

## · 专题交流 ·

## 上海市正常人群血清丁酰胆碱酯酶基因多态性研究

郑捷, 周志俊

(复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

**摘要:** 目的 描述上海市正常人群血清丁酰胆碱酯酶基因型的多态分布特点, 为其他研究提供基线资料。方法 选取 100 例无有机磷接触、无急慢性肝病和慢性消耗性疾病的正常人群, 应用 PCR-RFLP 法确定基因型。结果 丁酰胆碱酯酶 K (BCHE-K) 变异的 3 种基因型 UU、UK 和 KK 在正常人群中的频率分别为 74%、25% 和 1%; 等位基因 U、K 在正常人群中的频率分别为 86.5% 和 13.5%。遗传平衡检验发现其达到 Hardy-Weinberg 遗传平衡。结论 上海市正常人群的 BCHE-K 位点的多态分布与欧美人群接近。

**关键词:** 丁酰胆碱酯酶; 多态性; 基因频率; 等位基因频率

**中图分类号:** R394.3; Q34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2003)06-0346-02

## Study on serum butyrylcholinesterase gene polymorphism in healthy population of Shanghai

ZHENG Jie, ZHOU Zhi-jun

(School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract: Objective** To describe features of serum butyrylcholinesterase gene polymorphism in normal healthy population in Shanghai and to provide basis for other studies. **Method** One hundred of healthy people without exposure to organic phosphorous or histories of acute and chronic liver disease and chronic wasting disease were selected in Shanghai. Their genotype was determined with PCR-RFLP. **Result** Frequency of three variants of butyrylcholinesterase gene K (BCHE-K) polymorphism was 74%, 25% and 1% for UU, UK and KK, respectively in healthy people. Frequency of allele U and K was 86.5% and 13.5%, respectively in them, attaining the Hardy-Weinberg equilibrium. **Conclusion** Polymorphic distribution of serum butyrylcholinesterase gene K focus was similar to that in Caucasian people.

**Key words:** Butyrylcholinesterase; Polymorphism; Genotype frequency; Allele frequency

丁酰胆碱酯酶又称拟胆碱酯酶、假性胆碱酯酶和血清胆碱酯酶。它是由肝脏细胞合成分泌进入血液的, 主要分布在肝脏、血清和淋巴液中<sup>[1]</sup>。

丁酰胆碱酯酶蛋白为四聚体, 四个亚基的结构完全一样, 各包括 574 个氨基酸, 这些氨基酸的相对分子质量为 65 092。每个亚基还结合有 9 条糖链, 占亚基相对分子质量的 23.9%<sup>[2]</sup>。丁酰胆碱酯酶属于 B 酯酶, 在有机磷中毒解毒中发挥了重要作用, 通过和有机磷结合, 减少了血中可和乙酰胆碱酯酶结合的游离的有机磷, 从而减轻乙酰胆碱堆积造成的中毒症状, 起到了间接的解毒作用, 这种作用被称为“Scavenger”<sup>[3]</sup>。其次, 丁酰胆碱酯酶还和一些疾病, 如老年痴呆症等相关。其基因多态和有机磷中毒程度及这些疾病的发病易感等有密切关系。因此了解其基因多态在人群中的分布情况具有重要的现实意义。

丁酰胆碱酯酶基因 BCHE 位于 3 号染色体 3q21~25 区, 长度至少 73 kb, 包含 4 个外显子和 3 个内含子<sup>[4]</sup>。目前, 发现 BCHE 具有多种变异体, 其中研究最多的是非典型变异 (A) 和 K 变异。东方人中 A 变异发生频率很低, 平均为 0.000 2 甚

至为零。K 变异是发生频率最高的一种变异, 东方人中其等位基因频率是 13%<sup>[2]</sup>。因此我们描述上海市正常人群 K 变异的分布特征, 获得正常人群的本底资料, 以与其他地区、其他人种进行比较。

## 1 研究对象

上海某厂职工 100 人 (男 82 人, 女 18 人), 汉族, 年龄 20~52 岁, 个体间无血缘关系, 无有机磷农药接触史, 无急慢性肝病。

## 2 内容与方法

## 2.1 样本采集

清晨空腹静脉采血, 不加抗凝剂, 室温下静置, 待血清析出后, 离心后立即分离血清。血凝块保存于 -70℃ 冰箱中。

## 2.2 基因组 DNA 的提取

采用酚-氯仿、异戊醇法提取血凝块中 DNA<sup>[5]</sup>。

## 2.3 BCHE-K 的 DNA 体外扩增-聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

## 2.3.1 主要试剂

2.3.1.1 2× PCR Mixture Mix: 包含 TaqDNA 聚合酶 0.05 单位/ $\mu$ l; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol/L 4 种 dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 每种各 0.4 mmol/L (购于 MBI 公司, 由晶美生物技术公司代理)。

2.3.1.2 PCR 引物: 查阅文献, 根据情况选择合适的引物。

收稿日期: 2003-06-23

基金项目: 上海市教委科研基金

作者简介: 郑捷 (1976-), 女, 浙江省杭州市人, 硕士研究生。

引物由上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表 1<sup>[9]</sup>。

表 1 BCHE-K 位点引物序列

引物代码	引物序列 (5'-3')
正义引物	ATATTTTACAGGAAATATTGATGTA
反义引物	ATTAGAGACCCACACAACCTT

2.3.2 PCR 反应体系及反应条件 PCR 反应体系 25 $\mu$ l, 内含 50ng 基因组 DNA, 1.5 U TaqDNA 聚合酶, 200 $\mu$ mol/L dNTPs, 引物各 8 $\mu$ mol。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 共 30 个循环, 然后于 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10min。

2.4 限制性片段长度多态 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

BCHE 产物用 Mae III 切割, 55 $^{\circ}$ C 水浴中温育 16 h, 根据条带确定基因型。UU 型只有一条 137 bp 的条带, KK 型只有一条 115 bp 的条带, 而杂合子 UK 两条带都具有。

### 3 统计分析

在 SPSS 中建库, 求得每种基因型和等位基因的百分比。

为检验基因型频率是否达到遗传平衡, 用以估计群体调查资料的可靠性, 需要根据 Hardy-Weinberg 平衡进行吻合度检验。若  $P \geq 0.05$ , 则认为观察所得的基因型频率符合 Hardy-

表 4 对照组 BCHE \*K 位点吻合度测验

基因位点	基因型	观察数 (O)	期望数 (E)	(O-E) <sup>2</sup> /E	$\sum \chi^2$ 值	P 值
BCHE *K	Ala/Ala (UU)	74	74.8225	0.0090	0.4961	> 0.05
	Ala/Thr (UK)	25	23.3550	0.1159		
	Thr/Thr (KK)	1	1.8225	0.3720		

结果显示 BCHE-K 位点基因型期望值与观察值吻合较好, 达到了 Hardy-Weinberg 平衡。

### 5 讨论

丁酰胆碱酯酶在有机磷农药代谢中发挥了重要的间接解毒作用。同时有大量研究证实了它的多态现象的存在。多态导致酶活性的改变, 进而解毒能力也发生改变, 因此有必要对它的多态加以研究, 描述其分布情况, 获得上海市正常人群的基准值, 用以和其他地区人群进行比较。同时为特殊人群的多态分布的描述和进一步研究多态性与健康状况相关关系提供方法和基础。

丁酰胆碱酯酶具有多种变异, 目前发现至少有 20 种。其中 A 变异由于和使用麻醉药琥珀酰胆碱造成的过度呼吸抑制相关, 最早在临床应用中被发现和深入研究。K 变异在人群中的发生频率最高, 并且使得酶活性降低 33%, 因而也被广泛研究。由于东方人和非洲黑人非典型等位基因的发生频率很低 (0.0002) 甚至为零, 因此本实验选取了 K 变异进行多态性的描述。目前分子学研究已经揭示了 K 变异的机制<sup>[2]</sup>。它是由于 BCHE 的第 1615 位核苷酸发生了由 G $\rightarrow$ A 的点突变, 从而导致了氨基酸从 Ala539 (GCA)  $\rightarrow$  Thr539 (ACA) 的改变<sup>[7]</sup>。文献报道 K 变异的等位基因频率是 13%, K 的纯合子发生频率是 1%, 是发生频率最高的一种变异。本次实验结果显示, 在正常对照人群中 UU、UK、KK 三种基因型频率分别为

Weinberg 定律, 达到遗传平衡。

### 4 结果

#### 4.1 BCHE \*K 基因型在正常人群中的分布

分析 BCHE \*K 基因型 UU、UK 和 KK 在正常人群中的分布, 见表 2。

表 2 BCHE \*K 基因型在正常人群中的分布

基因位点	基因型	例数 (%)
BCHE *K	Ala/Ala (UU)	74 (74.0)
	Ala/Thr (UK)	25 (25.0)
	Thr/Thr (KK)	1 (1.0)

#### 4.2 BCHE \*K 等位基因分布

分析 BCHE \*K 等位基因 Ala 和 Thr 在正常人群中的分布, 见表 3。

表 3 BCHE \*K 等位基因在正常人群中的分布

基因位点	等位基因	例数 (%)
BCHE *K	Ala	173 (86.5)
	Thr	27 (13.5)

#### 4.3 吻合度检测

为了检验观察样本基因型频率是否达到了 Hardy-Weinberg 平衡, 对基因型频率进行吻合度测验。

74%、25% 和 1%, 与文献报道的欧美人群的 77.28%、20.45%、2.27% 接近。U、K 等位基因的频率分别是 86.5% 和 13.5%, 纯合子检出 1 例, 其发生频率是 1%, 也与文献报道的欧美人群的等位基因频率 87.2% 和 12.8% 接近<sup>[7]</sup>。提示汉族人群 BCHE-K 位点分布和欧美人群一致。

#### 参考文献

- [1] 方文, 胡鸿. 血清胆碱酯酶活性在肝病时的变化及其相关性 [J]. 贵阳医学院学报, 1999, 24 (4): 362-363.
- [2] 周宏灏. 遗传药理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 40-60.
- [3] Raveh L, Grunwald J, Marcus D, et al. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 45: 2465-2474.
- [4] Matthew J M. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements [J]. Clin Chim Acta, 1995, 237: 91-105.
- [5] Sinan T. Purification of DNA from clotted blood [J]. Clin Chem, 1990, 36 (10): 1851.
- [6] Jensen F S, Nielsen L R, Schwartz M. Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site [J]. Hum Hered, 1996, 46: 26-31.
- [7] Bartels C F, Jensen F S, Lockridge O, et al. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites [J]. Am J Genetic, 1992, 50: 1086-1103.