

# 冠心病患者血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与锰超氧化物歧化酶 9 Ala/Val 基因多态性关系探讨\*

姚创利, 赵佳, 鲁旭娟, 姜小建 (西安市中心医院检验科, 西安 710003)

**摘要:**目的 探讨锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)基因多态性与脂蛋白磷脂酶 A2(Lp-PLA2)联合检测在冠心病(CHD)早期诊断中的临床价值。方法 选取冠心病患者组 92 例与健康对照组 78 例,分别检测各组血清中 Lp-PLA2 活性, Mn-SOD 活性以及 Mn-SOD 基因多态性,分析血清 Mn-SOD, Lp-PLA2 及 Mn-SOD 基因多态性与 CHD 的相关性。测定项目所用方法: Mn-SOD 采用比色法, Lp-PLA2 采用连续监测法,应用测序法检测 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性的基因型。结果 CHD 组 Mn-SOD 9 VV 基因型患者血清 Lp-PLA2 活性显著高于 AV+AA 基因型患者,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ); VV 基因型患者血清 Mn-SOD 活性显著低于 AV+AA 基因型患者,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。结论 联合检测 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性和血清 Lp-PLA2 活性,可作为 CHD 早期诊断、预测的重要依据。

**关键词:**脂蛋白相关磷脂酶 A2; 锰超氧化物歧化酶; 基因多态性; 冠心病

中图分类号: R541.4; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)01-026-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.008

## Study on the Relationship between Lipoprotein Associated Phospholipase A2 Level and Manganese Superoxide Dismutase 9 Ala/Val Genetic Polymorphism in Patients with Coronary Heart Disease

YAO Chuang-li, ZHAO Ja, LU Xu-juan, JIANG Xiao-jian

(Department of Clinical Laboratory, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the clinical value of the combined detection of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) genetic polymorphism and lipoprotein phospholipase A2 (Lp-PLA2) in the early diagnosis of coronary heart disease (CHD). **Methods** 92 cases of coronary heart disease patients and 78 cases of healthy control group were selected. The activity of Lp-PLA2, the activity of Mn-SOD and genotype of Mn-SOD 9 Ala/Val genetic polymorphism were detected in the serum of each group via the use of colorimetry, continuous monitoring technique and gene-sequencing method respectively and then the correlation of serum Mn-SOD, Lp-PLA2 and Mn-SOD genetic polymorphism with CHD were analyzed. **Results** The Lp-PLA2 activity in serum of CHD groups with Mn-SOD 9 VV genotype was statistically significantly higher than that of patients with the AV+AA genotype ( $P<0.01$ ). The serum Mn-SOD activity in patients with VV genotype was significantly lower than that of those with AV+AA genotype ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Combined detection of Mn-SOD 9 Ala/Val genetic polymorphism and Lp-PLA2 activity in the serum can provide an important foundation for the diagnosis and prediction of coronary heart disease.

**Keywords:** Lp-PLA2; Mn-SOD; genetic polymorphism; CHD

冠心病是目前最常见、危害最大的心脏疾患,起病快、发病急,近年来在国内外死亡率所占比例逐年增高,而动脉粥样硬化(AS)是冠心病的重要病理变化,炎症反应是动脉粥样硬化性疾病的重要机制之一, Ross R 在其损伤反应学说的基础上明确提出了 AS 是一种炎症性疾病<sup>[1]</sup>,所以炎症因子对冠心病的发生发展具有重要意义。锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)是 SOD 三种同工酶中的一种,是体内最重要的内源性抗氧化酶之一,在对抗氧自由基损伤和脂质过氧化损伤的过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。相关研究显示,AS 的发生与 Mn-SOD 的活

性降低有密切关系<sup>[3]</sup>。脂蛋白相关性磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)是近年来引起广泛关注的磷脂酶超家族成员,是一种与冠心病有关的新的炎症标志物,而且可能直接参与 AS,是冠心病独立的风险预测因子<sup>[4]</sup>,而连续监测光谱分析法测定 Lp-PLA2 活性有明显优势,但目前尚无报道。本文通过测定冠心病患者血清 Lp-PLA2 活性与 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性关系,探讨冠心病患者 Mn-SOD AA 型、AV 型和 VV 型 3 种基因型和血清 Lp-PLA2 水平变化的相关性,为冠心病的预测和早期诊断提

\* 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:姚创利(1962—),男,本科,副主任检验师,主要从事临床生物化学检验工作, E-mail: yaoc7270@163.com。

通讯作者:鲁旭娟(1966—),女,本科,主管检验师, E-mail: 1323878654@qq.com。

供实验室依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2015年10月~2016年8月期间西安市中心医院心内科的冠心病住院患者92例,男性49例,女性43例,年龄56~73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(WS 319-2010)。对照组选取同期西安市中心医院体检中心的健康体检人群,经询问病史、体检、心电图和实验室检查均无异常者,共78例,男性41例,女性37例,年龄55~68岁,且两组间年龄性别无统计学差异。

1.2 试剂及仪器 北京天根生化科技有限公司的人血液基因组DNA提取试剂盒(DP318),南京建成生物工程研究所生产的SOD分型试剂盒(A001-2),血清TC, TG, HDL, LDL测定试剂盒为北京利德曼生化股份有限公司生产, Lp-PLA2活性测定采用德赛诊断系统(上海)有限公司试剂盒;血清TC, TG, HDL, LDL水平和Lp-PLA2活性应用日立7600全自动生化分析仪检测。

## 1.3 方法

1.3.1 标本制备:分别采集冠心病组(患者入院后,在治疗前)和对照组的空腹肘静脉血约5 ml。其中2 ml加入枸橼酸盐抗凝剂(血液与抗凝剂比例为9:1),用于DNA提取;另外3 ml置于促凝

管中,在1 h内,3 000 r/min离心10 min,分离血清,用于TC, TG, HDL, LDL水平和SOD, Mn-SOD, Lp-PLA2活性检测。

1.3.2 Mn-SOD 9 Ala/Val基因测序: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,提取DNA基因组。提取的基因组DNA由深圳华大基因研究院协作测序,测定Mn-SOD 9 Ala/Val基因多态性。

1.3.3 血清Lp-PLA2活性测定:采用德赛诊断系统(上海)有限公司试剂盒,使用日立7600全自动生化分析仪按照说明书应用连续监测法测定Lp-PLA2活性。

1.3.4 血清TC, TG, HDL, LDL水平测定:TC, TG, HDL, LDL测定试剂盒为北京利德曼生化股份有限公司生产,使用日立7600全自动生化分析仪按照说明书编写参数,其中TC, TG用酶法测定, HDL-C, LDL-C用直接一步法测定。

1.3.5 血清Mn-SOD活性测定:应用南京建成生物工程研究所生产的SOD分型试剂盒(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532 nm波长处测定Mn-SOD活性。

## 2 结果

### 2.1 Mn-SOD 9 Ala/Val基因分布

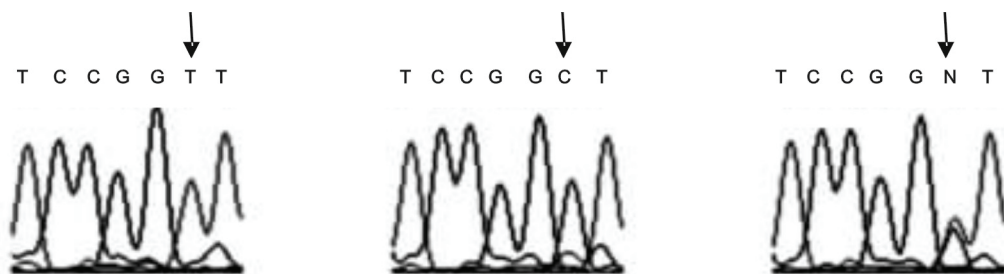


图1 Mn-SOD 9 Ala/Val基因多态性

Mn-SOD基因存在Ala(-9) Val变异,从而产生AA型、AV型和VV型3种基因型和A, V两种等位基因。测序结果, 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,箭头所指为基因变异点。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,经卡方检验,差异具有统计学意义( $\chi^2 = 7.65, P < 0.05$ ),见表1。

2.2 冠心病患者血清Lp-PLA2结果 见表2。用连续监测法测定两组研究对象血清Lp-PLA2活性,同时测定血清TC, TG, HDL, LDL水平,结果显示,冠心病患者血清Lp-PLA2结果明显高于健康对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。两组研究对象血清TC, TG, HDL, LDL水平虽有差异,但不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 两组研究对象Mn-SOD 9 Ala/Val基因多态性基因型分布[n(%)]

组别	n	基因型频率		等位基因频率	
		VV	AV+AA	V	A
健康对照组	78	54(69.2)	24(30.8)	69.2	30.8
冠心病组	92	81(88.0)	11(12.0)	88.0	12.0

表2 冠心病组与对照组血清Lp-PLA2及血脂结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CHD组(n=92)	对照组(n=78)	t	P
Lp-PLA2(U/L)	862±29	365±18	9.61	<0.01
TC(mmol/L)	4.98±0.42	4.06±0.34	0.713	>0.05
TG(mmol/L)	2.05±0.12	1.32±0.10	0.681	>0.05
HDL-C(mmol/L)	1.01±0.19	1.36±0.23	0.525	>0.05
LDL-C(mmol/L)	3.62±0.31	2.82±0.26	0.561	>0.05

### 2.3 冠心病患者血清Lp-PLA2活性与Mn-SOD

9 Ala/Val 基因多态性关系 测定冠心病 Mn-SOD 9 VV 基因型和 AV+AA 基因型患者血清 Lp-PLA2 活性,结果显示,VV 基因型患者血清 Lp-PLA2 活性(756 U/L)显著高于 AV+AA 基因型患者(402 U/L),差异具有统计学意义( $t=7.261, P<0.01$ );VV 基因型患者血清 Mn-SOD 活性(38.6 U/L)显著低于 AV+AA 基因型患者(65.3 U/L),差异具有统计学意义( $t=6.628, P<0.01$ );将冠心病组 Mn-SOD 9 VV 基因型的 Mn-SOD 活性与 Lp-PLA2 活性作 Spearman 相关性分析,结果呈高度负相关,具有统计学意义( $t=-0.822, P<0.01$ )。

3 讨论 冠心病是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病,动脉粥样硬化(AS)是冠心病的病理生理基础,炎症反应是动脉粥样硬化性疾病的重要机制,各种炎症细胞和大量炎症因子在 AS 形成和发展的过程中发挥着极其重要作用,Mn-SOD 是 SOD 三种同工酶中的一种,Mn-SOD 作为线粒体内重要的抗氧化酶,通过清除  $O_2^-$  自由基以保护生物系统免受氧化损伤,人体内 Mn-SOD 浓度的稳定能使机体细胞保持正常的生理功能。Mn-SOD 是由 6q25 核基因编码、主要位于线粒体的抗氧化酶,Mn-SOD 基因多态性致其活性发生改变。本次研究结果显示,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,而 Mn-SOD 9 VV 基因型的血清 Mn-SOD 活性低于 Mn-SOD 9 AV(%) + AA(%)基因型,Mn-SOD 活性降低,使得机体清除活性氧自由基的能力下降,导致  $O_2^-$  自由基和脂质过氧化物增加,造成 AS 发生发展,从而引起冠心病的发病风险增高,与相关报道一致<sup>[3]</sup>。在本次研究中,由于病例选取的限制,Mn-SOD 9 Ala/Val 基因测序结果 AA(%)基因型比例略低于文献报道,但不影响 Mn-SOD 9 VV(%)基因型引起冠心病的发病风险增高研究结果。

脂蛋白相关性磷脂酶 A2(Lp-PLA2)是磷脂酶超家族成员中非  $Ca^{2+}$  依赖性活性磷脂酶,由 441 个氨基酸残基组成的一种丝氨酸酯酶,活性中心为丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸,Lp-PLA2 能催化脂蛋白和细胞膜上的甘油磷脂二位酰基酯键水解,形成非酯化脂肪酸和溶血磷脂的酶族<sup>[5]</sup>。血液中的 Lp-PLA2 主要通过炎症介质调节,由成熟的巨噬细胞和 T 淋巴细胞合成和分泌<sup>[6]</sup>。

Lp-PLA2 同时具有抗炎和致炎作用。在循环血液中,Lp-PLA2 约 80%~85%与低密度脂蛋白(LDL)结合,具有促进 AS 作用,在 LDL 的两种表

型中,Lp-PLA2 与 sdLDL 结合则具有更强的致动脉粥样硬化能力;小部分 Lp-PLA2 约 15%~20%与高密度脂蛋白(HDL)和其他脂蛋白结合,具有抗氧化及抗炎作用<sup>[6,7]</sup>。本次研究表明,冠心病患者较对照组血清 Lp-PLA2 活性有明显的升高,是冠心病诊断的重要指标。血脂水平异常是冠心病的传统危险因素,然而 50%的冠心病患者血脂水平在正常范围<sup>[8]</sup>,本次研究两组 TC, TG, HDL, LDL 水平虽有差异,但不具有统计学意义,可能与冠心病病程有关。

升高的 LDL 在损伤的内皮细胞下蓄积,被氧化修饰为 ox-LDL。Lp-PLA2 水解 ox-LDL 生成溶血卵磷脂(LysoPC)及氧化型游离脂肪酸(ox-NEFAs),这两种物质都能促进黏附分子和炎症因子的表达,进而促进单核细胞分化为巨噬细胞,吞噬 ox-LDL 而成为泡沫细胞,大量泡沫细胞在血管内皮细胞下聚集,最终导致 AS 斑块形成<sup>[1]</sup>。

Lp-PLA2 促使炎性细胞释放细胞因子和蛋白酶,降解纤维帽的平滑肌细胞和胶原基质,使斑块纤维帽变薄或破坏,此时巨噬细胞继续合成和分泌 Lp-PLA2,从而使斑块加重、破裂,形成血栓,导致心血管事件发生。传统诊断、预测 AS 的指标为血脂,但研究发现有冠心病患者的血脂水平在正常范围;Lp-PLA2 作为独立预测冠心病的新指标,可有效区分血脂达标人群的患病风险。在 AS 早期,与 LDL 结合的 Lp-PLA2 水解 ox-LDL 生成 LysoPC 及 oxNEFAs 两种物质,促进 AS 斑块的形成及斑块的破裂;在 AS 形成后,Lp-PLA2 活性能在一定程度上反映冠状动脉的狭窄程度,与冠心病严重程度有密切关系,有研究表明,冠脉造影显示 Lp-PLA2 水平与冠脉严重病变血管支数明显相关<sup>[9]</sup>。

本研究还对冠心病患者组中 Mn-SOD 9 VV 基因型和 AV+AA 基因型分别进行了血清 Lp-PLA2 活性和 Mn-SOD 活性测定,结果表明,VV 基因型 Lp-PLA2 活性显著高于 AV+AA 基因型,冠心病组 Mn-SOD 9 VV 基因型的 Mn-SOD 水平与 Lp-PLA2 水平呈显著负相关。冠心病组 Mn-SOD 9 VV 基因型 Mn-SOD 活性降低,机体清除活性氧自由基的能力下降,造成 AS, Lp-PLA2 水平升高与 sdLDL 结合增强了致 AS 能力,加大了冠心病风险。检测 Lp-PLA2 水平可以反映 Mn-SOD 9 VV 基因型和 V 等位基因频率,早期预测、诊断冠心病。

冠心病患者血清 Lp-PLA2 活性测定结果很少报道,本研究使用连续监测光谱分析法测定 Lp-PLA2 活性和活性测定有明显优势,实验操作简单,样本无需前处理,可使用全自动生化分析仪用

于临床大批量检测,检测结果精密度好、准确高,校准品有溯源性,结果采用国际单位(U/L),并且酶活性测定与酶质量测定相比,能真实反映发挥效力的酶的水平,更具有临床意义。

综上所述,冠心病患者血清 Lp-PLA2 活性与 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性有高度相关性,冠心病组 Lp-PLA2 活性检测与 Mn-SOD 9 VV 基因型有高度的负相关性,检测 Mn-SOD 9 VV 基因型冠心病患者血清 Lp-PLA2 活性, Lp-PLA2 结果升高,因此,联合检测 Mn-SOD 9 Ala/Val 基因多态性和血清 Lp-PLA2 活性,可作为冠心病早期诊断、预测的重要依据,尤其对冠心病患者的血脂水平在正常范围内预测冠心病的指标,可有效预测血脂达标人群的患病风险,为心血管事件的发生提供了新的手段。

#### 参考文献:

- [1] 张彤格,贾 玫. 脂蛋白相关性磷脂酶 A2 与冠心病相关性研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(7):493-497.  
Zhang TG, Jia M. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and coronary heart disease[J]. Chin J Lab Med, 2015, 38(7):493-497.
- [2] 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. Effect of homocysteine on blood lipid and manganese superoxide dismutase in patients with coronary heart disease[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(5):44-45, 49.
- [3] 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. Effect of manganese su-

peroxide dismutase 9 Ala/Val gene polymorphism on coronary heart disease[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(2):1-2, 6.

- [4] Epps KC, Wilensky RL. Lp-PLA2-a novel risk factor for high risk coronary and carotid artery disease [J]. J Intern Med, 2011, 269(1):94-106.
- [5] Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1488(1/2):1-19.
- [6] Silve IT, Mello AP, Damasceno NR. Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A2(Lp-PLA2): a review[J]. Lipids Health Dis, 2011, 10(1):170.
- [7] 徐如林,蔡安平,麦炜颐. 脂蛋白相关性磷脂酶 A2: 一种新型的,具有前景的评估心血管危险的生化标记物[J]. 新医学,2014,45(4):211-217.  
Xu RL, Cai AP, Mai WY. Lipoprotein associated phospholipase A2: a novel, promising biochemical marker for evaluating cardiovascular risk [J]. New Medicine, 2014, 45(4):211-217.
- [8] Sachdeva A, Cannon CP, Deedwania PC, et al. Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: an analysis of 136 905 hospitalizations in Get with the Guidelines[J]. Am Heart J, 2009, 157(1):111-117, e2.
- [9] 张伟伟,张一娜,迟啸威,等. 脂蛋白相关性磷脂酶 A2 在冠心病中的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(4):469-471.  
Zhang WW, Zhang YN, Chi XW, et al. Research progress of lipoprotein associated phospholipase A2 in coronary heart disease[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease, 2012, 10(4):469-471.

收稿日期:2016-09-26

修回日期:2016-12-17