

NRF2 启动子区基因多态性与世居喀什地区维吾尔族 COPD 相关性研究

李 黎

(喀什地区第一人民医院呼吸与危重症医学科,新疆 喀什 844000)

摘要:目的:研究核因子E2相关因子2(NRF2)启动子区基因多态性与世居喀什地区维吾尔族慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的相关性。方法:选取2017-09~2019-09喀什地区第一人民医院呼吸科门诊、急诊收治的世居喀什维吾尔族COPD病人200例纳入研究对象,设为病例组;另外选取同期收治的体检健康志愿者300例纳入研究对象,设为对照组。两组入院后均抽取血液标本3 mL,检测NRF2基因rs 6706649位点多态性,并统计两组基础资料信息,包括年龄、性别、身体质量指数(BMI)、居住地区、文化程度及有无吸烟史、饮酒史、COPD家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史。对比两组基础资料信息及NRF2基因rs6706649位点基因型及等位基因频率分布差异,并将两组有显著性差异的临床信息纳入Logistic回归分析模型,行量化赋值后明确世居喀什地区维吾尔族COPD发生的独立危险因素。结果:两组性别、BMI、居住地区、文化程度对比差异无统计学意义($P>0.05$);病例组年龄 ≥ 60 岁、吸烟史、饮酒史、COPD家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史、携带NRF2基因rs6706649位点CT和TT基因型及T等位基因占比显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经Logistic回归分析证实,年龄、吸烟史、饮酒史、COPD家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史及携带NRF2基因rs6706649位点CT、TT基因型及T等位基因为世居喀什地区维吾尔族COPD发生的危险因素($P<0.05$)。结论:世居喀什地区维吾尔族人群COPD的发生因素较多,其中NRF2基因rs6706649位点多态性与疾病的发生关系密切,值得关注。

关键词:慢性阻塞性肺疾病;核因子E2相关因子2;维吾尔族;危险因素

中图分类号:R563

文献标识码: B

文章编号:2095-512X(2021)06-0613-05

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)属于临床较为常见的慢性呼吸系统疾病。据报道,近年来其发病率在全球范围内仍呈逐年上升趋势,预计到2030年将居于全球致死原因第3位^[1]。而近年来我国新疆南疆地区COPD患病率也呈逐年增长趋势,尤其作为维吾尔族人群聚居地的新疆喀什地区,COPD患病率普遍较高,且中老年人高发,与该地区特殊的地域特点及干燥寒冷的气候环境有关^[2]。而COPD发病机制复杂,不仅与环境因素有关,还与氧化-抗氧化失衡导致的氧化应激、遗传易感性等有关^[3]。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, NRF2)作为细胞氧化应激反应的关键因子,参与肺脏大多数抗氧化蛋白和细胞保护基因表达调控过程,可预防炎症所致氧化应激损伤;一旦机体受到外界刺激而发生氧化损伤时,NRF2会与Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1解离,并转移到细胞核内结合抗氧化反应

元件启动子区,调控下游氧化应激相关基因表达,在COPD氧化-抗氧化平衡中意义重大^[4]。有研究表明,COPD病人肺组织NRF2表达明显下调,而启动子区调控NRF2表达及其稳定性,故这些区域的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)变化可能会引起NRF2表达改变,并影响其对疾病的易感性^[5]。但目前尚无报道分析NRF2启动子区基因多态性与喀什地区维吾尔族COPD的相关性。为此,本研究通过探讨NRF2基因rs6706649位点多态性与世居喀什地区维吾尔族COPD的遗传易感性,旨在揭示世居喀什的维吾尔族COPD病人疾病发生的相关分子生物学机制,为其基因诊断和治疗提供新思路,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收稿日期:2021-09-22;修回日期:2021-10-28

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2017D01C009)

作者简介:李黎(1982-),女,喀什地区第一人民医院呼吸与危重症医学科副主任医师。

选取2017-09~2019-09喀什地区第一人民医院呼吸科门诊、急诊收治的世居喀什维吾尔族COPD病人200例纳入研究对象,设为病例组;另外选取同期收治的体检健康志愿者300例纳入研究对象,设为对照组。病例组纳入标准:(1)符合2016年最新慢性阻塞性肺疾病全球倡议(Global initiative for chronic obstructive lung disease, GOLD)指南的诊断标准^[6],吸入支气管扩张剂后,第1秒用力呼气容积占用力肺活量的百分比(forced expiratory volume in the first second is the percentage of forced vital capacity, FEV1/FVC) < 70%,经询问病史、胸部CT或X线胸片等检查确诊;(2)年龄 > 18岁;(3)民族均为维吾尔族(世居喀什地区且无外族通婚史)。对照组纳入标准:(1)所有受试者均为喀什地区第一人民医院维吾尔族健康体检者;(2)肺功能检查FEV1/FVC > 80%;最大呼气中期流速、50%用力呼气流速、75%用力呼气流速中任意两项占预计值百分比 > 65%;(3)X线胸片或胸部CT提示未发现肺气肿、慢性支气管炎等表现;(4)年龄 > 18岁;(5)民族均为维吾尔族(世居喀什地区且无外族通婚史)。排除标准:(1)合并其他肺疾病史,如肺纤维化、哮喘、支气管扩张症、肺结核等;(2)既往有一个或一个以上肺叶切除史,肺容量显著降低;(3)急性心肌梗死;(4)合并进展期恶性肿瘤;(5)处于严重感染、创伤等严重应急状态;(6)疑似或确实存在药物滥用及酒精依赖史;(7)妊娠、哺乳期妇女。本研究符合《赫尔辛基宣言》,且研究对象均对本研究知情同意。

1.2 方法

1.2.1 研究方法 统计两组基础资料信息,包括年龄、性别、身体质量指数(body mass index, BMI)、居住地区、文化程度及有无吸烟史、饮酒史、COPD家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史,观察两组NRF2基因rs6706649位点多态性,并分析世居喀什地区维吾尔族人群COPD发生的独立危险因素。

1.2.2 NRF2基因rs6706649位点多态性检测 (1)主要仪器与试剂。主要仪器包括UNO II 48型聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增仪(德国Biometra公司);Nanodrop 2000超微量分光光度计(美国Thermo公司);AM100电子分析天平(北京赛多利斯公司);微型离心机(德国Effendorf公司);其他仪器如超高速离心机、高压灭菌器、-80℃冰箱等均购自日本Sanyo公司。主要试剂包括全血基因组DNA提取试剂盒(荷兰Qiagen公司);沙丁胺

醇气雾剂(西班牙Glaxo Wellcome S.A公司);其他试剂如无水乙醇、异丙醇等均由宝生物工程(大连)有限公司提供。(2)检测方法。所有研究对象抽取2 mL空腹静脉血,乙二胺四乙酸抗凝,按照全血基因组DNA提取试剂盒说明书快速提取DNA,保存于-80℃超低温冰箱。使用Nanodrop 2000微量分光光度计行DNA浓度和纯度测定,采用260 nm与280 nm处的吸光度比值(A260/A280)及260 nm与230 nm的吸光度比值(A260/A230)评价DNA纯度,确保A260/A280值处在1.8~2.0范围内,A260/A230值大于2.0。使用Sequenom公司引物设计软件MassARRAY Assay Design 3.0设计待测rs 6706649位点的PCR扩增引物与单碱基延伸引物,并在生物工程(上海)有限公司合成。PCR引物:上游5'-ATCTGTGGCGTGGTGGCTGCGCTTTGG-3',下游5'-AGCTCCTGTTCCGACGTCACCCTGAGCG-3'。利用多重PCR技术对该位点基因序列进行扩增。PCR反应条件:94℃ 4 min;94℃ 20 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共计45个循环;72℃ 3 min;4℃保持。于PCR仪上放置PCR反应板,启动PCR反应。待PCR反应结束后用SAP(Shrimp alkaline phosphatase, 虾碱性磷酸酶)处理PCR产物。碱性磷酸酶处理结束后行单碱基延伸反应,完毕后利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱基因分型技术,测定基因分型结果。NRF2基因rs6706649位点有3种基因型,即为CC、CT、TT基因型;存在2个等位基因,即等位基因C和等位基因T。

1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0进行统计学数据分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验;计数资料采用率或百分比表示,采用 χ^2 检验;单因素分析有意义的因素赋值后引入多因素Logistic分析,检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 影响世居喀什地区维吾尔族人群COPD发生的单因素分析

两组性别、BMI、居住地区、文化程度对比差异无统计学意义($P > 0.05$);病例组年龄 ≥ 60 岁、吸烟史、饮酒史、COPD家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史、携带NRF2基因rs6706649位点CT和TT基因型及T等位基因占比显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表1)。

表1 影响世居喀什地区维吾尔族人群COPD发生的单因素分析(n,%)

临床资料		n	病例组(n=200)	对照组(n=300)	χ^2	P
年龄(岁)	≥60	128	98(76.56)	30(23.44)	95.829	<0.001
	<60	372	102(27.42)	270(72.58)		
性别	男性	232	87(37.50)	145(62.50)	1.127	0.288
	女性	268	113(42.16)	155(57.84)		
BMI(kg/m ²)	<18.50	21	14(66.67)	7(33.33)	6.814	0.078
	18.50~23.90	262	100(38.17)	162(61.83)		
	24.00~27.90	170	66(38.82)	104(61.18)		
	≥28.00	47	20(42.55)	27(57.45)		
居住地区	城市	200	83(41.50)	117(58.50)	0.313	0.576
	农村	300	117(39.00)	183(61.00)		
文化程度	小学	120	58(48.33)	62(51.67)	4.891	0.180
	初中	213	77(36.15)	136(63.85)		
	高中及中专	99	39(39.40)	60(60.60)		
	大专及以上	68	26(38.24)	42(61.76)		
吸烟史	有	276	152(55.07)	124(44.93)	58.316	<0.001
	无	224	48(21.43)	176(78.57)		
饮酒史	有	250	130(50.00)	120(48.00)	30.000	<0.001
	无	250	70(28.00)	180(72.00)		
COPD家族史	有	67	44(65.67)	23(34.33)	21.245	<0.001
	无	433	156(36.03)	277(63.97)		
个人呼吸道疾病史	有	322	180(55.90)	142(44.10)	95.285	<0.001
	无	178	20(11.24)	158(88.76)		
有害气体或粉尘接触史	有	47	30(63.83)	17(36.17)	12.274	<0.001
	无	453	170(37.53)	283(62.47)		
NRF2基因rs6706649位点(基因型/等位基因)	CC	436	166(38.07)	270(61.93)	6.900	0.032
	CT	59	30(50.85)	270(61.93)		
	TT	5	4(80.00)	1(20.00)		
	C	931	363(38.99)	568(61.01)		
	T	69	37(53.62)	32(46.38)		

2.2 影响世居喀什地区维吾尔族人群COPD发生的多因素Logistic回归分析

将世居喀什地区维吾尔族人群COPD作为因变量,将表1中有统计学意义的项目作为自变量,纳入Logistic回归分析模型,行量化赋值(见表2)。多因素Logistic回归分析显示,年龄、吸烟史、饮酒史、COPD家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史及携带NRF2基因rs6706649位点CT、TT基因型及T等位基因是世居喀什地区维吾尔族COPD发生的独立危险因素($P < 0.05$)(见表3)。

3 讨论

COPD是最为常见的慢性呼吸系统疾病,其患病率在不同地区存在很大差异,如湖北省COPD的患病率为8.92%,而重庆市渝中区COPD患病率为12.50%,推测可能与不同地区环境危险因素的暴露率差异有关^[7,8]。目前COPD发病机制尚不明确,主要认为与蛋白酶与抗蛋白酶失衡、炎症反应、氧化与抗氧化失衡、自身免疫、细胞凋亡等机制有关,其中氧化应激被认为是COPD发病的关键促发因素,

表2 量化赋值表

变量		量化赋值
年龄	X1	< 60岁 = 0, ≥60岁 = 1
吸烟史	X2	无 = 0, 有 = 1
饮酒史	X3	无 = 0, 有 = 1
COPD家族史	X4	无 = 0, 有 = 1
个人呼吸道疾病史	X5	无 = 0, 有 = 1
有害气体或粉尘接触史	X6	无 = 0, 有 = 1
携带 NRF2 基因 rs6706649 位点 CT 基因型	X7	无 = 0, 有 = 1
携带 NRF2 基因 rs6706649 位点 TT 基因型	X8	无 = 0, 有 = 1
携带 NRF2 基因 rs6706649 位点 T 等位基因	X9	无 = 0, 有 = 1
COPD	Y	无 = 0, 有 = 1

表3 影响世居喀什地区维吾尔族人群 COPD 发生的多因素 Logistic 回归分析

变量	β	S.E.	Wald	P	OR	95%CI
年龄	0.795	0.198	16.121	< 0.001	2.215	1.502 ~ 3.266
吸烟史	0.300	0.131	5.244	0.022	1.350	1.045 ~ 1.744
饮酒史	0.118	0.059	4.000	0.046	1.125	1.002 ~ 1.263
COPD 家族史	0.372	0.138	7.267	0.007	1.450	1.106 ~ 1.901
个人呼吸道疾病史	0.113	0.045	6.306	0.012	1.120	1.106 ~ 1.901
有害气体或粉尘接触史	1.082	0.546	3.927	0.047	2.950	1.012 ~ 8.599
携带 NRF2 基因 rs6706649 位点 CT 基因型	0.490	0.188	6.793	0.009	1.632	1.130 ~ 2.357
携带 NRF2 基因 rs6706649 位点 TT 基因型	1.407	0.669	4.423	0.036	4.082	1.100 ~ 15.148
携带 NRF2 基因 rs6706649 位点 T 等位基因	0.568	0.172	10.905	0.001	1.764	1.259 ~ 2.472

氧化应激损伤不仅可直接诱发肺组织和气道损伤,还可导致蛋白酶-抗蛋白酶失衡,诱导炎症反应的发生;而 NRF2 属细胞氧化应激反应的关键因子,在 COPD 的发生及发展中发挥着重要作用^[9]。新疆维吾尔自治区处于我国西北边陲,秋冬季寒冷、少雪、少雨,空气较干燥,属 COPD 高发区。虽然年龄、性别、民族等个体因素已被临床研究证实与 COPD 的发病密切相关,但目前鲜有报道分析世居喀什地区维吾尔族 COPD 发生的独立危险因素,关于性别、居住地区、饮酒史、COPD 家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史等因素与世居喀什地区维吾尔族 COPD 发病的相关性尚未完全明确,且关于 NRF2 启动子区基因多态性与世居喀什地区维吾尔族 COPD 的相关性鲜有报道^[10]。因此,本研究对此展开初步探讨。

本研究结果显示,年龄、吸烟史、饮酒史、COPD 家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史是世居喀什地区维吾尔族 COPD 发生的独立危险因素,与既往报道^[11,12]相似。推测原因,随着年龄的增长,机体各个器官功能逐渐衰退,会减少肺泡与肺弹力纤维弹性,致使胸廓顺应性降低、肺功能下

降,故高龄本身会引发 COPD。吸烟时产生的苯并芘、尼古丁等多种有害物质,会反复刺激气道及肺泡,引起支气管黏膜下细胞肥大和增生,致使黏膜下腺体分泌亢进,同时会引起气道上皮细胞损伤,促使纤毛运动减弱、气道阻力加重。另外,香烟燃烧产生的烟雾可形成较多的氧自由基,促使细胞分泌破坏能力较强的中性粒细胞弹性蛋白酶,致使肺弹力纤维分解、肺泡壁破坏,最终形成肺气肿,诱发 COPD。而 COPD 属一种受环境因素与遗传因素共同作用的多基因疾病,其发病具有家族聚集性,故 COPD 家族史也是 COPD 发生的独立危险因素。此外,个人呼吸道疾病史也是增加 COPD 患病风险的因素之一,既往有呼吸道疾病史可能会影响肺功能,加速 COPD 进程,推测与肺组织损伤、结构改变和肺顺应性降低有关。同时,有害气体或粉尘接触史也是 COPD 的重要危险因素,有害气体或职业性呼吸道粉尘的慢性暴露可诱发气道阻塞,引起 COPD。

本研究结果显示,携带 NRF2 基因 rs6706649 位点 CT、TT 基因型及 T 等位基因是世居喀什地区维吾尔族 COPD 发生的独立危险因素,与 Cui W 等^[13]报道相似。NRF2 广泛表达于肾脏、肺脏、肌肉等多个组

织,对多种抗氧化酶基因表达具有调控作用,参与COPD的发生及发展^[14]。生理情况下NRF2会结合胞浆蛋白分子伴侣Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1而存在于细胞浆中,活性呈相对抑制状态;一旦受外界刺激而出现氧化损伤时,其会与Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1解离,转移至细胞核内,并与抗氧化反应元件启动子区结合,调节下游抗氧化应激相关基因表达,维护机体免受氧化应激损伤。Kubo H等^[15]研究表明,NRF2基因敲除的小鼠吸烟所致肺气肿较野生型小鼠更为严重,可更早进展为肺气肿,出现更加严重的肺组织损害,提示NRF2参与了对抗机体氧化应激的过程。Chi Y等^[16]报道COPD病人支气管上皮细胞和肺泡巨噬细胞内NRF2 mRNA表达水平较正常人低,提示NRF2参与COPD的发病过程。NRF2参与的主要细胞信号传导通路有蛋白激酶、活化B细胞的核因子K-轻链增强子、磷酸肌醇-3-激酶、促分裂原活化蛋白激酶等细胞信号转导途径,推测NRF2可能通过参与这些途径诱导COPD的发生。而NRF2基因上存在诸多SNP位点。付聪丽等^[17]报道NRF2单核苷酸多态性与COPD肺功能FEV1水平相关。张宝华等^[18]认为rs6706649可能是阿尔茨海默病发病风险相关的SNP位点。笔者推测,携带NRF2基因rs6706649位点CT、TT基因型及T等位基因与世居喀什地区维吾尔族COPD显著相关,但关于该位点是如何对COPD的发生、发展产生作用,目前仍尚未清楚,今后仍需进行相关位点的功能研究,培养基因敲除鼠,经熏烟造模成COPD,行NRF2基因rs6706649位点蛋白基因层面研究,以便进一步了解COPD发病机制,为COPD防治提供思路。

综上所述,世居喀什地区维吾尔族人群COPD的发生不仅与年龄、吸烟史、饮酒史、COPD家族史、个人呼吸道疾病史、有害气体或粉尘接触史有关,还与NRF2基因rs6706649位点多态性密切相关,临床应引起足够重视。但本文由于选取病例数偏少,研究结果可能存在偏倚,故今后需作进一步深入研究。

参考文献

- [1]Riley CM, Sciruba FC. Diagnosis and outpatient management of chronic obstructive pulmonary disease: a review[J]. JAMA, 2019;321(8):786-797
- [2]廖佩花, 者炜, 刘来新, 等. 新疆监测点40岁及以上人群慢性阻塞性肺疾病患病情况及影响因素分析[J]. 中国慢性病预防与控制, 2018;26(8):576-579
- [3]Corlataeanu A, Mendez Y, Wang Y, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and phenotypes: a state-of-the-art[J]. Pulmonology, 2020;26(2):95-100
- [4]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
- [5]Ban WH, Kang HH, Kim IK, et al. Clinical significance of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Korean J Intern Med, 2018;33(4):745-752
- [6]Masoompour SM, Mohammadi A, Mahdaviad H. Adherence to the global Initiative for chronic obstructive lung disease guidelines for management of COPD: a hospital-base study[J]. Clin Respir J, 2016;10(3):298-302
- [7]唐雨萌, 李茜, 张岚, 等. 湖北省慢性阻塞性肺疾病流行病学调查及影响因素[J]. 中华疾病控制杂志, 2018;22(7):721-725
- [8]张雍, 汤洪秀, 周琦, 等. 重庆市渝中区成年居民慢性阻塞性肺疾病患病情况及影响因素研究[J]. 重庆医学, 2019;48(24):4226-4230
- [9]刘瀚旻, 陆权. 生命早期起源的慢性阻塞性肺病之研究[J]. 中华儿科杂志, 2019;57(4):244-247
- [10]罗琳琳, 喻杰, 郭韶梅, 等. 江西省中老年居民慢性阻塞性肺疾病患病情况及影响因素分析[J]. 中国公共卫生, 2019;35(11):1482-1486
- [11]张银娥, 吴婷婷, 马丽霞, 等. 宁夏监测点居民慢性阻塞性肺疾病流行特征及危险因素调查分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2018;22(3):231-234
- [12]邵英, 杨永芳, 秦明芳, 等. 云南省40岁及以上居民慢性阻塞性肺疾病流行情况及影响因素分析[J]. 现代预防医学, 2018;45(20):3654-3658
- [13]Cui W, Zhang Z, Zhang P, et al. NRF2 attenuates inflammatory response in COPD/emphysema: Crosstalk with Wnt3a/ β -catenin and AMPK pathways[J]. J Cell Mol Med, 2018;22(7):3514-3525
- [14]Bewley MA, Budd RC, Ryan E, et al. Opsonic phagocytosis in chronic obstructive pulmonary disease is enhanced by NRF2 agonists[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018;198(6):739-750
- [15]Kubo H, Asai K, Kojima K, et al. Exercise ameliorates emphysema of cigarette smoke-induced COPD in mice through the exercise-irisin-NRF2 axis[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2019;14(1):2507-2516
- [16]Chi Y, Di Q, Han G, et al. Mir-29b mediates the regulation of NRF2 on airway epithelial remodeling and Th1/Th2 differentiation in COPD rats[J]. Saudi J Biol Sci, 2019;26(8):1915-1921
- [17]付聪丽, 卞涛. 核转录因子E2相关因子2启动子CpG岛甲基化对其蛋白表达及COPD的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2017;37(19):1498-1502
- [18]张宝华, 武琪. NRF2基因启动子rs35652124,rs6706649和rs6721961位点单核苷酸多态性与阿尔茨海默病的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017;32(5):62-65