

微粒体环氧化物水解酶基因多态性与慢性阻塞性肺疾病的关系

肖丹 王辰 杜敏捷 庞宝森 张洪玉 肖白 刘敬忠 翁心植 苏丽

David C. Christiani

【摘要】 目的 明确微粒体环氧化物水解酶(mEH)基因多态性与中国人慢性阻塞性肺疾病(COPD)易感性的关系。方法 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析的方法检测 100 对年龄、性别匹配的 COPD 患者和健康对照者 mEH 外显子 3 (Tyr113→His)、外显子 4 (His139→Arg) 基因多态性。结果 (1) COPD 组有 42 例(42%), 对照组有 32 人(32%) 为 mEH 外显子 3 的 His139 突变杂合子 ($P = 0.015$), 经年龄、性别、体块指数和吸烟年支数调整后的 OR 值为 2.96(95% CI 为 1.24~7.09); (2) 极慢代谢活性的 mEH 基因型对应其他代谢活性基因型在病例组和对照组间未发现明显差别; (3) 将病例组分为不吸烟者和吸烟者(包括目前仍吸烟者和戒烟者)两组, 极慢代谢活性的 mEH 基因型对应其他代谢活性基因型在不吸烟者 OR 值均大于 1.00, 而在吸烟者中均小于 1.00。结论 (1) mEH 外显子 3 的 His113 突变杂合子与中国 COPD 易感性有关; (2) COPD 患者 mEH 基因型与吸烟之间可能存在交互作用。

【关键词】 肺疾病, 阻塞性; 微粒体; 环氧化物水解酶类; 基因; 吸烟

Association between polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase (mEH) gene and chronic obstructive pulmonary disease XIAO Dan*, WANG Chen, DU Min-jie, PANG Bao-sen, ZHANG Hong-yu, XIAO Bai, LIU Jing-zhong, WENG Xin-zhi, SU Li, David C. Christiani. *Beijing Institute of Respiratory Medicine, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China

Corresponding Author: XIAO Dan

【Abstract】 **Objective** To investigate the association between polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase (mEH) gene and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in a Chinese population. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were performed to genotype mEH polymorphisms in exon3 (Tyr113→His) and exon4 (His139→Arg) in 100 COPD patients and 100 age and sex matched healthy controls. **Results** (1) The proportion of mEH heterozygotes in exon3 was significantly higher in the patients with COPD than that in the control subjects (42% vs 32%). The odds ratio (OR) adjusted by age, sex, body mass index (BMI) and cigarettes years was 2.96(95% CI 1.24~7.09). (2) There was no marked difference in very slow activity genotype versus other genotypes between COPD patients and controls. (3) When COPD patients were nonsmokers, the OR of very slow activity genotype versus other genotypes was more than 1.00, and when COPD patients were smokers (Current smokers and ex-smokers), the OR was less than 1.00. **Conclusions** (1) mEH heterozygotes in exon3 might be associated with the susceptibility to COPD in China. (2) The interaction might be existed between mEH genotype and smoke.

【Key words】 Lung diseases, obstructive; Microsomes; Epoxide hydrolases Genes; Smoking

基金项目: 国家“十五”科技攻关课题资助项目(2001BA703B03); 北京市自然科学基金资助项目(7022014)

作者单位: 100020 北京, 首都医科大学附属北京朝阳医院 - 北京呼吸疾病研究所[肖丹(现在首都医科大学附属北京天坛医院呼吸科)、王辰、杜敏捷、庞宝森、张洪玉、翁心植], 基础医学研究中心(肖白、刘敬忠); 哈佛大学公共卫生学院环境健康系职业病研究科(苏丽、David C. Christiani)

通讯作者: 肖丹

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是严重影响公共健康的重大疾病, 以气流受限为特征^[1]。其危险因素包括个体易感因素和环境因素, 常常是由于二者相互作用而发生。吸烟是 COPD 的主要危险因素, 与气道阻塞有明确的关系。但对吸烟的反应却有显著的个体

间差异,估计仅有 10% ~ 20% 的慢性重度吸烟者发展成为有症状的 COPD 患者^[2],表明有额外的遗传或环境因素,有助于发展成 COPD。另外,一些患者在年龄很小的时候就发展成气流阻塞,COPD 的发生有家族聚集现象等^[3],均表明遗传因素与 COPD 有关。微粒体环氧化物水解酶(microsomal epoxide hydrolase, mEH)是一种重要的抗氧化解毒酶,参与对外来异型生物物质、氧化物和反应性氧化物中间产物在肺中的首过代谢。国内外已有一些学者对 mEH 的基因多态性与 COPD 的关系进行了研究^[4-7]。但不同人种,COPD 的发生率不同,基因多态性与疾病的关系也不同^[8],我们的主要目的是以分子流行病学的方法探讨 mEH 基因多态性与中国人 COPD 易感性的关系。

对象与方法

一、对象

病例组为曾在首都医科大学附属北京朝阳医院就诊或住院的确诊的 COPD 患者 100 例(采用系列检查确诊 COPD,如肺功能检测、胸片、高分辨 CT、血清 IgE 测定和过敏原皮试等),并进行标准 ATS 问卷调查;根据肺功能测试、心电图检查和医院体检结果,筛选性别、年龄(±2 岁)匹配的健康对照者 100 名。

二、实验方法

病例和对照组分别取静脉血 3ml 提取 DNA(采用新鲜血标本,依照细胞沉淀、蛋白沉淀、DNA 沉淀和 DNA 纯化次序提取 DNA)后冻存于-20℃冰箱,集中进行基因检测。

用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)-限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析检测 mEH 基因多态性。采用 PE2400 型 PCR 扩增仪进行基因扩增。

1. PCR 反应体系的组成(1 份标本):灭菌双蒸水,5.66 μl;10 × 缓冲液,1 μl;5 × Q-溶液,2 μl;MgCl₂(25 mmol/L),0.2 μl;dNTP 混合物(100 mmol/L),0.08 μl(每份 0.02 μl);引物 1(200 pmol/μl),0.01 μl;引物 2(200 pmol/μl),0.01 μl;Hotstar 酶,0.04 μl;DNA 模板,1 μl;合计 10 μl。

2. PCR 反应条件:初始 DNA 降解:95℃ 15 min;PCR 循环(31 个):95℃ 30 s;62℃ 30 s(外显子 4)或 56℃ 30 s(外显子 3);72℃ 60 s;最后延伸:72℃ 10 min。

3. RFLP 反应(1 份标本):(1)mEH 外显子 3: EcoR V(20U/μl),0.3 μl;10 × 缓冲液 3,1.5 μl;100 × BSA,0.15 μl;灭菌双蒸水,3.05 μl;PCR 产物,10 μl;合计 15 μl。37℃ 孵育 3 h。(2)mEH 外显子 4:Rsa I(10U/μl),0.6 μl;10 × 缓冲液 1,1.5 μl;灭菌双蒸水,2.9 μl;PCR 产物,10 μl;合计 15 μl。37℃ 孵育 3 h。

4. 电泳分离 DNA 酶解片段:分别通过 2%、3% 琼脂糖电泳分离 mEH 外显子 3 和外显子 4 DNA 酶解片段,在凝胶成像仪(UVP-Image Store 7500)下判定被检测基因型别。

5. 基因型判定:(1)mEH 外显子 3 基因型的判定:Tyr 113/Tyr 113 野生纯合子:140 and 22 bp;His113/His113 突变纯合子:162 bp;Tyr 113/His113 杂合子:162,140 and 22 bp。(2)mEH 外显子 4 基因型的判定:His139/His139 野生纯合子:295 and 62 bp;Arg139/Arg139 突变纯合子:174,121, and 62 bp;His139/Arg139 杂合子:295,174,121, and 62 bp。(3)通过 mEH 基因型判定酶代谢活性^[9]:极慢代谢活性、慢代谢活性、中间代谢活性和快代谢活性。

DNA 提取、PCR-RFLP 所用试剂由哈佛大学公共卫生学院提供。dATP, dTTP, dGTP, dCTP 等购自华美生物工程公司;引物设计参考文献[9],由美国 LT 公司合成。

三、统计学处理

用 SPSS10.0 统计软件包进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。病例-对照组间计量资料比较采用 *t* 检验。基因频率采用基因计数法计算,基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律及组间等位基因频率的差异比较用 χ^2 检验。用 Logistic 回归计算 OR 值和 95% CI。 $P < 0.05$ 为差异有显著性标准。

结 果

一、病例组和对照组的基本资料(表 1)

病例组有 79 例为曾吸烟者,有 31 例已经戒烟;对照组有 44 人为曾吸烟者,有 14 人已经戒烟;病例组吸烟量明显高于对照组。

二、病例组和对照组 mEH 基因的检测结果

1. COPD 患者和健康对照 mEH 基因型检测结果:COPD 组有 42 例(42%),对照组有 32 人(32%)为 mEH 外显子 3 的 His113 突变杂合子(差异具有

表 1 病例组和对照组的基本资料

项目	病例组	对照组
男: 女	64: 32	64: 32
年龄(岁)	62 ± 7	61 ± 7
体块指数(kg/m ²)	24 ± 5	26 ± 5 *
吸烟年支分布(人数)		
0	21	56
<400	30	25
400 ~	32	12
800 ~	9	4
1200 ~	5	2
≥1600	3	1
吸烟状态(人数)		
已戒烟者	31	14
目前吸烟者	48	30
吸烟年支数	554.4 (50 ~ 2500)	429.9 (20 ~ 1600) *
肺功能		
FEV ₁ (%)	46 ± 16	102 ± 14 *
FEV ₁ %, ≤50	35 ± 9 (n = 61)	
FEV ₁ %, >50	62 ± 9 (n = 39)	
FEV ₁ /FVC(%)	53 ± 10	87 ± 6 *

注: 不吸烟者吸烟年支数 = 0; * 病例组与对照组相比, $P < 0.01$

显著性, $P = 0.015$), 经年龄、性别、体块指数和吸烟年支数调整后的 OR 值为 2.96 (95% CI 1.24 ~ 7.09), 表 2。

2. COPD 患者和健康对照 mEH 突变基因频率检测结果: COPD 组 mEH 外显子 3 和外显子 4 突变

基因的频率分别为 0.59 和 0.085, 对照组分别为 0.55 和 0.09, 差异无显著性(表 3)。

表 3 COPD 患者和健康对照 mEH 突变基因频率检测结果

组别	例数	突变基因频率	OR(95% CI) (传输突变基因)
外显子 3			
病例组	100	0.59	0.85(0.57 ~ 1.26)
对照组	100	0.55	1.0
外显子 4			
病例组	100	0.085	0.98(0.66 ~ 1.46)
对照组	100	0.09	1.0

3. COPD 患者和健康对照不同代谢活性的 mEH 基因型的比较: 极慢代谢活性的 mEH 基因型与其他代谢活性基因型相比, 病例组和对照组未发现明显差别(表 4)。

4. 吸烟对 COPD 患者 mEH 代谢活性的比较: 将病例组分为不吸烟者和吸烟者(包括目前仍吸烟者和戒烟者)两组, 极慢代谢活性的 mEH 基因型对应其他代谢活性基因型在不吸烟者 OR 值均大于 1.00, 而在吸烟者中均小于 1.00(表 5)。

讨 论

研究表明, 吸烟是 COPD 发病的主要病因。烟雾中众多的环氧化物^[10] 及其前身如未经 mEH 解

表 2 COPD 患者和健康对照 mEH 基因型检测结果

组别	例数	野生纯合子		杂合子		突变纯合子	
		例数	百分率(%)	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)
外显子 3 基因多态性							
病例组	100	20	20	42	42	38	38
对照组	100	29	29	32	32	39	39
OR(95% CI)		1.0		1.90(0.92 ~ 3.96)		1.41(0.69 ~ 2.91)	
调整后的 OR(95% CI) *		1.0		2.96(1.24 ~ 7.09) **		1.67(0.73 ~ 3.78)	
外显子 4 基因多态性							
病例组	100	83	83	17	17	0	
对照组	100	82	82	18	18	0	
OR(95% CI)		1.07(0.52 ~ 2.22)		1.0			
调整后的 OR(95% CI) *		0.88(0.38 ~ 2.02)		1.0			

注: * 调整年龄、性别、体块指数和吸烟年支数; ** 与对照组比较, $P = 0.015$

表 4 极慢代谢活性的 mEH 基因型对应其他代谢活性基因型患 COPD 危险性的比较

组别	例数	对应所有其他代谢活性	对应慢代谢活性	对应中间代谢活性	对应快代谢活性
病例组	100	34/66	34/40	34/21	34/5
对照组	100	32/66	32/36	32/24	32/8
OR(95% CI)		0.96(0.53 ~ 1.73)	1.08(0.56 ~ 2.09)	0.89(0.42 ~ 1.89)	0.61(0.18 ~ 2.05)
调整后 OR(95% CI) *		1.06(0.54 ~ 2.09)	1.31(0.60 ~ 1.72)	0.73(0.31 ~ 2.88)	0.60(0.15 ~ 2.45)

注: * 调整年龄、性别、体块指数和吸烟年支数

表 5 极慢代谢活性的 mEH 基因型对应其他代谢活性基因型在不吸烟者和吸烟者中患 COPD 危险性的比较

组别	例数	对应所有其他代谢活性	对应慢代谢活性	对应中间代谢活性	对应快代谢活性
不吸烟者	21	1.32(0.39~4.43)	1.97(0.48~8.13)	1.01(0.21~4.88)	-
吸烟者	79	0.87(0.35~2.14)	0.99(0.38~2.99)	0.53(0.17~1.72)	-

注:吸烟者包括目前吸烟者和已戒烟者

毒,可直接与 DNA、RNA、蛋白质和脂质结合,导致严重的细胞毒、基因毒效应。因环氧化物具有上述组织破坏作用、抗蛋白酶活性和增加蛋白酶分泌的效应,故在 COPD 发病中起重要作用。mEH 可催化各种外源性环氧化物,使之水解,形成反式的溶于水的二氢二醇,是参与解毒过程的关键物质。Hassett 等^[11]发现由于有或者没有两个点突变基因的存在,mEH 基因多态性在人群中表现为 4 种 mEH 等位基因,两个点突变分别在外显子 3 和外显子 4 上,前者为 T→C,相应的蛋白表型为 Tyr113→His,酶活性至少减少 50%,称为慢等位基因(slow allele);后者为 A→G,蛋白表型为 His139→Arg,酶活性至少增加 25%,称为快等位基因(fast allele);野生型等位基因没有这些改变,具有正常的酶活性;很少的人同时具有两种点突变,其酶活性也是正常的。

有研究报道,mEH 基因多态性与酒精性肝病、肝细胞癌、结肠癌、肺癌、帕金森氏病和自发性流产等多种疾病的易感性有关。关于其多态性与 COPD 的关系,英国^[4]、朝鲜^[5]、日本^[6]和中国^[7]均有过报道,但结论不一。英国学者研究显示 mEH 的基因多态性可能与 COPD 和肺气肿的易感性有关^[4];朝鲜^[5]和中国学者^[7]的研究结果却未发现 mEH 的基因多态性与 COPD 的易感性有关;日本人群 mEH 基因多态性与肺气肿的易感性亦不相关^[12],而另一项研究^[6] mEH 基因外显子 3 His139 突变纯合子与 COPD 的进展而不是 COPD 易感性有关。

本研究用 PCR-RFLP 方法检测 100 对年龄、性别匹配的 COPD 患者和健康对照 mEH 外显子 3 和外显子 4 基因多态性。因中国的 COPD 患者中遗传 α_1 -AT 缺陷少见,故本研究中病例组的选择未强调排除 α_1 -AT 缺陷患者。结果发现 COPD 组有 42 人(42%),对照组为 32 人(32%)为 mEH 外显子 3 的 His139 突变杂合子,经年龄、性别、体块指数和吸烟年支数调整后的 OR 值为 2.96 (95% CI 1.24~7.09),说明 mEH 外显子 3 的 His113 突变杂合子与中国 COPD 的发生有关。病例组和对照组在突变基因频率和酶活性方面没有发现明显差别。本研究是

以分子流行病学的方法对 mEH 的基因多态性与 COPD 的易感性进行研究,与国内外一些研究结果的差异可能与种族、研究对象的选择以及样本量的多少有关。

研究表明,吸烟对 mEH 活性具有诱导作用。有研究使用 PCR-RFLP 方法调查 974 例高加索肺癌患者和 1142 名对照,未发现 mEH 基因型和肺癌危险性具有相关性。然而,极慢代谢活性基因型和环境交互作用分析表明,累积吸烟量在 mEH 基因型和肺癌危险性之间的关系上起一种枢轴的作用,极慢代谢活性基因型在非吸烟者是一种直接的危险因子,而在重度吸烟者为一种相对的保护因子^[9]。已知吸烟是 COPD 的主要原因,但对于 COPD 患者,基因与环境存在何种交互作用尚不清楚。本文因研究样本量小,故将 COPD 患者分为非吸烟者和吸烟者(包括目前仍吸烟者和戒烟者)两组,观察到一种现象:VL 活性基因型对应其他活性基因型,在非吸烟者 OR 值均大于 1,而在吸烟者中均小于 1。提示吸烟对 mEH 基因型和 COPD 的关系判定可能有影响。也就是说,在 COPD 患者,mEH 基因型与吸烟之间可能存在交互作用。但吸烟在 mEH 基因型与 COPD 关系上的确切作用,有待于扩大样本量后进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163: 1256-1276.
- 2 Bascom R. Differential susceptibility to tobacco smoke: possible mechanisms. Pharmacogenetics, 1991, 1: 102-106.
- 3 Givelber RJ, Couropmitree NN, Gottlieb DJ, et al. Segregation analysis of pulmonary function among families in the Framingham study. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157: 1445-1451.
- 4 Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. Lancet, 1997, 350: 630-633.
- 5 Yim JJ, Park GY, Lee CT, et al. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. Thorax, 2000, 55: 121-125.
- 6 Yoshikawa M, Hiyama H, Ishioka S, et al. Microsomal epoxide hydrolase genotypes and chronic obstructive pulmonary disease in

- Japanese. *Int J Mol Med*, 2000, 5: 49-53.
- 7 张荣葆, 张爱珍, 何权瀛, 等. 中国北方汉族人微粒体环氧化物水解酶基因多态性与慢性阻塞性肺疾病易感性的关系. 中华内科杂志, 2002, 41: 11-14.
- Zhang RB, Zhang AZ, He QY, et al. Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Han nationality of North China. *Chin J Intern Med*, 2002, 41: 11-14.
- 8 Wu X, Gwyn K, Amos CI, et al. The association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in African-Americans and Mexican-Americans. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 923-928.
- 9 Wei Zhou, Sally W, Thurston, et al. The Interaction between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention*, 2001, 10: 461-466.
- 10 Idell S, Zwieb C, Kumar A, et al. Pathways of fibrin turnover of human pleural mesothelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 7: 414-426.
- 11 Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, et al. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet*, 1994, 3: 421-428.
- 12 Takeyabu K, Yamaguchi E, Suzuki I, et al. Gene polymorphism for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema in a Japanese population. *Eur Respir J*, 2000, 15: 891-894.

(收稿日期: 2003-02-06)

(本文编辑:高健)

· 读者·作者·编者 ·

本刊开辟“急重症抢救”栏目

本刊从 2002 年第 6 期开始推出“急重症抢救”的栏目。这一栏目将较详细地介绍对急重症抢救的成功经验及临床体会, 以期使临床工作者得以借鉴, 提高对急重症的抢救水平。与本刊“危重病医学”栏目文稿不同之处是, 这一栏目系原创性临床论文, 性质等同于“论著”; 而后者是以继续教育形式为主的讲座。

本栏目投稿的具体要求如下。

1. 病例的选择: (1)治疗过程复杂的急重症病例; (2)涉及多学科、多领域的疑难病例; (3)在抢救过程中或诊断中有经验、教训可以借鉴的病例; (4)其他: 对临床工作, 尤其是对基层医院的急诊抢救工作有提示或重要的指导意义的

病例。以上病例最终获得明确诊断及成功的经验。

2. 写作格式及要求: (1)文题可以用主要的诊断或主要体征命名; (2)论文主要分“临床资料”和“分析与讨论”两部分, 还可以有参考文献; (3)可以配有相应的图表资料, 如: “生命指标监测图”; (4)“临床资料”部分要交代病例的一般情况(包括主诉、病史、体格检查、实验室检查)及抢救过程; (5)“分析与讨论”部分要求逻辑性强, 条理清楚, 能较好地体现正确的临床思维, 对临床工作有实际借鉴及启迪作用; (6)字数一般在 4 000 字以内。

欢迎广大读者、作者向本栏目踊跃投稿并进行评议。

本刊“临床医学影像”栏目征稿

医学影像学检查是临床常用的诊断手段。影像学改变是病理改变的反映, 但不同的病理改变往往有相似的影像学表现, 这给诊断带来很大困难。为了促进临床影像诊断经验的交流和诊断、鉴别诊断水平的提高, 《中华医学杂志》自 2001 年第 1 期开辟“临床医学影像”栏目, 为特殊的、少见的、但具有临床启发意义的影像学表现提供一个展示园地, 使局部的、个人的经验尽快地为广大临床医师借鉴, 为临床医学影像诊断积累宝贵的第一手资料。本栏目是一个以图

片展示为主的栏目, 要求提供高质量的影像图片, 图片必须清晰、对比度好、病变特征显示明确。每篇文章可提供 2~4 幅不同影像技术的图片, 如 X 线、CT、磁共振成像、超声、核素显像或病理图片等。文字部分则宜简炼, 描述病人的简要病史, 主要影像学表现, 经病理或临床科学手段确定的最后诊断结果, 不进行讨论, 不引用参考文献, 字数在 400 字以内。欢迎踊跃投稿。