

• 短篇论著 •

Nrf2 基因多态性与维吾尔族人群 COPD 的相关性*

李 黎¹, 唐李凤^{2#}, 钟雪梅¹, 任 杰¹, 张素杰², 何川疆¹, 邹小广^{1△}, 许爱敏^{1▲}

1. 新疆维吾尔自治区喀什地区第一人民医院呼吸与危重症医学科, 新疆喀什 844000;

2. 石河子大学, 新疆石河子 832000

摘 要:目的 探讨 Nrf2 基因多态性与维吾尔族慢性阻塞性肺疾病发生、发展的关系。方法 选择 203 例维吾尔族慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者作为病例组,另选取 199 例维吾尔族体检健康者作为对照组。采用 Sequenom-MassARRAY 单核苷酸多态性技术对样本在 Nrf2 基因启动子区域中的两个位点(rs35652124、rs6721961)进行基因型鉴定,并分析不同基因型与 COPD 的相关性。结果 多因素 Logistic 回归分析结果显示 rs35652124(C/T)、rs6721961(G/T)位点的基因型和等位基因与 COPD 的关系差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 Nrf2 启动子区域基因位点 rs35652124、rs6721961 单核苷酸多态性均与维吾尔族人群 COPD 不相关。

关键词:Nrf2; 基因多态性; 维吾尔族; 慢性阻塞性肺疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.10.025

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2021)10-1263-03

文献标志码:A

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种可防、可治的常见病^[1]。我国 COPD 的疾病负担重,患病率呈逐年上升趋势^[2]。COPD 病因和发病机制复杂,受环境和遗传因素共同影响^[3]。目前,研究结果表明 COPD 的分子发病机制主要是气道炎性反应,且氧化应激可促使炎症反应相关基因表达^[4]。Nrf2 的激活是机体抵抗氧化应激的关键,它可调节多个抗氧化酶来保护细胞免受氧化损伤^[5]。近年来研究发现,Nrf2 启动子区域的多态性与 COPD 易感性有关,围绕 Nrf2 遗传变异的研究可能开辟未来治疗 COPD 的重要途径^[6],然而,关于 Nrf2 基因多态性与维吾尔族人群 COPD 的相关性研究报道较少。本研究旨在评估 Nrf2 基因位点 rs35652124、rs6721961 单核苷酸多态性(SNP)与维吾尔族人群 COPD 易感性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 9 月至 2019 年 9 月在新疆维吾尔自治区喀什地区第一人民医院接受治疗的 203 例 COPD 患者作为病例组,COPD 的诊断符合《慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗与预防全球倡议》(GOLD)标准^[1]。同期选择新疆维吾尔自治区喀什地区第一人民医院 199 例维吾尔族体检健康者作为对照组,均满足以下条件:(1)胸部 CT 检查结果显示无器质性病变;(2)肺功能正常,第 1 秒用力呼气容积占预计值百分比(FEV1% Pred) $>80\%$,吸入 400 μg 沙丁胺醇 30 min 后第 1 秒用力呼气容积与用力肺活量比(FEV1/FVC) $>70\%$ 。所有研究对象均符合以下标准:(1)排除与氧化应激有关的疾病,如支气管扩张、肺结核、肺间质纤维化、结节病、支气管哮喘、糖尿病、心脏病等;(2)排除有各系统肿瘤病史;(3)均为维

吾尔族,至少 3 代长期居住于喀什地区,各研究对象之间无任何血缘关系,且无外族通婚史。本研究通过新疆维吾尔自治区喀什地区第一人民医院伦理委员会审核批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采集所有研究对象清晨空腹外周静脉血,使用 Greiner 基因组 DNA 提取试剂盒(德国, Greiner)按照说明书步骤从全血标本中提取 DNA。

1.2.2 SNP 选择 使用 Sequenom 公司 Genotyping Tools 及 MassARRAY Assay Design 软件设计待测 SNP 位点的 PCR 扩增引物及单碱基延伸引物,并送至中国上海天昊生物技术有限公司进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。

1.2.3 基因检测 采用多重 PCR 技术,在以下反应条件下扩增所选位点的基因序列:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,循环 40 次,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min;然后将扩增产物用虾碱性磷酸酶处理以除去反应中的 dNTPs,再经过单碱基延伸引物(约 20 bp)扩增 SNP 位点及树脂纯化,最后采用 Sequenom-MassARRAY SNP 技术进行 SNP 分型检测^[7]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理及统计分析,采用 Hardy-Weinberg 平衡定律检验样本的群体代表性。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用多因素 Logistic 回归分析法校正性别、年龄、体质指数(BMI)、吸烟指数(SI)等混杂因素,评估 Nrf2 基因

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2017D01C009)。

共同第一作者。△ 通信作者,E-mail:Zoungx2020@163.com。▲ 共同通信作者,E-mail:519202069@qq.com。

本文引用格式:李黎,唐李凤,钟雪梅,等. Nrf2 基因多态性与维吾尔族人群 COPD 的相关性[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(10):1263-1265.

rs6721961、rs35652124 位点 SNP 与 COPD 的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 Nrf2 基因多态性位点引物序列

SNP 基因位点	引物序列	熔解温度(℃)
Nrf2 rs35652124	上游引物:TTGGTGGAAGAGGTTCTC	57.6
	下游引物:AAGAGTTGTTTGCGAAGGTC	57.0
Nrf2 rs6721961	上游引物:GCTTTGGTGGAAGAGGTT	59.1
	下游引物:AGTTCGGACGCTTTGAAAC	57.9

2 结 果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验 分别对两组研究对象中所检测到的 Nrf2 基因多态性位点(rs6721961、rs35652124)的基因型分布频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果显示这两个位点的基因分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($P>0.05$),具有群体代表性。

2.2 病例组与对照组基线资料比较 病例组与对照

组在性别、BMI、吸烟、动物粉尘暴露方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组间年龄、SI、FEV1%Pred、用力肺活量占预计值百分比(FVC%Pred)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 两组 Nrf2 基因多态位点的基因型及等位基因分布频率比较 病例组与对照组 rs6721961(G/T)、rs35652124(C/T)的基因型和等位基因分布频率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 两组的基线资料比较

组别	<i>n</i>	性别 [<i>n</i> (%)]	年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)	BMI ($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	吸烟 [<i>n</i> (%)]	SI>400 [<i>n</i> (%)]	动物粉尘暴露 [#] [<i>n</i> (%)]	FEV1%Pred ($\bar{x}\pm s$)	FVC%Pred ($\bar{x}\pm s$)
对照组	199	89(44.7)	55.4±11.1	25.3±4.2	28(14.1)	3(1.5)	72(36.2)	80.18±19.7	83.6±21.0
病例组	203	99(48.8)	65.0±9.2	25.6±4.8	32(15.8)	17(8.4)	78(38.4)	71.4±16.1	73.6±20.2
χ^2/t		0.660	0.898	9.436	0.584	5.351	0.216	4.878	4.851
<i>P</i>		0.416	<0.001	0.560	0.634	0.021	0.642	<0.001	<0.001

注: [#] 鸽子;SI=每天吸烟支数×吸烟年数。

表 3 两组 Nrf2 基因多态位点的基因型和等位基因分布频率比较[*n*(%)]

基因位点	<i>n</i>	rs35652124				
		CC	TC	TT	C	T
对照组	199	41(20.6)	111(55.8)	47(23.6)	193(48.5)	205(51.5)
病例组	203	40(19.7)	102(50.2)	61(30.1)	182(44.8)	224(55.2)
χ^2		—	0.053	0.937	—	1.085
OR(95%CI)		—	0.942(0.565~1.571)	1.330(0.746~2.372)	—	1.159(0.878~1.529)
<i>P</i>		—	0.819	0.333	—	0.298

基因位点	<i>n</i>	rs6721961				
		GG	GT	TT	G	T
对照组	199	105(52.8)	86(43.2)	8(4.0)	296(74.4)	102(25.6)
病例组	203	124(61.1)	71(35.0)	8(3.9)	319(78.6)	87(21.4)
χ^2		—	2.968	0.104	—	1.971
OR(95%CI)		—	0.699(0.465~1.051)	0.847(0.307~2.334)	—	0.791(0.571~1.097)
<i>P</i>		—	0.085	0.748	—	0.160

注:—为无数据。

2.4 多因素 Logistic 回归分析 在校正性别、年龄、吸烟等混杂因素后,结果显示 rs35652124、rs6721961 位点的基因型和等位基因分布频率与 COPD 的关系差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 多因素 Logistic 回归分析

变量	rs35652124 OR(95%CI)	rs6721961 OR(95%CI)
$\beta_{\text{性别}}$	0.871(0.554~1.369)	0.885(0.564~1.390)
$\beta_{\text{年龄}}$	1.095(1.070~1.119)*	1.092(1.068~1.117)*
β_{BMI}	1.019(0.969~1.071)	1.018(0.969~1.070)
$\beta_{\text{SI>400}}$	5.974(1.583~22.548)	6.298(1.659~23.911)

续表 4 多因素 Logistic 回归分析

变量	rs35652124 OR(95%CI)	rs6721961 OR(95%CI)
$\beta_{\text{动物粉尘暴露}}$	1.096(0.694~1.730)	1.085(0.687~1.715)
β_{CC}	1.311(0.729~2.357)	—
β_{TC}	1.697(0.880~3.273)	—
β_{C}	1.276(0.934~1.745)	—
β_{GG}	—	0.902(0.568~1.433)
β_{GT}	—	1.330(0.420~4.207)
β_{G}	—	0.988(0.684~1.428)

注:与对照组比较,* $P<0.05$;—为无数据。

3 讨 论

氧化应激损伤和抗氧化防御机制在 COPD 的发生、发展中起着重要作用, Nrf2 是维持肺组织增生和存活最重要的抗氧化分子之一^[8]。在氧化应激状态下, 位于细胞质的 Nrf2 分子转移至细胞核内与抗氧化反应元件(ARE)结合, 促进抗氧化剂基因表达^[9], 进而发挥稳定抗氧化作用。近年来研究发现, Nrf2 表达下调可能是 COPD 发病的重要原因之一, 激活 Nrf2 表达可能是未来治疗 COPD 的重要途径^[10]。

SNP 是人类遗传变异最常见的来源, 当关键区域突变时可能会影响基因功能。近年来, 国内外已开展多项关于 Nrf2 启动子区域 SNP 与 COPD 易感性的研究。例如, 美国学者研究发现, Nrf2 启动子区域的 rs6721961(C/C)与极低出生体质量(VLBW)新生儿重度支气管肺发育不良(BPD)风险降低有关^[11], 而事实上幼年时期肺发育不良是 COPD 的重要危险因素之一^[12]。此前, 国内针对内蒙古地区蒙古族人群的研究发现, rs6721961 位点与 COPD 遗传易感性不相关^[13]。但周小果^[14]的研究却发现, rs6721961(C/A)的 A 等位基因频率是我国汉族 COPD 的危险因素。此外, Nrf2 启动子区域的 rs35652124 位点也显示出与氧化应激性疾病风险的相关性, 俄罗斯最近的一项研究发现, rs35652124 位点 SNP 是吸烟人群 COPD 的危险因素, 该位点 AA 基因型与 FEV1 明显相关^[15]。有趣的是, 本研究证实 Nrf2 启动子区基因位点 rs35652124(C/T)、rs6721961(G/T)SNP 与 COPD 的关系差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究强调了不同人群 COPD 易感性的遗传异质性。

本研究是首次在维吾尔族人群中进行 Nrf2 基因多态性与 COPD 相关性的研究, 由于样本地理来源的局限性, 研究结果仅表明这两个基因位点在喀什地区维吾尔族人群中存在差异。但由于本研究样本有限, 结果可能存在偏差。鉴于本研究得到的阴性结果, 未来的研究将增加样本量以充分了解更多的遗传异质性。

综上所述, 本研究显示 Nrf2 启动子区基因位点 rs35652124 和 rs6721961SNP 与维吾尔族人群 COPD 发病无关, 表明遗传与环境等因素共同影响着 COPD 的发生、发展, 基因多态性与疾病的相关性因地域或种族不同而存在一定差异, 有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] CLAUS F, VOGELMEIER, GERARD J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report[J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53(3):128-149.
- [2] WANG C, XU J, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China

(the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study[J]. Lancet, 2018, 391(10131):1706-1717.

- [3] PÉREZ-RUBIO G, CORDOBA-LANUS E, CUPERTINO P, et al. Role of genetic susceptibility in nicotine addiction and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Rev Invest Clin, 2019, 71(1):36-54.
- [4] WANG Y, XU J, MENG Y, et al. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13:3341-3348.
- [5] ZHAO H, EGUCHI S, ALAM A, et al. The role of nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 312(2):L155-162.
- [6] CHO H Y, MARZEC J, KLEEGERGER S R. Functional polymorphisms in Nrf2: implications for human disease[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(Pt B):362-372.
- [7] LI L, CHAO W, WANG H Z, et al. Study of IL-4 and IFN- γ gene single nucleotide polymorphism in uygur patients with pigeon breeder's lung[J]. Prog Med Biol, 2015, 15:45-66.
- [8] MIZUMURA K, MARUOKA S, SHIMIZU T, et al. Role of Nrf2 in the pathogenesis of respiratory diseases[J]. Respir Investig, 2020, 58(1):28-35.
- [9] ABED D A, GOLDSTEIN M, ALBANYAN H, et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents[J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(4):285-99.
- [10] YAMADA K, ASAI K, NAGAYASU F, et al. Impaired nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression increases apoptosis of airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease due to cigarette smoking[J]. BMC Pulm Med, 2016, 16:27.
- [11] SAMPATH V, GARLAND J S, HELBLING D, et al. Antioxidant response genes sequence variants and BPD susceptibility in VLBW infants[J]. Pediatr Res, 2015, 77(3):477-483.
- [12] LANGE P, CELLI B, AGUSTI A, et al. Lung-function trajectories leading to chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2015, 373(2):111-122.
- [13] 丁明静. NRF2、HMOX1 基因多态性与内蒙古地区蒙古族人群慢性阻塞性肺疾病关联性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
- [14] 周小果. Nrf2 基因多态性与 COPD 的相关性及噻托溴铵粉雾剂联合布地奈德/福莫特罗的干预效果[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(15):2448-2452.
- [15] KORYTINA G F, AKHMADISHINA L Z, AZNABAEVA Y G, et al. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Gene, 2019, 692:102-112.