

• 临床检验研究论著 •

性别和检测方法对乙醛脱氢酶 2 基因多态性的影响

卫建筠¹, 徐楹健^{2△}

(1. 广州医学院第一附属医院感染科, 广东广州 510120; 2. 广州医学院第一附属医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:目的 考察性别因素和两种不同检测方法对乙醛脱氢酶 2(ALDH2)基因遗传多态性的影响。方法 应用基因芯片法对 271 例来院就诊患者进行 ALDH2 基因检测,按性别分类进行基因多态性分析;应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析法,对其中 61 例进行检测以比较两种方法的差异。结果 基因芯片法中野生型占 55.0%(149/271),突变型占 45.0%(122/271);男性中 GG 型占 54.5%(91/167),GL 型占 38.3%(64/167),LL 型占 7.2%(12/167);而女性中 GG 型占 55.8%(58/104),GL 型占 35.6%(37/104),LL 型占 8.7%(9/104),在男性和女性中,ALDH2 各基因型的发生率无显著差异;PCR-RFLP 法中 GG 型占 65.6%(40/61),GL 型占 32.8%(20/61),LL 型占 1.6%(1/61),与基因芯片法结果相比各基因型的发生率无显著差异。结论 性别及检测方法(PCR-RFLP 与基因芯片法)对 ALDH2 基因多态性的影响在统计学上无显著差异。

关键词:基因芯片; 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性; 乙醛脱氢酶 2; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1541-02

Effect of gender and detection method on genetic polymorphism of ALDH2

Wei Jianyun¹, Xu Yunjian^{2△}

(1. Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract:Objective To assess the effect of gender and detection method on genetic polymorphism of ALDH2. **Methods** ALDH2 genes in 271 patients were analyzed by gene chip and the genetic polymorphism was classified with different gender. In order to compare the difference of two methods, 61 samples were detected by PCR-RFLP. **Results** In gene chip, 55.0% (149/271) were homozygous for wildtype, 45.0% (122/271) were homozygous for mutants. Among genotyped male subjects, 54.5% (91/167) were ALDH2 GG, 38.3% (64/167) were ALDH2 GL, and 7.2% (12/167) were ALDH2 LL. Among female subjects, 55.8% (58/104) were ALDH2 GG, 35.6% (37/104) were ALDH2 GL, 8.7% (9/104) were ALDH2 LL. There was no significant difference in gender in this study. In PCR-RFLP, 65.6% (40/61) were ALDH2 GG, 32.8% (20/61) were ALDH2 GL and 1.6% (1/61) were ALDH2 LL. No significant difference has been observed on the PCR RFLP when compared with gene chip. **Conclusion** There was no statistical difference in genetic polymorphism of ALDH2 between gender and detection method (gene chip and PCR-RFLP).

Key words: gene chip; RFLP; ALDH2; genetic polymorphism

不同遗传背景对酒精性肝病的发病率有明显影响^[1],乙醛脱氢酶(ALDH)是其中一个易感因素^[2]。ALDH 是由 ALDH2 基因编码,在人群中该基因有 3 种基因型,具有正常催化活性的纯合子型 ALDH2 GG、催化活性下降的杂合子型 ALDH2 GL、催化活性失去的纯合子型 ALDH2 LL。不同基因型与人对乙醇的敏感性、耐受性、酒后反应以及引发疾病密切相关。为考察性别和不同检测方法对 ALDH2 基因多态性的影响,本文用基因芯片法和聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法测定患者的 ALDH2 基因型,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 3~6 月来本院就诊的住院和门诊患者,男性 167 例,年龄 38~86 岁;女性 104 例,年龄 28~77 岁。

1.2 仪器与试剂 基因组提取试剂盒和 ALDH2 基因检测试剂盒(芯片法)购自上海百傲科技有限公司,PCR 反应试剂和限制性内切酶 EcoRI 购自大连宝生物公司,9700 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司,全自动杂交仪和生物芯片识读仪购自上海百傲科技有限公司,超微紫外分光光度计购自美国 Thermo scientific 公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 取患者 EDTA 抗凝全血 200 μ L,按照 DNA 提取试剂盒的流程提取基因组 DNA,紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,DNA 浓度必须达到 10 ng/ μ L 以上,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值应为 1.5~2.0。

1.3.2 基因芯片法的操作方法

1.3.2.1 PCR 扩增的操作 ALDH2 等位基因的反应体系为:基因组 DNA 2 μ L,ALDH2 扩增液 22 μ L,反应液 A 1 μ L,总体积 25 μ L;ALDH2 扩增液中含生物素残基标记的引物对;设置阳性对照和阴性对照,与标本一起扩增。ALDH2 等位基因的扩增条件均为:50 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 25 s,60 $^{\circ}$ C 25 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.2.2 杂交显色的操作 按说明配好预杂交液、杂交反应液(180 μ L 杂交缓冲液+10 μ L ALDH2 扩增产物)、洗液 1、洗液 2、洗液 3、抗体液(碱性磷酸酶标记的亲合素)和显色液(BCIP/NBT)。杂交仓放入预杂交液 43 $^{\circ}$ C,5 min,吸除;再加入杂交反应液,基因芯片放入,43 $^{\circ}$ C,30 min,吸除杂交反应液;加入洗液 1,43 $^{\circ}$ C 6 min,吸除洗液 1,重复 1 次;加入洗液 2,28 $^{\circ}$ C 5 min,吸除洗液 2,重复 1 次;加入抗体液,28 $^{\circ}$ C

20 min,吸除抗体液;加入洗液 2,28 ℃ 5 min,吸除洗液 2,重复 1 次;加入洗液 3,28 ℃ 3 min,吸除洗液 3,重复 1 次;加入显色液,43 ℃ 30 min,吸除显色液;芯片显色区用蒸馏水冲洗烘干。

1.3.2.3 基因芯片扫描与数据分析 将芯片放入芯片识读仪,用百微基因芯片图像分析软件进行图像扫描与数据分析,输出检测结果。

1.3.2.4 每次实验设置阴性对照(空白),阳性对照(ALDH2 LL),跟随标本同时实验。

1.3.3 PCR-RFLP 法的操作方法

1.3.3.1 序列特异性引物的设计与酶切位点的选择 引物的设计参照相关文献^[3]和 Genbank 中的序列,由华大基因公司合成,F:5'-GTT TGG AGC CCA GTA ACC CTT-3';R:5'-CCC ACA CTC ACA GTT TTG AAT T-3',选用 EcoRI 为限制性内切酶。

1.3.3.2 PCR 扩增体系与条件 PCR 体系为 25 μL,包括 DNA 聚合酶系统 Premix Taq 11 μL、引物 1 与引物 2 各 1 μL、DNA 模板 2 μL、H₂O 10 μL。反应参数为:97 ℃ 预变性 5 min,80 ℃ 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 终延伸 7 min。

1.3.3.3 PCR 扩增产物的酶切 酶切反应体系为:PCR 产物 2 μL,EcoRI 限制性内切酶 1 μL,Buffer 2 μL,去离子蒸馏水补体积至 20 μL,37 ℃ 过夜。

1.3.3.4 PAGE 电泳 PCR 产物和限制性内切酶酶切后产物,用 15%聚丙烯酰胺凝胶电泳,EB 染色,紫外灯照射,观察结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 14.0 统计软件完成,采用卡方检验进行统计学分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因芯片法 ALDH2 三种基因型的检出率 167 例男性和 104 例女性患者 ALDH2 的基因多态性结果见表 1。野生型纯合子(GG)占 55.0%,突变型纯合子(LL)占 7.7%,突变型杂合子(GL)占 37.3%。在男性和女性患者中,三种基因型的卡方检验结果均为 $P>0.05$,ALDH2 各基因型的发生率差异无统计学意义。

表 1 ALDH2 的基因多态性分析

基因型	男性		女性		合计	
	<i>n</i>	频率(%)	<i>n</i>	频率(%)	<i>n</i>	频率(%)
GG	91	54.5	58	55.8	149	55.0
GL	64	38.3	37	35.6	101	37.3
LL	12	7.2	9	8.7	21	7.7
合计	167	—	104	—	271	—

—:无数据。

2.2 PCR-RFLP 法测 ALDH2 等位基因和基因型的分型结果 ALDH2 基因 PCR 扩增产物为 108 bp 的 DNA 片段,该产物经 EcoRI 限制性内切酶酶切后,产生 3 种基因型:ALDH2 GG 型,酶切片段长度为 90 bp;ALDH2 GL 型,酶切片段长度为 90 bp、108 bp;ALDH2 LL 型,不被酶切,片段长度为 108 bp。分型结果为野生型纯合子(GG)占 65.6%,突变型纯合子(LL)占 1.6%,突变型杂合子(GL)占 32.8%。

2.3 两种方法对 ALDH2 的基因多态性分析的比较 在 61 例样本中,三种基因型的卡方检验结果均为 $P>0.05$,PCR-

RFLP 与基因芯片法对 ALDH2 基因多态性的影响差异无统计学意义。见表 2。

表 2 两种方法对 ALDH2 的基因多态性分析的比较

基因型	基因芯片法		PCR-RFLP 法	
	<i>n</i>	频率(%)	<i>n</i>	频率(%)
GG	33	54.1	40	65.6
GL	23	37.7	20	32.8
LL	5	8.2	1	1.6
合计	61	—	61	—

—:无数据。

3 讨 论

饮酒后吸收进入体内的乙醇,主要在肝脏进行代谢。乙醇被氧化成乙醛后,其 95%在肝脏变成乙酸,余下 5%在其他组织及血液被代谢掉。乙醇在体内代谢产物乙醛是导致酒精性肝病的主要原因,而体内乙醛转化为乙酸主要依靠 ALDH 同工酶中的 ALDH2,由于 ALDH2 G 的基因序列发生突变形成 ALDH2 L 等位基因,二者随机组合可编码形成 ALDH2 GG、ALDH2 GL 或 ALDH2 LL 3 种基因型。基因型是 ALDH2 GG 的饮酒者,体内把乙醛氧化成乙酸能力很强,对乙醇耐受性高,可以过量饮酒,但应适当节制。基因型是 ALDH2 GL 的饮酒者,血液中乙醛的浓度是前者的 6 倍,对酒有一定的耐受性,可以适量饮酒。基因型是 ALDH2 LL 的饮酒者血液中乙醛的浓度是前者的 19 倍^[4],对酒敏感,没有耐受性,饮酒后很快出现严重不适现象,因而拒酒不再饮。ALDH2 LL 被认为是对过量饮酒的抑制因子。

关于 ALDH2 基因的 2 种等位基因,在不同的地域、民族、人种中的频率是不相同的。非洲的黑人种,欧美的白人种,未发现 ALDH2 LL 等位基因;属于黄种人系的日本大和民族^[5],其 ALDH2 LL 等位基因频率为 0.24~0.25。国内河南省洛阳市汉族样本检测,其 ALDH2 LL 等位基因频率为 0.15^[6]。北京汉族样本该等位基因频率为 0.11^[7],本研究的华南地区汉族样本 LL 等位基因频率为 0.07,均低于洛阳和北京的 ALDH2 LL 等位基因频率,而日本人群的明显高于中国汉族人群。本研究结果提示 ALDH2 各基因型的发生率在男女性别上差异无统计学意义。

本研究中,PCR-RFLP 与基因芯片法对 ALDH2 的基因多态性分析进行比较,结果无统计学差异。ALDH2 基因分型研究现常采用 PCR-RFLP 分析方法。近年迅速发展的基因芯片技术作为基因分型的有效平台,可对基因多态性进行高灵敏度、高通量检测^[8-9]。基因芯片技术是采用原位合成寡核苷酸或直接将基因片段以点样方式有序固化于支持物表面,通过使用特异性引物对扩增待测基因,将带生物素标记的扩增产物与固定在醛基片上的探针进行特异性杂交反应,并进行酶促显色反应,使特异性的杂交信号呈现颜色,经识读仪扫描,软件分析得出基因型结果。此法简便快捷,高效准确,灵敏度高,可重复性好,可为科研及临床应用提供先进平台。

参考文献

- [1] Zintzaras E, Stefanidis I, Santos M, et al. Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease[J]. Hepatology, 2006, 43(2): 352-361.
- [2] 冷爱民, 王德强, 袁伟建. 汉族人群酒精性肝病 ALDH2 和 CYP2E1 基因多态性研究[J]. 重庆医科大学学报(下转第 1544 页)

统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验,组间比较采用 U 检验,相关分析采用直线相关分析。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 COPD 患者的血清 CRP 水平肺动脉高压组与无肺动脉高压组相比有统计学意义($P < 0.05$)。肺动脉高压组患者血清 CRP 水平经对数转换后与 SPAP 呈正相关($r = 0.405, P < 0.05$)。

2.2 COPD 患者肺动脉高压组、无肺动脉高压组动脉血氧分压、二氧化碳分压经统计学检验有显著性差异。肺动脉高压组、无肺动脉高压组患者血清 CRP 水平与动脉血氧分压、二氧化碳分压水平相关性分析, P 值均大于 0.05,无相关性。二组患者动脉血氧分压、二氧化碳分压水平与肺动脉压力水平相关性分析, P 值均大于 0.05,无相关性。

2.3 COPD 患者肺动脉高压组与无肺动脉高压组肺功能检测结果显示,肺动脉高压组患者 FEV1/FVC% 水平低于无肺动脉高压组患者,经统计学检验 U 值为 1.59, $P > 0.05$,差异无统计学意义。肺动脉高压组患者 FEV1/预计值% 水平明显低于无肺动脉高压组患者,经统计学检验 U 值为 2.49, $P < 0.05$,差异有统计学意义。肺动脉高压组患者血清 CRP 水平经对数转换后与 FEV1/预计值% 水平呈负相关($r = -0.713, P < 0.05$)。

3 讨 论

慢性阻塞性肺疾病是一种以炎症为核心的多因素构成的疾病,发病机制复杂,叶胜兰等^[2]研究认为 CRP 与 COPD 的发病机制密切相关,肺血管内皮细胞功能障碍、肺血管重塑是慢性阻塞性肺疾病肺动脉高压的形成机制之一。近期研究发现,炎症因素参与肺动脉高压中的血管损伤^[3],相关实验数据表明炎症蛋白在肺动脉生理及肺动脉压力调节中发挥了重要作用^[4]。

CRP 是一种炎症蛋白,正常情况下由呼吸道上皮细胞、肝细胞分泌,炎症因子刺激、激活肺泡巨噬细胞亦可产生 CRP^[2,5],随炎症因子的增多患者血清 CRP 水平升高。如果炎症持续存在,CRP 水平持续升高^[6]。患者的气道炎症愈重,CRP 升高愈明显,且随着 COPD 严重程度增加,血清 CRP 水平不断增高^[7]。同时 CRP 是反映心血管疾病的独立危险因素^[8],可影响血管内皮细胞功能,导致血管内皮功能障碍及血管重塑、肺动脉高压形成或加重。本组并发肺动脉高压的稳定期 COPD 患者血清 CRP 水平显著高于与无肺动脉高压组,差异有统计学意义。肺动脉高压组患者血清 CRP 水平与 SPAP 呈正相关,提示 CRP 在 COPD 相关性肺动脉高压形成机制中

起重要作用^[3],一定程度反映肺动脉压力水平。

值得注意的是,本组 133 例患者均有直接或间接烟草、烟雾接触史。已有研究^[9]证实吸烟是肺动脉高压的危险因素。烟雾暴露是 COPD 发病及病情加剧、疗效欠佳的重要因素,烟雾刺激可激活炎症细胞因子,启动并加重炎症反应。

肺功能检查对 COPD 的诊断、严重程度判断及疗效评估具有重要意义,本研究以 FEV1/FVC%、FEV1/预计值% 来反映患者肺功能情况,观察到肺动脉高压组患者 FEV1/预计值% 明显低于无肺动脉高压组患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$);肺动脉高压组患者血清 CRP 水平经对数转换后与 FEV1/预计值% 水平呈负相关;提示 CRP 水平与气流受限程度具有相关性,可反映肺功能损伤程度。

综上所述,COPD 是一种慢性气道炎症性疾病,血清 CRP 水平与气道、肺实质及肺血管的慢性炎症密切相关,一定程度反映 COPD 继发肺动脉高压的严重程度,可为 COPD 相关并发病的预防、疗效判断及预后情况提供依据。

参考文献

- [1] 陆慰萱,王辰.肺循环病学[M].北京:人民卫生出版社,2007:275.
- [2] 叶胜兰,李承红.COPD 急性发作期患者血清 IL-2、IL-8、CRP 水平变化与肺功能的相关性分析[J].内科急危重症杂志,2010,16(1):34-35.
- [3] 王同生,毛毅敏,孙玉霞,等.C 反应蛋白和内皮素-1 在慢性阻塞性肺疾病并发肺动脉高压患者中的表达[J].中华结核和呼吸杂志,2011,34(7):545-546.
- [4] 赵宇,超敏 C 反应蛋白在慢性阻塞性肺疾病并发肺动脉高压中的意义[J].实用医技杂志,2008,15(21):2761-2763.
- [5] 易辉,王树立,崔江禹.COPD 患者 C 反应蛋白、TNF- α 、IL-8、IL-6 临床研究[J].现代生物医学进展,2011,11(3):534-537.
- [6] 阳海红,陈建设.PCT 和 CRP 检测对细菌性和病毒性脑膜炎的鉴别诊断[J].实用预防医学,2010,17(1):155-156.
- [7] 王晓青.慢性阻塞性肺疾病患者血清 IL-8、IL-10、 α -HBDH、CRP 及 NO 水平的变化[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(12):1262-1263.
- [8] 何丹,白淑荣.慢性阻塞性肺疾病患者系统性炎症与肺动脉高压的关系研究[J].实用心脑血管病杂志,2010,18(12):1768-1769.
- [9] 钟小宁.对慢性阻塞性肺疾病肺血管改变的几点认识[J].中华结核和呼吸杂志,2011,34(4):248-250.

(收稿日期:2012-11-08)

(上接第 1542 页)

报,2008,33(9):1108-1110.

- [3] 高丽波,钟树荣,贺良峰,等.云南汉族酒精依赖综合征与 ADH2、ALDH2 基因多态性的关联研究[J].医学研究杂志,2010,39(3):35-39.
- [4] Yamamoto K, Ueno Y, Mizoi Y, et al. Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism[J]. Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Ison, 1993, 28(1):13-25.
- [5] Yoshihara E, Ameno K, Nakamura K, et al. The effects of the ALDH2 *1/2, CYP2E1 C1/C2 and C/D genotypes on blood ethanol elimination[J]. Drug Chem Toxicol, 2000, 23(2):371-379.

- [6] 李志祥,谢桂岚. ALDH2 基因第 12 外显子(G/A)多态性在北京汉族人群的检测[J].中国现代医学杂志,2005,15(3):457-458.
- [7] 张竹梅,刘茶珍,边建超,等.洛阳市汉族群体 ADH2 和 ALDH2 的基因多态性研究[J].遗传,2002,24(5):532-536.
- [8] 陈骢,王睿,文思远,等.用基因芯片技术测定健康人群 P450 2C9 基因多态性[J].中国临床药理学杂志,2005,21(3):176-179.
- [9] Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, et al. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 392(6):1093-1108.

(收稿日期:2013-01-12)