

锰超氧化物歧化酶基因变异 与血脂和同型半胱氨酸水平的关系研究^{*}

赵佳^{1a}, 左林^{1b}, 姚创利^{1a}, 黎阳^{1a}, 姜小建^{1a}, 杨军乐²

(1. 西安市中心医院 a. 检验科; b. 放射科, 西安 710003;

2. 第四军医大学唐都医院放射科, 西安 710038)

摘要:目的 探讨锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)9 Ala/Val 基因多态性与血脂和同型半胱氨酸(HCY)水平的关系。方法 应用测序法检测 137 例冠心病患者和 85 例对照组的 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性的基因型,应用比色法检测血清总超氧化物歧化酶(T-SOD)和 Mn-SOD 活性,应用终点法测定血清胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,应用酶法测定血清 HCY 水平。结果 冠心病组的 Mn-SOD 9 VV 基因型和 V 等位基因频率显著高于对照组。冠心病组的 T-SOD 和 Mn-SOD 活性显著低于对照组。Mn-SOD 9 VV 基因型的 T-SOD 和 Mn-SOD 活性显著低于 Mn-SOD 9 AA 基因型。Mn-SOD 9 VV 基因型的血清 TC, TG, LDL-C 和 HCY 水平显著高于 Mn-SOD 9 AA 基因型, HDL-C 水平显著低于 Mn-SOD 9 AA 基因型。Mn-SOD 活性与血清 TC, TG, LDL-C 和 HCY 水平呈负相关,与血清 HDL-C 水平呈正相关。结论 冠心病患者机体的抗氧化能力降低。Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性通过影响 Mn-SOD 活性进而导致血脂代谢紊乱,促进冠心病的发生发展。HCY 通过自身氧化和抑制 Mn-SOD 活性,致使体内氧化物质增多,增加冠心病的发病风险。

关键词:锰超氧化物歧化酶;基因多态性;血脂;同型半胱氨酸;冠心病

中图分类号:Q754;R446.12 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)03-012-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.004

Study on the Relationship between Manganese Superoxide Dismutase Gene Variants and the Levels of Blood Lipid and Homocysteine

ZHAO Jia^{1a}, ZUO Lin^{1b}, YAO Chuang-li^{1a}, LI Yang^{1a}, JIANG Xiao-jian^{1a}, YANG Jun-le²

(1a. Department of Clinical Laboratory; 1b. Department of Radiology,

Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, China; 2. Department of Radiology,

Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) 9 Ala/Val genetic polymorphisms and the levels of blood lipid and homocysteine (HCY). **Methods** The genotypes of Mn-SOD 9 Ala/Val genetic polymorphisms were identified by sequencing method, the serum activities of T-SOD and Mn-SOD were detected by colorimetric method, the serum level of HCY was detected by enzymatic method, and the serum levels of cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected by end-point method in 137 patients with coronary heart disease (CHD) and 85 controls. **Results** Compared with the control group, the VV genotype and V allele of Mn-SOD 9 Ala/Val genetic polymorphisms in the CHD group were higher, while the serum activities of T-SOD and Mn-SOD in the CHD group was significantly lower. The serum activities of T-SOD and Mn-SOD of the Mn-SOD 9 VV genotype was significantly lower than the Mn-SOD 9 AA genotype. Compared with the Mn-SOD 9 AA genotype, the serum levels of TC, TG, LDL-C and HCY of the Mn-SOD 9 VV genotype were significantly higher, while the serum level of HDL-C was significantly lower. The serum activity of Mn-SOD was negatively correlated with the serum levels of TC, TG, LDL-C and HCY and positively correlated with the serum level of HDL-C. **Conclusion** The antioxidative ability in patients with CHD was decreased. Mn-SOD 9 Ala/Val genetic polymorphisms led to lipid metabolism disorders by affecting the Mn-SOD activity, promoting the development of CHD. HCY resulted in increased oxidative substances by self-oxidation and inhibition of the Mn-SOD activity, increasing the risk of CHD.

Keywords: manganese superoxide dismutase; genetic polymorphism; blood lipid; homocysteine; coronary heart disease

冠心病(coronary heart disease, CHD)是严重和死亡率呈逐年上升的趋势。目前冠心病的发病危害人类健康的心血管疾病之一,近年来其发病率机制有多种学说,其中由活性氧介导的氧化应激在

^{*} 基金项目:陕西省科学技术研究发展计划项目(项目编号:2013K12-02-10)。

作者简介:赵佳(1984—),女,博士,主管检验师,主要从事临床生物化学检验工作, E-mail:84911zj@163.com。

通讯作者:姜小建(1968—),男,本科,主任检验师,主要从事临床医学检验工作, E-mail:jiangxiaojian1005@126.com。

动脉粥样硬化的发生发展中发挥重要作用^[1~3]。锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)是内源性抗氧化防御屏障的重要组成部分,它能清除体内的活性氧自由基,保护机体免受过氧化损伤。前期研究显示,Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性可导致酶结构改变,进一步影响 Mn-SOD 的转运而使其活性降低,抗氧化能力减弱^[4]。本文通过检测 Mn-SOD 基因变异及血脂和 HCY 水平,探讨 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性与血脂和 HCY 水平的关系,为冠心病的发病机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 随机选取 2014 年 5 月~2015 年 5 月期间入住西安市中心医院的汉族无血缘关系的冠心病患者 137 例,男性 74 例,女性 63 例,年龄 51~87 岁。全部病例均符合 2010 年卫生部冠状动脉粥样硬化性心脏病的诊断标准(WS319-2010)。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。对照组选取西安市中心医院体检中心的经询问病史、体检、心电图和实验室检查均无异常者,共 85 例,男性 45 例,女性 40 例,年龄 55~64 岁。

1.2 试剂和仪器 HCY 水平测定应用北京九强生物技术股份有限公司生产的同型半胱氨酸测定试剂盒;总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(北京利德曼生化股份有限公司生产)。血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 和 HCY 水平的检测应用日立 7600 全自动生化分析仪。

1.3 研究方法

1.3.1 血液标本采集:分别采集冠心病组和对照组的空腹外周静脉血 5 ml。其中 2 ml 全血加入枸

橐酸盐抗凝剂(血液与抗凝剂比例为 1:9),用于 DNA 提取;另外 3 ml 全血加入促凝管中,以 3 000 r/min 离心 10 min,分离上层血清,用 EP 管分装后于-80℃冰箱保存备用。

1.3.2 基因组 DNA 提取:应用北京天根生化科技有限公司生产的血液基因组 DNA 提取试剂盒(DP318),按照试剂说明书的方法进行操作。

1.3.3 Mn-SOD 基因测序:提取的基因组 DNA 送到深圳华大基因研究院进行测序,测定 Mn-SOD 9 Ala/Val 的基因多态性。

1.3.4 血清 T-SOD 和 Mn-SOD 活性测定:应用南京建成生物工程研究所生产的超氧化物歧化酶分型测试盒(A001-2),按照试剂说明书的方法进行操作,分别在可见分光光度计 550 nm 和 532 nm 处测定 T-SOD 和 Mn-SOD 活性。

1.3.5 血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 和 HCY 水平测定:应用终点法测定血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平,应用酶法测定血清 HCY 水平。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,所有数据均用均数±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,两变量的相关分析采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性分布 见表 1。测序结果显示,Mn-SOD 9 Val 纯合子基因型第 9 位为胸腺嘧啶(T),Mn-SOD 9 Ala 纯合子基因型第 9 位为胞嘧啶(C),见图 1。冠心病组和对照组的基因型分布和等位基因频率经 χ^2 检验($\chi^2 = 10.55, 6.74$, 均 $P < 0.01$),差异具有统计学意义。

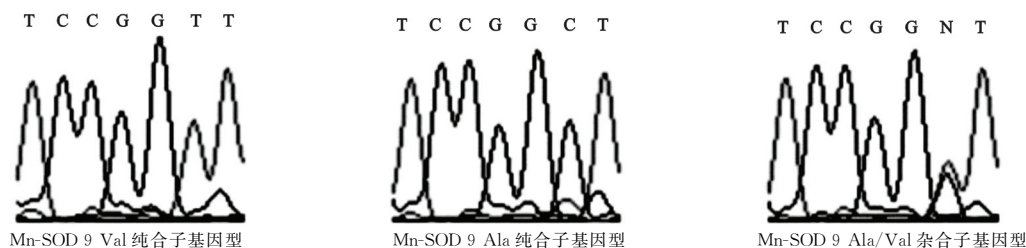


图 1 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性

表 1 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性基因型分布

组别	n	基因型分布[n(%)]			等位基因频率	
		VV	AA	A/V	V	A
对照组	85	53(62.4)	14(16.5)	18(21.2)	0.73	0.27
冠心病组	137	109(79.6)	18(13.1)	10(7.3)	0.83	0.17

2.2 冠心病组和对照组 T-SOD 和 Mn-SOD 活性比较 冠心病组的 T-SOD 和 Mn-SOD 活性(47.73 ± 7.11 U/ml, 21.02 ± 8.41 U/ml)显著低

于对照组(64.16 ± 6.54 U/ml, 44.25 ± 12.61 U/ml),差异具有统计学意义($t = 4.56, P < 0.001$; $t = 5.39, P < 0.001$)。

2.3 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性不同基因型血清 T-SOD 和 Mn-SOD 活性比较 Mn-SOD 9 VV 基因型的 T-SOD 和 Mn-SOD 活性(49.27 ± 6.41 U/ml, 25.41 ± 8.13 U/ml)显著低于 Mn-SOD 9 AA 基因型(54.98 ± 6.92 U/ml, $33.23 \pm$

9.89 U/ml), 差异具有统计学意义 ($t=2.94, P<0.01$; $t=3.02, P<0.01$); Mn-SOD 9 A/V 基因型的 T-SOD 和 Mn-SOD 活性 (50.73 ± 7.06 U/ml, 27.32 ± 10.41 U/ml) 显著低于 Mn-SOD 9 AA 基因型, 差异具有统计学意义 ($t=2.78, P<0.05$; $t=2.83, P<0.05$)。

2.4 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性不同基因型血脂和 HCY 水平比较 见表 2。Mn-SOD 9 VV 基因型的血清 TC, TG, LDL-C 和 HCY 水平显著高于 Mn-SOD 9 AA 基因型, 差异有统计学意义 ($t=2.87, P<0.01$; $t=2.34, P<0.05$; $t=2.69, P<0.01$; $t=3.66, P<0.001$), HDL-C 水平显著低于 Mn-SOD 9 AA 基因型, 差异具有统计学意义 ($t=2.06, P<0.05$); Mn-SOD 9 VV 基因型的血清 TC, TG 和 HCY 水平显著高于 Mn-SOD 9 A/V 基因型, 差异具有统计学意义 ($t=2.22, P<0.05$; $t=2.28, P<0.05$; $t=3.41, P<0.001$), HDL-C 水平显著低于 Mn-SOD 9 A/V 基因型, 差异具有统计学意义 ($t=2.01, P<0.05$); Mn-SOD 9 A/V 基因型的血清 TC, LDL-C 和 HCY 水平显著高于 Mn-SOD 9 AA 基因型, 差异具有统计学意义 ($t=2.24, P<0.05$; $t=2.26, P<0.05$; $t=2.31, P<0.05$)。

2.5 Mn-SOD 活性与血清 TC, TG, HDL-C, LDL-C 和 HCY 水平的相关性分析 Mn-SOD 活性与血清 TC, TG, LDL-C 和 HCY 水平呈负相关 ($r=-0.35, P<0.01$; $r=-0.22, P<0.01$; $r=-0.27, P<0.01$; $r=-0.28, P<0.01$), 与血清 HDL-C 水平呈正相关 ($r=0.31, P<0.01$)。

表 2 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性
不同基因型血脂和 HCY 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	VV 基因型	AA 基因型	A/V 基因型
TC (mmol/L)	5.36 ± 0.92	4.38 ± 0.71	5.06 ± 0.85
TG (mmol/L)	2.04 ± 0.61	1.63 ± 0.47	1.71 ± 0.53
HDL-C (mmol/L)	1.04 ± 1.19	1.13 ± 0.27	1.11 ± 0.24
LDL-C (mmol/L)	3.14 ± 0.87	2.50 ± 0.62	3.06 ± 0.74
HCY (μ mol/L)	20.16 ± 9.81	12.33 ± 5.51	14.29 ± 6.20

3 讨论 超氧化物歧化酶(SOD)广泛存在于生物体内, 可以清除由氧化反应产生的超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$, 防止脂质过氧化损伤。Mn-SOD 存在于线粒体中, 是 SOD 同工酶的一种, 也是体内最重要的抗氧化酶之一。Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性是由于 Mn-SOD 第 9 位氨基酸密码子突变导致 Ala 被 Val 替代, 这种替代会增大罹患冠心病的风险^[5]。

本研究结果显示, 冠心病组的 T-SOD 和 Mn-SOD 活性显著低于对照组。这提示冠心病患者机体清除活性氧自由基的能力减弱, 大量的氧自由基存在造成脂质过氧化损伤, 进而加剧冠状动脉粥样硬化的进展。在本研究中, 冠心病组的 Mn-SOD 9 VV 基因型和 V 等位基因频率高于对照组, Mn-SOD 9 VV 基因型的 T-SOD 和 Mn-SOD 活性显著低于 Mn-SOD 9 AA 基因型。这提示 Mn-SOD 9 Val 等位基因携带者体内 Mn-SOD 的活性减弱, 罹患冠心病的风险更高。Mn-SOD 在细胞质中完成翻译过程, 然后进一步在信号肽的引导下进入线粒体发挥抗氧化功能。研究发现, Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性可通过影响 Mn-SOD 的转运, 进而影响酶的活性, 含有 Val 的 Mn-SOD 活性显著低于含有 Ala 的 Mn-SOD 活性^[6]。

在公认的动脉粥样硬化独立危险因素中, 血脂代谢紊乱是最重要的, 血清 LDL, TC 和 TG 水平的增高被认为能增加心血管疾病的发病风险, 而 HDL 水平与心血管疾病发生风险呈独立的负相关^[7,8]。在本研究中, Mn-SOD 9 VV 基因型的血清 TC, TG 和 LDL-C 水平显著高于 Mn-SOD 9 AA 基因型, HDL-C 水平显著低于 Mn-SOD 9 AA 基因型。Mn-SOD 活性与血清 TC, TG 和 LDL-C 水平呈负相关, 与血清 HDL-C 水平呈正相关。氧自由基可以从多个环节参与脂质的代谢, 将 LDL 氧化修饰形成氧化型 LDL (Ox-LDL)。Ox-LDL 是导致动脉粥样硬化的关键物质, 对 endothelial 细胞有毒性作用, 改变内皮细胞形态结构, 破坏其完整性, 促进泡沫细胞形成^[7,9]。Mn-SOD 可通过抑制 LDL 的氧化来抑制动脉粥样硬化的发生, 并稳定血小板, 抵抗氧化的 LDL 诱导的巨噬细胞的吞噬过程, 保护内皮细胞的功能稳定^[10]。Mn-SOD 9 Val 等位基因携带者的血清 Mn-SOD 活性降低, 对 LDL 氧化成有毒性的 Ox-LDL 的抑制作用减弱, 从而使冠心病的发病风险增加。HDL 一方面参与 TC 的逆向转运, 清除周围组织中的 TC, 预防动脉粥样硬化的形成; 另一方面 HDL 具有强大的抗氧化能力, 可以抑制 LDL 的氧化反应, 延缓动脉粥样硬化的进展^[11]。Mn-SOD 9 VV 基因型的 Mn-SOD 活性降低, 清除氧自由基的能力减弱, 致使体内氧化物质增多。当 HDL 暴露于氧化物质时, 同样也容易被氧化形成氧化型 HDL (Ox-HDL)。HDL 被氧化后, 导致 TC 的逆向转运效率降低而使体内的 TC 水平升高, 不仅丧失了对血管的保护作用, 还促进了动脉粥样硬化的形成^[12]。

在本研究中, Mn-SOD 9 VV 基因型的血清 HCY 水平显著高于 Mn-SOD 9 AA 基因型, Mn-

SOD活性与血清HCY水平呈负相关。前期研究显示,HCY通过参与脂质代谢和动脉粥样硬化形成,促进冠心病的发生发展^[13]。HCY可以通过巯基发生自身氧化,形成氧自由基,引起血管内皮细胞损伤^[14]。HCY还可以通过抑制细胞抗氧化酶如Mn-SOD的活性,减少活性氧的清除,导致活性氧在组织细胞内聚集,加剧动脉粥样硬化的进展^[15]。Mn-SOD 9 Val等位基因携带者的血清HCY水平增高,自身氧化形成的氧自由基增多,同时抑制了Mn-SOD的活性,减少氧自由基的清除,致使大量氧自由基在体内积聚,增加了冠心病的发病风险。

参考文献:

- [1] Matsushima S, Kuroda J, Ago T, et al. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2013, 112(4): 651-663.
- [2] Altenhöfer S, Kleikers PW, Radermacher KA, et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(14): 2327-2343.
- [3] Lee R, Margaritis M, Channon KM, et al. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(16): 2504-2520.
- [4] 姚创利, 赵佳, 黎阳, 等. 锰超氧化物歧化酶9 Ala/Val基因多态性对冠心病的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(2): 1-2, 6.
Yao CL, Zhao J, Li Y, et al. Effects of manganese superoxide dismutase 9 Ala/Val genetic polymorphisms on coronary heart disease[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(2): 1-2, 6.
- [5] 杨茂平, 叶林秀, 邱红, 等. 锰超氧化物歧化酶9 Ala/Val基因多态性与冠心病的关系[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2008, 29(6): 775-779.
Yang MP, Ye LX, Qiu H, et al. Association between manganese superoxide dismutase 9 Ala/Val genetic polymorphisms and coronary artery disease[J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2008, 29(6): 775-779.
- [6] Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease[J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(10): 1267-1274.
- [7] Erhardt LR, Leiter LA, Hobbs FD. Lipid management in cardiovascular disease prevention guidelines: strategies and tactics for implementation[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196(2): 532-541.
- [8] Deedwania P, Singh V, Davidson MH. Low high-density lipoprotein cholesterol and increased cardiovascular disease risk: an analysis of statin clinical trials[J]. *Am J Cardiol*, 2009, 104(10 Suppl): 3E-9E.
- [9] Smith JD. Myeloperoxidase, inflammation, and dysfunctional high-density lipoprotein[J]. *J Clin Lipidol*, 2010, 4(5): 382-388.
- [10] Ohashi M, Runge MS, Faraci FM, et al. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2006, 26(10): 2331-2336.
- [11] Hazen S. HDL structure, function, therapeutics, and imaging[J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2010, 30(2): 138.
- [12] Thomas MJ, Chen Q, Zabalawi M, et al. Is the oxidation of high-density lipoprotein lipids different than the oxidation of low-density lipoprotein lipids[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(6): 1719-1724.
- [13] 赵佳, 姚创利, 左林, 等. 冠心病患者血清同型半胱氨酸对血脂和锰超氧化物歧化酶的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(5): 44-45, 49.
Zhao J, Yao CL, Zuo L, et al. Effects of homocysteine on blood lipid and manganese superoxide dismutase in patients with coronary heart disease[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(5): 44-45, 49.
- [14] Ignashkova TI, Mesitov MV, Rybakov AS, et al. Deposition of von willebrand factor in human endothelial cells HUVEC in the endoplasmic reticulum stress induced by an excess of homocysteine in vitro[J]. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 2012(3): 81-86.
- [15] Caylak E, Aytekin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 60(4/5): 289-294.

收稿日期: 2015-03-06

修回日期: 2016-01-23

(上接 11 页)

- [11] 孙宇晶, 刘畅, 龙彦, 等. ADx-ARMS法与PCR-Sanger测序法检测非小细胞肺癌微小标本EGFR基因突变的比较[J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(7): 485-489.
Sun YJ, Liu C, Long Y, et al. Comparison between ADx-ARMS and PCR-Sanger sequencing for EGFR mutation detection in small biopsy samples of non-small cell lung cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical*

Laboratory Science, 2014, 32(7): 485-489.

- [12] 李曙东, 田伟, 豆亚伟, 等. 吸烟相关因素与EGFR基因突变状态的关系研究[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2015, 18(9): 1489-1493.
Li SD, Tian W, Dou YW, et al. Relationship between EGFR gene mutation and smoking-related factors[J]. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine*, 2015, 18(9): 1489-1493.

收稿日期: 2015-12-01

修回日期: 2016-05-13