

照组与各实验组比较差异极显著 ($P < 0.01$), 各实验组组间两两比较差异均极显著 ($P < 0.01$)。

讨 论

在药物洗脱支架时代, 支架内再狭窄的发生率较前明显减低。目前国内、外药物支架常用的有 3 大类涂层药物: 抗炎 (如可的松)、抗血栓形成 (如肝素) 和抗增生药物, 已经上市的药物包括雷帕霉素 (sirolimus, rapamycin)、紫杉醇 (paclitaxel, taxol) 等都属于抗增生类药物, 它们都在动物实验中显示了令人满意的抑制平滑肌细胞增生、迁移、促进凋亡的效应, 从而有效抑制由支架和球囊损伤导致的血管内膜增生达到治疗再狭窄的目的。

随着对凋亡机制研究的进一步深入, 线粒体在凋亡中的作用越来越受重视。线粒体膜通透性转运孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 是细胞凋亡的调节物, 可能作为细胞死亡的“开关”, 一旦打开, $\Delta\Psi_m$ 下降, 细胞不可逆地进行凋亡^[8,9]。对 As_2O_3 的效应谱进行研究, 也发现 $\Delta\Psi_m$ 下降是几乎所有砷剂引起的各种类型细胞凋亡的共同途径^[10]。研究表明在 As_2O_3 诱导细胞凋亡过程中, $\Delta\Psi_m$ 下降的表现早于细胞凋亡的形态学改变, 是细胞凋亡的特异性标志^[11]。砷剂作用最敏感的细胞器是线粒体。本实验发现, As_2O_3 能够诱导 VSMCs 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的降低与其诱导细胞凋亡效应明显相关, 研究发现细胞 $\Delta\Psi_m$ 下降后, 线粒体释放凋亡活性物质细胞色素 C (Cyt C) 进入胞质, CytC 可激活 caspase 级联反应最终导致细胞凋亡。caspase-3 是 caspase 级联反应中重要的效应酶, 负责对凋亡途径最后执行阶段的全部

或部分关键性蛋白的酶切。在本实验中, 研究发现 As_2O_3 诱导血管平滑肌细胞凋亡的同时可检测到 caspase-3 酶活性增高, 表明 As_2O_3 诱导血管平滑肌细胞凋亡可能与正调节 caspase-3 活性相关。

参考文献

- 1 何丽雅, 赖冬波, 佟莉贞. 儿童急性非淋巴细胞性白血病 89 例临床分析. 医学研究杂志, 2009, 38(5): 84-86
- 2 赵朴. 三氧化二砷治疗慢性粒细胞白血病临床研究. 医学研究杂志, 2008, 37(12): 54-56
- 3 喻智勇, 王曙光, 秦红军, 等. 三氧化二砷诱导血管内皮细胞凋亡和抑制血管生成的实验研究. 武警医学, 2004, 15(1): 22-24
- 4 杨巍, 葛均波, 刘红玲, 等. 三氧化二砷洗脱支架防治兔血管损伤后再狭窄的实验研究. 中华心血管病杂志, 2006, 34(9): 14-18
- 5 陈鹏, 王建华, 胡美玉. 三氧化二砷诱导大鼠动脉平滑肌细胞凋亡的实验研究. 中国临床医学, 2006, 13(2): 296-297
- 6 Yang W, Ge J, Liu H, *et al.* Arsenic trioxide eluting stent reduces neointima formation in a rabbit iliac artery injury model. Cardiovasc Res, 2006, 72(3): 483-493
- 7 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1999: 68-73
- 8 Nakagawa Y, Akao Y, Morikawa H, *et al.* Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. Life Sci, 2002, 70(19): 2253-2269
- 9 邢茂, 张恩娟, 叶鑫. 三氧化二砷诱导肿瘤细胞凋亡途径的研究. 中国药理学通报, 2002, 18(1): 87-90
- 10 Chen GQ, Zhu J, Shi XG, *et al.* In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. Blood, 1996, 88(3): 1052-1061
- 11 蔡循, 陈国强, 陈竺, 等. 三氧化二砷治疗肿瘤的机制研究. 肿瘤, 2001, 21(2): 142-144

(收稿: 2010-04-19)

人类 β -防御素-1 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病关系的研究

孙丽蓉 张 敏 李冬梅 刘 柱 李水霞 高 扬 张建玲

摘 要 目的 探讨人类 β -防御素-1 (hBD-1) 基因多态性与慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 之间的关系。**方法** 采用病例对照研究和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术, 检测 COPD 患者 hBD-1 基因型频率分布。**结果** COPD 组 C、G 等位基因频数分别是 85.25% 和 14.75%, 对照组 C、G 等位基因频数分别是 73.33% 和 26.67%, C 等位基因在 COPD 组的频数明显高于健康对照组 ($\chi^2 = 5.237, P < 0.05$, OR: 2.101, 95% CI: 1.104 ~ 3.998)。**结论** hBD-1 基因 668C/G 位点基因多态性与中国北方汉族人群 COPD 易感性有相关性, C 等位基因可能是 COPD 的高

危险基因。

关键词 慢性阻塞性肺病 人类 β -防御素 基因多态性

The Relationship between Human Beta - defensin - 1 Polymorphism and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Sun Lirong, Zhang Min, Li Dongmei, Liu Zhu, Li Shuixia, Gao Yang, Zhang Jianling. *Deptment. of Respiration, The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Neimenggu 014030, China*

Abstract Objective This study was designed to investigate the relationship between polymorphisms of hBD - 1 668 C/G loci and COPD in Chinese Han population. **Methods** We used a case - control study to compare the frequent distribution of human β - defensin - 1 genotypes with a polymerase chain reaction - fragment polymorphism (PCR - RFLP) method. **Results** The allele frequencies of 668 C and 668G were 85.25% and 14.75% in COPD smokers, and 73.33% and 26.67% in healthy smokers ($P < 0.05$, OR was 2.101 with 95% confidence interval 1.104 ~ 3.998). **Conclusion** The polymorphism of hBD - 1 668 C/G is associated with susceptibility to COPD in Chinese Han population. Furthermore, the 668C allele represents relatively higher susceptibility to COPD.

Key words Chronic obstructive pulmonary disease; Human β - defensin; Genetic polymorphism

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以不完全可逆的气流受限为特征的一组疾病, 气流受限呈进行性发展, 并伴有对有毒颗粒或气体的异常炎症反应^[1]。目前研究表明吸烟是引起 COPD 最重要的危险因素, 但吸烟者中也只有 10% ~ 20% 成为具有临床症状的 COPD 患者, 从而说明个体遗传易感性在 COPD 的发病中起着重要的作用^[2]。本研究采用病例对照研究方法, 应用聚合酶链式反应 - 限制性片段长度多态性 (PCR - RFLP) 和琼脂糖凝胶电泳等技术来分析人类 β - 防御素 - 1 (human beta - defensin - 1, hBD - 1) 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病之间的关系, 从而为 COPD 的遗传易感性提供理论依据。

资料与方法

1. 研究对象: 研究对象选自包头医学院第二附属医院 2008 年 3 月 ~ 2009 年 8 月笔者医院住院患者及同期健康体检者。COPD 患者, 符合慢性阻塞性肺疾病防治全球倡议中的诊断标准。根据肺功能第 1 秒用力呼气容积占用力肺活量百分比 (FEV_1/FVC) 和第 1 秒用力呼气容积占预计值百分比 ($FEV_1\%$ 预计值) 结果, 将受试者分为两组: 61 例 COPD 患者 (COPD 组); 病情稳定期患者, $FEV_1/FVC < 70\%$; 60 名健康者 (健康对照组); $FEV_1/FVC \geq 70\%$, $FEV_1 \geq 80\%$ 预计值。健康对照组, 胸部影像学及肺功能检查结果均正常。所有研究对象均无支气管哮喘、肺癌、支气管扩张症、肺间质纤维化等呼吸系统疾病病史及冠心病、高血压病、糖尿病、恶性肿瘤等具有遗传倾向的疾病病史。

2. 基因组 DNA 的提取: 所有研究对象均抽取晨起空腹外周静脉血 2ml, EDTA₂ 钠抗凝, 放入 -20℃ 冰箱中保存, 择期用白细胞裂解液裂解, 提取 DNA, 溶解后 -20℃ 保存。

3. PCR - RFLP 技术: 根据 Genebank DNA 序列 (基因号 U50930), 利用 Primer5 软件设计相应引物 (上游: 5' - 3' caa atg aca cca ggg gtt agc gat 下游: 5' - 3' cag agc tta cct gag gcc

atc tc), 将引物及基因组 DNA 放入相应 PCR 扩增体系中进行扩增 (退火温度 66℃)。扩增产物加入相应的酶切体系中进行酶切。酶切产物进行琼脂糖凝胶 (含 1% 溴化乙锭) 电泳。电泳后的凝胶在紫外投射仪上观察电泳条带, 判断基因型。

4. 统计方法: 应用 SPSS11.0 软件包处理, 基因型采用直接计数法, 等位基因频率 = (该基因纯合子个体数 × 2 + 该基因杂合子个体数) / 总个体数 × 2。两组间均数的比较采用 t 检验。基因型、等位基因频率和组间计数资料比较采用 χ^2 检验, 并计算等位基因的相对危险性, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

1. 两组研究对象的性别构成、年龄、吸烟指数等资料比较见表 1。其中两组性别构成差异经 χ^2 检验示无统计学意义 ($P > 0.05$), 年龄、吸烟指数差异经 t 检验示无统计学意义 ($P > 0.05$), 两组资料具有可比性。

表 1 两组研究对象一般资料比较

组别	<i>n</i>	性别组成 (男性/女性)	年龄 (岁)	吸烟指数 (年 × 支)
COPD 组	61	(48/13)	68.21 ± 9.28	391 ± 394
对照组	60	(50/10)	66.73 ± 7.19	431 ± 405
t/χ^2		0.424	0.980	-0.546
<i>P</i>		0.515	0.329	0.586

2. hBD - 1 基因 668 位点 PCR - RFLP 电泳 (EB 染色法) 结果: PCR 扩增产物为包含 668 位点的 272bp DNA 片段。含 668G 等位基因的片段包含限制性内切酶 BsmA I 酶切位点, 可以被切为 163bp/109bp 两个片段, 含 668C 等位基因的片段不被 BsmA I 酶切, 显示 272bp 1 条带。纯合 CC 型为 272bp 1 条带, 杂合型为 272bp/163bp/109bp 3 条带, 纯合 GG 型在本实验中未检出, 见图 1、图 2。

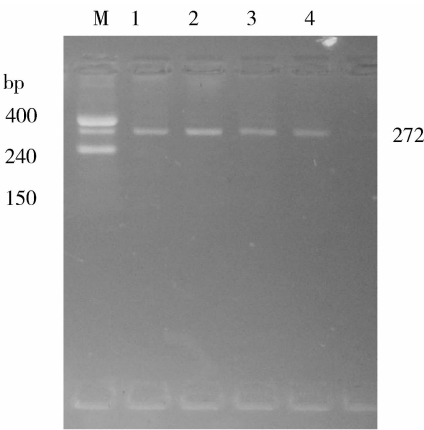


图 1 hBD-1 exon-2 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 (含 EB)
M. DNA Marker; 1~4. PCR 产物 (272bp)

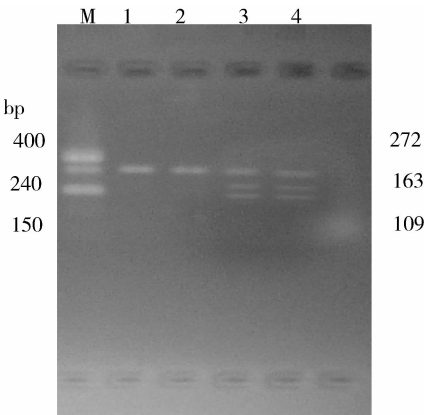


图 2 hBD-1 exon-2 酶切产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 (含 EB)
M. DNA Marker; 1. PCR 产物 (272bp); 2. CC 型 (272bp); 3~4. 杂合型 CG (272/163/109bp)

3. 两种等位基因在 COPD 组及对照组中的分布:
hBD-1 668 位点在 61 例 COPD 患者和 60 例对照者中的等位基因频率见表 2。

表 2 两组研究对象 hBD1 668 位点等位基因频率分布							
组别	n	基因型 [n (%)]			等位基因		
		CC 型	CG 型	GG 型	G (%)	χ^2	P
COPD 组	61	43 (70.49)	18 (29.51)	0 (0)	14.75		
对照组	60	28 (46.67)	32 (53.33)	0 (0)	26.67	5.237	0.022

COPD 患者中 CC 型纯合子、CG 型杂合子分别占 70.49% 和 29.51%, 对照组中 CC 型纯合子、CG 型杂合子分别占 46.67% 和 53.33%, 两组均未检出 GG 型纯合子, 两组间差异经 χ^2 检验示有统计学意义

($\chi^2 = 7.081, P < 0.01$)。分析 GC 等位基因频数, COPD 组 C、G 等位基因频数分别是 85.25% 和 14.75%, 对照组 C、G 等位基因频数分别是 73.33% 和 26.67%, G 等位基因在健康对照组的频数明显高于 COPD 组 ($\chi^2 = 5.237, P < 0.05$)。hBD1 基因 668 位点 C 等位基因可能是 COPD 的高危险基因 (OR: 2.101, 95% CI: 1.104 ~ 3.998)。

讨 论

流行病学研究表明: COPD 是在易感基因基础上, 各种外部因素共同作用下发生的一种多基因遗传性慢性疾病, 而这种遗传易感性与 COPD 的发病机制有着很密切的关系, 其中炎症学说、蛋白酶/抗蛋白酶失衡学说、氧化/抗氧化失衡学说是阐明 COPD 发病机制的 3 个重要学说。目前易感基因除 α_1 抗胰蛋白酶 (α_1 -AT) 基因已明确外, 其他基因尚未定论。本课题选用人体内一种重要的保护性基因 hBD-1 基因, 研究其基因多态性与 COPD 发生的相关性, 从而筛选 COPD 易感人群, 并进行早期预防。防御素是宿主抵御感染的重要的低分子阳离子多肽, 其富含半胱氨酸和精氨酸, 具有广谱抗微生物活性, 能有效地杀灭病毒、细菌、真菌、螺旋体等, 对肿瘤细胞也有杀伤作用^[4-6]。在人类发现的防御素主要有 3 大类, α 、 β 、 θ -防御素。 β -防御素-1 在气管、细支气管、肺泡上皮细胞和黏膜下腺体均有表达, HBD1 可以通过直接杀伤微生物发挥自身免疫作用, 也可以通过化学趋化多种炎性细胞和免疫增强影响细胞介导的适应性免疫^[7-10]。有研究显示 HBD1 具有抗腺病毒活性, 而腺病毒感染通过改变炎性因子表达及影响气道重塑促进 COPD 发生发展^[11-13]。hBD1 基因位于第 8 号染色体上 8p23.2 ~ 23.1 区域, 其基因的片段约 7.0kb。有 1 个内含子和两个外显子, 第 1 个外显子编码信号肽和原片段, 第二个外显子编码成熟肽; 成熟肽是一富含半胱氨酸, 由 36 个氨基酸残基组成的阳离子小分子多肽, 通常以单体形式存在, 形成一个典型的 β 折叠结构, 这种结构使其具有双极性的电荷分布; 进而使 HBD1 可以与靶细胞膜作用, 使靶细胞膜断裂形成通道导致细胞溶解, 最终细胞死亡。

hBD1 基因的多态性位点已有报道: Matsushita 等^[14]研究, 在日本人群中 hBD1 基因 1654 位点 G/A 变异导致 Val38Ile 变构体出现, 影响 HBD1 蛋白质功能, 使其更易患 COPD, 但主要在慢性支气管炎的发生中起作用, 而不是在肺气肿的形成中发挥作用。都勇等^[15]对 128 例 COPD 患者及 112 例对照者进行的

病例对照研究,提示中国汉族人群中 hBD1 基因 1654 位点 G/A 变异与 COPD 相关,COPD 患者 hBD1 基因 1654 位点突变率 15.23%,显著高于对照组 6.70%,研究结果与 Matsushita 等的研究结果一致。但是,Dork 等^[16]的研究显示:hBD-1 基因 1654 位点多态性 G/A 变异及 Val38Ile 变构体在白种人群中出现频数较低,约 20% 多一点,并不导致吸烟人群肺功能的下降及呼吸系统感染的增加。提示 hBD1 基因多态性与 COPD 的相关性可能存在种族差异^[17]。研究还发现:hBD1 基因 668 位点存在 G/C 变异,且变异与 1 型糖尿病患者口腔念珠菌感染及口腔鳞癌发生有关^[18],健康人群 G 等位基因频率叫病例组高,约 14.71%~45.74%。但未见该位点变异与呼吸系统疾病的相关性报道。本研究通过对 61 例 COPD 患者和 60 例健康对照者的病例对照研究显示:hBD1 基因 668G/C 位点的基因型分布在两组中有差异。COPD 患者 668G 等位基因频数显著低于对照组,提示 hBD1 基因 668G/C 多态性与 COPD 易感性相关,携带 668C 等位基因者对 COPD 有较高的易感性,668G 等位基因可能为 COPD 的保护性基因。668G/C 位于 hBD1 mRNA 3'端,翻译起始点上游-44bp 处。所以其本身的变异并不导致蛋白质氨基酸序列的改变,影响机制目前尚不明确,可能是其影响翻译过程及修饰过程而调节 HBD1 蛋白质功能^[14,18]。

研究不同国家、不同种族及地区 COPD 的易感基因,对高危人群进行 COPD 的易感基因检测,可以做到早期预防及治疗,降低 COPD 的发病率,可能是未来预防治疗 COPD 的方向。我们的研究发现 hBD1 基因中的 C 等位基因是发生 COPD 的风险基因,针对可能发生 COPD 的高危人群进行 hBD1 基因型检测,让携带 C 等位基因的人群改善生活方式,避免接触粉尘,做一些预防工作,从而能够减少 COPD 发病率。

参考文献

- 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 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163 (5): 1256-1276
- Joos L, Pare PD, Sandford AJ. Genetic risk factors of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Swiss Med Wkly*, 2002, 132: 27-37
- Daniel R, Ouellette, COL, *et al.* The answer is fifteen percent what is the question? [J]. *Chest*, 2004, 125: 3-5
- Hiratsuka T, Nakazato M, Ashtani J, *et al.* A study of human beta-defensin-1 and human beta-defensin-2 in airway mucosal defense [J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 1999, 73: 156-162
- Gropp R, Frye M, Wagner TO, *et al.* Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus mediated gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 957-964
- Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, *et al.* Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells [J]. *Immunology*, 2002, 106: 517-525
- Singh PK, Hong Peng Jia, *et al.* Production of β -defensins by human airway epithelia [J]. *Medical Sciences*, 1998, 95 (25): 14961-14966
- Zhao C, Wang I, Lhrer RI. Widespread expression of β -defensins in human secretory glands and epithelial cells [J]. *FEBS Lett*, 1996, 396: 319-322
- Sun L, C M Finnegan, T Kish-Catalone, *et al.* Human β -defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection [J]. *J. Virol*, 2005, 79: 14318-14329
- Niyonsaba, F., Ogawa, H., and Nagaoka, I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor- α -treated human neutrophils [J]. *Immuology*, 2004, 111: 273-281
- Ogawa E, Elliot t WM, Hughes F, *et al.* Latent adenoviral infection induces production of growth factors relevant to airway remodeling in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286: L189-L197
- Gilmour PS, Rahman I, Hayashi S, *et al.* Adenoviral E1A primes alveolar epithelial cells to PM (10)-induced transcription of interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281: L598-L606
- Higashimoto Y, Keicho N, Elliott WM, *et al.* Effect of adenovirus E1A on ICAM-1 promoter activity in human alveolar and bronchial epithelial cells. *Gene Expr*, 1999, 8: 287-297
- Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, *et al.* Genetic variants of human beta-defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 17-22
- 都勇, 孙书明, 李玉. 肿瘤坏死因子- α 、人类 β -防御素-1 基因多态性与慢性阻塞性肺病相关性的研究 [J]. *中国临床医学*, 2008, 15 (3): 329-331
- Dork T, Stuhmann M. Polymorphisms of the human betadefensin-1 gene [J]. *Mol Cell Probes*, 1998, 12: 171-173
- Jurevic RJ, Chrisman P, Mancl L, *et al.* Single nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations [J]. *Genet Test*, 2002, 6: 261-269
- Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, *et al.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high throughput SNP assays and association with Candida carriage in type I diabetics and non-diabetic control [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 90-96

(收稿: 2010-04-08)