

β -烯醇化酶基因多态性与 COPD 骨骼肌萎缩的相关性

王祝君, 张剑青, 方利洲, 赵芝焕, 戴路明
(昆明医科大学第一附属医院呼吸内二科, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨 β -烯醇化酶基因的 2 个突变位点: rs121918403 (G/A)、rs121918404 (G/A) 的基因突变率与 COPD 骨骼肌萎缩的关系. **方法** 采用多聚酶链反应 (PCR) 及 DNA 单向直接测序的方法, 对昆明地区 120 例 COPD 患者和 60 例年龄匹配正常对照者的 2 个位点: rs121918403 (G/A)、rs121918404 (G/A) 及其附近位点进行分析. **结果** 在 COPD 患者和健康对照组中, rs121918403 (G/A)、rs121918404 (G/A) 2 个位点均未发生突变. **结论** β -烯醇化酶的 rs121918403 (G/A)、rs121918404 (G/A) 2 个突变位点的基因多态性与昆明地区 COPD 患者骨骼肌萎缩无相关性.

[关键词] β -烯醇化酶; 基因多态性; 慢性阻塞性肺疾病; 肌萎缩

[中图分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 12-0081-04

The Correlation between SNPs in Beta Enolase Gene and Skeletal Muscle Atrophy in patients with COPD

WANG Zhu-jun, ZHANG Jian-qing, FANG Li-zhou, ZHAO Zhi-huan, DAI Lu-min
(Dept. of Respiratory Medicine, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between beta enolase gene two point rs121918403 (G/A), rs121918404 (G/A) polymorphism with skeletal muscle Atrophy in the patient with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method** Beta enolase genes were assayed by polymerase chain and one-way directed sequencing methods between 120 COPD patients and 60 age-matched controls in Kunming. **Result** There was no mutation in rs121918403 (G/A) and rs121918404 (G/A) of beta enolase gene in COPD patients and healthy subjects. **Conclusion** SNPs of two mutational sites of beta enolase are not correlated to skeletal muscle atrophy in COPD patients in Kunming.

[Key words] Beta enolase; Gene polymorphism; Chronic obstructive pulmonary disease; Muscle atrophy

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 主要累及肺脏, 但也可引起全身 (skeletal muscle dysfunction, SMD) 的不良效应, 其中, 骨骼肌功能障碍尤为突出, 它直接影响运动功能^[1], 导致健康状况不佳^[2], 是预测医疗资源利用率和死亡率的独立因素^[3,4]. β -烯醇化酶是能量代谢中的重要同工酶, 是人类肌生成最早期的标志之一^[5]. 笔者先期的研究鉴定出了可能与 COPD 肌萎缩发生密切相关的 12 种蛋白, 其

中烯醇化酶表达上调^[6]. 随后的研究中发现, 在 COPD 骨骼肌萎缩患者中, β -烯醇化酶蛋白浓度与 β -烯醇化酶 mRNA 表达水平一致升高, 且较 COPD 骨骼肌非萎缩患者、健康人高, 由此说明在 DNA 层面上, β -烯醇化酶的调控机制不同, 推测可能存在 ENO3 基因单核苷酸多态性, 从而引起了骨骼肌代谢功能的紊乱. 本实验系探索性研究, 选择了昆明地区汉族人群为研究对象, 探讨 β -烯醇化酶基因的 2 个突变位点: rs121918403 (G/A)、

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FB171); 云南省卫生科技计划内设机构项目 (2011WS0055)

[作者简介] 王祝君 (1987~), 女, 云南保山市人, 在读硕士研究生, 主要从事呼吸科临床工作.

[通讯作者] 戴路明. E-mail: dailuming6622@hotmail.com

rs121918404 (G/A) 的基因突变率与 COPD 患者骨骼肌萎缩的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

所有患者都符合中华医学会呼吸分会慢性阻塞性肺疾病学组颁布的《慢性阻塞性肺疾病诊疗指南》(2013 年修订版) 诊断标准: 吸入支气管扩张剂后 FEV1/FVC < 70%, 并以 FEV1% 预计值来评估 COPD 严重程度, 所有患者近 3 周均未使用过全身性的激素。但允许吸入维持剂量的长效激素和(或) 支气管扩张剂 (B₂ 受体激动剂或胆碱能受体阻滞剂)。排除标准: COPD 患者伴有恶性肿瘤、哮喘、支气管扩张症、心功能衰竭、截瘫、最近外科手术、肝肾功能不全、内分泌功能障碍及免疫系统性疾病。按照上述标准, 最终纳入昆明地区 COPD 患者 120 例。60 例年龄相匹配的健康对照者均无亲戚关系, 均来自昆明地区。登记所有入选对象的基本资料, 包括年龄、性别、吸烟指数、体质指数 (body mass index, BMI)、无脂肪组织指数 (fat-free mass index, FFMI, 生物电阻抗法测定)、动脉氧分压 (PaO₂) 和肺功能 [FEV 占预计值的百分比 (FEV1%)、1 s 用力呼气量占用力肺活量比值 (FEV1/FVC%)]; 对 COPD 患者, 以 BMI > 21 kg/m² 和 BMI ≤ 21 kg/m², 且男性以 FFMI > 16 kg/m² 和 FFMI ≤ 16 kg/m², 女性以 FFMI > 15 kg/m² 和

FFMI ≤ 15 kg/m² 的 COPD 组患者分为萎缩组和非萎缩组。一般情况及相关检查, 见表 1。

1.2 方法

DNA 的提取, 取外周全血 3 mL, EDTA-Na₂ 抗凝, -80℃ 冰箱保存 (不超过 6 个月)。冰冻血块室温解冻后, 采用血液基因组 DNA 抽提试剂盒 (康为), 严格按说明操作, 提取外周血白细胞 DNA。所提 DNA 放入 -80℃ 冰箱中保存备用。

β 烯醇化酶基因多态性分析在 PUBMED 上查出 β 烯醇化酶基因全序列。2 个突变位点相邻。采用普通聚合酶链反应 (PCR) 方法, 用 Primer Premier 设计引物, rs121918403 (G/A) 引物: 上游引物 ENO3-F: TCCACCCCAACACCCCGCC - CCTG, 下游引物 ENO3-R: CCATACTTGGCCTT - GATGACCCCT, rs121918404 (G/A) 引物: 上游引物 ENO3-F2: CCCTGCAGAGTGCTTGCTACCC - AAA, 下游引物 ENO3-R2: AGAATTTGGAGGGT - TAGGTGAGGCT; 扩增体系: DNA 2 μL, 上下游引物各 2 μL; 高保真 EXTaq 酶 0.5 μL; 10 × Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL; dNTP 1 μL; 加 ddH₂O 到总体积 25 μL。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 60 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 35 个循环后延伸 5 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析, rs121918403 (G/A) 和 rs121918404 (G/A) 目的条带分别于 240 bp 和 352 bp 处显影, PCR 产物外送上海生工进行 DNA 直接单向测序, 对基因多态性位点进行检测。

表 1 一般情况及相关检查 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The general data and related examination results ($\bar{x} \pm s$)

项 目	COPD 非萎缩组	COPD 萎缩组	正常对照组
性别 (男 / 女)	63(41/22)	57(38/19)	60(39/21)
年龄 (岁)	72.27 ± 10.45	74.03 ± 9.57	73.15 ± 8.25
吸烟指数	363 ± 22.00	374 ± 49.50	319 ± 33.00 ^{△*}
身高 (cm)	165.54 ± 10.20	163.52 ± 6.67	166.35 ± 8.48
体重 (kg)	62.37 ± 5.72	53.30 ± 9.60 [*]	64.17 ± 7.94 [△]
BMI (kg/m ²)	23.91 ± 1.47	19.32 ± 1.58 [*]	24.71 ± 2.78 [△]
去脂肪指数 (kg/m ²)	18.62 ± 1.98	13.79 ± 0.86 [*]	19.71 ± 1.66 [△]
FEV1/FVC%	54.44 ± 5.04	49.78 ± 4.47	77.90 ± 7.34 ^{△*}
FEV1/PRE	43.23 ± 15.30	37.16 ± 9.89	92.58 ± 15.51 ^{△*}
PaO ₂ (KPa)	9.10 ± 1.07	7.84 ± 1.10	10.49 ± 0.82 ^{△*}
PaCO ₂ (KPa)	4.86 ± 0.69	4.51 ± 0.46	5.24 ± 0.57 ^{△*}
股四头肌周径 (cm)	42.5 ± 4.7	36.6 ± 3.3 [*]	42.8 ± 3.7 [△]

与非萎缩组比较, *P < 0.05; 与萎缩组比较, [△]P < 0.05。

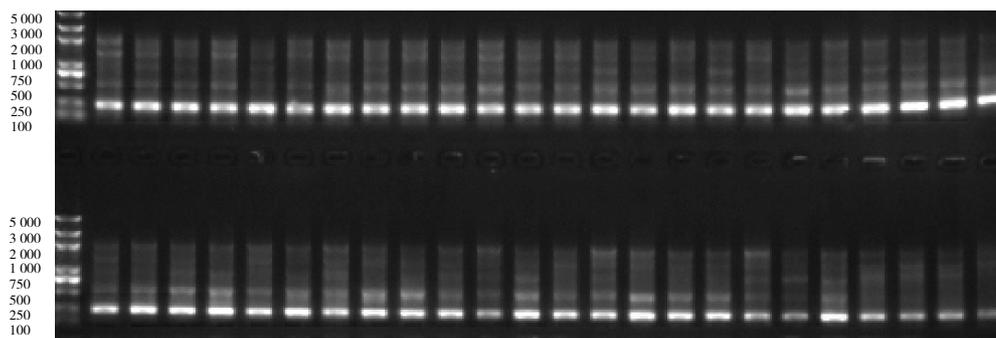


图 1 部分样本的 ENO3 基因

Fig. 1 ENO3 gene in some samples

4858288..4858648 rs121918403 的 PCR 结果电泳图. 目的条带在 240bp 位置

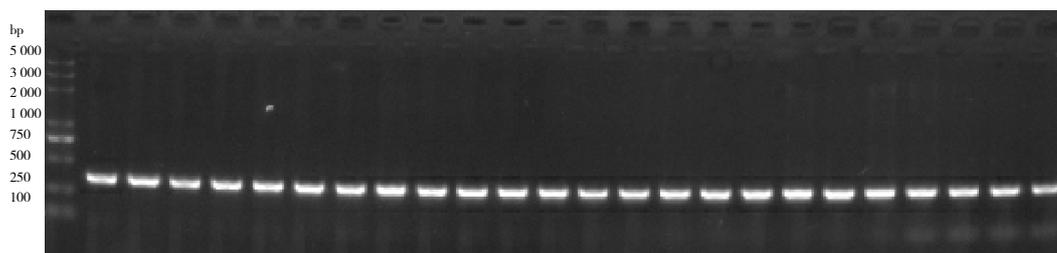


图 2 部分样本的 ENO3 基因

Fig. 2 ENO3 gene in some samples

4859760.4860111 rs121918404 的 PCR 结果电泳图. 目的条带在 352 bp 位置

1.3 统计学方法

采用 SPSS 软件包对数据进行统计处理, 数据用均数 \pm 标准差表示. 两组数据比较用独立样本均数 t 检验, 多组均数比较应用单因素方差分析; 3 组间的基因型与等位基因频率分布比较采用 χ^2 检验, 以 Hardy-Winberg 平衡法检验各组基因频率群体代表性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

经过实验, 扩增出所需目的片段, 共成功测序 180 例. 经比对, 在 COPD 患者骨骼肌萎缩组、COPD 患者骨骼肌非萎缩组和健康对照组中, rs121918403 (G/A)、rs121918404 (G/A) 两个位点均未发生突变, 均为 G, 提示均为 GG 型纯合子. 所以未对 3 组间基因型和等位基因进行比较.

3 讨论

慢性阻塞性肺疾病的肺外表现近年来被认为与 COPD 的发病率和死亡率密切相关, 其中骨骼肌功能障碍尤为突出, 发生于 COPD 的各个时期, 即使进行低强度运动, 患者的耐力仍然是下降的

^[7], 在 III 期骨骼肌功能障碍的发生率为 31%, IV 期上升为 38%^[8], I/II 期患者的骨骼肌细胞水平、分子水平都发生了改变^[9]. β -烯醇化酶参与肌修复和肌再生, 主要分布于骨骼肌和心肌. 由 β -烯醇化酶基因 (ENO-3 基因) 编码, 该基因位于 17 号染色体短臂上, 17p13.2, 包括 12 个外显子, 第一个外显子包含了未翻译序列, 编码由 433 个氨基酸残基构成的蛋白质, 即 β -烯醇化酶, 从而发挥相应的生物学作用.

β -烯醇化酶的低氧应答发生在一个保守的富含 GC 的启动子区域上, GC 盒可与转录激活蛋白 Sp1 和 Sp3 结合, Sp3 的过度表达可抑制 β -烯醇化酶的启动子. 低氧可导致 Sp3 逐渐耗竭, 而 Sp1 蛋白水平却未发生变化^[10]. 当 COPD 患者 β -烯醇化酶 GC 盒发生突变或缺失后, 不能与 Sp 蛋白结合, 失去了启动子功能, 导致基本的有氧表达减少, 低氧应答消失^[10], 不能以糖酵解途径产生足够的 ATP 以补偿机体能量的不足, 导致蛋白质合成代谢降低, 从而骨骼肌发生萎缩.

目前, COPD 骨骼肌萎缩发病机制研究中, 已有研究者发现血管紧张素转换酶 (ACE)、维生素 D 受体的基因多态性与 COPD 骨骼肌功能障碍有关. 而先期我们的研究发现, β -烯醇化酶表达上调导致 COPD 骨骼肌不同表型产生, 笔者推测究

其根本原因在于 β -烯醇化酶基因的多态性。本实验所选 2 个突变位点与糖原储积病 XIII 型有关, COPD 骨骼肌萎缩患者由于慢性缺氧、骨骼肌类型转换的原因, 其依靠无氧糖酵解获能的肌纤维数量增加, 此类肌纤维极易疲劳, 耐力差, ATP 消耗率高, 与糖原储积病 XIII 型患者的临床表现相似, 且 β -烯醇化酶皆为导致其骨骼肌代谢异常的关键酶。本研究证实, 上述 2 个突变位点在昆明地区汉族人群突变概率低, 与 COPD 骨骼肌萎缩无明显关系。需要进一步筛查 β -烯醇化酶基因的其他突变位点的多态性与 COPD 患者骨骼肌萎缩的关系。

[参考文献]

- [1] GOSSELINK R, TROOSTERS T, DECRAMER M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153 (3): 976 - 980.
- [2] SIMPSON K, KILLIAN K, MCCARTNEY N, et al. Randomised controlled trial of weightlifting exercise in patients with chronic airflow limitation [J]. *Thorax*, 1992, 47(2): 70 - 75.
- [3] DECRAMER M, GOSSELINK R, TROOSTERS T, et al. Muscle weakness is related to utilization of health care resources in COPD patients [J]. *Eur Respir J*, 1997, 10(2): 417 - 423.
- [4] SWALLOW E B, REYES D, HOPKINSON N S, et al. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Thorax*, 2007, 62(2): 115 - 120.
- [5] FOUGEROUSSE F, EDMOND-VOVARD F, MERKULOVA T, et al. The muscle-specific enolase is an early marker of human myogenesis [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2001, 22 (6): 535 - 544.
- [6] 郭巍, 傅炜萍, 杨玉, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者外周骨骼肌萎缩蛋白质组初步分析 [J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(14): 948 - 951.
- [7] CORONELL C, OROZCO-LEVI M, MENDEZ R, et al. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD [J]. *Eur Respir J*, 2004, 24(1): 129 - 136.
- [8] SEYMOUR J M, SPRUIT M A, HOPKINSON N S, et al. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity [J]. *Eur Respir J*, 2010, 36(1): 81 - 88.
- [9] OTTENHEIJM C A, HEUNKS L M, DEKHUIJZEN R P. Diaphragm adaptations in patients with COPD [J]. *Respir Res*, 2008, 9(1): 12.
- [10] DARYL J, DISCHER, NANETTE H, et al. Peterson, and Keith A. Webster. Hypoxia regulates β -enolase and pyruvate kinase-m promoters by modulating sp1/Sp3 binding to a conserved GC element [J]. *J Biological Chemistry*, 1998, 273: 26 087 - 26 093.

(2014 - 09 - 02 收稿)