

对氧磷酶₁ 55 *Met/Leu*、对氧磷酶₂ 148 *Ala/Gly* 和锰超氧化物歧化酶 9 *Ala/Val* 基因多态性与冠心病

迟东升 凌文华 马静 夏敏 侯孟君 王庆 朱惠莲 唐志红 余小平

【摘要】 目的 探讨对氧磷酶₁ 55 *Met/Leu* (*PON*₁ 55 *Met/Leu*)、对氧磷酶₂ 148 *Ala/Gly* (*PON*₂ 148 *Ala/Gly*)和锰超氧化物歧化酶 9 *Ala/Val* (*MnSOD* 9 *Ala/Val*)基因多态性与冠心病(CHD)、血浆对氧磷酶(PON)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和锰超氧化物歧化酶(MnSOD)活性以及丙二醛(MDA)浓度的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 262 例 CHD 患者和 100 名对照组的 *PON*₁ 55 *Met/Leu*、*PON*₂ 148 *Ala/Gly* 和 *MnSOD* 9 *Ala/Val* 基因多态性的基因型,采用比色法测定血浆 PON、T-SOD 和 MnSOD 活性以及 MDA 浓度。结果 与对照组比较,CHD 患者的血浆 PON[(349.27 ± 138.36 vs. 454.75 ± 166.00)nmol·min⁻¹·ml⁻¹, *P* < 0.001]、T-SOD[(23.61 ± 16.51 vs. 44.01 ± 22.68)U/ml, *P* < 0.001]和 MnSOD 活性[(21.56 ± 13.11 vs. 28.79 ± 8.65)U/ml, *P* < 0.001]明显降低,MDA 浓度显著增高[(2.47 ± 0.73 vs. 2.15 ± 0.55)nmol/ml, *P* < 0.01];CHD 患者的 *PON*₁ 55 LM 杂合子基因型、M 等位基因频率,*PON*₂ 148 GG 纯合子基因型和 AG 杂合子基因型、G 等位基因频率和 *MnSOD* 9 AA 基因型、A 等位基因频率较对照组明显增多;*PON*₁ 55 LM 杂合子基因型的 PON 和 T-SOD 活性较 LL 纯合子基因型明显降低;*PON*₂ 148 GG 基因型和 AG 基因型的 PON 活性较 AA 基因型明显降低;MnSOD AA 基因型的 PON 和 MnSOD 活性较 VV 基因型明显降低;logistic 回归分析显示 *PON*₁ 55 LM 杂合子基因型、M 等位基因、*PON*₂ 148 GG/AG 基因型、G 等位基因是 CHD 的危险因子。结论 CHD 患者的抗氧化能力明显降低,脂质过氧化物显著增高;*PON*₁ 55 *Met/Leu*、*PON*₂ 148 *Ala/Gly* 和 *MnSOD* 9 *Ala/Val* 基因多态性通过影响血浆 PON 和 MnSOD 活性而参与 CHD 的发病。

【关键词】 冠心病;对氧磷酶;锰超氧化物歧化酶;基因;多态性

Study of the association between paraoxonase₁ 55 *Met/Leu*, paraoxonase₂ 148 *Ala/Gly* and manganese superoxide dismutase (*MnSOD*) 9 *Ala/Val* genetic polymorphisms and coronary heart disease CHI Dong-sheng*, LING Wen-hua, MA Jing, XIA Min, HOU Meng-jun, WANG Qing, ZHU Hui-lian, TANG Zhi-hong, YU Xiao-ping. *Heart Center, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510105, China

【Abstract】 **Objective** To study the associations between paraoxonase₁ 55 *Met/Leu* (*PON*₁ 55 *Met/Leu*), paraoxonase₂ 148 *Ala/Gly* (*PON*₂ 148 *Ala/Gly*) and manganese superoxide dismutase 9 *Ala/Val* (*MnSOD* 9 *Ala/Val*) genetic polymorphisms and coronary heart disease (CHD), plasma activities of paraoxonase(PON), total superoxide dismutase(T-SOD), MnSOD, as well as plasma concentration of maleic dialdehyde(MDA). **Methods** Using PCR-RFLP method to identify genotype of *PON*₁ 55 *Met/Leu*, *PON*₂ 148 *Ala/Gly* and *MnSOD* 9 *Ala/Val* genetic polymorphisms, and using colorimetry to detect plasma activities of PON, T-SOD, MnSOD and plasma concentration of MDA in 262 CHD patients and 100 controls. **Results** Compared with controls, the plasma activities of PON[(349.27 ± 138.36 vs. 454.75 ± 166.00)nmol·min⁻¹·ml⁻¹, *P* < 0.001], T-SOD[(23.61 ± 16.51 vs. 44.01 ± 22.68)U/ml, *P* < 0.001] and MnSOD[(21.56 ± 13.11 vs. 28.79 ± 8.65)U/ml, *P* < 0.001] reduced obviously, while plasma MDA concentration increased markedly [(2.47 ± 0.73 vs. 2.15 ± 0.55)nmol/ml, *P* < 0.01] in CHD patients.

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2004036155);广东省自然科学基金团队资助项目(015042)

作者单位:510105 广州中医药大学第二临床医学院心脏中心(迟东升);中山大学公共卫生学院医学营养系(凌文华、马静、夏敏、侯孟君、王庆、朱惠莲、唐志红、余小平)

There were more *LM* genotype and *Met* allele of *PON*₁ 55 *Met/Leu* (24.8% *vs.* 1.4%, $P < 0.001$ and 12.4% *vs.* 0.5%, $P = 0.001$, respectively), *GG* and *AG* genotype and *G* allele of *PON*₂ 148 *Ala/Gly* (11.8% *vs.* 5.0%, $P < 0.001$, 48.1% *vs.* 24.0%, $P < 0.001$ and 36.0% *vs.* 17.0%, $P < 0.001$, respectively) and *AA* genotype, *A* allele of *MnSOD* 9 *Ala/Val* genetic polymorphisms (64.2% *vs.* 43.0%, $P = 0.001$ and 80.0% *vs.* 67.0%, $P = 0.014$, respectively) in CHD patients than in controls. The activities of plasma *PON* and T-SOD were lower in individuals with *PON*₁ 55 *LM* genotype than those with *LL* genotype. The activity of plasma *PON* was also lower in individuals with *PON*₂ 148 *GG/AG* genotype than those with *AA* genotype. The activities of plasma *PON* and *MnSOD* depressed in individuals with *MnSOD* *AA* genotype compared with those with *VV* genotype. Logistic regression analysis demonstrated that *PON*₁ 55 *LM* genotype, *PON*₂ 148 *GG/AG* genotype and *G* allele were independent risk factors for CHD. **Conclusion** The antioxidative ability decreased, while lipid superoxide increased in CHD patients. Gene polymorphisms of *PON*₁ 55 *Met/Leu*, *PON*₂ 148 *Ala/Gly* and *MnSOD* 9 *Ala/Val* seemed to involve in the morbidity of CHD by influencing the plasma activities of *PON* and *MnSOD*.

【Key words】 Coronary heart disease; Paraoxonase; Manganese superoxide dismutase; Gene; Polymorphism

越来越多的证据表明,遗传因素在冠心病(CHD)的发病中起着重要的独立作用。高密度脂蛋白(HDL)有对抗动脉粥样硬化(AS)的性质,人类血浆对氧磷酶(PON)与HDL相连接,可能与HDL的抗AS性质有关^[1]。低密度脂蛋白(LDL)氧化是AS形成的关键步骤^[2],超氧化物歧化酶(SOD)是对抗活性氧(ROS)的第一道也是最重要的抗氧化酶防线,锰超氧化物歧化酶(MnSOD)是线粒体内最主要的抗氧化酶^[3],*MnSOD* 9 *Ala/Val* 基因多态性通过影响线粒体的 *MnSOD* 转运效率而使酶活性降低^[4]。本文拟探讨对氧磷酶₁ 55 *Met/Leu* (*PON*₁ 55 *Met/Leu*)、对氧磷酶₂ 148 *Ala/Gly* (*PON*₂ 148 *Ala/Gly*) 和 *MnSOD* 9 *Ala/Val* 基因多态性与CHD、血浆 *PON*、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、*MnSOD* 活性以及丙二醛(MDA)浓度的关系。

对象与方法

1. 研究对象:随机选取 2003 年 8 月至 2004 年 8 月期间入住中山大学第二医院的广东地区汉族无血缘关系的 CHD 患者 262 例,男 138 例,女 124 例;年龄 38~92(67.03 ± 10.51)岁;其中稳定性心绞痛 220 例,陈旧性心肌梗死 42 例。符合 1979 年 WHO 冠状动脉粥样硬化性心脏病的诊断标准。剔除急性心肌梗死、不稳定性心绞痛、脑血管疾病、糖尿病和严重肝、肾疾病患者。对照组来源于广州市花都区人民医院老干部健康体检,经询问病史、体检、心电图和实验室检查均无异常者,共 100 名,男 53 名,女 47 名,年龄 51~86(66.64 ± 6.41)岁。

2. 研究方法:

(1)血液标本采集:采集空腹外周静脉血 5 ml,加 0.85 ml ACD 抗凝。2 ml 全血用于 DNA 抽提,另

外 3 ml 以 3000 r/min 离心 10 min,分离上层血浆,EP 管分装后 -80℃ 冰箱保存备用。

(2)DNA 提取方法:应用上海生工生物工程有限公司生产的 UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒(SK1342),按其说明书上的方法提取基因组 DNA。

(3)PCR 反应:采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法。用于 PCR 扩增的引物由上海生工生物工程有限公司合成。*PON*₁ 55 *Met/Leu* 的顺向引物序列为:5'-GAAGAGTGA TGTATAGCCCCAG-3',反向引物序列为:5'-TTT AATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3'; *PON*₂ 148 *Ala/Gly* 的顺向引物序列为:5'-CAACCCACCATA GGGATTGTTTG-3',反向引物序列为:5'-TATA TACAGTGGAAATTTTAAATTTGAAGCAG-3'; *MnSOD* 9 *Ala/Val* 的顺向引物序列为:5'-CAGCCCAGCCTGCGTAGACG-3',反向引物序列为:5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3'。应用 TaKaRa PCR Amplification Kit(大连宝生物工程有限公司)PCR 试剂盒在 25 μl PCR 反应体系中进行基因组 DNA 扩增,包括模板 DNA 1 μl(10 mg/L),10 × PCR buffer(含 3 mmol/L MgCl₂) 2.5 μl, dNTP Mixture 2 μl, TaKaRa Taq DNA 聚合酶 0.125 μl(5 U/μl),引物各 1 μl(0.5 μmol/L),灭菌去离子水 17.375 μl。PCR 反应条件如下:*PON*₁ 55 *Met/Leu* 为 95℃ 预变性 3 min;然后 95℃ 变性 1 min,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min;*PON*₂ 148 *Ala/Gly* 为 94℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 45 s,68℃ 延伸 45 s,35 个循环,最后 68℃ 延伸 7 min;*MnSOD* 9 *Ala/Val*

为 93℃ 预变性 3 min, 然后 93℃ 变性 1 min, 66℃ 退火 1 min, 70℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 70℃ 延伸 10 min。

(4) 酶切方法: PCR 扩增后的 *PON₁ 55 Met/Leu* 基因片段为 170 bp, PCR 反应完成后, 在 10 μl 的 PCR 反应产物中加入: RE 10× buffer 2 μl、Acetylated BSA 0.2 μl (10 μg/μl)、Hsp92 II 内切酶 0.5 μl (10 U/μl, Promega, USA), 灭菌去离子水 7.3 μl, 酶切反应总体积为 20 μl, 置 37℃ 恒温干浴锅温育 4 h 进行酶切。PCR 扩增后的 *PON₂ 148 Ala/Gly* 基因片段为 153 bp, PCR 反应完成后, 在 10 μl 的 PCR 反应产物中加入: 10× NEB buffer 2 μl、Fnu4HI 酶 0.5 μl (10 U/μl, New England BioLabs, USA), 灭菌去离子水 7.5 μl, 酶切反应总体积为 20 μl, 置 37℃ 恒温干浴锅温育 15 h 进行酶切。PCR 扩增后的 *MnSOD 9 Ala/Val* 基因片段为 172 bp, PCR 反应完成后, 在 10 μl 的 PCR 反应产物中加入: 10× NEB buffer 2 μl、100× BSA 0.2 μl、BsaW I 酶 0.5 μl (5 U/μl, New England BioLabs, USA), 灭菌去离子水 7.3 μl, 酶切反应总体积为 20 μl, 酶切反应液放置于 60℃ 恒温干浴锅温育 16 h 进行酶切。

(5) 基因型判定方法: 酶切产物经 3.5% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5 μg/ml 溴化乙锭), 电泳缓冲液为 0.5× TBE, 在 80 V 电压下电泳 40 min。 *PON₁ 55 MM* 纯合子基因型个体显示一条 126 bp 长的 DNA 片段, *PON₁ 55 LL* 纯合子基因型个体显示一条 170 bp 长的 DNA 片段, 而 *PON₁ 55 ML* 杂合子基因型个体则显示长度分别为 170 bp 和 126 bp 的 DNA 片段。 *PON₂ 148 AA* 纯合子基因型个体显示一条 123 bp 长的 DNA 片段, *PON₂ 148 GG* 纯合子基因型个体显示一条 153 bp 长的 DNA 片段, 而 *PON₂ 148 AG* 杂合子基因型个体则显示两条长度分别为 123 bp 和 153 bp 的 DNA 片段。 *MnSOD 9 AA* 纯合子基因型个体显示一条 88 bp 长的 DNA 片段, *MnSOD 9 VV* 纯合子基因型个体显示一条 172 bp 长的 DNA 片段, 而 *MnSOD 9 AV* 杂合子基因型个体则显示两条长度分别为 88 bp 和 172 bp 的

DNA 片段。

(6) 血浆 T-SOD、MnSOD 活性和 MDA 浓度测定: 采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 按其说明书上的方法, 分别在可见分光光度计 550 nm 和 532 nm 处测定 T-SOD、MnSOD 活性和 MDA 浓度。

(7) 血浆对氧磷酶测定: 采用水解对氧磷生成对硝基酚的方法^[5], 在分光光度计 412 nm 处测定对氧磷酶活性管与对照管吸光度差值, 查标准曲线获得血浆对氧磷酶活性单位。

3. 统计学分析: 应用 SPSS 12.0 统计软件包进行统计学分析, 所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据间的比较采用独立样本的 *t* 检验, 多组数据间的比较采用单因素方差分析, 相关性用双变量相关分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 危险分层采用 logistic 回归分析。 $P < 0.05$ (双侧) 认为差异有统计学意义。

结 果

1. CHD 组和对照组的一般情况比较: 两组年龄、性别经统计学分析差异无统计学意义。对照组吸烟者 8 名 (8.0%), 不吸烟者 92 名 (92.0%); CHD 组吸烟者 35 例 (13.4%), 不吸烟者 227 例 (86.6%), 经 χ^2 检验两组差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.99, P = 0.16$)。对照组有 CHD 家族史者 4 名 (4.0%), 无家族史者 96 名 (96.0%); CHD 组有 CHD 家族史者 22 例 (8.4%), 无家族史者 240 例 (91.6%), 经 χ^2 检验两组差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.10, P = 0.15$) (表 1)。

2. CHD 组和对照组的 PON、T-SOD、MnSOD 活性和 MDA 浓度比较: CHD 组的 PON、T-SOD、MnSOD 活性较对照组明显降低, 而 MDA 浓度显著增高 (表 2)。

3. Hardy-Weinberg 平衡:

(1) CHD 组和对照组 *PON₁ 55 Met/Leu* 基因多态性基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 (CHD 组 $\chi^2 = 1.20, P > 0.20$; 对照组 $\chi^2 = 0, P > 0.99$); 两

表 1 CHD 组和对照组的一般情况比较

组别	例数	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)	Glu (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	BMI (kg/m ²)
对照组	100	120.42 ± 11.97	75.52 ± 8.17	5.09 ± 1.38	4.81 ± 0.65	1.67 ± 1.14	1.16 ± 0.23	2.43 ± 0.49	23.13 ± 2.54
CHD 组	262	140.38 ± 23.42 [#]	80.36 ± 13.07 [*]	5.82 ± 1.61 [#]	4.92 ± 1.22	1.62 ± 1.26	1.12 ± 0.34	2.94 ± 0.92 [#]	23.50 ± 3.47

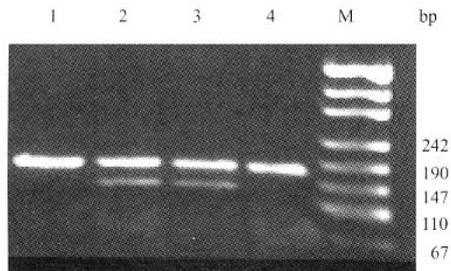
* $P < 0.01$; # $P < 0.001$; SBP: 收缩压; DBP: 舒张压; Glu: 血糖; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; BMI: 体重指数; 1 mm Hg = 0.133 kPa

表2 CHD 组和对照组的 PON、T-SOD、MnSOD 活性和 MDA 浓度比较

组别	例数	PON(nmol·min ⁻¹ ·ml ⁻¹)	T-SOD(U/ml)	MnSOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
对照组	100	454.75 ± 166.00	44.01 ± 22.68	28.79 ± 8.65	2.15 ± 0.55
CHD 组	262	349.27 ± 138.36*	23.61 ± 16.51*	21.56 ± 13.11*	2.47 ± 0.73*

* P < 0.001

组基因型分布和等位基因频率经 χ^2 检验差异有统计学意义 $\chi^2 = 27.52, P < 0.001$ 和 $\chi^2 = 11.44, P = 0.001$, 两组均未发现 MM 纯合子基因型(图 1 和表 3)。



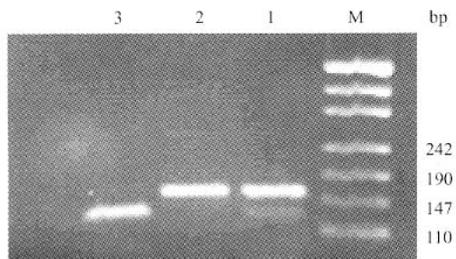
M:pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker; 1,4: PON₁ 55 LL 纯合子基因型; 2,3: PON₁ 55 LM 杂合子基因型

图1 PON₁ 55 Met/Leu 基因多态性基因型鉴定

表3 CHD 组和对照组 PON₁ 55 Met/Leu 基因多态性基因型分布和等位基因频率比较

组别	例数	基因型分布			等位基因频率(%)	
		LL (%)	MM (%)	LM (%)	L	M
对照组	100	99(99.0)	0(0)	1(1.0)	0.995	0.005
CHD 组	262	197(75.2)	0(0)	65(24.8)	0.876	0.124

(2) CHD 组和对照组 PON₂ 148 Ala/Gly 基因多态性基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(CHD 组 $\chi^2 = 0.64, P > 0.30$; 对照组 $\chi^2 = 1.96, P > 0.10$); 两组基因型分布和等位基因频率经 χ^2 检验差异有统计学意义 ($\chi^2 = 27.77, P < 0.001$ 和 $\chi^2 = 12.13, P < 0.001$)。见图 2 和表 4。



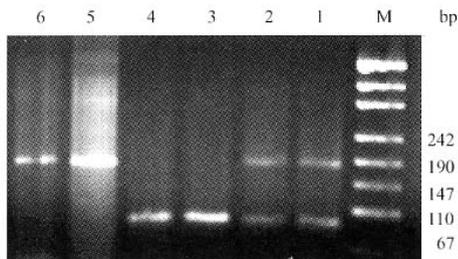
M:pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker; 1: PON₂ 148 AG 杂合子基因型; 2: PON₂ 148 GG 纯合子基因型; 3: PON₂ 148 AA 纯合子基因型

图2 PON₂ 148 Ala/Gly 基因多态性基因型鉴定

(3) CHD 组和对照组 MnSOD 9 Ala/Val 基因多态性基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(CHD 组 $\chi^2 = 0.16, P > 0.50$; 对照组 $\chi^2 = 0.81, P > 0.30$); 两组基因型分布和等位基因频率经 χ^2 检验差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.82, P = 0.001$ 和 $\chi^2 = 6.00, P = 0.014$)。见图 3 和表 5。

表4 CHD 组和对照组 PON₂ 148 Ala/Gly 基因多态性基因型分布和等位基因频率比较

组别	例数	基因型分布			等位基因频率(%)	
		AA (%)	GG (%)	AG (%)	A	G
对照组	100	71(71.0)	5(5.0)	24(24.0)	0.83	0.17
CHD 组	262	105(40.1)	31(11.8)	126(48.1)	0.64	0.36



M:pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker; 1,2: MnSOD 9 AV 杂合子基因型; 3,4: MnSOD 9 AA 纯合子基因型; 5,6: MnSOD 9 VV 纯合子基因型

图3 MnSOD 9 Ala/Val 基因多态性基因型鉴定

表5 CHD 组和对照组 MnSOD 9 Ala/Val 基因多态性基因型分布和等位基因频率比较

组别	例数	基因型分布			等位基因频率(%)	
		AA (%)	VV (%)	AV (%)	A	V
对照组	100	43(43.0)	9(9.0)	48(48.0)	0.67	0.33
CHD 组	262	168(64.2)	9(3.4)	85(32.4)	0.80	0.20

4. PON₁ 55 Met/Leu、PON₂ 148 Ala/Gly 和 MnSOD 9 Ala/Val 基因多态性不同基因型对 PON、T-SOD、MnSOD 活性和 MDA 浓度的影响: 结果显示 PON₁ 55 LM 杂合子基因型的 PON 和 T-SOD 活性较 LL 纯合子基因型明显降低; PON₂ 148 AG 和 GG 基因型的 PON 活性较 AA 基因型者明显降低, 尤其以 GG 基因型降低更明显; 而 MnSOD 9 AA 基因型的 PON 和 MnSOD 活性最低(表 6)。

表6 PON_1 55 *Met/Leu*、 PON_2 148 *Ala/Gly* 和 *MnSOD* 9 *Ala/Val* 基因多态性不同基因型对 PON 、 $T-SOD$ 、 $MnSOD$ 活性和 MDA 浓度的影响

组别	例数	PON ($nmol \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$)	$T-SOD$ (U/ml)	$MnSOD$ (U/ml)	MDA ($nmol/ml$)
PON_1 55 <i>Met/Leu</i>					
55 <i>LL</i>	296	394.84 ± 154.87	30.22 ± 21.29	23.77 ± 12.42	2.36 ± 0.72
55 <i>LM</i>	66	$304.73 \pm 125.04^\#$	$24.89 \pm 16.14^*$	22.58 ± 12.67	2.48 ± 0.54
PON_2 148 <i>Ala/Gly</i>					
148 <i>AA</i>	176	417.34 ± 159.00	30.55 ± 21.66	24.94 ± 10.99	2.38 ± 0.76
148 <i>GG</i>	36	$281.47 \pm 84.70^\blacktriangle$	29.40 ± 14.01	21.93 ± 14.72	2.50 ± 0.70
148 <i>AG</i>	150	$356.00 \pm 145.95^{\blacktriangle\Delta}$	27.68 ± 20.50	22.31 ± 13.37	2.35 ± 0.61
<i>MnSOD</i> 9 <i>Ala/Val</i>					
9 <i>AA</i>	211	363.31 ± 152.32	28.67 ± 21.02	22.87 ± 13.47	2.38 ± 0.61
9 <i>VV</i>	18	416.13 ± 184.28	35.63 ± 17.51	$32.04 \pm 9.19^{\star\blacktriangle}$	2.43 ± 0.98
9 <i>AV</i>	133	397.26 ± 149.72	29.30 ± 20.12	$23.49 \pm 10.69^{\star}$	2.38 ± 0.79

注:与 PON_1 55 *LL* 比较, * $P < 0.05$; # $P < 0.001$; \blacktriangle $P < 0.001$, vs. PON_2 148 *AA*; Δ $P < 0.01$, vs. PON_2 148 *GG*; \star $P < 0.01$, vs. *MnSOD* 9 *AA*; $\star\blacktriangle$ $P < 0.01$, vs. *MnSOD* 9 *VV*

5. 相关分析:经双变量相关分析显示血浆 PON 与 $T-SOD$ 正相关 ($r = 0.19, P < 0.01$), 与 MDA 负相关 ($r = -0.12, P < 0.01$); $MnSOD$ 与 MDA 负相关 ($r = -0.15, P < 0.01$)。

6. 多因素分析:采用 logistic 回归分析 (Enter 法), 经年龄、性别、吸烟、CHD 家族史、血压、血糖、 TC 和 $LDL-C$ 校正后显示, PON_1 55 *LM* 杂合子基因型 ($OR = 73.36, 95\% CI: 6.92 \sim 777.42, P = 0.001$)、*M* 等位基因 ($OR = 15.40, 95\% CI: 1.49 \sim 159.20, P = 0.022$)、 PON_2 148 *GG/AG* 基因型 ($OR = 1.64, 95\% CI: 1.13 \sim 2.38, P = 0.01$)、*G* 等位基因 ($OR = 2.85, 95\% CI: 1.27 \sim 6.36, P = 0.011$) 是 CHD 的危险因子。

讨 论

本研究发现 CHD 组以 PON_1 55 *LM* 杂合子基因型和 *M* 等位基因携带者、 PON_2 148 *GG* 纯合子/*AG* 杂合子基因型和 *G* 等位基因携带者较多见, 与对照组差异有统计学意义。logistic 回归分析显示 PON_1 55 *LM* 杂合子基因型、*M* 等位基因和 PON_2 148 *GG* 纯合子基因型/*AG* 杂合子基因型以及 *G* 等位基因携带者是 CHD 的危险因子。Oliveira 等^[6]经冠状动脉造影证实的 CHD 患者的 PON_1 55 *MM* 基因型和 PON_2 148 *GG* 基因型发生率较高, 多元回归分析显示 PON_1 55 *Met/Leu* 基因多态性是 CHD 的独立标志物, 与本研究的结果一致。提示 PON_1 55 *Met/Leu* 基因多态性的 *LM* 杂合子基因型和 *M* 等位基因携带者、 PON_2 148 *GG* 纯合子基因型/*AG*

杂合子基因型以及 *G* 等位基因携带者易患 CHD。

本研究结果显示, CHD 组的 PON 、 $T-SOD$ 和 $MnSOD$ 活性较对照组明显降低, 而 MDA 浓度显著增高。提示 CHD 患者的抗氧化能力下降, 脂质过氧化物生成增加。Senti 等^[7]的研究发现 CHD 患者的 PON 活性只有健康对照组的一半。小鼠的遗传性研究也显示 PON 的表达与 AS 病变之间有明确的关系, 当喂饲高脂肪、高胆固醇饮食时 PON 基因缺陷小鼠比它们的野生型同胞更易患 AS, 从它们体内分离出的 $HDL-C$ 和 $LDL-C$ 也更易被共同培养的细胞氧化^[1]。本研究相关分析显示血浆 PON 与 $T-SOD$ 正相关, 与 MDA 负相关。提示 PON 活性与体内抗氧化能力密切相关, 其活性增高, 体内的脂质过氧化物生成下降。 PON 是 Ca^{2+} 依赖性酯酶, 体内外研究表明它是 $HDL-C$ 抗氧化的主要酶, 与 $HDL-C$ 易被氧化性呈负相关, 纯化的人类 PON 能减少 $LDL-C$ 中脂质过氧化物的生成和聚集^[1]。

PON 基因型决定了 PON 活性变化的 75%^[8]。本研究发现 PON_1 55 *LM* 杂合子基因型和 PON_2 148 *GG/AG* 基因型的 PON 活性明显降低, 提示 PON_1 55 *L* 等位基因同工酶比 *M* 等位基因同工酶、 PON_2 148 *A* 等位基因同工酶比 *G* 等位基因同工酶的活性高。研究显示 PON_1 55 *Met/Leu* 基因多态性可调节 PON 酶活性成分, 也是血清 PON 酶浓度的决定因素之一。Mackness 等^[9]报道 55 *L* 同工酶在体内抗 LDL 氧化的作用比 *M* 同工酶强。因此推测 *M* 等位基因和 *G* 等位基因携带者易患心脏病的原因可能是由于血浆 PON 活性下降。

本研究发现 CHD 组的 *MnSOD* 9 *Ala/Val* 基

因多态性的 AA 纯合子基因型和 A 等位基因携带者较对照组明显增高,提示 A 等位基因是一种致病基因, A 等位基因携带者可能更易患 CHD。文献报道 MnSOD 基因与人类致 AS 性脂蛋白表型和小而密 LDL-C 过多形成有关^[2], A 等位基因携带者易患与氧化应激有关的疾病,如乳腺癌和帕金森病的发病危险增高^[3]。目前尚未见有关 MnSOD 9 Ala/Val 基因多态性与冠心病关系方面的研究报道。本研究结果显示 AA 基因型的 MnSOD 活性较 VV 基因型者明显减低,提示 A 等位基因携带者易患 CHD 的可能原因是由于其 MnSOD 活性较低,不能有效地清除过多的超氧化物,而导致冠脉血管细胞的氧化应激损伤和脂质过氧化,最终导致冠状动脉 AS。研究显示 MnSOD 对转基因鼠的心肌缺血有保护作用,并可逆转无 AS 改变的兔颈动脉的血管功能异常;在体外可抑制内皮细胞的 LDL 氧化;缺乏 MnSOD 的 apoE 缺陷鼠的 AS 改变更严重^[2]。MnSOD 9 Ala/Val 基因多态性可改变蛋白的二级结构,9 Ala 多态性导致 α -螺旋结构形成,而 9 Val 多态性导致 β -折叠层结构形成。 α -螺旋结构对酶蛋白前体有效地转运进入线粒体是重要的,因此理论上 MnSOD 9 Val 多态性在线粒体内抗氧化活性可能比 9 Ala 多态性低^[4,10],与本研究结果似乎矛盾,其原因有待于进一步探讨。本研究相关分析显示血浆 MnSOD 与 MDA 负相关,提示 MnSOD 在抗脂质过氧化中起着重要作用,其活性增高,体内的脂质过氧化物生成下降。本研究发现正常广州市汉族人群以 A 等位基因携带者为主,占 66.7%;高于新加坡华人(30%)、日本人(11%)和欧洲人群(41%~62%)^[10]。这可能是由于种族差异的结果。

本研究结果表明 CHD 患者的血浆 PON、T-SOD 和 MnSOD 活性明显降低,MDA 浓度显著增高;PON₁ 55 Met/Leu 基因多态性的 LM 基因型和 M 等位基因携带者、PON₂ 148 Ala/Gly 基因多态性的 GG/AG 基因型和 G 等位基因携带者是冠心病

的危险因子,并且这些基因型患者的血浆 PON 活性明显降低;MnSOD 9 Ala/Val 基因多态性 AA 基因型的血浆 MnSOD 活性降低,因此该基因型和 A 等位基因携带者可能更易患 CHD。本研究结果提示遗传因素在 CHD 的发生和发展中起一定的作用,为 CHD 的基因诊断、疾病预防和今后的基因治疗提供了参考依据。

参 考 文 献

- 1 Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today*, 1999, 5: 381-386.
- 2 Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P, et al. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2003, 168: 147-152.
- 3 Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 827-829.
- 4 Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, et al. Manganese superoxide dismutase and cytochrome P450 1A1 genes polymorphisms in rheumatoid arthritis in Taiwan. *Hum Immunol*, 2003, 64: 366-373.
- 5 周志俊, 郭红梅, 胡云平, 等. 血清对氧磷酶活性测定方法研究. *中国公共卫生*, 2000, 16: 303-304.
- 6 Oliveira SA, Mansur AP, Ribeiro CC, et al. PON₁ Met/Leu 55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 2004, 94: 73-77.
- 7 Senti M, Tomas M, Vila J, et al. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis*, 2001, 156: 443-449.
- 8 Ko YL, Ko YS, Wang SM, et al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis*, 1998, 141: 259-264.
- 9 Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler Suppl*, 2002, 3: 49-55.
- 10 Zhang Z, Zhang X, Hou G, et al. The increased activity of plasma manganese superoxide dismutase in tardive dyskinesia is unrelated to the Ala-9 Val polymorphism. *J Psychiatr Res*, 2002, 36: 317-324.

(收稿日期: 2005-09-22)

(本文编辑: 张林东)