

• 流行病学研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0854-03

## 老年人血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与其 基因型、性别和年龄的关系

张绍艳<sup>1</sup>, 王滨有<sup>2</sup>

(1. 苏州大学放射医学与公共卫生学院, 江苏省苏州市 215123;

2. 哈尔滨医科大学公共卫生学院流行病学教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150081)

[关键词] 流行病学; 脂蛋白相关磷脂酶 A2; 血小板活化因子; 乙酰水解酶; 单核苷酸多态性; 动脉粥样硬化; 影响因素; 活性

[摘要] 目的 研究血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因、性别和年龄等因素的关系。方法 应用聚合酶链反应技术和分光光度法, 检测 1 867 例 50 岁以上老年人的脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因 G994T 的多态性及血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性。结果 不同的脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因型血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性差异存在显著 ( $P < 0.001$ ), GG 基因型活性最高, GT 次之, TT 最低; GG 和 GT 基因型中, 男性血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性显著高于女性 ( $P < 0.001$ ), 吸烟者酶活性显著高于不吸烟者 (GG 与 GT 基因型中分别为  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ); 在 GG 基因型中, 男性脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性随年龄升高, 在 GT 基因型中随年龄降低。结论 血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与基因型密切相关; 男性脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性高于女性, 本研究中这种差异与吸烟有关; GG 基因型中男性活性增高可能是一种对随年龄增长的血小板活化因子或氧化磷脂的应激反应的代偿机制, 而这种代偿机制在 GT 中不明显。

[中图分类号] R18

[文献标识码] A

### Correlations Between Plasma Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity And Genotype, Sex and Age

ZHANG Shao-Yan<sup>1</sup>, and WANG Bin-You<sup>2</sup>

(1. Department of Epidemiology, School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Department of Epidemiology, Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein-associated Phospholipase A2; platelet-activating factor acetylhydrolase; Single Nucleotide Polymorphisms; Atherosclerosis; Influencing Factors; Activity

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate effects of the G994T, sex, and age on the lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity. **Methods** Genotyping of the G994T was done by the allele-specific PCR. The Lp-PLA2 activity was measured using a commercial kit by the spectrophotometric method. **Results** The Lp-PLA2 levels were significantly higher in GG subpopulation, as compared to GT population and TT population. The Lp-PLA2 activity was correlated with sex. We found that, in men with the GG genotype, enzyme activity increased significantly with age. In contrast, plasma Lp-PLA2 activity in men with the GT genotype did not significantly increase with age. **Conclusions** The G994T was strongly correlated with the enzyme activity. The Lp-PLA2 activity in men was higher than that in women. Plasma PAF-AH activity may increase in response to stresses induced by PAF and/or oxidized phospholipids. This compensatory response may be attenuated or not evident in individuals with the m allele.

脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 是一种不依赖于钙存在的磷脂酶 A2, 主要由单核细胞和巨噬细胞合成<sup>[1]</sup>。血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 被认为是许多病理过程包括炎症反应及血栓形成的化学

递质, Lp-PLA2 通过水解作用除去 PAF 分子 sn-2 位上的短乙酰基团, 生成 lyso-PAF 而使 PAF 灭活, Lp-PLA2 也可水解氧化磷脂生成溶血卵磷脂 (lyso-PC)<sup>[2]</sup>。近来流行病学研究表明 Lp-PLA2 酶的活性是冠心病和缺血性中风的独立危险因素<sup>[3,4]</sup>。目前对于 Lp-PLA2 活性的影响因素的研究很少, 而且大部分是在白种人中进行, 也没有估计到基因型的影响, 因而作者认为有必要在老年人中进行血浆 Lp-PLA2 活性与基因型、性别、年龄关系的研究。

[收稿日期] 2007-01-15 [修回日期] 2007-11-20

[作者简介] 张绍艳, 博士, 副主任医师, 主要从事慢性病分子流行病学研究, 联系电话为 13862004376, E-mail 为 zhangsy829@sina.com.cn。通讯作者王滨有, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为先天疾病分子流行病学和新发传染病流行病学。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

1 867 例(男 1 003 例,女 864 例)来源于 1995~2003 年间来日本岛根大学进行健康体检的 50 岁以上人群,吸烟状况通过询问获得。空腹状态收集静脉血,检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC),通过 Friedewald 公式计算低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。休息 15 min 后测量血压 3 次,取其平均值。

### 1.2 血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因型的检测

从外周血提取 DNA,通过等位基因特异性聚合酶链式反应检测 Lp-PLA2G994T 基因型<sup>[5]</sup>,针对血浆型 Lp-PLA2 基因第 9 外显子及其正常等位基因,使用四条引物 T1, G1, PAFAH1 和 PAFAH2,引物 1 和引物 2 特异性扩增血浆 Lp-PLA2 基因全部第 9 外显子, PAFAH1 和 G1 特异性扩增正常等位基因, PAFAH2 和 T1 特异性扩增突变等位基因。第 9 外显子扩增片段为 396 bp,正常和突变等位基因片段分别为 186 bp 和 237 bp。

为进一步证实基因型检测的准确性,随机抽取 60 个 DNA 样本,采用限制性片段多态性的方法,使用引物 1 和引物 2 进行扩增,所得 PCR 产物进行 MaeII 消化(fermentas, burlington, canada),消化后的产物行琼脂凝胶电泳。

### 1.3 脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性的测定

血浆样本储存于 -80 °C,检测前取出自然融解,使用试剂盒(Azwell Inc, 大阪, 日本)检测血浆中 Lp-PLA2 活性,该试剂盒以 1-十四酰-2-(4 磷酸硝基琥珀酰)卵磷脂为底物,酶的活性以 IU/L 表示。

### 1.4 统计分析

临床参数比较应用 SPSS 11.0 版本软件包中方差分析或  $\chi^2$  检验,等位基因频率和基因型分布应用  $\chi^2$  检验进行比较,活性的性别分布及各基因型中吸烟与活性关系比较应用方差分析及 95% 的可信区间(confidence interval, CI)表示。以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

### 1.5 质量控制

包括对调查员培训、实验室工作人员培训、仪器的标定及调查表的核实等方面的质量控制。

## 2 结果

### 2.1 研究对象的基本情况

1 867 例研究对象中,GG、GT 和 TT 的基因型分别为 1 274 例(68.2%),542 例(29.0%)和 51 例(2.8%)。突变基因频率为 0.17。研究人群年龄为  $58.5 \pm 8.0$  岁,体质指数为  $23.3 \pm 2.9$ ,平均血压为  $100.9 \pm 13.7$  mmHg,空腹血糖为  $5.94 \pm 1.40$  mmol/L,总胆固醇  $5.47 \pm 0.88$  mmol/L,高密度脂蛋白为  $1.59 \pm 0.42$  mmol/L,低密度脂蛋白为  $3.26 \pm 0.82$  mmol/L,甘油三酯为  $1.30 \pm 0.69$  mmol/L,且各基因型之间上述指标差异无显著性。血浆 Lp-PLA2 活性和 G994T 基因型密切相关,GG 基因型的酶活性最高,为  $442.4 \pm 108.9$  IU/L;其次为 GT,为  $243.7 \pm 55.5$  IU/L;TT 基因型的酶活性最低为  $48.5 \pm 19.4$  IU/L。不同的基因型血浆 Lp-PLA2 活性差异存在显著性( $P < 0.001$ )。

### 2.2 血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与性别的关系

在 GG 和 GT 基因型中,男性血浆 Lp-PLA2 活性显著高于女性(表 1),TT 基因型的个体,几乎无活性,性别和 Lp-PLA2 活性也无关联。在 GG 和 GT 基因型中吸烟人群的血浆 Lp-PLA2 活性高于不吸烟人群( $P < 0.05$ ,表 2),提示引起男女血浆 Lp-PLA2 活性差异可能与吸烟有关。

表 1. 不同基因型血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性的性别分布 ( $\bar{x} \pm s$ , IU/L)

基因型	男		女	
	n	活性	n	活性
GG	631	455.7(447.0~464.3)	571	427.7(419.0~436.3)
GT	287	252.5(245.6~259.4)	224	232.5(226.2~238.9)
TT	25	47.3(40.3~54.2)	23	49.8(40.3~59.3)

表 2. 调整年龄后吸烟与血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性的关系 ( $\bar{x} \pm s$ , IU/L)

基因型	GG		GT		TT	
	n	活性	n	活性	n	活性
不吸烟	699	434.4(426.5~442.3)	275	239.2(232.4~245.9)	27	49.7(41.5~57.8)
吸烟	465	452.7(442.6~462.8)	214	250.8(243.5~258.1)	18	49.9(40.9~58.9)

### 2.3 血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与年龄的关系

在 GG 和 GT 基因型亚群中,各年龄组中男性血浆 Lp-PLA2 活性均高于女性。在 GG 基因型亚群中男性血浆活性随年龄增长而升高,GT 基因型亚群中男性血浆活性不随年龄增长。GG 和 GT 基因型中女性均无明显趋势(表 3)。

表 3. GG 和 GT 基因型中男女血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与年龄的关系 ( $\bar{x} \pm s$ , IU/L)

年龄 (岁)	GG		GT	
	男	女	男	女
50~	450.8±106.7	419.3±99.3	255.9±57.1	227.4±42.5
60~	461.5±114.5	440.6±110.7	250.2±64.0	242.3±55.0
70~	478.8±133.0	420.1±110.7	226.8±47.5	219.2±45.1

### 3 讨论

Lp-PLA2 基因位于染色体 6p12p22.1,长 45 kb,由 12 个外显子组成。Stafforini 等<sup>[6]</sup>已证实人类第 9 外显子 994 位核苷酸存在点突变,即 GT 的碱基替换,使相应的遗传密码 GUU 变为 UUU,导致第 279 位的缬氨酸残基被苯丙氨酸残基取代,由此引起酶的活性缺乏。日本人中该基因突变杂合子人群占 27%,纯合子 4%<sup>[5]</sup>,这进一步证明单核苷酸多态性在日本人中比白种人更常见<sup>[6]</sup>。现阶段的研究表明血浆 Lp-PLA2 活性受基因和环境因素的影响,基因型影响血浆 Lp-PLA2 活性,GG 基因型中活性最高,GT 基因型中活性次之,TT 基因型中几乎无活性,可见,Lp-PLA2 基因突变使酶活性降低或缺乏,导致 PAF 在血浆或组织中聚集,从而延长了 PAF 的生物学作用。

血浆 Lp-PLA2 活性在 GG 和 GT 基因型中男性明显高于女性,而在 TT 基因型中几乎无活性也没有明显差异。本研究表明在老年人中此种性别差异与吸烟有关,吸烟可增加血浆 Lp-PLA2 活性。

血浆 Lp-PLA2 活性升高是对 PAF 或氧化磷脂所致的应激的反应,PAF 和氧化磷脂随年龄增长而累积升高,此结果和过去的发现一致,血浆 Lp-PLA2 活性产物由 PAF 刺激而反应性升高,而这种代偿性的反应在 T 等位基因的个体中会被减少或不明显,因而表现出在 GG 基因型中随年龄的升高,而在 GT 基因型中随年龄的降低,可能这种代偿机制男性要高于女性。这些发现提示血浆 Lp-PLA2 活性在保护血

管壁抵抗与老龄有关的 PAF 或氧化磷脂引起的应激起着重要作用。

血小板活化因子(PAF)参与了脑梗死的发病,是动脉粥样硬化形成的启动因子<sup>[7]</sup>。血浆 Lp-PLA2 活性具有两方面的作用,一方面水解介导炎症的 PAF 介质和氧化磷脂而具有抵抗动脉粥样硬化的作用,另一方面由此产生的氧化自由脂肪酸和 lyso-PC 又是炎症递质,可加速动脉粥样硬化的进程。大量的文献已经指出了 lyso-PC 的动脉粥样硬化和炎症前的作用<sup>[8]</sup>。最近在白种人中的流行病学研究表明较高的血浆 Lp-PLA2 活性是冠状动脉疾病和脑中风的危险,这是可能较高的 Lp-PLA2 活性释放更多的 lyso-PC 和氧化脂肪酸;而在日本人群中的研究表明较低的血浆 Lp-PLA2 活性易得脑中风<sup>[9]</sup>和冠心病<sup>[10]</sup>,由此可假设 Lp-PLA2 活性过高或过低都会对动脉粥样硬化不利。总之,此项研究为进一步进行临床和流行病学研究具有重要意义。

#### [参考文献]

- [1] 刘甲兴,郑兴. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (3): 274-276.
- [2] Zalewski A, Macphee C. Role of Lipoprotein Associated Phospholipase A2 in Atherosclerosis: Biology, Epidemiology, and Possible Therapeutic Target [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (5): 923-931.
- [3] Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, et al. Lipoprotein associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [J]. *Circulation*, 2004, 109 (7): 837-842.
- [4] Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE, et al. Lipoprotein associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [J]. *Arch Intern Med*, 2005, 165 (21): 2479-484.
- [5] Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) [J]. *Prog Lipid Res*, 2003, 42 (2): 93-114.
- [6] Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency: a missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97 (12): 2784-794.
- [7] Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30 (Suppl 5): S294-301.
- [8] Sudhir K. CLINICAL REVIEW: lipoprotein associated phospholipase A2, a novel inflammatory biomarker and independent risk predictor for cardiovascular disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (5): 3100-105.
- [9] Hiramoto M, Yoshida H, Imaizumi T, Yoshimizu N, Satoh K. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279>Phe) is a genetic risk factor for stroke [J]. *Stroke*, 1997, 28 (12): 2417-420.
- [10] Yamada Y, Yoshida H, Ichihara S, Imaizumi T, Satoh K, Yokota M. Correlations between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and PAF-AH genotype, age, and atherosclerosis in a Japanese population [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 150 (1): 209-216.

(此文编辑 李小玲)