

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.12.1336

· 论 著 ·

载脂蛋白 M 基因单核苷酸多态性与慢性阻塞性肺疾病的相关性分析

乔莹莹¹, 周 军^{1*}, 罗光华²

1. 苏州大学附属第三医院呼吸内科, 常州 213003

2. 苏州大学附属第三医院综合实验室, 常州 213003

[摘要] **目的** 探讨载脂蛋白 M (*apoM*) 基因单核苷酸多态性 (SNP) 与慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的相关性, 以期为 COPD 高危人群的筛查、早期诊断及治疗提供依据。**方法** 采用碱基淬灭探针技术检测分析 256 例 COPD 患者 (COPD 组) 和 248 例健康对照 (对照组) 的 *apoM* 基因 rs805264、rs707922 及 rs707921 多态性位点。**结果** COPD 组和对照组 *apoM* 基因 rs805264、rs707922 及 rs707921 位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 (P 均 >0.05)。COPD 组 rs805264 位点的 AA 纯合子基因型频率低于对照组, GG+GA 基因型频率高于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.769$, $P=0.029$); COPD 组 rs707921 位点的 AA 纯合子基因型频率低于对照组, CC+CA 基因型频率高于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.769$, $P=0.029$); 两组 rs707922 位点的基因型频率分布差异无统计学意义 ($P>0.05$)。COPD 组和对照组 *apoM* 基因 rs805264、rs707922 及 rs707921 位点等位基因频率分布差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。rs805264 位点与 rs707921 位点及 rs707922 位点与 rs707921 位点呈强连锁不平衡 (D' 均 >0.8 , r^2 均 >0.8), rs805264 位点与 rs707922 位点呈完全连锁不平衡 ($D'=1.000$, $r^2=0.820$)。**结论** *ApoM* 基因 rs805264 和 rs707921 位点 SNP 可能与 COPD 的易感性有关, 而 rs707922 位点 SNP 可能与 COPD 无关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 载脂蛋白 M; 单核苷酸多态性; 碱基淬灭探针技术**[中图分类号]** R 563.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)12-1336-07

Association of apolipoprotein M gene single nucleotide polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease

QIAO Ying-ying¹, ZHOU Jun^{1*}, LUO Guang-hua²

1. Department of Respiratory Medicine, The Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, Jiangsu, China

2. Department of Integrated Laboratory, The Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To explore the association between single nucleotide polymorphism (SNP) of apolipoprotein M (*apoM*) gene and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), so as to provide evidence for screening early diagnosis and treatment of COPD in high-risk population. **Methods** The base-quenched probe technique was performed to determine and analyze the *apoM* gene SNP loci (rs805264, rs707922 and 707921) of 256 COPD patients (COPD group) and 248 healthy control participants (control group). **Results** The frequencies of *apoM* (rs805264, rs707922 and rs707921) genotypes of COPD patients and healthy control participants were found to be in genetic equilibrium according to the Hardy-Weinberg Law (all $P>0.05$). Compared with the control group, the frequency of rs805264 locus AA genotype was lower and the frequency of GG+GA combined genotype was higher in the COPD group, and the difference was significant ($\chi^2=4.769$, $P=0.029$). Compared with the control group, the frequency of rs707921 locus AA genotype was lower and the frequency of CC+CA was higher in the COPD group, and the difference was significant ($\chi^2=4.769$, $P=0.029$). However, there was no significant difference in the genotype frequency distribution of rs707922 locus between the two groups ($P>0.05$). There were no significant differences in the frequencies of alleles of *apoM* rs805264, rs707922 or rs707921 loci between the COPD and control groups (all $P>0.05$). The rs805264 and rs707921, and rs707922 and rs707921 showed strong linkage disequilibrium (both $D'>0.8$, both $r^2>0.8$); and rs805264 and rs707922 showed complete linkage

[收稿日期] 2018-04-24 **[接受日期]** 2018-08-02**[基金项目]** 江苏省前瞻性研究专项基金(BE2013629), 常州市卫生人才培养工程资助项目(2016ZCLJ002)。Supported by Special Foundation for Prospective Research of Jiangsu Province (BE2013629) and Health Talent Training Project of Changzhou (2016ZCLJ002)。**[作者简介]** 乔莹莹, 硕士, 住院医师。E-mail: qiaoying_1209@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0519-68870811, E-mail: zhouyfan@126.com

disequilibrium ($D' = 1.000$, $r^2 = 0.820$). **Conclusion** *ApoM* gene rs805264 and rs707921 loci may be associated with COPD susceptibility, while the rs707922 locus may not be associated with COPD.

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease; apolipoprotein M; single nucleotide polymorphism; base-quenched probe technique

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(12): 1336-1342]

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续气流受限为特征性疾病, 与气道和肺对有害颗粒和 (或) 气体的慢性炎症反应增强有关。据全球疾病负担研究 (The Global Burden of Disease Study) 估计, 2020 年 COPD 将位居全球死亡原因的第 3 位^[1]。

载脂蛋白 M (apolipoprotein M, apoM) 相对分子质量为 26 000, 属于脂质运载蛋白 (lipocalin) 超家族^[2]。*ApoM* 基因位于 6 号染色体组织相容性复合体 III 区, 非常靠近肿瘤坏死因子 α 和淋巴毒素基因, 该区存在很多与免疫反应有关的基因。*ApoM* 基因定位提示该基因可能与机体的免疫反应有关。Feingold 等^[3]研究表明, apoM 广泛参与机体的免疫炎症反应, 在感染和炎症反应时血清 apoM 水平发生改变。Burkart 等^[4]经 meta 分析后发现一些 apoM 侧翼单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点与肺功能和肺气肿相关。Li 等^[5]证明 COPD 患者血清 apoM 水平增高, 增高程度与 COPD 严重程度相关。我们推测 *apoM* 基因 SNP 与 COPD 易感性相关, 前期利用第二代测序技术筛选出 *apoM* 基因突变频率 >20% 的高可信突变位点 rs805264、rs707922 和 rs707921, 并认为其可能与 COPD 发病相关^[6]。本研究采用碱基淬灭探针技术检测并对比 COPD 患者和健康对照 *apoM* 基因 rs805264、rs707922 和 rs707921 位点的基因型频率和等位基因频率的分布差异, 初步探索 *apoM* 基因的 SNP 在部分人群中是否与 COPD 易感性存在联系, 为 COPD 的易感基因筛查提供实验室依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象 COPD 组为 2014 年 6 月至 2016 年 12 月就诊于苏州大学附属第三医院呼吸内科的 COPD 患者 256 例, 对照组为同期于苏州大学附属第三医院体检中心进行健康体检的健康人 248 例。COPD 组纳入标准: 符合 2016 年《慢

性阻塞性肺疾病诊治指南》^[7] COPD 诊断标准, 且第 1 秒用力呼气容积 (forced expiratory volume in one second, FEV₁) / 用力呼气容积 (forced vital capacity, FVC) < 0.7。对照组纳入标准: 经呼吸内科医师临床问诊及体格检查、胸部 X 线检查、肺功能检查均无异常。排除标准: 肺结核、支气管扩张、间质性肺疾病、哮喘等呼吸系统疾病, 严重肝、肾功能损伤等, 结缔组织疾病如类风湿性关节炎等, 各系统良恶性肿瘤等。本研究为回顾性病例对照研究, 所有入组者均遵循自愿参加原则并签署知情同意书, 研究方案通过苏州大学附属第三医院伦理委员会审批。

1.2 研究指标

1.2.1 人口学特征 收集患者的性别、年龄, 性别依据生理学特征分为男和女; 根据 COPD 发病特点, 纳入年龄为 40 岁及以上的符合纳入标准的研究对象。

1.2.2 吸烟史 有吸烟史定义为已吸烟 10 年及以上且每日吸烟 ≥ 20 支, 即吸烟指数 ≥ 200 支年。

1.2.3 COPD 综合评估 根据临床表现、慢性阻塞性肺疾病评估测试 (chronic obstructive pulmonary disease assessment test, CAT) 评分、改良的英国医学研究委员会呼吸困难量表 (modified British Medical Research Council dyspnea scale, mMRC) 评分、改良的每年加重次数将患者分为 4 组 (A 组、B 组、C 组、D 组)。A 组即症状少、风险低, CAT 评分 < 10 分, mMRC 评分 < 2 分, 每年加重次数 < 2 次; B 组即症状多、风险低, CAT 评分 ≥ 10 分, mMRC 评分 ≥ 2 分, 每年加重次数 < 2 次; C 组即症状少、风险高, CAT 评分 < 10 分, mMRC 评分 < 2 分, 每年加重次数 ≥ 2 次; D 组即症状多、风险高, CAT 评分 ≥ 10 分, mMRC 评分 ≥ 2 分, 每年加重次数 ≥ 2 次。

1.2.4 *ApoM* 基因 rs805264、rs707922 和 rs707921 位点的基因型及等位基因 rs805264 基因型为 GG、GA 和 AA, 等位基因为 G 和 A; rs707922 基因型为

GG、GT 和 TT，等位基因为 G 和 T；rs707921 基因型为 CC、CA 和 AA，等位基因为 C 和 A。

1.3 研究方法

1.3.1 DNA 抽提 所有受试者于禁食后空腹抽取外周静脉血 2 mL，乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝，-80 °C 保存。采用上海申能博彩生物科技有限公司 DNA 纯化试剂盒提取基因组 DNA，并于 -20 °C 保存。

1.3.2 ApoM 基因 SNP 检测 采用碱基淬灭探针技术检测 SNP。rs805264、rs707922 及 rs707921 位点的上游引物、下游引物和探针见表 1，其中下划线部分为突变位点。引物和探针均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。PCR 总反应体系为 25 μL，含 2 μL 模板 DNA、2.5 μL 10×缓冲液、1.5 μL 25 μmol/L MgCl₂、0.5 μL 4×dNTPs、0.25 μL 5 U/μL Taq DNA 聚合酶、17.95 μL ddH₂O、100 μmol/L 上下游引物各 0.1 μL 和 10 μmol/L 探针 0.1 μL。PCR 在德国罗氏公司 LightCycler® 480 型实时荧光定量 PCR 仪上进行。循环反应条件为 95 °C 变性 2 min，95 °C 2 s，60 °C 1 min，温度转换率均为 20 °C/s，共 40 个循环；扩增产物的熔解曲线分析条件为 95 °C 30 s、25 °C 4 min，逐渐升至 70 °C 时，温度转换率均为 0.1 °C/s，并持续收集荧光数据。

表 1 ApoM 基因 rs805264、rs707922 和 rs707921 位点引物和探针序列

Tab 1 Sequences of primers and probes of apoM gene rs805264, rs707922 and rs707921 loci

Primer/probe	Sequence (5'-3')
Forward primer 1	CTC TGC TCT ACT TCT ATG GTA TTA TCC TT
Reverse primer 1	CAG TCA AAA CAG CAA GAT TTA GGG
Forward primer 2	GCA TCT CTG TTC TCA TAC TTC TCC C
Reverse primer 2	CTC TTT TGA GTA GCC CAG AAC CC
Probe rs805264	AGG CTT CCC <u>CCA</u> ATC TCA GT-FAM
Probe rs707922	CAA GGT AAG <u>G</u> TG TTA AAA T-FAM
Probe rs707921	CAG GAT TAG GAC TCA <u>CCA</u> AGT CTT-FAM

The underlined part is the mutation site. Primer 1: The amplification primer of rs805264 locus; Primer 2: The shared amplification primer of rs707922 and rs707921 loci. ApoM: Apolipoprotein M; FAM: Carboxy-fluorescein

1.3.3 基因型判读 根据碱基淬灭探针技术结合熔解曲线分别对 rs805264、rs707922 和 rs707921 位点的基因型进行判别。碱基淬灭探针技术^[8]是一种

成本低、效率高、操作简便的单核苷酸检测技术，基本方法为参照待测 SNP 所在 DNA 序列设计并合成引物及探针，探针的一端标记 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, 6-FAM)，依据碱基淬灭荧光的原理，应用 PCR 技术结合熔解曲线的方法进行 SNP 分型。该方法仅需 1 对引物和 1 条单荧光标记的探针。标有荧光基团的寡核苷酸序列游离在反应体系中时发出强烈荧光，当它与互补序列配对时，荧光强度随之减弱。PCR 结束时，碱基淬灭探针与靶 DNA 序列在较低温度条件下 (如 30 °C 或 42 °C) 杂交 (图 1A 左)，6-FAM 发出的荧光被邻近的碱基 (A、T、C 或 G) 淬灭；当温度慢慢升高时探针熔解脱离靶 DNA (图 1A 右)，荧光急剧增加，不同等位基因间熔解温度有明显差异。在基因扩增检测仪上，纯合子标本会呈现单一熔解谷，不同等位基因的纯合子会在不同温度处各出现 1 个熔解谷，杂合子则可见 2 个熔解谷，由 1 个碱基错配而造成的温度漂移通常在 7 °C 左右，很容易识别。rs805264、rs707922、rs707921 位点基因分型的熔解曲线见图 1B~1D。

1.4 统计学处理 运用 Hardy-Weinberg 平衡检验检测样本的群体代表性，P>0.05 为该群体的基因型符合遗传学平衡定律，即样本具有群体遗传代表性。所有实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，COPD 组与对照组比较采用两独立样本 t 检验；基因型、等位基因频率等计数资料以例数和百分数表示，两组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料 256 例 COPD 患者中男 185 例、女 71 例，年龄为 (67.7±8.4) 岁。其中 A 组 98 例，男 74 例、女 24 例，年龄在 40~49 岁者 2 例、50~59 岁者 10 例、60~69 岁者 61 例、≥70 岁者 25 例，有吸烟史者 62 例，吸烟指数<200 支年者 36 例、200~400 支年者 10 例、>400 支年者 52 例。B 组 78 例，男 52 例、女 26 例，年龄在 40~49 岁者 1 例、50~59 岁者 8 例、60~69 岁者 38 例、≥70 岁者 31 例，有吸烟史者 40 例，吸烟指数<200 支年者 38 例、200~400 支年者 5 例、>400 支年者 35 例。C 组 16 例，男 9 例、女 7 例，年龄在 50~59 岁者 5 例、60~69 岁者 5 例、≥70 岁

者 6 例, 有吸烟史者 7 例, 吸烟指数 <200 支年者 9 例、200~400 支年者 1 例、>400 支年者 6 例。D 组 64 例, 男 50 例、女 14 例, 年龄在 40~49 岁者 2 例、50~59 岁者 7 例、60~69 岁者 24 例、≥70 岁者 31 例, 有吸烟史者 43 例, 吸烟指数 <200 支

年者 21 例、200~400 支年者 6 例、>400 支年者 37 例。248 名健康对照中男 173 名、女 75 名, 年龄为 (67.1±8.8) 岁, 有吸烟史者 159 名。两组间性别、年龄、吸烟史比较差异均无统计学意义 (P 均 >0.05), 具有可比性, 详见表 2。

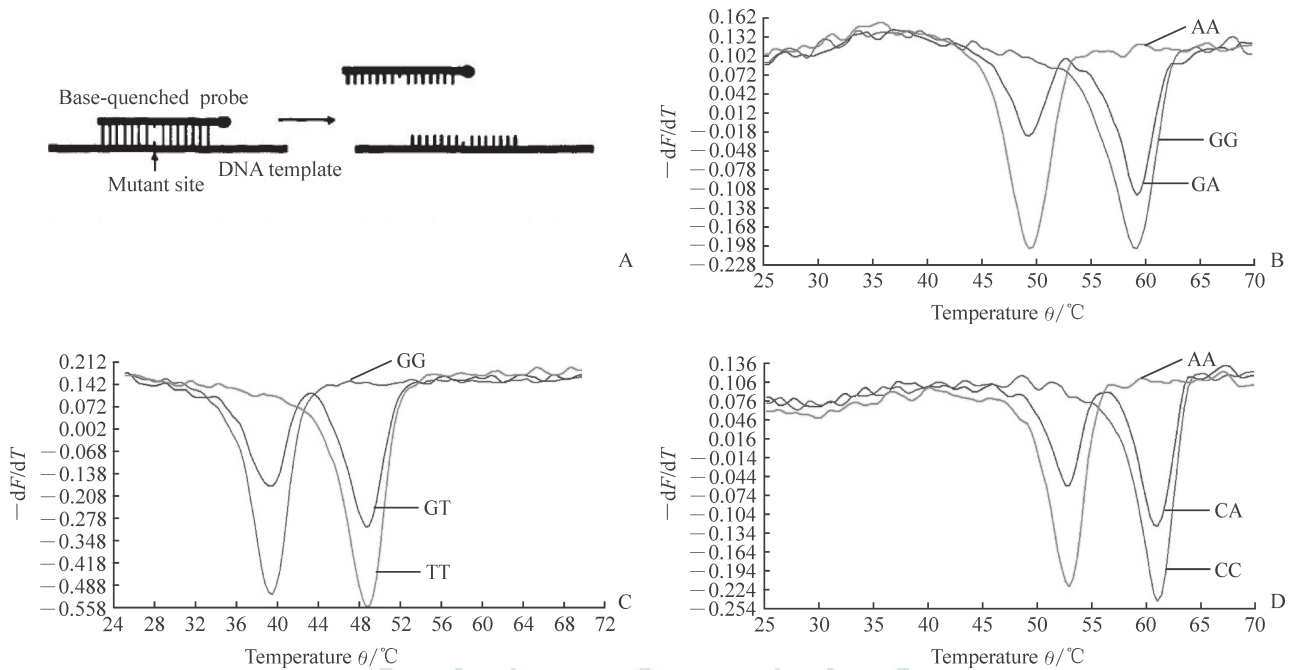


图 1 碱基淬灭探针技术检测 SNP 原理图和基因分型溶解曲线图

Fig 1 Schematic diagram of base-quenched probe technique detecting SNP and melting curves of SNP genotypes

A: Schematic diagram of base-quenched probe technique detecting SNP; B-D: Melting curves of rs805264, rs707922 and rs707921 genotypes, respectively. SNP: Single nucleotide polymorphism; F: Fluorescence

表 2 COPD 组及对照组的一般资料

Tab 2 General characteristics of COPD patients and healthy controls

Characteristic	COPD					Control N=248	χ^2 value	P value
	A group N=98	B group N=78	C group N=16	D group N=64	Total N=256			
Gender							0.385	0.535
Male	74	52	9	50	185	173		
Female	24	26	7	14	71	75		
Age (year)							7.064	0.070
40-49	2	1	0	2	5	1		
50-59	10	8	5	7	30	46		
60-69	61	38	5	24	128	112		
≥70	25	31	6	31	93	89		
Smoking history							1.197	0.274
Yes	62	40	7	43	152	159		
No	36	38	9	21	104	89		
Smoking index (cigarette-year)							1.301	0.522
<200	36	38	9	21	104	89		
200-400	10	5	1	6	22	21		
>400	52	35	6	37	130	138		

A, B, C and D grouping based on the clinical data of COPD patients, chronic obstructive pulmonary disease assessment test scores, modified British Medical Research Council dyspnea scale scores and exacerbation times yearly. COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

2.2 *ApoM* 基因型频率分布与 COPD 相关性分析 COPD 组和对照组 *apoM* 基因 rs805264、rs707922 及 rs707921 位点基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 (COPD 组 $\chi^2=3.46$ 、1.01、3.83, $P=0.063$ 、0.315、0.051; 对照组 $\chi^2=1.36$ 、1.05、0.68, $P=0.243$ 、0.307、0.410), 具有群体代表性。见表 3, COPD 组 rs805264 位点 GG、GA、AA 基因型频率分别为 190 (74.2%)、65 (25.4%)、1 (0.4%), 对照组分别为 186 (75.0%)、55 (22.2%)、7 (2.8%); COPD 组 rs707922 位点 GG、GT、TT 基因型频率分别为 181 (70.7%)、71 (27.7%)、4 (1.6%), 对照组分别为 175 (70.6%)、64 (25.8%)、9 (3.6%); COPD 组 rs707921 位点 CC、CA、AA 基因型频率分别为 188 (73.4%)、67 (26.2%)、1 (0.4%), 对照组分别为 182 (73.4%)、59 (23.8%)、7 (2.8%); 两组各位点 3 种基因型频率分布差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。进一步分析表明, COPD 组 rs805264 位点的 AA 纯合子基因型频率低于对照组, GG+GA 基因型频率高于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.769$, $P=0.029$), 表明 rs805264 位点 AA 纯合子基因型对 COPD 易感人群可能有一定保护作用; COPD 组 rs707921 的 AA 纯合子基因型频率低于对照组, CC+CA 基因型频率高于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.769$, $P=0.029$), 表明 rs707921 的 AA 纯合子基因型可能是 COPD 的保护性因素。

2.3 *ApoM* 等位基因频率分布与 COPD 相关性分析 COPD 组和对照组 *apoM* 基因 rs805264、rs707922、rs707921 位点等位基因频率分布差异均无统计学意义 (P 均 >0.05), 见表 4。

2.4 *ApoM* 基因 rs805264、rs707922、rs707921 位点的连锁不平衡分析 *ApoM* 基因 rs805264、rs707922、rs707921 位点连锁程度经 SHEsis 在线软件 (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) 分析, 结果 (表 5) 示 rs805264 位点与 rs707921 位点及 rs707922 位点与 rs707921 位点呈强连锁不平衡 (D' 均 >0.8 , r^2 均 >0.8); rs805264 与 rs707922 呈完全连锁不平衡 ($D'=1.000$, $r^2=0.820$)。且 rs805264 位点、rs707922 位点及 rs707921 位点的等位基因 G-G-C 及 A-T-A 紧密连锁。

表 3 COPD 组和对照组 *apoM* 基因型频率分布
Tab 3 Distribution of *apoM* gene genotype in COPD and control groups

Genotype	n (%)		χ^2 value	P value
	COPD N=256	Control N=248		
rs805264			5.250	0.072
GG	190 (74.2)	186 (75.0)		
GA	65 (25.4)	55 (22.2)		
AA	1 (0.4)	7 (2.8)	4.769	0.029
GG+GA	255 (99.6)	241 (97.2)		
rs707922			2.261	0.323
GG	181 (70.7)	175 (70.6)		
GT	71 (27.7)	64 (25.8)		
TT	4 (1.6)	9 (3.6)	2.141	0.143
GG+GT	252 (98.4)	239 (96.4)		
rs707921			4.979	0.083
CC	188 (73.4)	182 (73.4)		
CA	67 (26.2)	59 (23.8)		
AA	1 (0.4)	7 (2.8)	4.769	0.029
CC+CA	255 (99.6)	241 (97.2)		

ApoM: Apolipoprotein M; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

表 4 *ApoM* 等位基因频率分布与 COPD 相关性分析
Tab 4 Correlation analysis of *apoM* allele frequency distribution and COPD

Allele	n (%)		χ^2 value	P value
	COPD N=512	Control N=496		
rs805264			0.147	0.701
G	445 (86.9)	427 (86.1)		
A	67 (13.1)	69 (13.9)		
rs707922			0.228	0.633
G	433 (84.6)	414 (83.5)		
T	79 (15.4)	82 (16.5)		
rs707921			0.321	0.571
C	443 (86.5)	423 (85.3)		
A	69 (13.5)	73 (14.7)		

ApoM: Apolipoprotein M; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

表 5 *ApoM* 基因 rs805264、rs707922、rs707921 位点的连锁不平衡分析

Tab 5 Linkage disequilibrium analysis of *apoM* gene rs805264, rs707922 and rs707921 loci

SNP	D'	r^2
rs805264-rs707922	1.000	0.820
rs805264-rs707921	0.991	0.935
rs707922-rs707921	0.983	0.833

SNP: Single nucleotide polymorphism

3 讨论

COPD 的发病机制较为复杂, 且个体之间发病易感性差异较大。吸烟已被证实为 COPD 发病最主要的危险因素, 但流行病学研究发现仅有 10%~20% 的吸烟者发展为具有临床症状的 COPD^[9], 并且 COPD 和肺功能受损具有家族聚集倾向, 另外不同国家、不同民族 COPD 的发病率也不同^[10]。随着基因组学的深入研究及人类全基因组测序的完成, 从基因水平分析疾病发病机制及遗传易感性、揭示遗传因素与疾病的相关性成为研究者关注的焦点。本研究旨在通过对 *apoM* 基因 SNP 的研究, 进一步探索 COPD 患者的遗传背景, 为早期识别社区风险群体和发展新的个体化的治疗靶点提供依据。

组织病理学研究证实, COPD 患者细支气管和肺实质组织有明显的炎症反应, 肺实质损伤部位和支气管灌洗液中巨噬细胞、中性粒细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞过度增加^[11-12]。ApoM 由 Xu 和 Dahlbäck^[13] 在 1999 年发现, 主要存在于高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 中。研究证明了 *apoM*/HDL-胆固醇途径在 COPD 和肺气肿的发病机制中的新型效应, 较高水平的 HDL 与较低的 FEV₁/FVC 和肺气肿发病相关^[4]。ApoM/HDL 可能通过以下 3 个途径参与 COPD 尤其是肺气肿的发生和进展: (1) HDL 通过抑制肿瘤坏死因子刺激人类内皮细胞中鞘氨醇激酶的活性, 从而增加神经酰胺、降低鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 的水平^[4]。动物实验研究表明, 神经酰胺上调可以增加肺细胞凋亡和肺气肿型疾病的发生^[14]。(2) 血浆中 HDL-*apoM* 将 S1P 呈递给 S1P1 受体发挥内皮细胞保护作用^[15]。S1P 在维持肺血管内皮屏障完整性和抑制肺气肿的发病中起重要作用。(3) HDL 结合 α 1-抗胰蛋白酶可以抑制血管平滑肌细胞外基质的降解和细胞凋亡^[16]。研究认为, *apoM* 是一种负性急性时相反应蛋白, 发生全身炎症以及败血症时, *apoM* 基因表达减少^[3,17]。在慢性全身炎症过程中, *apoM* 作为先天性保护机制的一部分, 其基因表达可能会补偿甚至上调。在 COPD 患者中, *apoM* 可能通过其疏水性信号肽锚定在脂蛋白的表面, 完成在血清脂蛋白库内重新分布^[18]。Li 等^[5]

研究发现, COPD 患者中 *apoM* 表达增加, 且血清 *apoM* 水平与 FEV₁/FVC 呈负相关, 表明血清 *apoM* 是 COPD 发病的预测因素, 且气流阻塞和 *apoM* mRNA 水平呈反向关系。

ApoM 基因定位于 6 号染色体短臂 p21.31, 是单拷贝基因, 包括 6 个外显子和 5 个内含子。rs805264 定位于第 1 内含子, rs707922 和 rs707921 定位于第 5 内含子。本研究应用碱基淬灭探针技术检测 rs805264、rs707922 及 rs707921 位点的基因型, 发现 rs805264 位点 AA 与 GG+GA 基因型和 rs707921 位点 AA 与 CC+CA 基因型频率分布的差异均有统计学意义 (P 均=0.029), 提示 *apoM* 基因 rs805264 位点和 rs707921 位点与 COPD 易感性相关, 且 rs805264 位点和 rs707921 位点的 AA 基因型可能为 COPD 的保护性因素。COPD 组和对照组 rs707922 位点基因型频率和等位基因频率分布差异无统计学意义, 提示 rs707922 位点基因多态性与 COPD 易感性无关。其原因可能为:

(1) 该多态性位点定位于第 5 内含子, 但其对基因表达的影响与 rs805264 及 rs707921 不同;
(2) 本实验样本量不够大, 产生 II 型错误的可能性增加, 可能导致假阴性的结论。rs805264、rs707922 及 rs707921 位点 3 个基因座之间存在强连锁不平衡, 与韩秀杰和贾建平^[19]对中国北方汉族人 SNP 的连锁不平衡研究结果一致, 且 rs805264、rs707922 及 rs707921 位点的等位基因 G-G-C 及 A-T-A 紧密连锁。rs805264、rs707922 及 rs707921 位点均位于内含子, 说明 *apoM* 基因部分定位于内含子的多态性位点影响 COPD 易感性, 内含子上 SNP 位点可能会影响基因拼接及基因表达, 但其对基因产物产生何种影响尚不明确; 3 个多态性位点间的强连锁不平衡对其基因功能的影响也不明确。因此, 后续研究需要进一步增加样本量并结合更多影响因素对其进行分层分析和深入研究。

[参考文献]

- [1] MURRAY C J L, LOPEZ A D. Evidence-based health policy—lessons from the Global Burden of Disease Study[J]. Science, 1996, 274: 740-743.
- [2] DUAN J, DAHLBÄCK B, VILLOUTREIX B O. Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site-directed mutagenesis[J]. FEBS

- Lett, 2001, 499(1/2): 127-132.
- [3] FEINGOLD K R, SHIGENAGQ J K, CHUI L G, MOSER A, KHOVIDHUNKIT W, GRUNFELD C. Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 199: 19-26.
- [4] BURKART K M, MANICHAIKUL A, WILK J B, AHMED F S, BURKE G L, ENRIGHT P, et al. APOM and high-density lipoprotein cholesterol are associated with lung function and percent emphysema[J]. *Eur Respir J*, 2013, 43: 1003-1017.
- [5] LI H, LIU Y, WANG L, SHEN T, DU W, LIU Z, et al. High apolipoprotein M serum levels correlate with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15: 1-7.
- [6] YU Y, ZHANG J, QIAO Y, PAN L, LI J, MAO H, et al. Apolipoprotein M gene single nucleotide polymorphisms discovery in patients with chronic obstructive pulmonary disease and determined by the base-quenched probe technique[J]. *Gene*, 2017, 637: 9-13.
- [7] Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Scientific information and recommendations for COPD programs (Updated 2016)[DB/OL]. [2017-03-09]. <https://goldcopd.org>.
- [8] 张俊,罗光华,郑璐,张晓膺,徐宁. 单核苷酸多态性的碱基淬灭探针技术检测方法的建立[J]. *中华检验医学杂志*, 2009,32:1064-1068.
- [9] JEFFERY P K. Differences and similarities between chronic obstructive pulmonary disease and asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29 (Suppl 2): 14-26.
- [10] BUIST A S, MCBURNIE M A, VOLLMER W M, GILLESPIE S, BURNEY P, MANNINO D M, et al; BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study[J]. *Lancet*, 2007, 370: 741-750.
- [11] SEEMUNGAL T, HARPER-OWEN R, BHOWMIK A, MORIC I, SANDERSON G, MESSAGE S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164: 1618-1623.
- [12] SAETTE M, DI STEFANO A, TURATO G, FACCHINI F M, CORBINO L, MAPP C E, et al. CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(3 Pt 1): 822-826.
- [13] XU N, DAHLBÄCK B. A novel human apolipoprotein (apoM)[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 31286-31290.
- [14] PETRACHE I, NATARAJAN V, ZHEN L, MEDLER T R, RICHTER A T, CHO C, et al. Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice[J]. *Nat Med*, 2005, 11: 491-498.
- [15] ARKENSTEIJN B W, BERBÉE J F, RENSEN P C, NIELSEN L B, CHRISTOFFERSEN C. The apolipoprotein M-sphingosine-1-phosphate axis: biological relevance in lipoprotein metabolism, lipid disorders and atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 4419-4431.
- [16] ORTIZ-MUÑOZ G, HOUARD X, MARTÍN-VENTURA J L, ISHIDA B Y, LOYAU S, ROSSIGNOL P, et al. HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property[J]. *FASEB J*, 2009, 23: 3129-3139.
- [17] KUMARASWAMY S B, LINDER A, ÅKESSON P, DAHLBÄCK B. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes[J/OL]. *Crit Care*, 2012, 16: R60. doi: 10.1186/cc11305.
- [18] CHRISTOFFERSEN C, AHNSTRÖM J, AXLER O, CHRISTENSEN E I, DAHLBÄCK B, NIELSEN L B. The signal peptide anchors apolipoprotein M in plasma lipoproteins and prevents rapid clearance of apolipoprotein M from plasma[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 18765-18772.
- [19] 韩秀杰,贾建平. 中国北方汉族人群中载脂蛋白 M 基因多态性分布特征及连锁不平衡分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2007, 24: 350-353.

[本文编辑] 杨亚红