

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.21.010

广东地区汉族人群乙醛脱氢酶 2 基因 Glu504Lys 多态性的研究

王 慧¹, 罗 娥², 欧雅文²

(1. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广州 510120; 2. 广州医科大学, 广州 510180)

摘要:目的 了解广东地区汉族人群乙醛脱氢酶 2 基因(ALDH2) Glu504Lys 的多态性分布。方法 应用 DNA 微阵列芯片法对 296 例广东地区汉族人群中的 ALDH2 基因进行多态性分析。结果 男性组 ALDH2 * 1/* 1、ALDH2 * 1/* 2、ALDH2 * 2/* 2 3 种基因型频率分别为 53.1%、39.6%、7.3%, 女性组分别为 57.7%、33.7%、8.6%, 2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$); 男性组 ALDH2 * 1 和 ALDH2 * 2 等位基因频率分别为 72.9%、27.1%, 女性组分别为 74.5%、25.5%, 2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。广东地区汉族人群 3 种基因型的频率分别为 54.7%、37.5%、7.8%, 突变型基因频率达 45.3%; 广东地区汉族人群 ALDH2 * 1 和 ALDH2 * 2 等位基因频率分别为 73.5%、26.5%。结论 广东地区汉族人 ALDH2 基因多态性在性别中无差异, ALDH2 * 2 等位基因频率高于山东、上海等地区。

关键词:乙醛脱氢酶 2; 基因多态性; 等位基因; 频率; DNA 微阵列芯片法

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)21-3197-04

Study of aldehyde dehydrogenase 2 gene Glu504Lys polymorphism among the Han population in Guangdong

WANG Hui¹, LUO E², OU Yawen²

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510180, China)

Abstract: Objective To investigate aldehyde dehydrogenase 2 gene (ALDH2) Glu504Lys polymorphism among the Han population in Guangdong. **Methods** ALDH2 gene polymorphisms of 296 samples were analyzed by DNA microarray method. **Results** A total of three genotypes of ALDH2 were detected including ALDH2 * 1/* 1, ALDH2 * 1/* 2 and ALDH2 * 2/* 2, frequencies of the three genotypes were 53.1%, 39.6%, 7.3% respectively in male group, frequencies of the three genotypes were 57.7%, 33.7%, 8.6% respectively in female group, there were no significant differences between different genders ($P > 0.05$). The allele frequency of ALDH2 * 1 and ALDH2 * 2 were 72.9% and 27.1% in male group, the allele frequency of ALDH2 * 1 and ALDH2 * 2 were 74.5% and 25.5% in female group, significant difference was not found in allele frequency of ALDH2 between the two groups ($P > 0.05$). The frequencies of ALDH2 genotypes among the Han population in Guangdong were ALDH2 * 1/* 1 (54.7%), ALDH2 * 1/* 2 (37.5%) and ALDH2 * 2/* 2 (7.8%) respectively, the mutant gene frequency was 45.3%. The allele frequency of ALDH2 * 1 and ALDH2 * 2 were 73.5% and 26.5% in Han population of Guangdong province. **Conclusion** Gene polymorphism of aldehyde dehydrogenase 2 had no correlation with gender, and the allele frequency of ALDH2 * 2 in Guangdong population was higher than that in Shandong, Shanghai and other areas.

Key words: aldehyde dehydrogenase 2; gene polymorphism; allele frequency; DNA microarray method

乙醛脱氢酶(ALDH)和乙醇脱氢酶(ADH)在人体内共同组成了人乙醇脱氢酶系,负责催化人体的乙醇分解代谢。其中,ALDH主要有两种,即对乙醛亲和力和较弱的胞质同工酶(ALDH1)和亲和力较强的线粒体同工酶(ALDH2)。ALDH2在肝和胃中具有很高的表达量,是乙醇代谢途径中最重要的酶之一,若编码该酶的基因异常将会导致乙醛代谢受阻,在体内堆积,造成机体损伤。ALDH2基因具有高度的多态

性,其中以东方人缺失的发生率最高^[1]。ALDH2基因位于12号染色体,由13个外显子构成,由于第12个外显子内存在一个单核苷酸多态(SNPs) rs671,出现碱基置换:当鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A)时,导致该基因编码蛋白504位的谷氨酸(Glu)替换为赖氨酸,即Glu504Lys,使得酶活性大大下降^[2]。所以,ALDH2有两个等位基因:野生型(ALDH2 * 1, * 504Glu),突变型(ALDH2 * 2, * 504Lys)。人群中该

酶基因型存在 3 种组合方式:野生纯合型 ALDH2 * 1/* 1(Glu504Glu),产生具有正常催化活性的酶;突变杂合型 ALDH2 * 1/* 2(Glu504Lys),产生的酶催化活性下降;突变纯合型 ALDH2 * 2/* 2(Lys504Lys),产生的酶催化活性明显降低。本研究将检测 ALDH2 基因多态性在广东地区汉族人群中的分布,并与其他地区的分布情况进行比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在广州医科大学附属第一医院进行健康体检或住院的广东地区成年汉族人共 296 例,其中男 192 例,年龄 28~85 岁;女 104 例,年龄 35~81 岁。

1.2 仪器与试剂 ABI9700 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司),e-Hyb 全自动杂交仪和 BE-2.0 生物芯片适读仪(上海百微科技有限公司),Thermo NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。血液基因组 DNA 提取纯化试剂盒和 ALDH2 基因检测试剂盒,购自上海百微科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 抽取受检者静脉血 2 mL,置于乙二胺四乙酸(EDTA)管中抗凝,按照血液基因组 DNA 提取纯化试剂盒的流程提取血液基因组 DNA;用微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,DNA 水平应在 10~60 ng/ μ L 为宜,OD260/OD280 的比值应为 1.5~2.0。

1.3.2 聚合酶链式反应(PCR)扩增 ALDH2 扩增液融解后,将其分装到 0.2 mL 离心管中,每管 22 μ L,在各扩增管中分别加入 1 μ L 反应液 A,在各扩增管中分别加入 2 μ L 提取好的样品基因组 DNA,总反应体系为 25 μ L;将各离心管放入 PCR 仪中,按下列条件进行扩增: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。

1.3.3 芯片杂交显色 按操作说明配好预杂交液、

杂交反应液(190 μ L 杂交缓冲液+10 μ L ALDH2 扩增产物)、洗液 1、洗液 2、洗液 3、抗体液和显色液;在百微 e-Hyb 全自动杂交仪上选择已设置好的杂交程序,将 ALDH2 基因芯片放入芯片片架中,并插入到杂交仪插片口内,将配好的杂交反应试剂条正确放入杂交仪中相应位置,运行杂交程序。

1.3.4 芯片识读与数据分析 启动 BE-2.0 生物芯片适读仪,将芯片放入适读仪中,运行基因芯片图像分析软件进行图像扫描与分析,图像分析自动输出检测报告。每次实验设置阴性对照(空白),阳性对照(ALDH2 * 2/* 2),跟随标本一起进行试验,以保证结果的准确性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALDH2 基因型 研究标本检测出的 ALDH2 基因型共有 3 种,分别为 GG 型(野生纯合子)ALDH2 * 1/* 1(Glu504Glu);GA 型(突变杂合子)ALDH2 * 1/* 2(Glu504Lys);AA 型(突变纯合子)ALDH2 * 2/* 2(Lys504Lys),见图 1。



注: A 为 ALDH2 * 1/* 1(Glu504Glu); B 为 ALDH2 * 1/* 2(Glu504Lys); C 为 ALDH2 * 2/* 2(Lys504Lys)

图 1 ALDH2 基因型 3 种扫描结果

2.2 研究人群 ALDH2 基因型及等位基因分布频率 ALDH2 各基因型及等位基因分布情况见表 1。各基因型(GG 型、GA 型、AA 型)在不同性别广东地区汉族人群中差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 ALDH2 基因多态性的分布

性别	n	基因型频率[n(%)]			等位基因频率(%)	
		ALDH2 * 1/* 1	ALDH2 * 1/* 2	ALDH2 * 2/* 2	* 1 等位基因	* 2 等位基因
男性	192	102(53.1)	76(39.6)	14(7.3)	72.9	27.1
女性	104	60(57.7)	35(33.7)	9(8.6)	74.5	25.5
合计	296	162(54.7)	111(37.5)	23(7.8)	73.5	26.5

2.3 研究人群 ALDH2 基因多态性分布的比较 进一步将 ALDH2 的各基因型分成 ALDH2 野生型组(GG)及 ALDH2 突变型组(GA+AA);将 ALDH2 的各基因型分成 ALDH2(AA)组及 ALDH2(GG+GA)组。分组结果均显示,不同性别组组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.4 广东地区汉族人群 ALDH2 基因型和等位基因

频率结果 广东地区汉族人群 ALDH2 * 1/* 1、ALDH2 * 1/* 2、ALDH2 * 2/* 2 3 种基因型的频率分别为 54.7% (162/296)、37.5% (111/296)、7.8% (23/296);广东地区汉族人群 ALDH2 * 1 及 ALDH2 * 2 等位基因频率分别为 73.5%、26.5%;广东地区汉族人群突变型基因(ALDH2 * 1/* 2+ALDH2 * 2/* 2)的频率为 45.3%。

表 2 ALDH2 基因多态性分布的比较[n(%)]

性别	n	基因型频率		基因型频率	
		GG	GA+AA	GG+GA	AA
男性	192	102(53.1)	90(46.9)	178(92.7)	14(7.3)
女性	104	60(57.7)	44(42.3)	95(91.3)	9(8.7)
合计	296	162(54.7)	134(45.3)	273(92.2)	23(7.8)

3 讨 论

乙醇进入体内后,将通过以下途径代谢:乙醇→乙醛→水、二氧化碳→排出体外。乙醛在体内的清除快慢是由“酒精基因”ALDH2 决定的。当 ALDH2 基因发生突变,将使 ALDH 活性降低,使乙醇在体内从乙醇→乙醛→水、二氧化碳的代谢过程受阻,大量乙醛滞留在体内,将会增加醉酒的严重性和导致身体伤害。YAMAMOTO 等^[3]的研究结果表明,饮酒后 ALDH2 纯合子缺失者(ALDH2 * 2/* 2)血液中的乙醛水平是携带 ALDH2 野生纯合子者(ALDH2 * 1/* 1)的 19 倍,是 ALDH2 突变杂合子者(ALDH2 * 1/* 2)的 3 倍。这说明 ALDH2 等位基因缺损者,无论是赖氨酸纯合型,还是谷氨酸赖氨酸杂合型,ALDH2 都不具有活性或活性很低。因此,ALDH2 基因发生突变的人,不能快速地完成酒精代谢过程,导致乙醛在体内堆积,将对人体的肝、肾、心、脑造成严重伤害,检测 ALDH2 基因多态性在筛选乙醇不耐受人群,并采取有效的保护和干预措施等方面都具有潜在的应用前景。

硝酸甘油是心绞痛急性发作的常规首选药物,但该药的临床疗效常因人而异,中国汉族人群中,硝酸甘油含服无效的比例高达 25%以上^[4]。硝酸甘油需在体内经 ALDH2 生物转化,然后才能释放出有药理活性的一氧化氮,发挥其抗心绞痛作用。如果患者基因中携带有 ALDH2 突变,会导致硝酸酯酶活性降低,从而使硝酸甘油无法产生一氧化氮,难以发挥药效。因此,今后医生在临床使用硝酸甘油的过程中,需考虑患者的这一遗传因素,用药前必须考虑先检测患者的 ALDH2 基因型,以减少用药无效导致的意外死亡。

大量文献均显示 ALDH2 基因型与心血管疾病、癌症和药物代谢等均存在很大的关联性^[5-7],ALDH2 基因突变人群罹患结直肠癌、食管癌、胃癌、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心肌梗死等疾病风险更高。而我国汉族人群 ALDH2 的基因型存在普遍的变异性,因此在人群中进行 ALDH2 基因型的普查,对该类人群无论从某些药物的应用上,还是在心血管病防治及癌症等疾病的研究中都有重要的启示性。

检测基因多态性的方法很多,包括荧光定量 PCR 技术、测序技术、等位基因特异性 PCR 技术、PCR-限制性片段长度多态性技术等。本研究采用的是 DNA

微阵列芯片法:提取样品基因组 DNA 后,用 ALDH2 基因特异引物进行 PCR 扩增;将带生物素标记的扩增产物与固定在醛基基片上的 ALDH2 基因型检测探针进行特异杂交反应,并通过酶促显色反应,使特异性杂交信号出现颜色;通过对芯片进行扫描,得到样品 DNA 与 ALDH2(Glu504Lys)基因位点的野生型和突变型探针杂交形成的杂交图像,判断待检样品的基因型。该方法操作简单,一张芯片即可检测一个样本,可自动化检测和分析,结果准确可靠,通过一次检测即可获得患者的相关遗传信息,终生受用,可用于指导制定合理用药方案,实现个性化治疗。

ALDH2 第 12 外显子的基因多态性存在明显的种族差异,亚洲人群中,ALDH2 * 1/* 2 基因型频率为 30%~50%^[1]。但是同一种族不同地域的人群 ALDH2 基因多态性分布也不一致,本研究显示广东地区汉族人群 ALDH2 * 1/* 1、ALDH2 * 1/* 2、ALDH2 * 2/* 2 3 种基因型的频率分别为 54.7%、37.5%、7.8%。据国内研究报道,上海人群 3 种基因型的频率分别为 65.4%、29.8%、4.8%;山东人群 3 种基因型的频率分别为 72.1%、26.3%、1.6%;湖北人群 3 种基因型的频率分别为 78.1%、21.9%、0%;浙江人群 3 种基因型的频率分别为 55.55%、38.90%、5.55%^[8-10]。

广东地区汉族人群 ALDH2 * 2 等位基因频率为 26.5%,上海汉族人群 ALDH2 * 2 等位基因频率为 19.7%,山东地区人群为 14.7%,湖北地区人群为 10.9%,浙江地区人群为 25.0%,即广东地区汉族人群 ALDH2 * 2 等位基因频率高于以上各地区。提示广东地区人群对乙醛的代谢能力差,对乙醇的耐受性差。

本研究结果显示广东地区汉族人群突变型基因(ALDH2 * 1/* 2 + ALDH2 * 2/* 2)的频率为 45.3%,说明广东地区汉族人发生 ALDH2 基因突变的概率较高,高于文献^[8-10]报道的上海(34.6%)、山东(27.9%)、湖北(21.9%)等地区,即广东地区人群中 ALDH 及硝酸酯酶活性降低的概率高,从而导致对乙醛的代谢能力差,对乙醇的耐受性低,对硝酸甘油的无效概率高;此人群中 ALDH2 酶活性缺乏者占近半数,罹患相关疾病的风险值可能会升高。

因此,在广东人群中进行 ALDH2 基因的普查检测非常重要,可为硝酸甘油的用药、饮酒指导及相关高风险疾病的预防提供有效的参考依据。

参考文献

[1] LI H, BORINSKAYA S, YOSHIMURA K, et al. Refined geographic distribution of the oriental ALDH2 * 504Lys (nee 487Lys) variant[J]. Ann Hum Genet, 2009, 73(3): 335-345.
 [2] WANG R S, NAKAJIMA T, KAWAMOTO T, et al. Effects of aldehyde dehydrogenase-2(下转第 3202 页)

伤,或手术后,激活单核细胞释放白细胞介素-1,刺激肝细胞加速合成 CRP,血-脑屏障也遭到破坏,使脑脊液中含量升高,是早期诊断感染性疾病的一项重要指标^[5-6]。AAG 是血清中类黏蛋白的主要成分之一,主要由肝巨噬细胞和粒细胞产生,健康人体内含量很少,被认为是反映炎症活动或急性状态的敏感指标^[7]。本研究发现,化脓组和病毒组血清中 CRP、AAG 水平均高于对照组,且化脓组高于病毒组,差异均有统计学意义($P < 0.05$), $AUC > 0.7$,血清中 CRP、AAG 对化脓性感染和病毒性感染有鉴别诊断意义。血清 CRP 的最佳临界值为 18.40 mg/L,血清 AAG 最佳临界值为 119.00 mg/dL,灵敏度和准确度都较高。

Ig 的主要种类是 IgG、IgA、IgM,当机体感染时,是免疫系统发挥作用所产生的功能性蛋白。中枢神经系统在未受到感染时自身不产生 Ig,且脑脊液中含量很低;脑脊液中的 Ig 10%来自于血液^[8]。在 3 种主要的 Ig 中 IgG 的相对分子质量最小,因此其可自由地通过血脑屏障而进入脑脊液中,是构成脑脊液中 Ig 的主要抗体。IgM 在脑脊液中含量很低,因其相对分子质量最大,无法自由出入血脑屏障。当机体感染时在脑脊液中 IgA 升高明显,是主要的抗体^[9]。本研究发现,化脓组和病毒组的 Ig 均明显升高,且 IgG、IgA 明显高于对照组,化脓组的 IgG、IgA 水平明显高于病毒组,差异均有统计学意义($P < 0.05$), AUC 分别为 0.760、0.711,均大于 0.70。脑脊液 IgG、IgA 的临界值分别为 45.40 mg/L、8.11 mg/L。

综上所述,血清中的 CRP、AAG 在化脓性感染和病毒性感染鉴别诊断方面有重要价值,再联合脑脊液中的 Ig 对脑膜炎的鉴别诊断具有较大的临床使用价值^[10]。

参考文献

- [1] 吴萍,若敏. 浅谈血清降钙素原、C 反应蛋白检测对小儿中枢神经系统感染性疾病的诊断价值[J]. 当代医药论丛,2014,12(9):47-48.
- [2] JUNG K, GOERDT C, LANGE P, et al. The use of S100B and Tau protein concentrations in the cerebrospinal fluid for the differential diagnosis of bacterial meningitis: a retrospective analysis[J]. Eur Neurol, 2011, 66(3):128-132.
- [3] 余向文,蓝锋,候萍萍. 乳酸脱氢酶、降钙素原及 C 反应蛋白检测在小儿中枢神经系统感染的价值研究[J]. 现代诊断与治疗,2014,25(18):218-219.
- [4] 石红娜. 婴幼儿化脓性脑膜炎病原菌分布及耐药性临床分析[J]. 中国实用神经疾病杂志,2012,15(3):58-59.
- [5] 吴斌. hs-CRP 对细菌、真菌感染早期鉴别的意义[J]. 放射免疫学杂志,2011,24(3):332-334.
- [6] 周小桢,陈平洋. 血清降钙素原、C 反应蛋白及脑脊液乳酸脱氢酶检测在小儿中枢神经系统感染的价值[J]. 中外医疗,2015,35(12):190-191.
- [7] VASILEIADOU K, PANTAZIDIS G, PAPADOPOULOU K, et al. Alpha-Acid glycoprotein production in rat dorsal air pouch in response to inflammatory stimuli, dexamethasone and honey bee venom [J]. Exp Mol Pathol, 2010, 89(1):63.
- [8] 朱伟,赵合庆,程庆璋,等. 血清及脑脊液特种蛋白检测在中枢神经系统感染性疾病中的意义[J]. 临床神经病学杂志,2010,23(3):177-180.
- [9] 王昱俊. 结核性脑膜炎与新型隐球菌性脑膜炎病例鉴别分析[J]. 中国实用神经疾病杂志,2013,16(5):33-35.
- [10] 王卫才. 脑脊液 C 反应蛋白及免疫球蛋白在儿童感染性脑膜炎诊断中的应用研究[J/CD]. 中西医结合心血管病电子杂志,2014,2(18):49-50.

(收稿日期:2018-02-14 修回日期:2018-05-18)

(上接第 3199 页)

- genetic polymorphisms on metabolism of structurally different aldehydes in human liver[J]. Drug Metab Dispos, 2002,30(1):69-73.
- [3] YAMAMOTO K, UENO Y, MIZOI Y, et al. Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism [J]. Arukoru Kenkyuto Yakabutsu Ison, 1993,28(1):13-25.
 - [4] MUKAMA K J, CHEN C M, RAO S R, et al. Alcohol Consumption and cardiovascular Mortality Among US adults, 1987-2002[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(13):1328-1335.
 - [5] 段富交,宋春花,崔姝沂,等. ALDH1 与 ALDH2 基因多态性与中国人食管癌发病风险的 Meta 分析[J]. 卫生研究,2012,41(5):723-729.
 - [6] 郭李柯,张超贤,郭晓凤,等. 乙醛脱氢酶 2、细胞色素 P4502 E1_RsaI 基因多态性和饮酒与口腔鳞状细胞癌发

病风险的关系[J]. 中国医学科学院学报,2012,34(4):390-395.

- [7] WANG Q, ZHOU S, WANG L, et al. ALDH2 rs671 Polymorphism and coronary heart disease risk among Asian populations: a meta-analysis and meta-regression [J]. DNA Cell Biol, 2013, 32(7):393-399.
- [8] 弭守玲,范凡,李纪明,等. 乙醛脱氢酶 2 基因多态性在上海市与山东省汉族人群中的分布差异[J]. 中国临床医学,2011,6(18):735-737.
- [9] 黄爱霞. 湖北地区汉族人群 ALDH2 * 504 Lys 基因多态性分析[J]. 医学综述,2015,16(5):877-879.
- [10] 吕远栋,胡细连,陶萍华,等. 基因芯片法检测浙江省部分汉族人群乙醛脱氢酶 2 基因多态性[J]. 心脑血管病防治,2014,13(1):8-10.

(收稿日期:2018-02-15 修回日期:2018-05-13)