行政院國家科學委員會專題研究計畫　成果報告

氧化壓力相關基因多形性和生物指標與缺血性心臟病之關係

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC94-2314-B-039-031-
執行期間：94 年 11 月 01 日至 95 年 07 月 31 日
執行單位：中國醫藥大學健康風險管理學系

計畫主持人：葉志清
共同主持人：郭李堂，宋鴻樟
計畫參與人員：賴慶輿、劉易承、林筱真

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中　華　民　國 95 年 10 月 31 日

中文摘要

背景：源自活性氧化物的氧化壓力是缺血性心臟病的危險因子。人體內的抗氧化酵素系統包括過氧化物歧化酵素(superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶(catalase, CAT)和麩胺基硫過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx1)負責去除活性氧化物種，而蛋白質羰基濃度(protein carbonyls)可作為氧化性傷害的生物指標。然而探討氧化壓力相關之生物標記或基因多形性的研究卻是相當有限。本研究利用病例對照研究設計，從抗氧化酵素基因多形性、氧化傷害指標和傳統危險因子間之交互作用，探討缺血性心臟病的危險性。

方法：研究對象來自台灣東北部一家醫學中心，308 位經心導管檢查確定為缺血性心臟病病人為病例組，171 位不具有血管阻塞者為對照組。利用 PCR-RFLP 方法分析其中 326 位研究對象的基因型，並利用酵素連結免疫吸附分析測定 259 件樣本的血漿蛋白質羰基濃度。由邏輯斯迴歸計算危險對比值和 95%信賴區間。

結果：抽菸者顯著的比不抽菸者有較高的危險性罹患缺血性心臟病(OR=2.19, 95% CI=1.34-3.58)。我們也觀察到 CAT C/T+T/T 或 SOD Ala/Val+Ala/Ala 基因型的人其罹病的風險也比較高，但未達統計顯著性。血漿蛋白質羰基濃度的分析發現，病例組的平均濃度(0.1348 ± 0.047 nmol carbonyls/mg plasma)顯著高於對照組的平均濃度(0.1253 ± 0.029 nmol carbonyls/mg plasma)(p=0.047)，尤其是抽菸者，其差異性更大(p=0.01)。

結論：我們的結果顯示，氧化壓力扮演台灣地區民眾罹患缺血性心臟病的重要角色。另外，抽菸不僅直接與缺血性心臟病有關，更貢獻部分的氧化壓力。

關鍵字：缺血性心臟病，氧化壓力，多形性，蛋白質羰基濃度，抽菸

Abstract

Background: Oxidative stress resulting from excessive production of reactive oxygen species (ROSs) has been related to ischemic heart disease. The enzymatic systems including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx1) cleared ROS and protein carbonyls are served as oxidative biomarker in plasma. However, studies on oxidative stress related biomarker and genetic polymorphism are limited. This study is to clarify the role of antioxidant genetic polymorphisms and oxidative biomarker in ischemic heart disease risk using a hospital-base case-control study.

Method: Cases were 308 ischemic heart disease angiographically confirmed at a medical center in the northeastern Taiwan. Controls were 171 individuals without narrow of the coronary vessels from the same examination. We genotyped these polymorphisms in 326 participants by PCR-RFLP methods and plasma carbonyl levels were determined in 259 samples by ELISA. Logistic regression was used to calculate the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs).

Results: The risk for ischemic heart disease appeared to be significantly increased in current smoker compared to non-smokers (OR=2.19, 95% CI=1.34-3.58). In addition, increased risks for ischemic heart disease were also observed among patients carrying CAT C/T+T/T or SOD Ala/Val+Ala/Ala genotypes. However, these associations were not statistically significant. We also found that the plasma carbonyl level was significant higher in cases (0.1348 ± 0.047 nmol carbonyls/mg plasma) than in controls (0.1253 ± 0.029 nmol carbonyls/mg plasma)(p=0.047), particularly among smokers (p=0.01).

Conclusion: Our results show that oxidative stress may play a role in the risk of ischemic heart disease for the Taiwanese population. Moreover, cigarette smoking may not only relate to risk of ischemic heart disease but also contribute to the oxidative stress.

Key words: ischemic heart disease, oxidative stress, polymorphism, protein carbonyls, and cigarette smoking

一、前言及研究目的

心臟疾病在 2004 年的國人十大死因中排名上升為第二，主要為缺血性心臟病（ischemic heart disease），亦稱冠狀動脈心臟病（coronary heart disease, CHD），簡稱冠心病。本計畫的目的在探討北台灣地區國人罹患缺血性心臟病的危險因子。缺血性心臟病等慢性病與老化有關，而生活型態和飲食習慣等環境條件的西化亦扮演重要角色，我們也必需了解環境改變造成的氧化性壓力在這方面的影響。又有許多研究指出缺血性心臟病與遺傳因子有關，因此遺傳基因的作用均須研究。我們的主要目標是：

1. 以問卷訪視、病歷審閱及體檢探討缺血性心臟病的生理、生化、生活形態和人體學等危險因子。
2. 經由 SOD、CAT、GPx1 基因多形性分析，了解基因型與缺血性心臟病發生的關係。利用酵素連結免疫吸附分析利用(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)測定血漿蛋白質羰基濃度，探討氧化性壓力對缺血性心臟病發生的關係。
3. 探討危險因子、基因型和氧化壓力間的交互作用與缺血性心臟病的相關。

二、文獻探討

(一)缺血性心臟病的流行病學特徵

根據WHO在2004年的估計，全球每年約有1千七百萬人死於心臟血管疾病，約為全球死亡人數的三分之一，其中超過60%發生在開發中國家(*1*)。雖然心臟血管疾病在已開發國家呈現下降的趨勢，在開發中或過度性的國家中卻是增加的。台灣正處於邁入已開發國家時期，近幾年的心臟疾病死亡率呈現穩定的狀態。在2004年，心臟疾病僅次於癌症為國人的第二大死因(*2*)，每年的死亡人數達12,861，佔全國死亡人數的9.6％，其年齡標準化死亡率為每十萬人口56.8。

最早也最富影響力的心臟病流行病學研究為Framingham Heart Study，此研究明顯的發現高膽固醇、高血壓和抽菸為缺血性心臟病主要的致病因子。另外，性別、家族史和年齡亦為重要的危險因子(*3*)。美國心臟協會根據流行病學和臨床研究的證據，將可能的缺血性心臟病危險因子歸為四類，第一類為抽菸、高血壓、高脂肪或膽固醇飲食和高的低密度膽固醇(LDL)，第二類為糖尿病、不運動、高的高密度膽固醇(HDL)、肥胖和停經，第三類為心理社會因素、氧化壓力(oxidative stress)和不喝酒等，第四類為年齡、性別、社會經濟狀況和家族史(*4*)。前三類為可修飾的因子，即藉由介入預防策略可以降低危險性。這些危險因子中，就氧化壓力的流行病學和臨床試驗證據最為薄弱(*4*)。在台灣地區進行的心血管疾病危險因子的研究亦驗證這些傳統危險因子為國人發生缺血性心臟病的主因(*5-22*)。金山世代研究的分析顯示高血壓、血脂異常為CHD和中風的共同危險因子，但以高血壓最重要(*22*)。高血壓預測的CHD危險比（hazard risk），男性為2.80、女性為6.08。而國內有關氧化壓力的研究則付之闕如。

(二)氧化壓力

越來越多的證據顯示氧化壓力在調控心臟肌肉功能上扮演重要的角色(*23*)。氧化壓力調控的細胞傷害來自於活性氧化物種(reactive oxygen species, ROS)。血管系統中，內皮細胞、平滑肌肉細胞與巨噬細胞產生的 ROS 主要與動脈粥樣硬化有關(*24*)。ROS 可以經由內和外因性的來源產生。內因性 ROS 來自於有氧代謝、活化的白血球和酵素，外因性 ROS 則包括香菸、污染物、有機溶劑、麻醉藥、過氧化環境、農藥、輻射線等暴露。當產生的 ROS 超過抗氧化系統的負荷就會導致氧化壓力，而引起細胞傷害。人體內的抗氧化系統包括酵素系統的過氧化物歧化酵素(superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶(catalase, CAT)和麩胺基硫過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx1)，以及非酵素系統的維生素 E、C 和 β-胡羅蔔素。這些抗氧化酵素位於細胞內，而細胞外的 ROS 就必須靠非酵素性的抗氧化維生素去除(*25,26*)。

酵素系統中的 SOD 負責催化過氧化自由基的歧化作用(dismutation)，使之成為過氧化氫和氧。心臟中，SOD 具有兩種亞型(isoforms)，其一為 MnSOD 存在粒腺體基質中(約佔 70%SOD 的活性)，另一為 Cu/ZnSOD 存在細胞漿中(*27*)。由於 MnSOD 為粒腺體上唯一的 SOD，所以 MnSOD 在控制粒腺體所產生的自由基上扮演重要的角色。在 MnSOD 基因同型結合剔除的小鼠身上發現，雖然發育正常，但不久便會死於心肌症(*28*)。SOD 產生的過氧化氫再經由 GPx 和 catalase 水解。GPx 利用還原的麩胺基硫(reduced glutathione, GSH)的氧化作用去除過氧化氫，而變成的氧化的麩胺基硫 (oxidized glutathione, GSSH)靠麩胺基硫還原酵素(glutathione reductase, GRed)還原。Gred 需要 nicotinamide adenine dinucleotide phosohate(NADPH)當作還原劑去驅動此還原作用(*23*)。

1.遺傳易感受性

藉由許多酵素功能表現或其基因型差異的研究，我們清楚的瞭解個人之間存在著對環境致癌物易感受性的差異。而多數的研究著重致癌物代謝酵素或 DNA 修補酵素(*29,30*)。這個計畫我們將研究與代謝活性氧化物種有關的基因，這些基因的介紹如下。

MnSOD 在自由基或香菸的刺激下會增加表現(*31,32*)。在 mitochondrial targeting sequence 的-9 位置有一個 Ala/Val (C/T)的替代發生，此替代會明顯的影響蛋白質的二級結構及其運輸進入粒腺體(*33*)。Hiroi 等人發現 Val-type leader peptide 的 processing efficiency 明顯比 Ala-type 低 11±4%，而且 Val-Val 基因型與非家族自發擴張性心肌病(nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy)有關 (87.2% in cases versus 74.7% in controls, odds ratio=2.3, p=0.013)(*34*)。另外，Valenti 等人針對遺傳性血色素沈著(haemochromatosis)病人的研究也發現，Val/Val 基因型有 10.1 倍的危險性得到心肌病(*35*)。MnSOD 的 targeting 效率變差會使粒腺體防禦過氧化自由基的能力下降，而導致蛋白質氧化或粒腺體 DNA 的突變。但是，在懷孕婦女身上發現，尿中的 8-羥基去氧鳥糞嘌呤核（8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG）濃度和 MnSOD 變異基因型（Val/Ala + Ala/Ala）有顯著的正相關

(p=0.04)(*36*)。

CAT 基因的 promoter region 發現一個常見的基因多形性(C-262T)。此變異型會顯著地增加 HepG2 和 K562 細胞中基因轉錄活性(*37*)。此研究也在捐血者身上發現，具有 T 對偶基因比起 CC 基因型的捐血者其血液中的過氧化氫酶濃度明顯較高。CAT 活性的變異性被認為與人體對抗氧化壓力的反應有關，實際上此基因的變異型亦發現與高血壓(*38*)、白斑病(*39*)或砷引起的皮膚角化過度(*40*)有關，而這些病都和氧化壓力有關。

GPx1 剔除的小鼠實驗發現，麩胺基硫過氧化酵素是對抗來自過氧化氫氧化壓力的重要角色(*41*)。動物實驗發現，GPx1 同型接合子的缺損會導致內皮血管擴張神經的傷害(*42*)，而異型接合子的缺損亦會顯著的影響血管結構和心臟正常功能(*43*)。Hamanishi 等人對第二型糖尿病人分析 GPx1 四個多形性位置(-602A/G, +2C/T, Ala^5/Ala^6 和 Pro198Leu)，研究發現-602G，+2T，Ala^6 和 198Leu 具強烈的連鎖不平衡；針對 Pro198Leu 分析發現，比起 Pro/Pro 基因型的人，頸動脈內膜厚度、心血管疾病和周邊血管疾病顯著的盛行於 Pro/Leu 基因型的人(*44*)。他們進行的功能研究也發現具有 Ala^6/198Leu 的細胞，其轉錄活性減少 40%。Winter 等人在英國的研究發現，帶有 Ala^6 對偶基因者具有 2 倍的危險性得到冠狀動脈心臟疾病(OR=2.07, 95%CI=1.08-3.99)(*45*)。

由上述文獻可看出，這些基因型對缺血性心臟病的貢獻仍不清楚。大部分研究的分析沒有考慮到基因型和傳統危險因子之間的交互作用。我們過去曾觀察大腸癌和基因多形性間的相關，單獨觀察基因的作用，並不大。但多項基因合併觀察時，即可突顯其重要性。例如我們觀察 GSTT1、飲食和抽菸對大腸直腸癌危險的交互作用發現：比起 GSTT1 null 和少吃蔬果的人，GSTT1 present 和多吃蔬果的人若不抽菸，其 OR 可降到 0.17（95% CI=0.07-0.42），即使抽菸的人，其 OR 也仍可維持 0.43（95% CI=0.25-0.73）(*46*)。因此我們假設具有高氧化壓力危險性基因型的人，其發生缺血性心臟病的危險性也比較高。

2.氧化壓力生物指標---蛋白質羰基濃度(Protein Carbonyls)

研究發現細胞中的蛋白質為 ROS 攻擊的目標，在老化、氧化壓力和一些病理狀況下，氧化的蛋白質會累積下來(*47-49*)，而蛋白質羰基濃度的測量為最常用來當作 ROS 產生的蛋白質氧化程度的生物指標，研究發現心臟在局部缺血下會增加氧化蛋白質濃度(*50*)。此指標與心臟血管疾病發生的相關性雖然不清楚，但為冠狀心臟手術過程產生的氧化壓力的良好指標(*51*)。氧化造成的氨基酸殘基(residues)改變會影響蛋白質的構造和功能，可以利用分析羰基與 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)的衍生物去測量蛋白質的氧化程度。早期的研究是利用比色分析方法(colorimetric assay)去定量 DNPH 的濃度，最近利用可以辨認 DNPH 抗體的 ELISA 方法已經建立(*52*)。這個方法的靈敏度較比色分析法高。

利用這兩種分析方法的研究皆發現，抽菸者的球蛋白和血清蛋白質的羰基濃度明顯高於非抽菸者(*53,54*)。利用比色分析方法的研究發現，婦女接受荷爾蒙替代治療後，其氧化蛋白質的濃度下降，但未在對照組身上發現(*55*)。利用 ELISA 方法在慢性腎臟病人身上也發現，同時具有糖尿病的病人的蛋白質羰基濃度較不是糖尿病人的濃度高(0.08 versus 0.052 nmol/mg protein)(*56*)。動物實驗方面，Husain 等人利用小鼠研究運動訓練和慢性一氧化氮合成酵素抑制劑對血壓、心跳和心臟氧化或抗氧化系統的影響，相對於對照組的蛋白質羰基濃度為 15.7 nmol/mg protein，施予抑制劑的小鼠其濃度顯著上升(19.9 nmol/mg protein)，而運動會顯著促進心臟抗氧化酵素表現增加，而減少蛋白質羰基濃度(15.7 nmol/mg protein)(*57*)。低脂肪酸不飽和程度與動物長壽有關，研究發現餵食不飽和油脂的小鼠其心臟粒腺體的蛋白質羰基濃度明顯高於飽和油脂組(不飽和油脂和飽和油脂分別為 0.38 和 0.58 nmol/mg protein, $p<0.05$)(*58*)。

上述文獻得知，蛋白質羰基濃度分析方法為測量氧化性壓力的良好指標，加上此生物指標有利於大樣本的研究，因為蛋白質的濃度遠高於 DNA 濃度，而且只需要少量的血液便可以分析(<500 μl)，氧化的蛋白質不會被修復，因此得以累積，使得更為靈敏。我們有興趣研究這個氧化壓力指標與 ROS 有關的環境因子間的關係，也探討這個指標與氧化傷害相關基因的基因多形性間的關係，進而瞭解這些因子與缺血性心臟病發生的關連性。這些相關研究不僅無國人的研究，國外的研究也僅限於腎臟病人同時具有糖尿病，推測與心血管疾病有關(*56*)。

三、研究方法

1. 研究對象

本研究之研究對象來自基隆長庚醫院，連續收集在心臟內科做心導管檢查的病人。由配合醫師擔任病例之尋求，經病人同意，然後填寫問卷並抽血。病例組為心導管檢查發現具有一條以上冠狀動脈阻塞者。對照組則為不具有阻塞者且須為非癌症病人，已經有過中風、心臟病、老人癡呆現象者，將排除，不予列入研究對象。

2. 資料收集

問卷收集之相關資料包括人口、社會經濟地位資料及心理社會因素。生活型態，包括抽菸及喝酒等。健康狀況史包括病歷所記載的身高體重等人體測量資料以求得身體質量指數(Body Mass Index, BMI)，血液、尿液生化檢查結果(包括總膽固醇、LDL、HDL、三酸乾油脂和血糖)，和過去病史。

3. 基因檢測

以含有 EDTA 的採血管收集靜脈血，保存於 4℃直到在實驗室分析。收集到的全血以 3000 rpm 離心 5min，分成三層，上層的血漿及下層的紅血球用 2ml 微量離心管分裝保存在-80℃冰箱，中間層的 buffy coat 以 QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Valencia, CA., USA)抽取 genomic DNA，用已滅菌過之二次水稀釋至 500ug/ml 濃度保存在 4 °C。基因型利用聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain

reaction, PCR)放大欲分析的基因片段，再利用限制片段多形性分析法(restriction fragment length polymorphism，RFLP)決定。所有的 PCR 反應利用 Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)分析。反應體積為 25ul 包含：50pmol of each primer, 50ng genomic DNA, 1.5mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs 和 1.0 unit of Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, Wis., USA)。SOD Ala-9Val (*59*)、CAT C-262T (*37*)、GPx1 Pro198Leu (*60*)基因的分析條件由文獻參考得知。

4. 血漿蛋白質羰基濃度的分析

蛋白質羰基濃度利用 ELISA 方法分析(*52,61*)。由於還原的小牛血清蛋白會產生高背景值及負值的測量濃度，使用磷酸生理食鹽水(phosphate-buffered saline, PBS)當作空白對照、阻斷試劑(blocking agent)和稀釋試劑(diluting agent)(*54*)。

5. 資料處理和分析

本計畫之資料採及時鍵入電腦檔的方式，研究人員隨時都可作偵錯分析及缺血性心臟病發生及相關危險因子分析，包括數值分布及模式分析，對可疑資料加以檢視、追蹤、校正。資料分析著重缺血性心臟病樣本及正常樣本的病例對照分析。依據問卷訪視資料及血液生化檢查資料，先進行一般的描述性分析，同時計算其勝算比（Odds Ratio）及其 95%信賴區間，檢視人口條件、社會經濟因素、飲食和生活型態、生理生化值、疾病史等危險因子與缺血性心臟病的相關，凡有可能出現干擾因子時，即以分層分析或多變項對數迴歸分析等再加以辨別。進而作多變項分析，觀察在調整其他因子下，個別因子的貢獻。基因和蛋白質實驗數據亦為缺血性心臟病危險估計因子。先分別檢視基因型和蛋白質上羰基濃度之相關，進而觀察傳統危險因子和這兩個因子不同組合之影響，包括這些因子之間的交互作用。在多變項分析時，將以 stepwise 做變項選擇以決定顯著的危險因子。起初的模式可包括人口基本變項、生活型態、BMI、血脂、基因多形性、蛋白質羰基濃度等。基因和蛋白質羰基濃度的影響可分別及合併觀察，並納入可能的交互作用分析。

四、結果

九個月研究期間總共收集 479 名接受心導管檢查研究對象，其中 308 名為缺血性心臟病患者，171 名為健康者。研究對象的人口基本資料如表一所示。病例組中男性佔(74%)，而對照組中男性只佔(61%)。病例組的平均年齡比對照組多了 5 歲（64.8 vs. 59.2, $p<0.01$）。病例組檢查發現具有一條、二條和三條冠狀動脈阻塞的人數分別有 109、97 和 102 人。超過 75%的研究對象為閩南人且不喝酒，約 1/3 的人從事藍領階層的工作，而且高於 80%的研究對象過去都有慢性病史。這些因子在病例組和對照組間的分布並無顯著差異，但是發現病例組有比較高的比例有抽菸習慣（$p=0.002$）。病例組有 42.8%的人目前為抽菸者，而對照組只有 28.7%的人有抽菸習慣。另外，在人體測

量資料方面，身高、體重和身體質量指數（BMI）並未發現有顯著疾病狀態上的差別。

分析這些因子與缺血性心臟病的相關性，發現抽菸會顯著增加危險性（表二）。相對於不抽菸者，抽菸者和戒菸者的危險對比值分別為 2.19（95% CI=1.34-3.58）和 1.35（95% CI=0.69-2.63）。且危險性隨著抽菸量的增加而上升（趨勢檢定 p=0.012）。每天吸不到一包和一包以上的危險對比值分別為 1.59（95% CI=0.80-3.19）和 1.99（95% CI=1.13-3.51）。至於喝酒和 BMI 則不會影響缺血性心臟病的危險性。

所有研究對象中，只有獲得 68%研究對象的 DNA 檢體，因為其血液檢體做為其他生化檢查或研究分析而使用耗盡。最後獲得 326 名個案的 DNA 進行基因型的分析。又部分血漿檢體為其他實驗所使用，只有 259（54%）的個案能進行血漿蛋白質羰基濃度的測定。為避免具有檢體和不具有檢體個案人口特徵差異造成的推論偏差，我們分析其人口基本變項分布是否有差異，結果並未發現有不同。

我們建立及分析了 CAT C-262T 和 SOD Ala-9Val 的基因型，其結果如表三所示。變異的 CAT –262T 和 SOD –9Ala 對偶基因頻率在對照組分別為 3.5% 和 7.35%。由於具有這些變異型的人數不多，因此將具有一個以上變異對偶基因的人歸在同一組。與 CAT –262C/C 和 SOD –9Val/Val 基因型比較發現，CAT –262C/T+T/T 和 SOD –9Ala/Val+Val/Val 基因型的危險對比值分別為 1.79（95% CI=0.69-4.66）和 1.75（95% CI=0.90-3.42）。進一步分析這兩個基因與抽菸對缺血性心臟病危險性的共同影響（表四）。結果並未發現這兩個基因型與抽菸間有交互作用，交互作用 p 值皆大於 0.6。

研究期間，我們完成 153 名病例和 106 名對照樣本的血漿蛋白質羰基濃度分析（表 5）。病例組血清蛋白質的羰基濃度為 0.1348 ± 0.047 （nmol carbonyls/mg plasma），對照組為 0.1253 ± 0.029，具有統計上的顯著差異性（p=0.047）。依性別來看，只有女性，病例組的羰基濃度高於對照組（p=0.043），但是病例組或對照組中的男女性並未見差異。依對照組年齡的四分位數來分組，發現病例組的羰基濃度只有在大於 69 歲這一組顯著高於對照組，同時發現，病例組的羰基濃度隨著年齡的增加而上升（p=0.07）。目前抽菸者，病例組的羰基濃度顯著高於對照組（p=0.01），而每日抽菸少於一包或不喝酒者也有相同的趨勢，不過未達統計上顯著意義（p=0.07）。依照基因型來比較病例組和對照組間是否有差異，或依照疾病狀態來比較不同基因型是否具有不同羰基濃度，並未發現有顯著上的差異性。

五、討論與建議

我們的結果支持我們的假說：缺血性心臟病的危險性與氧化壓力（蛋白質羰基濃度）有關，尤其是女性或抽菸者。同時，我們也發現蛋白質羰基濃度增加與年齡增加有關。另外，研究中發現氧化壓力相關基因與此疾病危險性有正相關，但未達統計顯著性。但是，這些基因型不會修飾抽菸與缺血性心臟病的相關性，亦不會影響羰基濃度。

我們這個研究中對照組的血漿蛋白質羰基濃度平均值為 0.1253（SD=0.029），比起我們之前大腸癌研究的濃度來得低，平均值為 0.097（SD=0.0168）。可能由於本研究中使用敏感性較低的試劑去作蛋白質定量分析，在要求加入同樣濃度的蛋白質濃度之下，加入較多的蛋白質所造成。

我們的研究發現罹患缺血性心臟病的病人其血漿中的蛋白質羰基濃度顯著高於其對照組，呼印之前研究發現氧化壓力在調控心臟肌肉功能上扮演重要的角色(*23*)。這個相關性尤其在女性個案和抽菸者身上特別突出，並未有相關的文獻去說明其性別差異。許多研究發現抽菸者比起不抽菸者，其球蛋白和血清蛋白質具有比較高濃度的羰基(*53,54,62*)，但是我們的研究結果未能驗證這樣的結果。然而我們發現在目前抽菸者當中，病例組的羰基濃度顯著高於對照組（$p=0.01$）推測抽菸不會引起我們研究對象的氧化壓力增加，只有在氧化壓力引起缺血性心臟病發生下，抽菸才會加重氧化壓力對缺血性心臟病的影響程度。研究中發現抽菸為一個非常重要的危險因子，因此香菸引起缺血性心臟病的發生可能不是來自於其產生的氧化壓力，而是透過其他途徑。已知老化過程會造成蛋白質的氧化作用，而且蛋白質上形成羰基鍵為最常見的蛋白質組織改變(*47,48*)，因此我們觀察到羰基濃度隨著年齡的增加而上升與這些研究相印證。我們的這些發現需要進一步相關的研究去證實。

有關測量血漿蛋白質羰基濃度作為氧化性傷害指標的研究並不多見，研究中納入氧化性傷害來源的環境因子，更是寥寥無幾。本研究中使用的 ELISA 方法對偵測蛋白質的氧化程度具有敏感度和精確度。除此之外，血液中的蛋白質含量遠多餘 DNA，僅需要少量的血漿即可分析（20μl）、而且氧化的蛋白質不會被修復，因此這個生物標記為測量氧化性傷害與疾病關係的良好指標。

探討氧化壓力相關基因多形性與缺血性心臟病的研究不多(*45*)。我們的研究是第一個針對中國人的研究。由於這些基因的變異型人數不多，需要比較大樣本的研究才能發現其相關性，不過我們發現 SOD 和 CAT 的變異基因型有增加危險性的趨勢，由於研究中具有 DNA 檢體的樣本數只有的 300 多人，因此需要再增加一些研究個案以確定其相關性，我們計畫再增加兩年研究時間，以增加研究人數，希望能獲得國科會支持。

参考文獻

(*1*) Atlas of Heart Disease and Stroke. WHO; 2004.

(*2*) Department of Health. Health and Vital Statistics. Taipei: Department of Health, Executive Yuan; 2004.

(*3*) Stokes J, 3rd, Kannel WB, Wolf PA, Cupples LA, D'Agostino RB. The relative importance of selected risk factors for various manifestations of cardiovascular disease among men and women from 35 to 64 years old: 30 years of follow-up in the Framingham Study. Circulation 1987;75:V65-73.

(*4*) Pearson T, Fuster V. 27th Bethesda Conference. Matching the Intensity of Risk Factor Management with the Hazard for Coronary Disease Events. September 14-15, 1995. J Am Coll Cardiol 1996;27:957-1047.

(*5*) Tsai HC, Yen TS, Wang LT, Cheng JT, Tseng WP, Chen CM. An epidemiologic study of the cardiovascular diseases among the inhabitants of a fishing village in Taiwan. I. Blood pressure and hypertension. Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi 1966;65:249-57.

(*6*) Tsai HC, Tseng WP, Yen TS, Cheng JT, Wang LT, Hsieh YY, et al. Coronary heart disease and hypertension in Taiwan aborigines. Am J Epidemiol 1967;86:253-63.

(*7*) Tseng WP. Blood pressure and hypertension in an agricultural and a fishing population in Taiwan. Am J Epidemiol 1967;86:513-25.

(*8*) Weaver CA, Ko YH, Alexander ER, Pao YL, Ting N. The Cornell Medical Index as a predictor of health in a prospective cardiovascular study in Taiwan. Am J Epidemiol 1980;111:113-24.

(*9*) Shieh SM, Fuh MM, Shen DC, Chen YD, Reaven GM. Coronary artery disease in Chinese males without hypercholesterolaemia. J Intern Med 1990;228:471-5.

(*10*) Wu JH, Kao JT, Wen MS, Wu D. Coronary artery disease risk predicted by plasma concentrations of high-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein AI, apolipoprotein B, and lipoprotein(a) in a general Chinese population. Clin Chem 1993;39:209-12.

(*11*) Lyu LC, Shieh MJ, Ordovas JM, Lichtenstein AH, Wilson PW, Schaefer EJ. Plasma lipoprotein and apolipoprotein levels in Taipei and Framingham. Arterioscler Thromb 1993;13:1429-40.

(*12*) Chen CH, Chuang JH, Kuo HS, Chang MS, Wang SP, Chou P. A population-based epidemiological study on cardiovascular risk factors in Kin-Chen, Kinmen. Int J Cardiol 1995;48:75-88.

(*13*) Chan P, Pan WH. Coagulation activation in type 2 diabetes mellitus: the higher coronary risk of female diabetic patients. Diabet Med 1995;12:504-7.

(*14*) Ho CH, Wang SP, Jap TS. Hemostatic risk factors of coronary artery disease in the Chinese. Int J Cardiol 1995;51:79-84.

(*15*) Chen CH, Chuang JH, Kuo HS, Chang MS, Wang SP, Chou P. Prevalence of coronary heart disease in Kin-Chen, Kinmen. Int J Cardiol 1996;55:87-95.
(*16*) Lien WP, Lai LP, Shyu KG, Hwang JJ, Chen JJ, Lei MH, et al. Low-serum, high-density lipoprotein cholesterol concentration is an important coronary risk factor in Chinese patients with low serum levels of total cholesterol and triglyceride. Am J Cardiol 1996;77:1112-5.
(*17*) Lai CP, Wang JH, Lin CL, Tseng WP. Risk factors associated with coronary artery stenosis among patients with chest pain in eastern Taiwan. J Formos Med Assoc 1997;96:405-8.
(*18*) Lien WP, Lai LP, Chen JJ, Hwang JJ, Lin JL, Lei MH, et al. A retrospective hospital-based study of coronary risk factors in Taiwan. Analysis of patients with established diagnoses. Jpn Heart J 1998;39:435-44.
(*19*) Lee Y, Lin RS, Sung FC, Yang C, Chien K, Chen W, et al. Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort in Taiwan-baseline data and five-year follow-up morbidity and mortality. J Clin Epidemiol 2000;53:838-46.
(*20*) Wang TD, Chen WJ, Chien KL, Seh-Yi Su SS, Hsu HC, Chen MF, et al. Efficacy of cholesterol levels and ratios in predicting future coronary heart disease in a Chinese population. Am J Cardiol 2001;88:737-43.
(*21*) Tseng CH. Body composition as a risk factor for coronary artery disease in Chinese type 2 diabetic patients in Taiwan. Circ J 2003;67:479-84.
(*22*) Chien KL, Sung FC, Hsu HC, Su TC, Chang WD, Lee YT. Relative importance of atherosclerotic risk factors for coronary heart disease in Taiwan. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2005;12:95-101.
(*23*) Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. J Mol Cell Cardiol 2002;34:379-88.
(*24*) Galle J, Heermeier K. Angiotensin II and oxidized LDL: an unholy alliance creating oxidative stress. Nephrol Dial Transplant 1999;14:2585-9.
(*25*) Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. Faseb J 1987;1:441-5.
(*26*) Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. Am J Med 1994;97:5S-13S; discussion 22S-8S.
(*27*) Assem M, Teyssier JR, Benderitter M, Terrand J, Laubriet A, Javouhey A, et al. Pattern of superoxide dismutase enzymatic activity and RNA changes in rat heart ventricles after myocardial infarction. Am J Pathol 1997;151:549-55.
(*28*) Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat Genet 1995;11:376-81.

(*29*) Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. J Natl Cancer Inst 2000;92:874-97.
(*30*) Vineis P, Malats, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J., and Boffeta, P. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. Vol 148. Lyon: International Agency for Reseach on Cancer; 1999.
(*31*) Rohrdanz E, Kahl R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. Free Radic Biol Med 1998;24:27-38.
(*32*) Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A. Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. Am J Pathol 1998;152:269-78.
(*33*) Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun 1996;226:561-5.
(*34*) Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. Biochem Biophys Res Commun 1999;261:332-9.
(*35*) Valenti L, Conte D, Piperno A, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fraquelli M, et al. The mitochondrial superoxide dismutase A16V polymorphism in the cardiomyopathy associated with hereditary haemochromatosis. J Med Genet 2004;41:946-50.
(*36*) Hong YC, Lee KH, Yi CH, Ha EH, Christiani DC. Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. Toxicol Lett 2002;129:255-62.
(*37*) Forsberg L, Lyrenas L, de Faire U, Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. Free Radic Biol Med 2001;30:500-5.
(*38*) Jiang Z, Akey JM, Shi J, Xiong M, Wang Y, Shen Y, et al. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. Hum Genet 2001;109:95-8.
(*39*) Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. Pigment Cell Res 2002;15:62-6.
(*40*) Ahsan H, Chen Y, Kibriya MG, Islam MN, Slavkovich VN, Graziano JH, et al. Susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis and oxidative stress genes myeloperoxidase and catalase. Cancer Lett 2003;201:57-65.
(*41*) de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J Biol Chem 1998;273:22528-36.

(*42*) Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings ES, Bierl C, et al. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;282:H1255-61.
(*43*) Forgione MA, Cap A, Liao R, Moldovan NI, Eberhardt RT, Lim CC, et al. Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure. Circulation 2002;106:1154-8.
(*44*) Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. Diabetes 2004;53:2455-60.
(*45*) Winter JP, Gong Y, Grant PJ, Wild CP. Glutathione peroxidase 1 genotype is associated with an increased risk of coronary artery disease. Coron Artery Dis 2003;14:149-53.
(*46*) Yeh CC, Hsieh LL, Tang R, Chang-Chieh CR, Sung FC. Vegetable/fruit, smoking, glutathione S-transferase polymorphisms and risk for colorectal cancer in Taiwan. World J Gastroenterol 2005;11:1473-80.
(*47*) Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997;272:20313-6.
(*48*) Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Chem Res Toxicol 1997;10:485-94.
(*49*) Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003;329:23-38.
(*50*) Powell SR, Gurzenda EM, Wahezi SE. Actin is oxidized during myocardial ischemia. Free Radic Biol Med 2001;30:1171-6.
(*51*) Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. Free Radic Biol Med 1999;27:1080-6.
(*52*) Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. Free Radic Biol Med 1997;23:361-6.
(*53*) Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). Cancer Lett 1998;132:219-27.
(*54*) Marangon K, Devaraj S, Jialal I. Measurement of protein carbonyls in plasma of smokers and in oxidized LDL by an ELISA. Clin Chem 1999;45:577-8.
(*55*) Telci A, Cakatay U, Akhan SE, Bilgin ME, Turfanda A, Sivas A. Postmenopausal hormone replacement therapy use decreases oxidative protein damage. Gynecol Obstet Invest 2002;54:88-93.
(*56*) Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al.

Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. Kidney Int 2004;65:1009-16.
(*57*) Husain K, Hazelrigg SR. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. Biochim Biophys Acta 2002;1587:75-82.
(*58*) Herrero A, Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Pamplona R, Barja G. Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H2O2 production and lipid and protein oxidative damage. Mech Ageing Dev 2001;122:427-43.
(*59*) Lin P, Hsueh YM, Ko JL, Liang YF, Tsai KJ, Chen CY. Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan. Lung Cancer 2003;40:123-9.
(*60*) Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C, Sato K, et al. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. J Urol 2004;172:728-32.
(*61*) Winterbourn CC, Buss IH. Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. Methods Enzymol 1999;300:106-11.
(*62*) Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F, et al. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. Cancer Res 2001;61:778-84.

計畫成果自評

本計畫研究內容與原計畫內容相去不遠，但囿於國科會給予的研究時間只有九個月且經費有限，因此我們初步的成果需要增加更多的研究對象來確定。

我們的研究是第一個以中國人為對象，探討氧化壓力與缺血性心臟病關連性的研究。基隆市是台灣地區心臟疾病標準化死亡率第二高的縣市，基隆長庚醫院又為該地區唯一的大型醫院，針對此醫院收集樣本，一方面較能代表整個基隆地區民眾罹患心臟血管疾病的狀況，一方面高危險族群的研究對象較能觀察到相關。雖然本計畫研究期間只有九個月，但成果已相當令人振奮，證明氧化壓力與缺血性心臟病具有相關性。在氧化壓力相關基因方面，我們的初步結果已經發現 SOD 和 CAT 的變異基因型有增加危險性的趨勢。由於這些基因的變異型頻率低，需要大樣本的研究才能大到顯著性，相信再增加研究人數後可以有比較大的檢力去判斷其相關性。若能確定氧化壓力相關基因多形性可能會增加罹患缺血性心臟病的風險，站在預防發生的觀點上，透過早期易感受性基因的篩檢，並教育和宣導民眾正確的飲食和生活習慣，是降低臺灣地區缺血性心臟病發生的最佳方法。

研究期間，受限於經費，因此利用中國醫藥大學環境醫學研究所吳芳鶯教授的設施，大大減少了研究費用，並提供五位大學專題生和一位環醫所碩士生良好的研究題材，成效卓著。

Table 1. General characteristics of participants in the coronary heart disease study

Variables	Cases, n (%) N=308	Control, n (%) N=171	p-value [a]
Gender			<0.01
Male	228(74.0)	104(60.8)	
Female	80(26.0)	67(39.2)	
Mean age (SD), years	64.8(11.3)	59.2(12.5)	<0.001
Artery stenosis (1/2/3)	109/97/102		
Ethnic group	305	171	0.77
Fukien	236(78.7)	129(75.9)	
Mainland Chinese	37(12.3)	22(12.9)	
Hskka	12(4.0)	9(5.3)	
Indigenous Taiwanes	2(0.7)	3(1.8)	
Others	13(4.3)	7(4.1)	
Cigarette smoking	304	171	0.002
Never	132(43.4)	103(60.2)	
Current smoker	130(42.8)	48(28.7)	
Ex-smoker	42(13.8)	20(11.7)	
Alcohol drinking	302	170	0.49
Never	235(77.8)	127(74.7)	
Current drinker	63(20.9)	42(24.7)	
Ex-drinker	4(1.3)	1(0.6)	
Past disease history	308	171	0.40
No	50(16.2)	33(19.3)	
Yes	258(83.8)	138(80.7)	
Occupation	290	169	0.60
White-collar	41(14.1)	22(13.0)	
Blue-collar	103(35.5)	54(32.0)	
Housekeeper	74(25.5)	53(31.4)	
Others	72(24.8)	40(23.7)	
Height (SD), cm	160.9(7.9)	161.2(8.5)	0.64
Weight (SD), kg	65.5(12.1)	67.0(14.4)	0.25
BMI (SD), kg/m^2	25.2(4.0)	25.6(4.2)	0.34

a: Continuous variables were tested by t-test, categorical variables were tested by Chi-square test

Table 2. General characteristics of participants in the coronary heart disease study

	Cases	%	Controls	%	aOR (95%CI) [a]
Cigarette smoking					
Never	132	43.4	103	60.2	1.00
Current smoker	130	42.8	48	28.1	2.19(1.34-3.58)
Ex-smoker	42	13.8	20	11.7	1.35(0.69-2.63)
Pack per day among current smokers					
0	174	64.0	123	75.0	1.00
<1	34	12.5	14	8.5	1.59(0.80-3.19)
≥1	64	23.5	27	16.5	1.99(1.13-3.51)
p for trend					0.012
Alcohol drinking					
Never	235	77.8	127	74.7	1.00
Current drinker	63	20.9	42	24.7	0.69(0.43-1.12)
Ex-drinker	4	1.3	1	0.6	2.67(0.28-25.3)
BMI (kg/m^2)					
<18.5	19	6.2	8	4.7	1.23(0.47-3.17)
18.5-24	113	36.7	53	31.0	1.00
24-30	144	46.8	86	50.3	0.85(0.55-1.33)
≥30	32	10.4	24	14.0	0.87(0.45-1.67)

a: adjusted for age and sex

Table 3. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) of the polymorphisms of oxidative stress-related genes for coronary heart disease

Genotypes	Cases (%)	Controls (%)	OR (95%CI)	aOR (95%CI) [a]
CAT	206	100		
C/C	184(89.3)	94(94.0)	1.0	1.0
C/T	21(10.2)	5(5.0)	2.15(0.78-5.87)	2.08(0.74-5.83)
T/T	1(0.5)	1(1.0)	0.51(0.03-8.26)	0.44(0.03-7.22)
C/T+T/T	22(10.7)	6(6.0)	1.87(0.73-4.77)	1.79(0.69-4.66)
SOD	208	102		
Val/Val	161(77.4)	88(86.3)	1.0	1.0
Ala/Val	43(20.7)	13(12.8)	1.81(0.92-3.54)	1.74(0.87-3.48)
Ala/Ala	4(1.9)	1(1.0)	2.19(0.24-19.9)	1.82(0.20-16.9)
Ala/Val+ Ala/Ala	47(22.6)	14(13.7)	1.84(0.96-3.52)	1.75(0.90-3.42)

a: adjusted for age and sex

Table 4. Combined effect of oxidative stress-related genotypes and cigarette smoking on coronary heart disease risk

Genotypes	Cigarette smoking	Cases (%)	Controls (%)	aOR (95%CI) [a]
CAT				
C/C	Never	73(36.1)	60(60.0)	1.00
C/C	Ever	107(53.0)	34(34.0)	2.70(1.46-4.99)
C/T+T/T	Never	9(4.5)	2(2.0)	3.68(0.74-18.4)
C/T+T/T	Ever	13(6.4)	4(4.0)	2.42(0.72-8.2)
p for interaction				0.61
SOD				
Val/Val	Never	59(29.5)	56(55.5)	1.00
Val/Val	Ever	99(49.5)	32(31.7)	3.04(1.63-5.66)
Ala/Val+ Ala/Ala	Never	22(11.0)	7(6.9)	2.91(1.13-7.48)
Ala/Val+ Ala/Ala	Ever	20(10.0)	6(5.9)	2.85(1.00-8.09)
p for interaction				0.70

a: adjusted for age and sex

Table 5. Level of oxidized plasma proteins for the participants stratified by general characteristics and genotypes

	Cases		Controls		
Characteristic	n	nmol carbonyls/mg plasma (mean ± SD)	n	nmol carbonyls/mg plasma (mean ± SD)	p-value
All	153	0.1348 ± 0.047	106	0.1253 ± 0.029	0.047
Sex					
Male	110	0.1316 ± 0.0457	62	0.1258 ± 0.0285	0.31
Female	43	0.1428 ± 0.0498	44	0.1245 ± 0.0301	0.043
		0.19		0.82	
Age range (years)					
<51	19	0.1181 ± 0.0183	27	0.1160 ± 0.0224	0.74
52, 60	29	0.1318 ± 0.0264	30	0.1280 ± 0.0345	0.63
61, 69	46	0.1352 ± 0.0240	25	0.1354 ± 0.0350	0.98
>69	59	0.1412 ± 0.0690	24	0.1218 ± 0.0163	0.047
p for trend		0.07		0.29	
Cigarette smoking					
Never	67	0.1373 ± 0.0595	64	0.1264 ± 0.0337	0.20
Current smoker	58	0.1362 ± 0.0400	29	0.1200 ± 0.0183	0.01
Ex-smoker	25	0.1252 ± 0.0174	13	0.1318 ± 0.0222	0.32
Pack per day among current smokers					
0	92	0.1340 ± 0.0517	77	0.1273 ± 0.0320	0.31
<1	14	0.1505 ± 0.0623	10	0.1167 ± 0.0157	0.07
≥1	28	0.1324 ± 0.0319	15	0.1217 ± 0.0187	0.17
p for trend		0.88		0.50	
Alcohol drinking					
Never	118	0.1372 ± 0.0518	80	0.1268 ± 0.0296	0.07
Current drinker	30	0.1273 ± 0.0245	24	0.1210 ± 0.0276	0.38
Ex-drinker	1		1		
CAT					
C/C	91	0.1367 ± 0.0560	60	0.1248 ± 0.0267	0.08
C/T+T/T	17	0.1229 ± 0.0194	0		
		0.07			
SOD					
Val/Val	78	0.1373 ± 0.0602	54	0.1248 ± 0.0275	0.11
Ala/Val+ Ala/Ala	30	0.127 ± 0.0179	8	0.1231 ± 0.017	0.59
		0.17		0.87	