, Qadar Pasha MA, Norboo T, Afrin F. Susceptibility to high altitude pulmonary oedema: role of *ACE* and *ET-1* polymorphisms. *Thorax*, 2006, 61(11): 1011–1012. [\[DOI\]](#)
- [22] Dehnert C, Weymann J, Montgomery HE, Woods D, Maggiorini M, Scherrer U, Gibbs JS, Bärtsch P. No association between high-altitude tolerance and the ACE I/D gene polymorphism. *Med Sci Sports Exerc*, 2002, 34(12): 1928–1933. [\[DOI\]](#)
- [23] Qi Y, Sun JY, Zhu TC, Wang W, Liu J, Zhou WY, Qiu CC, Zhao D. Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with high-altitude pulmonary oedema: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2011, 12(4): 617–623. [\[DOI\]](#)
- [24] Srivastava S, Bhagi S, Kumari B, Chandra K, Sarkar S, Ashraf MZ. Association of polymorphisms in angiotensin and aldosterone synthase genes of the renin-angiotensin-aldosterone system with high-altitude pulmonary edema. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2012, 13(1): 155–160.

- [25] Qi Y, Niu WQ, Zhu TC, Liu JL, Dong WY, Xu Y, Ding SQ, Cui CB, Pan YJ, Yu GS, Zhou WY, Qiu CC. Genetic interaction of Hsp70 family genes polymorphisms with high-altitude pulmonary edema among Chinese railway constructors at altitudes exceeding 4000 meters. *Clin Chim Acta*, 2009, 405(1–2): 17–22. [\[DOI\]](#)
- [26] Hanaoka M, Kubo K, Yamazaki Y, Miyahara T, Matsuzawa Y, Kobayashi T, Sekiguchi M, Ota M, Watanabe H. Association of high-altitude pulmonary edema with the major histocompatibility complex. *Circulation*, 1998, 97(12): 1124–1128. [\[DOI\]](#)
- [27] 罗勇军, 陈郁, 高钰琪. 线粒体基因组 4977bp 异质性缺失与高原肺水肿易感性无关. *第三军医大学学报*, 2011, 33(23): 2537–2538. [\[DOI\]](#)
- [28] Ahsan A, Charu R, Pasha MA, Norboo T, Charu R, Afrin F, Ahsan A, Baig MA. eNOS allelic variants at the same locus associate with HAPE and adaptation. *Thorax*, 2004, 59(11): 1000–1002. [\[DOI\]](#)
- [29] Mishra A, Ali Z, Vibhuti A, Kumar R, Alam P, Ram R, Thinlas T, Mohammad G, Pasha MA. *CYBA* and *GSTP1* variants associate with oxidative stress under hypobaric hypoxia as observed in high-altitude pulmonary oedema. *Clin Sci*, 2012, 122(6): 299–309. [\[DOI\]](#)
- [30] Saxena S, Kumar R, Madan T, Gupta V, Muralidhar K, Sarma PU. Association of polymorphisms in pulmonary surfactant protein A1 and A2 genes with high-altitude pulmonary edema. *Chest J*, 2005, 128(3): 1611–1619. [\[DOI\]](#)
- [31] Stobdan T, Kumar R, Mohammad G, Thinlas T, Norboo T, Iqbal M, Pasha MA. Probable role of β_2 -adrenergic receptor gene haplotype in high-altitude pulmonary oedema. *Respirology*, 2010, 15(4): 651–658. [\[DOI\]](#)
- [32] 解立新. 内皮素和肺疾患. *军医进修学院学报*, 1996, 17(3): 212–215. [\[DOI\]](#)
- [33] Bodmer D, Schepens M, Eleveld MJ, Schoenmakers EFPM, van Kessel AG. Disruption of a novel gene, *DIRC3*, and expression of *DIRC3-HSPBAP1* fusion transcripts in a case of familial renal cell cancer and t(2;3)(q35;q21). *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, 38(2): 107–116. [\[DOI\]](#)
- [34] Poppelreuther M, Rudolph B, Du C, Großmann R, Becker M, Thiele C, Ehehalt R, Füllekrug J. The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake. *J Lipid Res*, 2012, 53(5): 888–900. [\[DOI\]](#)
- [35] Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang DL, Levin L, Miller R, Ho SM. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of *ACSL3* to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4488. [\[DOI\]](#)
- [36] Luo YJ, Gao WX, Chen Y, Liu FY, Gao YQ. Rare mitochondrial DNA polymorphisms are associated with high altitude pulmonary edema (HAPE) susceptibility in Han Chinese. *Wilderness Environ Med*, 2012, 23(2): 128–132. [\[DOI\]](#)
- [37] 任雪平. 斯钙素的相关研究概述. *商丘师范学院学报*, 2010, 26(3): 108–110. [\[DOI\]](#)
- [38] Alam MR, Groschner LN, Parichatikanond W, Kuo L, Bondarenko AI, Rost R, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF. Mitochondrial Ca^{2+} uptake 1 (MICU1) and mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic β -cells. *J Biol Chem*, 2012, 287(41): 34445–34454. [\[DOI\]](#)
- [39] Sidorkiewicz M, Brocka M, Bronis M, Grek M, Jozwiak B, Piekarska A, Bartkowiak J. The altered expression of $\alpha 1$ and $\beta 3$ subunits of the gamma-aminobutyric acid A receptor is related to the hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(7): 1537–1542. [\[DOI\]](#)
- [40] Freedman ML, Monteiro AN, Gayther SA, Coetzee GA, Risch A, Plass C, Casey G, De Biasi M, Carlson C, Duggan D, James M, Liu P, Tichelaar JW, Vikis HG, You M, Mills IG. Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. *Nat Genet*, 2011, 43(6): 513–518. [\[DOI\]](#)