

· 论著 ·

# 谷胱甘肽 S-转移酶 P1 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 明确谷胱甘肽 S-转移酶 P1( GSTP1 )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 对 COPD 进行分子流行病学初步研究 ,采用病例对照研究设计 ,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 GSTP1 外显子 5 基因多态性 ,用 Logistic 回归计算比值比( OR )和 95% 可信区间( CI )。结果 经调整年龄、性别、体重指数和吸烟年支数 ,COPD 组和对照组 GSTP1 基因多态性没有明显差异(  $P$  值均  $>0.05$  )。结论 GSTP1 基因多态性与中国 COPD 的易感性可能没有明显关系。

**【关键词】** 肺疾病 阻塞性 ; 谷胱甘肽 S-转移酶 P1 ; 多态现象(遗传学) ; 吸烟

**Association between polymorphisms in the gene coding for glutathione S-transferase P1 and chronic obstructive pulmonary disease** XIAO Dan<sup>\*</sup>, WANG Chen, DU Min-jie, PANG Bao-sen, ZHANG Hong-yu, XIAO Bai, LIU Jing-zhong, WENG Xin-zhi, SU Li, David C Christiani. <sup>\*</sup>Beijing Chaoyang Hospital-Beijing Institute of Respiratory Medicine, Capital University of Medical Science, Beijing 100020, China

**Corresponding Author:** WANG Chen, Beijing Chaoyang Hospital-Beijing Institute of Respiratory Medicine, Capital University of Medical Science, Beijing 100020, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the association between polymorphisms in the gene coding for glutathione S-transferase P1( GSTP1 ) and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease( COPD ) in a Chinese population. **Methods** This was a pilot study of the molecular epidemiology in patients with COPD. The research design was a case-control study. Polymerase chain reaction ( PCR ) and restriction fragment length polymorphism ( RFLP ) were performed to genotype GSTP<sub>1</sub> polymorphisms in exon 5 in 100 COPD patients and 100 age and sex matched healthy controls. Logistic regression analysis method was used to calculate the odds ratio( OR ) and the 95% confidence interval( CI ). **Result** There was no significant difference in GSTP<sub>1</sub> polymorphisms adjusted by age , sex , body mass index and smoking between COPD patients and controls. **Conclusion** The gene polymorphism for GSTP<sub>1</sub> was not associated with susceptibility to COPD in the Chinese population.

**【Key words】** Lung disease, obstructive ; Glutathione S-transferase P1 ; Polymorphism ( genetics ) ; Smoking

慢性阻塞性肺疾病( COPD )是严重影响公众健康的重大疾病 ,以气流受限为特征。气流受限不能

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

作者单位 100020 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 100050 )、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 ); Occupational Health Program, Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts 02115-9957, USA( 苏丽、David C Christiani )

通讯作者 苏丽

完全逆转 ,并进行性发展 ,伴有气道对毒性颗粒或气体的异常炎症反应<sup>[1]</sup>。COPD 的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差异 据报道仅有 10% ~ 20% 的慢性重度吸烟者发展为有症状的 COPD 患者<sup>[2]</sup> ,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<sup>[3]</sup> 均表明遗传因素与 COPD 有关。

谷胱甘肽 S-转移酶( GSTs )是具有多种生理功

能的同功酶家族, 参与机体的二项解毒反应。国外已有学者对 GST 基因多态性与 COPD 的关系进行了研究<sup>[4,5]</sup>, 但结果不一。我们应用分子流行病学的方法初步探讨我国 COPD 的发病是否与谷胱甘肽 S-转移酶 P1(GSTP1) 的基因多态性有关。

## 对象与方法

### 一、对象

COPD 组: 1997 年 1 月 ~ 2002 年 1 月在首都医科大学附属北京朝阳医院就诊或住院确诊的 COPD 患者 100 例, 均接受肺功能检查, 有 62 例患者进行胸片检查, 并进行标准美国胸科协会(ATS)问卷调查(包括个人情况、职业史、症状、既往疾病史、烟草抽吸史、家庭取暖和燃料、家族史、就业史等)以明确病史、危险因素接触史, 从而协助诊断和资料分析, 诊断标准符合慢性阻塞性肺疾病诊治指南<sup>[6]</sup>。对照组: 根据肺功能测试、心电图检查和医院体检结果, 筛选性别、年龄匹配的健康对照者 100 名。

### 二、实验方法

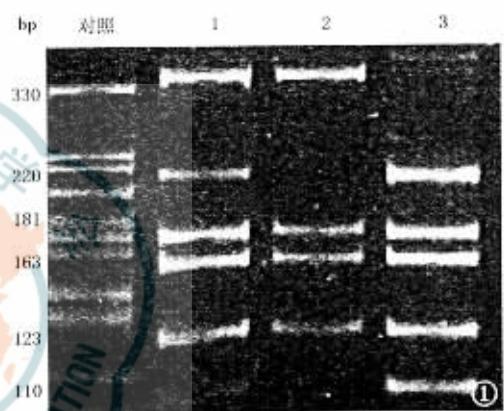
用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 GSTP1 外显子 5 基因多态性, 采用美国 PE2400 型 PCR 扩增仪(美国应用生物系统公司生产)进行基因扩增。DNA 提取、PCR-RFLP 所用试剂由美国哈佛大学公共卫生学院提供。dATP、dTTP、dGTP、dCTP 等购自北京华美生物工程公司, 引物设计参考文献[7], 并由美国 LT 公司合成, 即: GSTP1 外显子 5: GSTP1-F 为 5'-CGC ATGCTGCTGGCAGATCAG-3'; GSTP1-R 为 5'-CAA GCCACCTGAGGGTAAAGG-3'。

取所有研究对象静脉血 3 ml, 依照细胞沉淀、蛋白沉淀、DNA 沉淀和 DNA 纯化次序, 提取 DNA。PCR 反应体系的组成(10 μl): 10 倍缓冲液 1 μl, dNTP 混合物(100 mmol/L) 0.08 μl, GSTP1-F(200 pmol/μl) 0.05 μl, GSTP1-R(200 pmol/μl) 0.05 μl, 灭菌双蒸水 7.77 μl, Hotstar Taq 酶(热启动的 DNA 聚合酶) 0.05 μl(0.25 U), DNA 模板 1 μl。

PCR 扩增条件为: 初始 DNA 降解: 95℃、15 min; PCR 循环 38 次: 95℃、45 s, 66℃、45 s, 72℃、90 s; 最后延伸: 72℃、8 min。

限制性内切酶酶切反应(15 μl): 限制性内切酶 Alw 26I(BsmA I) 5 000 U/ml 1 μl, 10 倍缓冲液 1.5 μl, 灭菌双蒸水 2.5 μl, PCR 产物 10 μl。

PCR 产物用限制性内切酶 Alw 26I, 经 55℃ 孵育 16 h, 通过 8% 丙烯酰胺胶电泳分离 GSTP1 DNA 酶解片段, 在凝胶成像仪(UVP-Image Store 7500, 英国 UVP 公司产)下, 判定被检测基因型别(图 1)。



1: 110/181 杂合子 2: 110 纯合子 3: 181 纯合子

图 1 GSTP1 基因型判定

### 三、统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件分析数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 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  $\chi^2$  检验。用 Logistic 回归计算 OR 值和 95% CI,  $P < 0.05$  为统计学差异有显著性。

## 结 果

### 一、COPD 组和对照组的基本资料

COPD 组有 79 例为曾吸烟者, 其中 31 例已经戒烟。对照组有 44 例为曾吸烟者, 其中 14 例已经戒烟。

表 1 COPD 组和对照组的基本资料比较

组别	例数	性别 男 女	年龄 (岁)	体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )	年吸烟支数(例数)					吸烟状态		年吸烟支数 平均(范围)	肺功能 (%) FEV <sub>1</sub> FEV <sub>1</sub> /FVC			
					0 399	1~ 799	400~ 1 199	800~ 1 599	1 200~ ≥1 600	已戒 烟者	目前仍 吸烟者					
COPD 组	100	64	32	62 ± 7	24 ± 5*	21	30	32	9	5	3	31	48	554(50~2 500)*	46 ± 16*	53 ± 10*
对照组	100	64	32	61 ± 7	26 ± 5	56	25	12	4	2	1	14	30	430(20~1 600)	102 ± 14	87 ± 6

注: FEV<sub>1</sub>: 一秒钟用力呼气容积, FVC: 用力肺活量; 与对照组相比 \*  $P < 0.01$

COPD 组的吸烟量明显高于对照组 ( $P = 0.00076$ )。

表 2 COPD 组和对照组 GSTP1 基因型的分布比较

组 别	例数	I105 纯合子	I105/V105 杂合子	V105 纯合子	I105 基因频率
		例数(%)	例数(%)	例数(%)	
COPD 组	100	70(70)	29(29)	1(1)	0.85
对照组	100	57(57)	40(40)	3(3)	0.77
OR 值(95% CI)		3.68(0.37~36.30)	2.17(0.22~21.90)	1.0	-
调整后 OR 值(95% CI)*		2.21(0.21~23.51)	0.75(0.06~9.24)	1.0	-

注 :\* 调整年龄、性别、体重指数和吸烟年支数

两组的基本资料见表 1。

## 二、COPD 组和对照组 GSTP1 基因的检测结果

研究对象基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。GSTM1 基因的检测结果见表 2, 经 Logistic 回归方法调整年龄、性别、体重指数和吸烟年支数,COPD 组和对照组 GSTP1 基因多态性比较差异无显著性( $P$  值均  $>0.05$ )。

## 讨 论

迄今为止,GST 的 4 种基因,即 GSTM1、GSTM3、GSTP1 和 GSTT1 已证实具有多态性,基因的多态性可引起酶活性的改变,与疾病特别是肿瘤的易感性密切相关。有研究认为,GSTM 基因的缺失和肺气肿的发病有关,但在肺泡、肺泡巨噬细胞和支气管中 GSTP1 的基因表达较 GSTM 和其他 GSTs 丰富<sup>[8]</sup>,且 GSTP1 能防止脂质过氧化乙醛对胚胎性视黄酸合成的抑制,而在弹性蛋白酶诱导的实验性肺气肿模型中用视黄酸治疗可使肺泡恢复正常。GSTP1 还具有保护作用,可防止吸烟所致的气道细胞损伤<sup>[9]</sup>。因此,GSTP1 和 COPD 的关系日益引起人们的重视。

GSTM1 基因定位于染色体的 11q13,全长约 3 kb,包括 6 个内含子和 7 个外显子。其外显子 5、6 存在多态性<sup>[10]</sup> 外显子 5 上为 G→A 的改变导致蛋白质 105 位上的异亮氨酸(Ile)转变为缬氨酸(Val)外显子 6 上为 C→T 的改变导致蛋白质 114 位上的丙氨酸(Ala)转变为 Val。GSTP1 编码的酶可催化一系列底物亲电子中心与还原型谷胱甘肽结合,从而在外源化学物的代谢过程中起重要作用。研究表明,GSTM1 酶-Val105 的热稳定性比 GSTP1 酶-Ile105 低 2~3 倍,GSTM1 酶-Val114 的酶活力较 GSTP1 酶-Ala114 并无明显下降<sup>[11]</sup>。

目前证实,GSTM1 的两个多态性位点基因频率在不同种族群体间是不同的<sup>[11]</sup>。本组研究检测结果发现:I105/V105 等位基因的频率分别为 0.85 和

0.15 与 Board 等<sup>[10]</sup>报道的中国人 I105、V105 等位基因的频率分别为 0.81 和 0.19 结果相似。

日本学者<sup>[4]</sup>用 PCR-RFLP 法检测 53 例 COPD 患者和 50 名健康对照者 GSTP1 基因多态性,结果发现:COPD 组 I105 基因型的频数明显高于健康对照组(0.90 对 0.74),其 I105 纯合子对所有其他基因型的 OR 值为 3.5,认为 GSTP1/I105 与 COPD 易感性有关。韩国学者<sup>[5]</sup>用相同方法对 89 例 COPD 患者和 94 名健康吸烟者 GSTP1 基因多态性进行检测,但未发现两者有相关性。

Logistic 回归分析是分子流行病学研究的一种常用的统计方法,可以对多种类型的参数如基因、环境因素、发病年龄等进行估计和检验,能得到较精确的发病风险估计值。大量研究证实,吸烟是导致 COPD 的最重要的环境危险因素。在本研究中,COPD 组吸烟量亦明显高于对照组。因此本组研究在探讨遗传因素在 COPD 发生中的作用时,吸烟是一重要的混杂因素。为消除混杂因素的影响,我们将研究对象的年吸烟支数和一些基本变量包括年龄、性别和体重指数带入 Logistic 回归模型进行调整,分析 GSTP1 基因型与 COPD 发生风险的关系,以确实消除这些因素引起的差异,结果发现 COPD 组和对照组 GSTP1 基因多态性比较差异无显著性,表明 GSTP1 基因多态性与中国 COPD 易感性可能无关。确切结果尚需扩大样本量验证,与国外研究结果的差异可能与人种和研究对象选择不同有关。

由于 COPD 是由环境因素和遗传易感性相互作用引起的复杂的遗传疾病,在分子水平了解的很少,涉及许多炎症细胞、介质和酶,但它们的相对重要性尚不清楚。因而,有必要进一步寻找中国人 COPD 易感基因,明确其在 COPD 发生中的作用,为了解 COPD 发生机制及对未来基因治疗提供理论依据。

## 参 考 文 献

- diagnosis , management , and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 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 ( 5 Pt 1 ) : 1445-1451.
- 4 Ishii T , Matsuse T , Teramoto S , et al. Glutathione S-transferase P1 ( GSTP1 ) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax , 1999 , 54 : 693-696.
- 5 Yim JJ , Yoo CG , Lee CT , et al. Lack of association between Glutathione S-transferase P1 polymorphism and COPD in Koreans. Lung , 2002 , 180 : 119-125.
- 6 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组 . 慢性阻塞性肺疾病诊治指南 . 中华结核和呼吸杂志 2002 , 25 : 453-460.
- 7 Harris MJ , Coggan M , Langton L , et al. Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. Pharmacogenetics , 1998 , 8 : 27-31.
- 8 Cantlay AM , Smith CA , Wallace WA , et al. Heterogeneous expression and polymorphic genotype of glutathione S-transferases in human lung. Thorax , 1994 , 49 : 1010-1014.
- 9 Ishii T , Matsuse T , Igarashi H , et al. Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts : protective effect of glutathione S-transferase P1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol , 2001 , 280 : L1189-L1195.
- 10 Board PG , Webb GC , Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. Ann Hum Genet , 1989 , 53 ( Pt 3 ) : 205-213.
- 11 Watson MA , Stewart RK , Smith GB , et al. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms : relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. Carcinogenesis , 1998 , 19 : 275-280.

( 收稿日期 2003-01-10 )

( 本文编辑 尚宁 )

## · 青年学者沙龙 ·

### 基层医师如何诊治肺血栓栓塞症 ——大连市中青年呼吸学者沙龙活动简介

中华医学会大连市分会呼吸专业委员会

2003 年 3 月 29 日大连市中青年呼吸学者沙龙联合召开了有关“ 基层医院中肺血栓栓塞症的诊断与治疗 ” 研讨会。来自大连市各级医院的同道们展开了热烈的讨论 现将沙龙活动内容介绍如下。

#### 一、基层医院肺血栓栓塞症的发病趋势

目前大连市急性肺血栓栓塞症的发病情况尚无精确的统计 , 每年基层医院急性肺血栓栓塞症的确诊病例约为 2 ~ 10 余例 , 较之 5 年前有明显的提高 , 这主要是因为临床医生对该病的认识不断提高之故。

#### 二、诊断体会

肺血栓栓塞症是一种具有多种临床表现的潜在致死性疾病 , 诱因以脑外伤、骨科术后、长途旅行或长期卧床多见。在诊疗条件较差的基层医院 , 充分利用体格检查和基本的辅助检查还是能够发现有价值的线索。例如多数患者会出现呼吸困难 , 对此大家意见比较统一。高危因素在病史采集中是非常重要的。在对肺血栓栓塞症认识不足的情况下 , 易造成该病的误诊、漏诊。这方面有很深刻的经验教训 , 也是临床难以早期诊断的重要原因。也有医生提出 肺血栓栓塞症也发生在无任何高危因素的个体中 , 这种看法并不少见 , 在其

统计的病例中 85% ( 11/13 ) 的患者无明确的栓子来源。

正确应用辅助检查手段 , 尤其是心电图和彩色心脏多普勒检查对诊断的帮助较大 , 而且多数基层医院都具备。要注意心电图是“ 双刃剑 ” 彩超可以间接反映右心室负荷加重 , 甚至直接发现右心房、心室内血栓的存在。肺部增强螺旋 CT 则具有确定诊断的意义。

#### 三、治疗体会

参照中华医学会呼吸病学分会制定的《 肺血栓栓塞症的诊断与治疗指南 ( 草案 ) 》 急性肺血栓栓塞症的抗凝与溶栓治疗在大连市各级基层医院均有不同程度地开展。当前主要的问题是肺血栓栓塞症患者的病情趋向两极分化 , 对重症患者的处理常常是矛盾的焦点 , 多数基层医院的医生选择转往上级医院 , 患者因此丧失了宝贵的抢救时机。对此情况 , 与会者一致认为 既要当机立断 , 又要勇于承担责任才是切实提高肺血栓栓塞症诊治水平的关键。还有医生提出 , 临床对肺血栓栓塞症的危险因素都非常重视 , 但预防不足却是普遍存在的现象 , 这是今后工作中亟待解决的问题。

会上大家还听取了中华医学会大连市分会呼吸专业委员会的专家讲座 , 并就肺血栓栓塞症的规范诊治策略进行了系统的学习和深入的交流。

( 黄伟 万献尧 整理 )

( 收稿日期 2003-04-21 )

( 本文编辑 尚宁 )