

# GSTM1、GSTT1 基因多态性与新疆维吾尔族慢性阻塞性肺疾病易感性的关系

王妨娥<sup>1</sup>, 凌敏<sup>2</sup>, 白杰<sup>3</sup>, 苟安栓<sup>2</sup>, 钱建辉<sup>1</sup>, 赵宗峰<sup>4</sup>

**摘要** 目的 探讨谷胱甘肽 S 转移酶 M1、T1 (GSTM1、GSTT1) 基因多态性与新疆维吾尔族慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 易感性的关系。方法 通过多重聚合酶链反应 (PCR) 法检测新疆维吾尔族 80 例 COPD 患者和 80 例健康对照者 GSTM1、GSTT1 的基因型, 应用 SPSS 17.0 软件分析 GSTM1、GSTT1 基因多态性与 COPD 易感性的关系; 并与其他种族的基因型分布进行比较。结果 COPD 组 GSTM1、GSTT1 纯合缺失基因型频率均高于对照组的频率 ( $P = 0.015$ ,  $P = 0.010$ ); GSTM1 和 GSTT1 基因均为纯合缺失型的基因频率在 COPD 组与对照组的差异有统计学意义 ( $P = 0.002$ )。以研究对象是否患 COPD 为因变量经 Logistic 回归分析 (协变量包括年龄、性别、吸烟史、GSTM1 及 GSTT1 基因型), 经调整年龄、性别和吸烟史后, 发现 GSTM1 和 GSTT1 基因单独纯合缺失型均是 COPD 的危险因素 ( $OR = 2.22$ , 95% *CI*: 1.16 ~ 4.25,  $P = 0.016$ ;  $OR = 2.47$ , 95% *CI*: 1.23 ~ 4.97,  $P = 0.011$ ), GSTM1 和 GSTT1 同时为纯合缺失型也是 COPD 的危险因素 ( $OR = 4.67$ , 95% *CI*: 1.65 ~ 13.14,  $P = 0.004$ )。结论 维吾尔族人群中 GSTM1 纯合缺失型和 GSTT1 纯合缺失型均与 COPD 易感性相关。

**关键词** 慢性阻塞性肺疾病; 多态性; 谷胱甘肽 S 转移酶 M1; 谷胱甘肽 S 转移酶 T1

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0370-04

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的特征为不完全可逆的气流受限, 气流受限通常是与肺部异常炎症反应的有害颗粒或气体有关<sup>[1]</sup>。Thakur et al<sup>[2]</sup> 研究报告已经证实蛋白酶-抗蛋白酶和氧化酶-抗氧化酶的失衡是导

致 COPD 的主要因素。氧化酶-抗氧化酶失衡导致的氧化应激可以损害气道上皮组织和肺间质, 增强炎症反应, 使促炎症细胞因子基因上调, 进而影响 COPD 的发生和发展。谷胱甘肽 S 转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 作为其中的抗氧化酶在肺部起着保护作用, 可以催化各种与还原型谷胱甘肽共轭的电化合物。因此, COPD 的发展机制中可能不仅仅包括蛋白酶-抗蛋白酶失衡, 也有氧化酶-抗氧化酶失衡的参与。很多研究<sup>[3-6]</sup> 表明, COPD 与 GSTs 的相关性存在民族和地域的差异。由于地理位置特殊, 冬季漫长, 气候寒冷, COPD 是新疆地区常见的呼吸系统疾病。凌敏等<sup>[7]</sup> 对新疆农村地区 COPD 危险因素调查后发现, 维吾尔族和哈萨克族人群中 COPD 患病率较高。鉴于 GSTM1、GSTT1 基因多态性的分布在不同民族及地区间存在较大差异, 且与新疆维吾尔族 COPD 的相关性研究未见相关报道, 因此, 该研究对 GSTM1、GSTT1 基因多态性与新疆维吾尔族 COPD 易感性的关系进行了研究, 并与其他种族进行对比。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选择 2011 年 8 月 ~ 2013 年 8 月在新疆维吾尔自治区人民医院呼吸科住院治疗的新疆维吾尔族 COPD 患者 80 例 (COPD 组), 均符合《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》标准<sup>[1]</sup>, 选择年龄、性别匹配的本院健康体检者 80 例为对照组, 且肺功能符合以下指标: 第一秒用力呼气容积/用力肺活量 ( $FEV_1/FVC$ )  $> 70\%$ ,  $FEV_1 \geq 80\%$  预计值, 两组均排除支气管扩张、支气管哮喘、肺部肿块、结核性胸膜炎、胸廓畸形、肺间质纤维化等呼吸系统疾病及其他感染性疾病、外伤及自身免疫性疾病。两组年龄及性别均无显著差异, 具有可比性。两组均为无民族间遗传干扰 (与其他民族人无通婚情况)、无血缘关系的连续两代及以上长期居住于新疆的维吾尔族人群, 所有受试者均签署书面的志愿书, 该研究经新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂** 全血基因组 DNA 快速提取试剂盒

2013-09-07 接收

基金项目: 中华医学会慢性呼吸道疾病专项基金 (2007 年) (编号: 07010160024)

作者单位: <sup>1</sup>新疆石河子大学医学院, 石河子 832002

新疆维吾尔自治区人民医院<sup>2</sup> 呼吸二科、<sup>4</sup> 科研教育中心, 乌鲁木齐 830001

<sup>3</sup> 河南农业科学院, 郑州 450002

作者简介: 王妨娥, 女, 硕士研究生;

凌敏, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lingmin1121@163.com

(离心柱型), GSTM1、GSTT1 及白蛋白 3 对引物合成、Taq 酶、 $10 \times$  Buffer、dNTP、ddH<sub>2</sub>O 均购于北京鼎国生物科技有限公司, DNA Marker 购于 BBI 公司, DMSO 购于美国 Sigma 公司, 其他均为分子生物学常规试剂。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 标本采集** 在清晨空腹时采集研究对象的静脉血 2 ml, EDTA 抗凝, 将抗凝管上下轻轻颠倒 8 ~ 10 次, 使血液与抗凝剂充分混合,  $-20^{\circ}\text{C}$  低温保存。

**1.3.2 基因组 DNA 提取** 利用全血基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型), 按照厂家提供的说明书方法提取全血基因组 DNA。提取的 DNA 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.3.3 多重 PCR 法检测 GSTM1 和 GSTT1 基因多态性** 依据文献合成 GSTM1、GSTT1 及白蛋白 3 对引物<sup>[6]</sup>, 其中白蛋白为阳性内对照。3 对引物序列如下, GSTM1 上游引物: 5'-GAACTCCCTGAAAAGC TAAAGC-3', 下游引物: 5'-GTTGGGCTCAAATATAC GGTGG-3'; GSTT1 上游引物: 5'-TTCCTTACTGGTCC TCACATCTC-3', 下游引物: 5'-TCACCCGGATCATGG CCAGCA-3'; 白蛋白上游引物: 5'-GCCCTCTGCTAA CAAGTCCTAC-3', 下游引物: 5'-GCCCTAAAAAGA AAATCGCCAATC-3'。PCR 扩增反应体系(20  $\mu\text{l}$ ):  $10 \times$  Tap Buffer 2  $\mu\text{l}$ , 10 mmol/L dNTP 混合物 2  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  3 对上、下游引物各 0.5  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 5 U, 50 ng/ $\mu\text{l}$  人基因组 DNA 1  $\mu\text{l}$ , DMSO 1  $\mu\text{l}$ , 超纯水补足 20  $\mu\text{l}$ ; PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 接着进行扩增, 包括  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 共 35 个循环; 然后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 最后  $4^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 采用凝胶成像系统观察并判别基因型。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示; 年龄、吸烟指数(用年吸烟包数表示: 平均每天吸烟支数  $\times$  吸烟年数/20), 均数比较采用两独立样本  $t$  检验, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验; 各组间基因型和等位基因频率的比较以及 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律的吻合度采用  $\chi^2$  检验; 多因素调整采用 Logistic 回归分析, 计算比值比(odds ratios, OR) 和 95% 可信区间(confidence intervals, CI) 用来检测 GSTM1、GSTT1 与 COPD 的相关性。所有统计均为双侧, 显著性检验水准取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 一般资料的比较** 两组资料在性别(男:女比例为 44:36 和 41:39) 和年龄(平均年龄  $54.4 \pm 15.2$  和  $54.5 \pm 12.0$ ) 方面差异无统计学意义, 两组间吸烟指数差异均无统计学意义, 两组间 FEV<sub>1</sub> 预计值及 FEV<sub>1</sub>/FVC 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 GSTM1、GSTT1 基因纯合缺失的检测结果** 所有样本均能在 350 bp 处扩增出阳性内对照白蛋白目的条带, 480 bp 处出现一条带为 GSTM1 纯合缺失型; 215 bp 处出现一条带即为 GSTT1 纯合缺失型; 只出现一条白蛋白对照条带为 GSTM1、GSTT1 同时为纯合缺失型; 在 480 bp 和 215 bp 出现两条带为 GSTM1、GSTT1 非纯合缺失型, 见图 1。

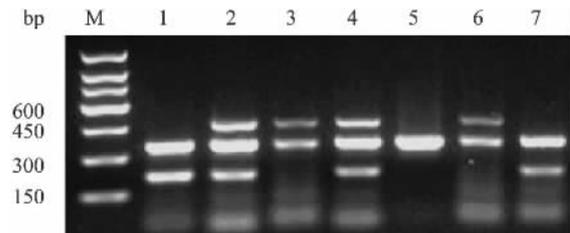


图1 GSTM1、GSTT1 基因多重 PCR 分析结果

M: Marker; 1,7: GSTM1/GSTT1 均为非纯合缺失型; 2,4: GSTM1 纯合缺失型; 3: GSTM1/GSTT1 同时为纯合缺失型; 5,6: GSTT1 纯合缺失型

**2.3 GSTM1、GSTT1 基因型在 COPD 组和对照组之间的分布差异** 如表 1 所示新疆维吾尔族 COPD 组 GSTM1 纯合缺失型基因型频率(70.0%) 高于对照组的频率(51.3%) ( $P = 0.015$ ); GSTT1 基因纯合缺失型频率在 COPD 组(40.0%) 与对照组(21.3%) 比较差异有统计学意义( $P = 0.01$ ); GSTM1、GSTT1 基因纯合缺失型的基因频率在 COPD 组与对照组的差异有统计学意义( $P = 0.002$ )。以研究对象是否患 COPD 为因变量经 Logistic 回归分析(协变量包括年龄、性别、吸烟史、GSTM1 及 GSTT1 基因型), 经调整年龄、性别和吸烟史后, 发现 GSTM1 基因纯合缺失型则为 COPD 的危险因素( $OR = 2.22$ , 95% CI: 1.16 ~ 4.25,  $P = 0.016$ ); GSTT1 基因纯合缺失型为 COPD 的危险因素( $OR = 2.47$ , 95% CI: 1.23 ~ 4.97,  $P = 0.011$ ), GSTM1、GSTT1 同时为纯合缺失型则为 COPD 的危险因素( $OR = 4.67$ , 95% CI: 1.65 ~ 13.14,  $P = 0.004$ )。

表1 GSTM1、GSTT1 基因型在 COPD 组和对照组之间的分布差异 [n = 80 n(%) ]

组别	GSTM1 纯合	GSTT1 纯合	GSTM1、GSTT1
	缺失型	缺失型	同时为纯合缺失型
COPD	56(70.0)	32(40.0)	19(23.8)
对照	41(51.3)	17(21.3)	5(6.3)

2.4 比较不同种族 COPD 组和对照组 GSTM1、GSTT1 基因型分布 由表2可见,GSTM1 纯合缺失型在哈萨克族、维吾尔族、北印度人和突尼斯人群中 COPD 组及对照组之间差异有统计学意义 (P < 0.05); GSTT1 纯合缺失型、GSTM1、GSTT1 同时纯合缺失型在维吾尔族人群中差异有统计学意义 (P < 0.05); 而汉族人群中 3 种基因型在 COPD 组和对照组中差异均无统计学意义。

表2 两组 GSTM1、GSTT1 基因型分布 [n(%) ]

种族	组别	n	GSTM1、GSTT1 基因型分布频率		
			GSTM1 纯合 缺失型	GSTT1 纯合 缺失型	GSTM1、GSTT1 同时 纯合缺失型
哈萨克族 <sup>[4]</sup>	COPD	150	94(62.7)*	55(36.7)	34(22.7)
	对照	150	76(50.7)	41(27.3)	29(19.3)
维吾尔族	COPD	80	56(70.0)*	32(40.0)*	19(23.8)*
	对照	80	41(51.3)	17(21.3)	5(6.3)
汉族 <sup>[9]</sup>	COPD	146	86(58.9)	66(45.2)	40(27.4)
	对照	109	57(52.3)	49(45.0)	21(19.3)
北印度人群 <sup>[2]</sup>	COPD	204	78(38.2)*	51(25.0)	-
	对照	208	124(59.6)	36(17.3)	-
突尼斯人群 <sup>[13]</sup>	COPD	234	153(65.38)*	74(31.62)	53(22.64)
	对照	182	99(54.39)	53(29.12)	34(18.68)

与对照组比较: \* P < 0.05

### 3 讨论

COPD 是多基因参与的复杂疾病,多个基因的多态性在 COPD 的易感性方面可能相互作用。氧化-抗氧化失衡是机体患 COPD 的一个主要发病机制,而抗氧化酶在其中起着重要作用。GSTs 是一个超家族的酶系,参与许多亲电子致癌物的解毒过程,在很多外源性化合物和药物的解毒过程起着重要的作用<sup>[1]</sup>,从而起着保护肺组织的作用。

本研究首次分析了新疆维吾尔族人群 GSTM1、GSTT1 与 COPD 易感性的关系。提示 GSTM1、GSTT1 基因与新疆维吾尔族人群的 COPD 有显著的相关性。对照组与 COPD 组对比结果提示 GSTM1 纯合缺失型、GSTT1 纯合缺失型、GSTM1、GSTT1 同时为纯合缺失型时是 COPD 的危险因素,在除去

COPD 的主要危险因素后,两组间的差异仍有统计学意义。因此,GSTM1 纯合缺失型、GSTT1 纯合缺失型是 COPD 的独立危险因素。

本研究结果提示 GSTM1 纯合缺失型、GSTT1 纯合缺失型可能和 COPD 易感性相关。Shuk et al<sup>[4]</sup>在北印度人群中研究表明:GSTM1 纯合缺失型基因为 COPD 的独立危险因素。马志明等<sup>[8]</sup>对中国汉族人群研究发现 GSTM1 纯合缺失基因型可能增加了长期大量吸烟人群对 COPD 的易感性,若同时伴有 GSTT1 的纯合缺失型基因可进一步增加对 COPD 的易感性。Smolonska et al<sup>[9]</sup>在亚洲人群中采用 Meta 分析时发现 GSTM1 基因纯合缺失型为 COPD 的独立危险因素,但进行分层分析后发现 GSTM1 基因纯合缺失型可能不是 COPD 的独立危险因素。此前,杨瑞红等<sup>[10]</sup>研究报道,GSTM1、GSTT1 基因多态性与汉族人群 COPD 易感性没有相关性,未发现两个基因之间有明显的协同作用。Lakhdar et al<sup>[5]</sup>没有发现 GSTM1 基因多态性和突尼西亚人群 COPD 有独立相关性。本课题组的前期研究<sup>[6]</sup>中也没有发现 GSTM1 基因多态性与新疆哈萨克族人群的 COPD 有独立相关性。这说明 GSTM1、GSTT1 基因在不同人群中的作用机制或对 COPD 的影响不同,可能与种族、地域等差异有关。这些研究结果提示,各地区各民族之间 GSTM1、GSTT1 基因分布确实存在差异。这可能是一些相关疾病在不同种族、不同区域间具有的不同发病率和临床特点的主要原因。

有研究<sup>[10]</sup>显示,携带 GSTT1 基因纯合缺失型的人群比携带 GSTT1 非纯合缺失型可能更容易导致具有遗传毒性和肺部疾病,这可能与 GSTT1 在肺部没有表达有关。近年来研究<sup>[11-13]</sup>证明 COPD 发生、发展过程中存在全身炎症反应和全身性氧化应激反应。GSTT1 可能通过参与拮抗全身性氧化应激的过程,起到一定的抗氧化作用。有研究<sup>[14]</sup>报道 GSTM1 基因纯合缺失型及其他参与抗氧化过程基因的变异(例如 GSTP1 和环氧化物水解酶)是 COPD 的危险因素。因此,在今后的研究中,需扩大样本量及增加其它参与氧化-抗氧化酶的研究(例如 GSTP1 或环氧化物水解酶等),以寻找出效度较高的 COPD 易感性遗传标记,以期为 COPD 防治提供新思路、新策略。

### 参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞

- 性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志 2013 36(4): 1-10.
- [2] Thakur H, Gupta L, Sobti R C, et al. Association of GSTM1, T1 genes with COPD and prostate cancer in north Indian population [J]. *Mol Biol Rep* 2011 38(3): 1733-9.
- [3] Xue H, Su J, Sun K, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism and COPD risk in smokers: an updated analysis [J]. *Mol Biol Rep* 2012 39(4): 5033-42.
- [4] Shuk R K, Kant S, Bhattacharya S, et al. Association of genetic polymorphism of GSTT1, GSTM1 and GSTM3 in COPD patients in a north Indian population [J]. *COPD* 2011 8(3): 167-72.
- [5] Lakhdar R, Denden S, Knani J, et al. Association of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in a tunisian population [J]. *Biochem Genet* 2010 48: 647-57.
- [6] 安海燕, 凌敏, 苟安栓, 等. 谷胱甘肽 S-转移酶 M1、T1 基因多态性与新疆哈萨克族慢性阻塞性肺疾病易感性的关系 [J]. 中华结核和呼吸杂志 2012 35(6): 451-2.
- [7] 凌敏, 荣艳, 苟安栓, 等. 新疆农村地区慢性阻塞性肺疾病危险因素调查 [J]. 中华结核和呼吸杂志 2011 34(9): 666-9.
- [8] 马志明, 张珍祥, 韩泽民, 等. GSTM1 和 GSTT1 基因多态性与 COPD 易感性的研究 [J]. 中国医师杂志 2004 6(6): 721-4.
- [9] Smolonska J, Wijmenga C, Postma D S, et al. Meta-analyses on suspected chronic obstructive pulmonary disease genes: a summary of 20 year's research [J]. *Am J Respir Crit Care* 2009 180(7): 618-31.
- [10] 杨瑞红, 何权瀛, 卢冰冰, 等. 谷胱甘肽 S-转移酶 M1、T1 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病易感性关系的研究 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志 2004 3(2): 79-82.
- [11] Cantlay A M, Smith C A, Wallace W A, et al. Heterogenous expression and polymorphic genotype of glutathione S transferases in human lung [J]. *Thorax* 1994, 49(10): 1010-4.
- [12] Noguera A, Busquets X, Sauleda J, et al. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158(5 Pt1): 1664-8.
- [13] Rahman I, Morrison D, Donaldson K, et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 154(4 Pt1): 1055-60.
- [14] Lakhdar R, Denden S, Mouhamed M H, et al. Correlation of EPHX1, GSTP1, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms with anti oxidative stress markers in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Exp Lung Res* 2011 37(4): 195-204.

## Association of genetic polymorphism GSTM1 and GSTT1 with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Xinjiang Uighur population

Wang Fang'e<sup>1</sup>, Ling Min<sup>2</sup>, Bai Jie<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002; <sup>2</sup>Dept of Respiratory Medicine, People's Hospital of Xinjiang, Urumqi 830001; <sup>3</sup>Henan Academy of Agricultural Science Zhengzhou 450002)

**Abstract Objective** To investigate the association of genetic polymorphism GSTM1 and GSTT1 with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Xinjiang Uighur population. **Methods** The genotypes of GSTM1 and GSTT1 were determined by multiplex polymerase chain reaction (mPCR) in patients with COPD (COPD group) and healthy control group, and analyzed its susceptibility. **Results** The frequencies of GSTM1 null genotype, GSTT1 null genotype, GSTM1 and GSTT1 homozygous null genotype were significantly higher than that of the control one, respectively. There were significant differences of genetic polymorphism GSTM1 and GSTT1 between the two groups. After adjustment for sex, age, smoking history, the GSTM1 and GSTT1 gene homozygous deletion alone were risk factors for COPD ( $OR = 2.22$ , 95%  $CI: 1.16 \sim 4.25$ ,  $P = 0.016$ ;  $OR = 2.47$ , 95%  $CI: 1.23 \sim 4.97$ ,  $P = 0.011$ ), GSTM1 and GSTT1 at the same time as a risk factor for homozygous deletion type was COPD. **Conclusion** Our results suggest that there are associations of genetic polymorphism of neither GSTM1 nor GSTT1 with susceptibility to COPD.

**Key words** chronic obstructive pulmonary disease; polymorphisms; glutathione S-transferase M1; glutathione S-transferase T1