

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.31.006

ADAM33 基因 S1、S2 位点多态性与新疆维吾尔族 COPD 的相关性^{*}

王 菲,胡 昕[△],齐曼古力·吾守尔,孙 慧,王 晶
(新疆医科大学第一附属医院呼吸科,乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 探讨新疆维吾尔族慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者与 ADAM33 基因 S1、S2 位点多态性的关系。**方法** 选取 2012 年 6 月至 2013 年 6 月就诊于该院呼吸内科,确诊为 COPD 的维吾尔族患者 100 例作为观察组,选择同期维吾尔族健康体检者 140 例作为对照组。采集两组对象外周血提取 DNA,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 ADAM33 基因 S1、S2 位点多态性。**结果** 与对照组比较,观察组 ADAM33 基因 S1 位点的基因型、等位基因频率分布差异均有统计学意义($\chi^2=11.41,11.55,P<0.05$)。Logistic 回归分析显示,与野生 CC 基因型比较,S1 位点 CT+TT 基因型可能为 COPD 发病的保护性遗传因素($OR=0.12,95\%CI:0.02\sim0.59$)。S2 位点基因型及等位基因频率分布两组对象比较差异无统计学意义($P>0.05$);SHESI 分析未发现 S1、S2 位点单体型与新疆地区维吾尔族人群 COPD 相关($P>0.05$);且 COPD 患者肺功能的 FEV1/FVC、FEV1/预计值与 S1 位点 SNPs 无相关性($P>0.05$)。**结论** ADAM33 基因 S1 位点与新疆维吾尔族人群易感 COPD 有关。

[关键词] 肺疾病,慢性阻塞性;ADAM33 基因;基因多态性
[中图法分类号] R562.2+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)31-3987-04

Correlation between S1 and S2 polymorphisms of ADAM33 gene and chronic obstructive pulmonary disease in Xinjiang Uygur population^{*}

WANG Fei, HU Xin[△], QIMANGULI · Wushouer, SUN Hui, WANG Jing
(Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between S1, S2 polymorphism of ADAM33 gene and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Xinjiang Uygur population. **Methods** Chosen 100 cases of Uygur COPD as the experimental group and 140 healthy Uygurs as the control group. The peripheral blood and DNA were extracted. The polymorphisms of ADAM33 gene S1 and S2 were detected by polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** Compared with the control group, the genotype and allele frequency distribution of ADAM33 gene S1 site in the experimental group were significantly different ($\chi^2=11.41,11.55,P<0.05$). Logistic regression analysis showed that the genotype of the S1 site (CT+TT) genotype was likely to be the protective genetic factor ($OR=0.12,95\%CI:0.02-0.59$) for the onset of chronic lung disease. There were no statistically significant differences between the genotype and allele frequency distribution of S2 site ($P>0.05$). The single-body analysis of S1 and S2 sites was not associated with COPD in Xinjiang Uygur population ($P>0.05$); the FEV1/FVC, FEV1/expected value of pulmonary function of the COPD patients and SNPs of S1 site were not correlated ($P>0.05$). **Conclusion** S1 site of ADAM33 gene is related to the susceptibility of COPD in Xinjiang Uygur population.

[Key words] pulmonary disease, chronic obstructive; ADAM33 gene; gene polymorphism

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种由有害颗粒导致的肺部异常炎症的呼吸道疾病,症状持续存在,其以不完全可逆且进行性发展的气流受限为特点^[1];到 2020 年,预计 COPD 将居升全球死亡原因第 3 位^[2],其防治工作刻不容缓。目前 COPD 的发病机制尚不全部明了,多项研究证实遗传因素与其发病机制相关。GOSMAN 等^[3]于 2007 年首次指出 ADAM33 基因的单核

^{*} **基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81160004,81760005);新疆维吾尔自治区重大科技专项基金(2017A03006);新疆医科大学卫生事业发展改革研究所基金(HADR201607)。 **作者简介:**王菲(1991—),在读硕士研究生,主要从事慢性阻塞性肺疾病的诊治研究。 [△]**通信作者,** E-mail:458899969@qq.com。

苷酸多态性 (single nucleotide poly-morphisms, SNPs) 通过影响气道的高反应性、炎症从而参与 COPD 病理、生理过程。由于地域、种族、研究对象选取等不同, ADAM 33 基因的 SNPs 与 COPD 的相关性研究结果存在差异, 目前仍在探索中。本研究旨在探讨 ADAM33 基因 S1、S2 位点的 SNPs 与新疆地区维吾尔族 COPD 患者易感性及肺功能下降的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 6 月至 2013 年 6 月就诊于本院呼吸内科, 确诊为 COPD 的维吾尔族患者 100 例作为观察组, 其中男 41 例, 女 59 例, 年龄 (58.73±15.19) 岁; 纳入标准: COPD 患者诊断参照文献[4], 且患者入组前均未接受过药物正规治疗。排除标准: 排除合并支气管哮喘、支气管扩张、间质性肺疾病、结核、肺癌、心血管疾病等病史的患者。选取同期 140 例维吾尔族健康体检者作为对照组, 其中男 54 例, 女 86 例; 年龄 (57.44±14.72) 岁。两组对象年龄、性别、吸烟指数比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 两组对象第 1 秒用力呼气容积 (FEV1)/用力肺活量 (FVC)、FEV1 占预计值百分比比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。资料采集及处理采用双盲原则进行; 该研究经医院伦理委员会审核批准, 受试对象均知情并签署知情同意书。

表 1 两组对象临床相关资料比较 ($\bar{x}\pm s$)				
组别	n	吸烟指数 (包/年)	FEV1/FVC (%)	FEV1/预计值 (%)
观察组	100	14.6±13.10	54.39±9.57	54.67±21.72
对照组	140	14.6±10.10	79.80±6.50	87.20±20.40
P		>0.05	<0.01	<0.01

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及鉴定 采集研究对象空腹外周静脉血 5 mL, 使用乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K₂) 抗凝, 放置于 -80 ℃ 保存。采用非离心柱型血 DNA 提取试剂盒的提取 DNA, 同时采用超微量分光光度计检测提取的 DNA 纯度和浓度。

1.2.2 聚合酶链反应 (PCR) 引物序列来源 NCBI 数据库 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。引物由上海生工生物有限公司合成。S1 位点上游引物: 5'-CTG GGA GTC GGT AGC AAC AC-3', 下游引物: 5'-CCT GTG CAG GCT GAA AGT ATG-3'; S2 位点上游引物: 5'-CTC GGA GCC TAC CCA CTG C-3', 下游引物: 5'-CCG CAG ACC ATG ACA CCT TC-3'。反应体系为 50 μL, 包括 DNA 1.0 μL, 上、下游引物各 1.0 μL, Taq Buffer 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL, Taq 酶 5 μL, 其余为双蒸水。扩增条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s; 55~65 ℃ 退火 35 s;

72 ℃ 延伸 40 s; 72 ℃ 修复延伸 5 min; 35 个循环数。1% 琼脂糖电泳 20 min, 电泳观察是否扩增成功。

1.2.3 限制性片段长度多态性 (RFLP) 检测 对 PCR 扩增产物进行酶切, 使用 RFLP 检测。酶切体系为 15 μL, 包括 PCR 产物 10 μL, 限制性内切酶 0.1 μL, 10×Buffer 1.5 μL, 余为双蒸水, 恒温 37 ℃, 水浴过夜。酶切产物在 TBE 缓冲液中电泳 30 min, 条件为 2% 琼脂糖凝胶、100 V 电压, 凝胶图像系统对结果的进行分析, 得出基因型。

1.2.4 测序分析 将扩增片段使用生工 SK1141 试剂盒进行测序, 测序结果采用 BLAST 软件与数据库录入的序列分析同源性, 验证得到的扩增基因片段正确性。

1.2.5 肺功能检测 两组对象均进行基础肺功能及支气管舒张试验肺功能的测定, 肺功能检测仪器为德国 Yeager 生产, 支气管扩张剂使用沙丁胺醇, 检测用药前后的 FVC、FEV1、FEV1/FVC、FEV1/预计值 % 等指标。

1.3 统计学处理 数据使用 SPSS19.0 软件进行分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。基因态性与 COPD 相对危险度以单变量的 Logistic 回归分析, 肺功能基因型与相关性用单因素方差分析, 使用 SHEsis 软件进行基因的单体型及连锁不平衡关系分析[5]。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S1、S2 位点基因型检测及测序结果 对所有研究对象进行基因型检测, ADAM33 基因 S1 位点基因的扩增产物为 192 bp DNA 片段; S2 位点基因的扩增产物为 166 bp DNA 片段。经 2% 琼脂糖凝胶电泳后, S1 位点有 3 种基因型 CC (166 bp)、TT (128, 38 bp)、CT (166, 128, 38 bp); S2 位点也有 3 种基因型 CC (166 bp)、GG (102, 64 bp)、CG (166, 102, 64 bp)。验证 PCR 扩增基因片段的正确性测序结果, 见图 1。

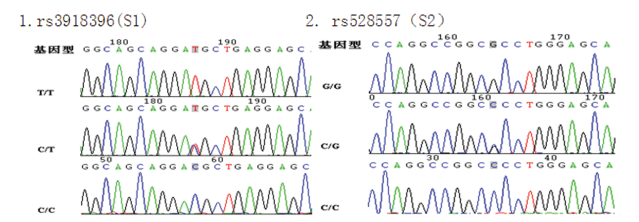


图 1 S1、S2 位点部分测序结果

2.2 遗传平衡符合性检验 对两组对象 χ^2 检验验证 S1、S2 位点的基因型分布, 其均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($\chi^2=0.29, 0.62, P>0.05$), 表明样本具有群体代表性。

表 2 S1、S2 位点基因型与等位基因频率分布比较[n(%)]

组别	n	S1 基因型			S1 等位基因		S2 基因型			S2 等位基因	
		C/C	C/T	T/T	C	T	C/C	C/G	G/G	C	G
病例组	100	98(0.98)	2(0.02)	0(0.00)	198(0.99)	2(0.01)	61(0.61)	33(0.33)	6(0.06)	155(0.78)	45(0.23)
对照组	140	119(0.85)	20(0.14)	1(0.01)	258(0.92)	22(0.08)	88(0.63)	44(0.31)	8(0.06)	220(0.79)	60(0.21)
χ^2		11.410			11.550		0.090			0.080	
P		0.003			0.001		0.960			0.780	

2.3 两组对象 S1、S2 位点基因型和等位基因频率分布比较 S1 位点的基因型和等位基因频率分布两组对象比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);两组对象 S2 位点的基因型及等位基因的频率分布比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.4 S1 位点基因型的 SNPs 与 COPD 易感的相关性分析 Logistic回归分析显示,携带突变基因 T 的基因型(包括 CT、TT)和野生基因型(CC)比较,前者能明显降低 COPD 发生的危险性($OR=0.12,95\%CI:0.02\sim0.59$),见表 3。

2.5 两组对象基因位点的单体型和连锁不平衡 对基因 S1、S2 位点进行单倍体型匹配,得到 4 种单倍体

型,其中单体型 H1(CC 型)、H3(CG)两组对象比较差异无统计学意义($P=0.55、0.22$);单倍体型 H2(TC 型)、H4(TG)中,观察组的基因型频率小于 0.05,故不分析,见表 4。S1、S2 多态性位点间存在连锁不平衡($D'=0.47,r^2=0.04$)。

表 3 S1 位点不同基因型与发生 COPD 的相关性[n(%)]

组别	n	CC	CT	TT	CT+TT
观察组	100	98(0.98)	2(0.02)	0(0.00)	2(0.02)
对照组	140	119(0.85)	20(0.14)	1(0.01)	21(0.15)
OR		1.00	0.12	0.00	0.12
95%CI			0.03~0.43		0.02~0.59

表 4 S1、S2 位点单体型基因频率分析[n(%)]

单体型	S1 位点	S2 位点	观察组	对照组	P	OR	95%CI
H1	C	C	155.00(0.78)	210.34(0.75)	0.55	1.14	0.74~1.75
H2	T	C	0	9.66(0.03)	0.01	0	0.00~0.01
H3	C	G	43.00(0.22)	47.66(0.17)	0.22	1.34	0.84~2.11
H4	T	G	2.00(0.01)	12.34(0.04)	0.03	0.22	0.05~0.99

2.6 S1 位点的 SNPs 与 COPD 患者肺功能相关指标的关系 S1 位点携带突变基因 T 的基因型(CT、TT)和野生基因型(CC)患者的 FEV1/FVC、FEV1/预计值比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 5。

表 5 观察组 S1 位点不同基因型与肺功能指标的关系($\bar{x}\pm s, \%$)

基因型	n	FEV1/FVC	FEV1/预计值
CC	98	54.26±9.74	54.77±22.00
CT+TT	2	59.45±3.18	50.00±15.56
F		0.56	0.09
P		0.46	0.76

3 讨 论

GOSMAN 等^[3]于 2007 年首次指出 ADAM33 基因的 SNPs 与 COPD 相关,开启了该疾病新的研究方向。ADAM33 基因表达具有一定的组织特异性,UMLAND 等^[6]发现其主要表达于成纤维细胞、平滑肌细胞和肌纤维细胞。DIJKSTRA 等^[7]在肺组织中

的基底上皮细胞和血管内皮细胞检测到其表达,对于生长因子、炎症介质的释放也有参与,考虑 ADAM33 基因参与了气道重塑、炎症反应和血管的生成。

近年国内外对 ADAM33 的 SNPs 与 COPD 相关性的研究结果不一。目前研究转向至不同地域、不同民族等差异。LAXMI 等^[8]得出结论印度人群 ADAM33 的 S1、S2 位点多态性在 COPD 病因遗传因素起重要作用。当然 ADAM33 基因的 SNPs 与 COPD 存在相关性受到很多学者质疑。目前对 ADAM33 基因 S1、S2 位点与 COPD 之间关系存在异议,PABAT 等^[9]发现在德国人中 ADAM33 基因 S2 位点 SNPs 对 COPD 发展过程无影响,与其不相关。有研究表明新疆地区维吾尔族人群 COPD 高发^[10],本研究选取该地区 COPD 患者进行分析,探讨其与 ADAM33 基因 S1、S2 位点 SNPs 的相关性,得出 S1、S2 位点基因型样本具有群体代表性,在新疆地区维吾尔族人群中 COPD 与 ADAM33 基因 S1 位点相关。考虑不同地区、不同种族 COPD 患者与 ADAM33 基因 S1、S2 位

点 SNPs 的关系有所不同,值得进一步探究。

TAN 等^[11]发现位于中国内蒙古地区蒙古族 AD-AM33 的 S2、S1 位点 SNPs 与 COPD 易感性有关。AIERKEN 等^[12]对不同民族、地域的 ADAM33 基因 SNPs 研究结果进行 Meta 分析,结果提示亚洲人种中 ADAM33 基因中 S1 与发生 COPD 危险性有关,而在欧洲人种中不相关。S2 与任何人种发生 COPD 的危险都无关。ZHOU 等^[13]对 5 篇关于欧洲人种和 8 篇关于亚洲人种的 13 个研究进行分析,得出 S1 位点 SNPs 与亚洲人种、欧洲人种发生 COPD 危险性有关;ZHANG 等^[14]通过不同民族、地域分类进行 Meta 分析,得出 S1 位点 SNPs 是中国吸烟人群发生 COPD 的危险相关遗传因素之一。本研究得出 ADAM33 基因的 S1 位点 SNPs 与新疆地区维吾尔族人群 COPD 的危险性相关,并且推测 S1 位点突变基因 T 等位基因可能为该人群 COPD 发病的保护性遗传因素。本研究未得出 S2 位点 SNPs 与新疆地区维吾尔族人群发生 COPD 的相关性,故 S2 位点 SNPs 与 COPD 的关联性尚不确定。

本研究对 ADAM33 基因 S1、S2 位点进行单倍体型分析,其单倍体型与新疆地区维吾尔族人群 COPD 发生无关联。EL-ZAHER 等^[15]研究埃及人群 COPD 吸烟患者的 ADAM33 基因发现其 S1 与肺功能下降明显相关。根据本研究得出 S1 位点 SNPs 与新疆地区维吾尔族 COPD 患者肺功能中 FEV1/FVC、FEV1/预计值不相关。首先考虑本研究样本量尚不够多,需扩大样本量进一步深入研究;其次不排除地域、种族的差异导致的差异性。

参考文献

[1] VOGELMEIER C F, CRINER G J, MARTINEZ F J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(5): 557-582.

[2] RABE K, HURD S S, ABAMES P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(6): 532-555.

[3] GOSMAN M M, BOEZEN H M, VAN DIEMEN C C, et al. A disintegrin and metalloprotease 33 and chronic obstructive pulmonary disease pathophysiology [J]. *Thorax*, 2007, 62(3): 242-247.

[4] 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(2013 年修订版) [J/CD]. 中国医

学前沿杂志(电子版), 2014, 36(2): 67-79, 80.

[5] SHI Y Y, HE L. A powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. *Cell Res*, 2005, 15(2): 97-98.

[6] UMLAND S P, GARLISI C G, SHAH H, et al. Human Adam33 messenger RNA expression profile and post-transcriptional regulation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(5): 571-582.

[7] DIJKSTRA A, POSTMA D S, NOORDHOEK J A, et al. Expression of ADAMs ("a disintegrin and metalloprotease") in the human lung [J]. *Virchows Arch*, 2009, 454(4): 441-449.

[8] LAXMI K V, SUBHAKAR K, LAKSHMI B V, et al. Association of ADAM33 gene S1 and S2 transmembrane domain polymorphisms in COPD from South-Indian population [J]. *Egypt J Med Hum Gen*, 2016, 17(4): 317-323.

[9] PABAT S, TOURON C P, GILLISSEN A, et al. ADAM33 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Eur J Med Res*, 2009, 14(4): 182-186.

[10] 凌敏, 荣艳, 苟安栓, 等. 新疆农村地区慢性阻塞性肺疾病的危险因素调查 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(9): 666-668.

[11] TAN JIE, LIU AI-PING, SUN CHAO, et al. Association of ADAM33 gene polymorphisms with COPD in the mongolian population of China [J]. *Ann Hum Biol*, 2014, 41(1): 9-14.

[12] AIERKEN H, WANG J, WUSHOUER Q, et al. Polymorphisms of the ADAM33 gene and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis [J]. *Clin Respir J*, 2014, 8(1): 108-115.

[13] ZHOU D C, ZHOU C F, TOLOO S, et al. Association of a disintegrin and metalloprotease 33(ADAM33) gene polymorphisms with the risk of COPD: an updated meta-analysis of 2,644 cases and 4,804 controls [J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(2): 409-422.

[14] ZHANG R, LI H, ZHAO H, et al. Polymorphisms in a disintegrin and metalloprotease 33 gene and the risk of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis [J]. *Respirology*, 2014, 19(3): 312-332.

[15] EL-ZAHER A H, NAGY H, FAROUK G, et al. Effect of a disintegrin and metalloprotease 33(Adam33) gene polymorphisms and smoking in COPD [J]. *Egypt J Che Dis Tuber*, 2012, 61(4): 275-280.