

过氧化物酶活性降低,提示机体抗氧化能力降低^[11]。对大鼠进行 5~11 天不等的快眼睡眠剥夺,发现海马及脑干的 Cu/Zn-SOD 活性较对照组明显下降^[12]。

综上所述,睡眠剥夺会增加活性氧簇(ROS)的生成,降低抗氧化酶及抗氧化复合物含量,导致机体抗氧化能力下降。本实验中在对大鼠进行连续 72h 睡眠剥夺后,大鼠的 GSH-Px 活性和 SOD 活性显著降低,肝脏组织中 MDA 含量上升,抗氧化能力下降。给予 6% 和 18% MCT 组的大鼠抗氧化能力有所改善,提示适量的 MCT 对睡眠剥夺大鼠的抗氧化能力有改善作用。

参考文献

- 1 Harding HP, Zhang Y, Zeng H, *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(3): 619-633
- 2 Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death[J]. *Mol Cell*, 2004, 15(5): 767-776
- 3 Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences[J]. 2004, 164(3): 341-346
- 4 Naidoo N, Giang W, Galante RJ, *et al.* Sleep deprivation induces the unfolded protein response in mouse cerebral cortex[J]. *J Neurochem*, 2005, 92(5): 1150-1157

- 5 Orzolek A, Wysocki P, Strzezek J, *et al.* Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16°C) in different extenders [J]. *Reprod Biol*, 2013, 13(1): 34-40
- 6 Koban M, Swinson KL. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 289(1): 68-74
- 7 Taheri S, Lin L, Austin D, *et al.* Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index[J]. *PLoS Med*, 2004, 1(3): 62
- 8 Cirelli C. How sleep deprivation affects gene expression in the brain: a review of recent findings? [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92(1): 394-400
- 9 Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(1): 47-95
- 10 Everson CA, Laatsch CD, Hogg N. Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(2): 374-383
- 11 唐庆娟, 陶凯忠, 胡森森, 等. 72 小时睡眠剥夺大鼠的氧化应激 [J]. *中国行为医学科学*, 2003, 5: 500-502
- 12 Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, *et al.* Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem [J]. *Neuroreport*, 2002, 13(11): 1387-1390

(收稿日期: 2013-02-18)

(修回日期: 2013-04-01)

浙东地区汉族人群 sLOX-1 浓度与 LOX-1 基因多态性相关性研究

徐卫峰 叶华丹 杨 曦 叶恭杰 黄 毅 周军波 陈治奎 姜庆军 廉姜芳 葛世俊 周建庆

摘 要 **目的** 观察血浆中 sLOX-1 浓度是否和 LOX-1 基因多态性相关。**方法** 采用酶联免疫吸附法测定 354 例接受冠状动脉造影的浙东地区汉族人群住院患者血清中 sLOX-1 的浓度, 并采用 Tm-shift 基因分型方法对 G501C 和 3' UTR-C/T 等位基因型进行检测, 其中包括 43 例急性心肌梗死、86 例不稳定型心绞痛、89 例稳定型心绞痛和 136 例经冠状动脉造影排除冠心病的患者。**结果** 3'UTR-C/T 位点 TT, TC, CC 基因型分别为 5.4%, 37.3%, 57.3%, 501G/C 位点 CC, GC, GG 基因型分别为 5.4%, 31.9%, 62.7%, 3'UTR-C/T TT, TC, CC 3 组 sLOX-1 浓度分别为 160.0 ± 56.1, 132.7 ± 52.0, 128.9 ± 58.0 pg/ml, 501G/C CC, GC, GG 3 组 sLOX-1 浓度分别为 134.0 ± 55.2, 127.2 ± 50.8, 134.2 ± 58.7 pg/ml。不同基因型患者 sLOX-1 浓度各组间没有显著性差异, 在各亚组间也没有差异。**结论** 浙东地区汉族人群 sLOX-1 浓度和 LOX-1 基因多态性无相关性。

关键词 可溶性血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 血凝素样氧化低密度脂蛋白受体基因多态性 关联分析

Correlation Analysis of Plasma Soluble LOX-1 Levels and Gene Polymorphism of Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor 1 (LOX-1). Xu Weifeng, Ye Huadan, Yang Xi, Ye Gongjie, Huang Yi, Zhou Junbo, Chen Zhikui, Jiang Qingjun, Lian Jiangfang, Ge Shijun, Zhou Jianqing. Medical Centre of Ningbo Lihui Hospital, Zhejiang 315040, China

基金项目: 宁波市医学科技计划基金资助项目(200802)

作者单位: 315040 宁波市医疗中心李惠利医院(徐卫峰、杨曦、周军波、陈治奎、姜庆军、廉姜芳、葛世俊、周建庆); 315211 宁波大学医学院(叶华丹、叶恭杰、黄毅)

通讯作者: 廉姜芳, 电子信箱: hjmpin@163.com

Abstract Objective To assess whether the level of serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (sLox-1) is associated with LOX-1 gene polymorphism. **Methods** Levels of sLox-1 were measured in 345 patients of Han population of eastern area of Zhejiang Province who come to our centre seeking for coronary angiography with enzyme-linked immunosorbent assay, including 45 acute myocardial infarction patients, 86 unstable angina pectoris patients, 89 stable angina pectoris patients and 136 non-coronary patients excluded by coronary arteriography. The polymorphisms of gene LOX-1 G501C and 3'UTR-C/T were measured by the way High-throughput SNP genotyping with single-tube PCR with Tm-shift primers. **Results** The frequencies for the 3'UTR-C/T TT, TC, CC were 5.4%, 37.3%, 57.3%, and G501C CC, GC, GG were 5.4%, 31.9%, 62.7%, respectively. The level of sLox-1 were 160.0 ± 56.1 , 132.7 ± 52.0 , 128.9 ± 58.0 pg/ml in 3'UTR-C/T TT, TC, CC group, and 134.0 ± 55.2 , 127.2 ± 50.8 , 134.2 ± 58.7 pg/ml in 501G/C CC, GC, GG group. There were no discrepancy in plasma sLox-1 levels between different groups. In subgroup analysis, there were no discrepancy too. **Conclusion** Levels of sLox-1 were not associated with the polymorphisms of gene LOX-1 in Han population of eastern area of Zhejiang Province.

Key Words Soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1; Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene polymorphism; Association analysis

已有多个研究证实可溶性血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, sLOX-1) 在急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 急性期患者的水平显著升高, 也有实验认为血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 基因多态性与急性心肌梗死发病存在相关性, 这两者之间是否存在相关性目前研究尚少。本研究拟探索 sLOX-1 水平和 LOX-1 基因多态性之间的相关性, 应用酶联免疫法检测了接受冠状动脉造影的浙东地区汉族人群患者血清中 sLOX-1 的水平, 并采用 Tm-shift 基因分型方法对 LOX-1 基因 G501C 和 3'UTR-C/T 等位基因进行分型, 发现两者间没有相关性, 且在急性心肌梗死、不稳定型心绞痛、稳定型心绞痛和非冠心病的各亚组分析中两者间亦没有相关性。

材料与方法

1. 对象: 收集 2011 年 9 月~2012 年 4 月宁波市医疗中心李惠利医院心血管内科住院接受选择性冠状动脉造影术的浙东地区汉族人群患者 354 例, 其中男性 231 例, 女性 123 例, 患者年龄 35~81 岁 (平均年龄 60.0 ± 8.0 岁), 包括急性心肌梗死 (AMI) 患者 43 例, 不稳定型心绞痛 (unstable angina pectoris, UAP) 患者 86 例, 稳定型心绞痛 (stable angina pectoris, SAP) 患者 89 例和冠心病 (non coronary heart disease, NCHD) 患者 136 例。其中, 急性心肌梗死, 不稳定型心绞痛和稳定型心绞痛的诊断标准分别参照中华医学会心血管病学分会/中华心血管病杂志编辑委员会发布的 2010 年《急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》, 2007 年《不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南》, 2007 年《慢性稳定型心绞痛诊断与治疗指南》^[1-3], 非冠心病组为临床上可疑冠心病而行选择性冠状动脉造影未见大于 50% 以上狭窄的患者。以上各组均排除

急性心肌炎、甲状腺疾病、严重肝肾功能不全者。

2. 方法: 采集患者年龄、性别、吸烟史、高血压史、糖尿病史等临床资料, 并在住院次日晨抽取空腹静脉血由全自动生化仪测得血脂谱。所有接受冠状动脉造影术的患者抽取动脉血 10ml, -80°C 冻存, 待测 sLOX-1 浓度和 LOX-1 基因多态性。采用酶联免疫法成批检测 sLOX-1 水平, 试剂盒购自武汉 Eiaab 公司, 严格按照说明书操作。采用常规苯酚-氯仿法抽提外周血白细胞基因组 DNA, 溶解于 TE 溶液。核酸蛋白测定仪 (Eppendorf) 检测 DNA 质量与浓度后, 保存于 -20°C 。利用 Primer 5.0 设计引物, 选择 Tm 值在 $59 \sim 62^{\circ}\text{C}$ 长度在 15~22bp 之间的最佳 SNP 的引物, 见参考文献[4], 引物序列见表 1。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。应用罗氏 Light-Cycler480 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) PCR 仪进行扩增, 采用 Tm-shift 基因分型方法对 G501C 和 3'UTR-C/T 等位基因进行分型, 见参考文献[4, 5]。PCR 反应体系为 12 μL , 分别由 6 μL SYBR Green 1 Master Mix (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), 2 μL DNA 模板和 300nmol/L 的各条引物组成。两个位点 PCR 反应程序均为: 94°C 预变性 30s; 94°C 变性 30s, 59°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 40 个循环; 最后 72°C 延伸 30s。扩增循环结束后, 对 PCR 产物进行融解曲线分析: 95°C 30s, 60°C 1min, 95°C 30s。根据定量 PCR 仪的分析软件获得融解曲线分析结果来判定样品的 SNP 类型。

表 1 单核苷酸多态性 G501C 和 3'UTR188C/T 位点的引物序列

引物	序列 (5'→3')
G501C - cF	GCGGGCAGGGCGGCAAGACAAGCACT-TCTCTTGGCTC
G501C - gF	GATTACCGAAGACAAGCACTTCTCTTGGCTG
G501C - R	CAAGACTGGATCTGGCATGGAGAAA GCGGGCAGGGCGGCCTTTATGTCAA-
3'UTR - C/T - cF	CATTTTGTATTCTAGCTAC
3'UTR - C/T - tF	GATTACCGCTTTATGTCAACATTTTGTAT-TCTAGCTAT
3'UTR - C/T - R	AATGCACTTCAGGCTGGCAGGG

3. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 软件包处理数据,计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计数资料以率表示。计量资料组间比较采用 *One-way ANOVA*,计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用 Arlequin 软件 (version 3.5) 检测基因型分布的 *Hardy Weinberg* 遗传平衡情况,见参考文献 [6]。

结 果

1. 各组间临床资料的比较:各组在年龄、体重、

高血压、糖尿病和吸烟史、总胆固醇 (cholesterol totel, TC)、低密度脂蛋白 (low - density lipoprotein, LDL) 等方面均没有统计学差异 ($P > 0.05$)。G501C 位点 CC 组甘油三酯 (glycerin trilaurate, TG) 水平高于 GG 和 GC 组 ($P < 0.05$), 3'UTR 位点 TT 组高密度脂蛋白 (high - density lipoprotein, HDL) 低于 CC 和 CT 组 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 LOX - 1 两个位点各组间临床资料的比较

项目	3'UTR - C/T				G501C			
	CC	CT	TT	<i>P</i>	GG	GC	CC	<i>P</i>
高血压	112/203	74/132	14/19	0.30	135/222	55/113	10/19	0.10
糖尿病	33/203	18/132	4/19	0.64	38/222	15/113	2/19	0.54
吸烟史	73/203	54/132	6/19	5.57	82/222	42/113	9/19	0.66
年龄 (岁)	60.1 ± 8.4	59.3 ± 7.3	64.0 ± 8.0	0.06	60.4 ± 7.8	59.1 ± 8.6	61.5 ± 6.0	0.25
体重 (kg)	65.4 ± 10.9	66.3 ± 9.5	69.9 ± 11.2	0.29	66.1 ± 10.8	65.2 ± 9.5	68.5 ± 10.6	0.51
TC (mmol/L)	4.2 ± 1.1	4.2 ± 1.0	4.2 ± 1.1	0.96	4.2 ± 1.0	4.2 ± 1.1	4.6 ± 1.3	0.30
LDL (mmol/L)	2.4 ± 0.9	2.4 ± 0.9	2.4 ± 1.0	0.97	2.4 ± 0.9	2.4 ± 1.0	2.5 ± 1.1	0.83
HDL (mmol/L)	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.04	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.75
TG (mmol/L)	1.5 ± 1.0	1.6 ± 0.9	1.7 ± 0.9	0.66	1.5 ± 0.9	1.6 ± 1.0	2.1 ± 1.7 *	0.02
CRP (mg/dl)	7.0 ± 13.7	7.4 ± 14.4	6.2 ± 6.1	0.92	6.4 ± 11.7	7.4 ± 13.1	14.3 ± 31.7	0.10

2. LOX - 1 两个位点基因型和等位基因的频率: 3'UTR188 C/T 位点 CC, CT 和 TT 基因型频率分别为 57.3%、37.3% 和 5.4%, G501C 位点 GG、GC 和 CC 基因型频率分别为 62.7%、31.9% 和 5.4% (表 3)。两个位点的基因型分布经 Arlequin 软件 (version 3.5) 检验符合 *Hardy - Weinberg* 平衡, 表明患者来自同一群体。

表 3 LOX - 1 两个位点基因型和等位基因的频率

基因多态性	基因型频率			等位基因频率	
	CC	CT	TT	C	T
3'UTR - C/T					
<i>n</i>	203	132	19	-	-
百分比 (%)	57.3	37.3	5.4	76.0	24.0
G501C					
<i>n</i>	222	113	19	-	-
百分比 (%)	62.7	31.9	5.4	78.7	21.3

3. 各组间 sLOX - 1 水平的比较:两个位点各组间 sLox - 1 的浓度没有显著性差异 ($P > 0.05$) (表 4)。在急性心肌梗死亚组、稳定型心绞痛亚组、不稳定型心绞痛亚组、非冠心病亚组各组间两个位点 sLOX - 1 的浓度亦没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

讨 论

Aoyama 等 [7] 研究了人的 LOX - 1 基因, 发现它是一个单拷贝基因, 位于 12 号染色体短臂的 p12.3 ~ p13.2 区域。有多个研究证实 LOX - 1 基因多态性与冠心病发病风险相关。Chen 等 [8] 对“女性缺血综合征患者评估 (the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE))”的研究样本作了 LOX - 1 基因多态性与冠心病相关性的分析。结果显示在白人女性中, 3'UTR/T 等位基因携带者 (TT + TC 基因型) 频率

表 4 LOX - 1 两个位点各组间 CRP 和 sLOX - 1 浓度的比较 (pg/ml)

组别	3'UTR - C/T				G501C			
	CC	CT	TT	<i>P</i>	GG	GC	CC	<i>P</i>
所有患者	128.9 ± 58.0	132.7 ± 52.0	160.0 ± 56.1	0.07	134.2 ± 58.7	127.2 ± 50.8	134.0 ± 55.2	0.55
AMI 组	129.4 ± 52.6	147.9 ± 43.0	147.2 ± 65.7	0.50	132.6 ± 49.7	149.6 ± 50.7	128.6 ± 57.0	0.58
UAP 组	144.5 ± 68.4	138.0 ± 52.3	193.9 ± 89.0	0.25	150.1 ± 66.0	136.1 ± 59.4	110.3 ± 32.4	0.32
SAP 组	124.6 ± 58.2	135.0 ± 57.5	149.0 ± 48.8	0.57	128.8 ± 60.6	131.0 ± 51.7	120.6 ± 80.9	0.95
NCHD 组	122.9 ± 52.3	122.0 ± 50.3	153.3 ± 40.1	0.26	127.2 ± 53.6	113.1 ± 42.2	153.0 ± 58.8	0.07

在狭窄 < 20% 组, 狭窄介于 20% ~ 50% 之间组, 狭窄 > 50% 组 3 组间逐渐升高 (67.9%、75.0%、79.2%) ($P = 0.013$)。Ohmori 等^[9]检测了 586 名进行冠脉造影的患者 G501C 的基因多态性发现, 按照冠心病严重程度分级, CC + CG 基因型频率分别为: 正常/轻度狭窄 (狭窄 < 25%) 组 49%, 轻度狭窄 (狭窄 26% ~ 50% 之间) 组 41%, 狭窄 > 50% 的 3 个亚组中单支病变组 39%, 2 支病变组 35%, 3 支病变组 32%, 多因素分析显示 CC + CG 基因型频率与狭窄严重程度呈负相关 ($OR = 0.61$; 95% $CI: 0.41 \sim 0.92$)。但也有多个研究得出了不同的结论^[10,11]。

LOX-1 在体内有两种存在方式, 一种是膜结合型, 另一种是经酶切后产生的可溶性形式。Hayashida 等^[12]的研究表明, 急性冠脉综合征患者体内 LOX-1 的可溶性形式 (sLOX-1) 在循环中的浓度明显升高, 且具有良好的敏感度和特异性。其与肌钙蛋白-T 相结合可以增加诊断急性冠脉综合征的敏感度和特异性^[13]。李如意等^[14]的研究提示, 急性冠脉综合征患者 sLOX-1 水平显著高于对照组和稳定型心绞痛组, 经治疗 2 周后显著下降, 但仍高于对照组。

但 LOX-1 基因多态性与 sLOX-1 水平之间的关系尚不明确, 有研究认为不同基因型之间 sLOX-1 水平存在显著性差异。在校正了年龄、性别、种族和 BMI 后, 这种相关性依然存在。但和预计的相反, 他们发现 T 等位基因与低的 sLOX-1 水平相关, 因为在一些研究中, 这个等位基因是和心血管疾病有阳性关联的^[15]。而在笔者的研究中, 这两者不存在相关性, 研究人群之间的差异可能是其中一个原因。曾有研究表明, 中国浙东地区汉族人群中, G501C 基因多态性在冠心病患者组和对照组中的基因型分布和等位基因频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。经过 Meta 分析, 也没有发现 G501C 与 CAD 的关联性, 故 G501C 基因位点多态性可能与 CAD 的发病无相关性^[16]。但是, 多种疾病和药物都可以影响 LOX-1 的表达。在 2 型糖尿病患者中, sLOX-1 水平较对照组升高, 随着血糖控制 sLOX-1 水平下降。还有资料显示肥胖妇女的 sLOX-1 水平升高。用于治疗 2 型糖尿病, 高血压, 高血脂的几种常见药物似乎都可以抑制 LOX-1 的表达。二甲双胍、氯沙坦、辛伐他汀/阿托伐他汀/普伐他汀、阿司匹林治疗都可以抑制 LOX-1 的表达。阿司匹林和普伐他汀联合治疗可以协同的减少血小板 LOX-1 的表达。而在笔者的研究中, 不同基因型组患者之间上述混杂因素没有得

到理想的控制, 并可能因此掩盖了这两者之间的关联。

综上所述, 笔者推测在浙东地区汉族人群中, LOX-1 基因多态性与 sLOX-1 水平之间没有相关性, 但由于样本量较小, 有待更大样本且有效控制疾病状态、药物应用等混杂因素的研究进一步证实。

参考文献

- 1 方全, 宁田海, 张运, 等. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2010, 38(8): 675-687
- 2 陈纪林, 范维琥, 柯元南, 等. 不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(4): 295-304
- 3 马虹, 沈璐华, 高润霖, 等. 慢性稳定型心绞痛诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(3): 195-206
- 4 Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, *et al.* High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers[J]. Biotechniques, 2005, 39(6): 885-893
- 5 袁芳, 徐进, 季林丹, 等. Tm-shift 基因分型方法在遗传学中的应用[J]. 遗传, 2012, 34(11): 1484-1490
- 6 Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Mol Ecol Resour, 2010, 10(3): 564-567
- 7 Aoyama T, Sawamura T, Furutani Y, *et al.* Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene[J]. Biochem J, 1999, 39(Pt 1): 177-184
- 8 Chen Q, Reis SE, Kammerer, *et al.* Genetic variation in lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX1) gene and the risk of coronary artery disease[J]. Circulation, 2003, 107(25): 3146-3151
- 9 Ohmori R, Momiyama Y, Nagano M, *et al.* An oxidized low-density lipoprotein receptor gene variant is inversely associated with the severity of coronary artery disease[J]. Clin Cardiol, 2004, 27(11): 641-644
- 10 Elisabetta T, Michele B, Ugo C, *et al.* On the association of the oxidized LDL receptor 1 (OLR1) gene in patients with acute myocardial infarction or coronary artery disease[J]. European Journal of Human Genetics, 2006, 14(1): 127-130
- 11 Sentinelli F, Filippi E, Fallarino M, *et al.* The 3'-UTR C>T polymorphism of the oxidized LDL-receptor 1 (OLR1) gene does not associate with coronary artery disease in Italian CAD patients or with the severity of coronary disease[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006, 16(5): 345-352
- 12 Hayashida K, Kume N, Murase T, *et al.* Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary syndrome: a novel marker for early diagnosis[J]. Circulation, 2005, 112(6): 812-818
- 13 Kobayashi N, Hata N, Kume N, *et al.* Soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 and high-sensitivity troponin T as diagnostic

(下转第 87 页)