

脂蛋白相关磷脂酶 A2基因 R92H 多态性与汉族人群冠心病易感性的关系

徐 敏¹, 孙建辉¹, 罗光华², 白江涛¹, 刘亚平¹, 柯海燕¹

(常州市第一人民医院 苏州大学附属第三医院 1. 心内科, 2. 综合实验室, 江苏省常州市 213003)

[关键词] 内科学; 脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因多态性; 冠心病; 冠状动脉病变

[摘要] 目的 探讨脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因 R92H 多态性与冠心病遗传易感性及冠状动脉病变程度的关系。方法 采用单荧光标记探针技术检测 261 例冠心病患者及 263 例正常人脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因 R92H 多态性。结果 冠心病组 RH 基因型和 H 等位基因频率显著高于对照组 ($P < 0.05$ 和 < 0.01)。RH 基因型、H 等位基因人群冠心病风险增高 (P 均 < 0.01)。Logistic 回归分析显示, R92H 多态性是冠心病的独立危险因素 ($P < 0.05$)。冠心病组中 RH 和 HH 基因型者总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平高于 RR 基因型者 ($P < 0.05$ 和 < 0.01), 高密度脂蛋白胆固醇水平显著低于 RR 基因型者 ($P < 0.05$)。冠心病组中, RH 和 HH 基因型者多支血管病变率比 RR 基因型者明显升高 ($P < 0.05$)。结论 脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因 R92H 多态性与中国汉族人群冠心病相关, 携带 RH、HH 基因型人群发生冠心病风险较高, 且与更严重的冠状动脉病变有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

An Association Between Lipoprotein-A associated Phospholipase A2 Gene R92H Polymorphism and Coronary Heart Disease in Han Chinese

XU Min¹, SUN Jian-Hui¹, LUO Guang-Hua², BAI Jiang-Tao¹, LIU Ya-Ping¹, and KE Hai-Yan¹

(1 Department of Cardiology, 2 Laboratory of Molecular Medicine, the First Hospital of Changzhou, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein-A associated Phospholipase A2 Gene Polymorphism; Coronary Heart Disease; Coronary Artery Stenosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) R92H single nucleotide polymorphisms (SNP) and susceptibility to coronary heart disease (CHD) and the degree of coronary artery stenosis. **Methods** 261 CHD patients and 263 normal controls were genotyped by using single-labeled probe technique. **Results** The frequencies of the RH genotypes and H allele were significantly higher in CHD patients than normal controls ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). Compared with RR genotype, the relative risk for CHD in people with RH genotypes was 1.77 ($P < 0.01$). The relative risk for CHD in people with H allele was 1.619 higher than R allele ($P < 0.01$). Binary logistic regression analysis showed that polymorphism of R92H was an independent risk factor for CHD. There was a significant increase of total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) in the RH + HH genotype of CHD patients while high density lipoprotein cholesterol (HDLC) was lower (all $P < 0.05$). The ratio of multiple vessel diseases was significantly increased in the RH + HH genotype of CHD patients ($P < 0.05$).

Conclusions The polymorphism of R92H of Lp-PLA2 gene could be associated with risk of CHD in Han Chinese; persons with RH or HH genotypes take higher risk of suffering from CHD.

冠心病常有一定的家族史, 其发病又与吸烟、高血压和高血脂等因素密切相关, 故其发生、发展是遗传因素和环境因素相互作用所致的多因素疾病。炎症在血管壁损伤中的重要作用已被证实。脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase

A2 Lp-PLA2) 作为重要的炎症因子, 其编码基因 Lp-PLA2 的多态性位点与冠心病发病有一定联系。多项研究显示, Lp-PLA2 基因 A379V、V279F 多态性与冠心病的发病密切相关^[1,2], 但有关该基因 R92H 遗传多态性与冠心病关联性的研究报道甚少。本文采用单荧光标记探针技术检测单核苷酸多态性, 旨在观察中国汉族人群 Lp-PLA2 基因 R92H 多态性的分布情况, 并初步探讨其与冠心病遗传易感性的相关性。

[收稿日期] 2008-09-24 [修回日期] 2008-11-23

[基金项目] 常州市卫生局重大招标项目 (ZD200709)

[作者简介] 徐敏, 硕士研究生, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 loisic@sohu.com。孙建辉, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊断与介入治疗。通讯作者罗光华, 博士, 主要从事临床分子生物学和临床分子诊断学研究, E-mail 为 shinerat@163.com。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2005年8月至2008年6月本院住院的冠心病患者261例,其中男性208例,女性53例,年龄 61.84 ± 9.59 岁。诊断符合WHO颁布的缺血性心脏病命名和诊断标准,并经冠状动脉造影检查确诊。所有病例以左前降支、左回旋支和右冠状动脉及其主要分支中至少有一支冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 为有意义病变。根据累及支数定义为单支病变、两支病变和三支病变,并作CAD^[3]评分。对照组选择本院健康体检者263例,男性196例,女性67例,年龄 61.08 ± 9.43 岁。经询问病史、体格检查、实验室检查(血、尿、粪常规及血脂、血糖)和心电图检查等排除冠心病、高血压病和糖尿病。两组受检者均为无近亲血缘关系的汉族人,除外炎症、风湿免疫病、肿瘤及肝、肾疾病等系统性疾病,均签署知情同意书。

1.2 观察指标

入院后详细询问个人的一般情况、既往疾病史、疾病家族史和吸烟饮酒史,女性患者询问月经史。晨起测体重、身高、血压,计算体质指数(body mass index, BMI)。空腹12 h取静脉血2 mL,生物化学分析仪检测甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)等各项生物化学指标。

1.3 外周血白细胞DNA的制备

采血前禁食12 h,静脉采血250 μ L, EDTA抗凝,其基因组DNA用UIQ-10柱式血液基因组DNA抽提试剂盒(上海生工)提取。DNA的浓度根据光密度(OD₂₆₀/OD₂₈₀)来计算,TE溶解保存于-20℃冰箱中。

1.4 脂蛋白相关磷脂酶A2基因R92H位点的基因型检测

根据ShineRoar探针技术^[4]改进的单荧光标记探针技术检测单核苷酸多态性(详细方法另文发表)。PCR总反应体系25 μ L,含2 μ L模板DNA、2.5 μ L 10 \times Buffer缓冲液(上海申能博彩公司)、2.5 μ L 25 mmol/L MgCl₂(上海申能博彩公司)、0.5 μ L 4 \times dNTP(上海申能博彩公司)、100 μ mol/L引物(上游5'-GTG AAC ACA GAG GTA TTT GAG TCC CCA C-3',下游5'-TAA CCT GCT ATT CTC ACC ACG GTA TTG C-3',由上海生物工程有限责

任公司合成和修饰)各0.1 μ L和0.2 μ L 10 μ mol/L探针(R92H引物和探针应用Primer 5.0设计)、0.25 μ L 5 000 ku/L TaqDNA聚合酶(上海申能博彩公司)及ddH₂O 16.85 μ L。PCR在罗氏公司Light-Cycler(版本号3.5)基因扩增检测仪上进行。循环反应条件为:95℃变性1 min, 95℃退火10 s, 65℃延伸40 s(温度转换率均为20℃/s),共40个循环;扩增产物的融解曲线分析程序为:95℃30 s, 42℃4 min,逐渐升至80℃时,温度转换率均为0.1℃/s并持续收集荧光数据。为进行实验质控,每一批PCR反应都以双蒸水代替模板作阴性对照,随机抽取10%的样本进行两次基因型分析。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验。采用HWE软件分析两组的Hardy-Weinberg平衡,组间基因型和等位基因频率用Fisher's精确概率检验。非条件Logistic逐步回归模型分析冠心病危险因素,以比值比(OR)及其95%可信区间(95% CI)表示相对危险度。

2 结果

2.1 临床资料分析

冠心病组性别分布和年龄与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),两组间TG、HDLC、FBG、BMI和吸烟史差异均有统计学意义(表1)。

表1 冠心病组和对照组临床资料比较

项 目	对照组 ($n = 263$)	冠心病组 ($n = 261$)
年龄(岁)	61.08 ± 9.43	61.73 ± 9.59
男/女(例)	196/67	208/53
BMI(kg/m^2)	23.70 ± 2.03	24.71 ± 2.97^a
TG(mmol/L)	1.79 ± 1.04	2.14 ± 1.30^a
TC(mmol/L)	5.02 ± 0.96	4.88 ± 1.27
LDLC(mmol/L)	2.68 ± 0.80	2.57 ± 1.00
HDLC(mmol/L)	1.31 ± 0.33	1.12 ± 0.25^a
血糖(mmol/L)	6.11 ± 1.29	6.62 ± 2.38^a
吸烟史(例)	89(33.8%)	134(51.3%) ^a
绝经(例)	60(22.8%)	46(17.6%)

a为 $P < 0.01$,与对照组比较。

2.2 基因型判定

Lp-PLA2基因R92H多态性位点有RR型、RH型和HH型3种基因型。由于RR基因型与探针完全匹配,具有较高的 T_m 值,在59.98℃左右;而HH

基因型与探针有 1 个碱基不匹配, T_m 值则漂移到 51.02℃左右; RH 基因型则出现 2 个融解谷, T_m 值分别为 51.02℃和 59.98℃左右。2 个融解谷之间的温度差 (ΔT) 在 8.96℃左右 (图 1)。

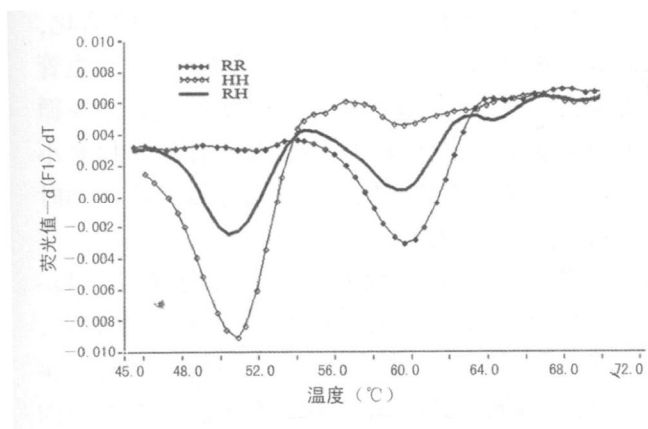


图 1 脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因 R92H 多态性位点荧光检测图

2.3 冠心病组和对照组脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因 R92H 多态性

冠心病组 RH 基因型和 H 等位基因频率显著高于对照组 (P 均 < 0.05)。RH 基因型患者患冠心病风险为 RR 基因型者的 1.77 倍 (95% CI 为 1.183~2.653), H 等位基因携带者发生冠心病的风险是 R 等位基因携带者的 1.75 倍 (95% CI 为 1.222~2.502) (表 2)。R92H 在冠心病组及对照组的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 (F 值分别为 -0.047 22 和 -0.039 21, P 均 > 0.05), 两组基因型分布频率达到遗传平衡, 具有群体代表性。

表 2 冠心病组与对照组 R92H 基因型分布和等位基因频率

项目	对照组 (263 例)	冠心病组 (261 例)	OR	95% CI	P 值
基因型					
RR	209 (79.5%)	177 (67.8%)	1.00	-	-
RH	52 (19.8%)	78 (29.9%)	1.77	1.183~2.653	0.005
HH	2 (0.7%)	6 (2.3%)	3.54	0.706~17.771	0.102
RH+HH	54 (20.5%)	84 (32.2%)	1.84	1.236~2.730	0.002
等位基因					
R	470 (89.4%)	432 (82.8%)	1.00	-	-
H	56 (10.6%)	90 (17.2%)	1.75	1.222~2.502	0.002

2.4 冠心病患者 R92H 多态性与冠心病危险因素及冠状动脉病变程度的关系

由于 HH 基因型例数较少, 与 RH 型合并计算。

冠心病组中 RH+HH 基因型患者血清 TC、LDLC 水平显著高于 RR 基因型者 ($P < 0.05$ 和 0.01), HDLC 水平显著低于 RR 基因型者 ($P < 0.05$)。TG、血糖、BMI、高血压史、糖尿病病史、吸烟史和性别比例在冠心病组 RH+HH 基因型患者与 RR 基因型者间差异均无显著性。对 RR 基因型者与 RH+HH 基因型者冠状动脉病变支数进行比较, 发现 RH+HH 基因型患者多支病变 (包括两支病变和三支病变) 率显著高于 RR 基因型者 ($P < 0.05$)。对患者的冠状动脉造影结果以 CAD i 评分^[3], 发现 RH+HH 基因型患者冠状动脉评分明显高于 RR 基因型者 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 3 冠心病组 RR 基因型者与 RH+HH 基因型者冠心病危险因素及冠状动脉病变程度对比

参数	RR 基因型 ($n = 177$)	RH+HH 基因型 ($n = 84$)
TG (mmol/L)	2.11 ± 1.23	2.22 ± 1.43
TC (mmol/L)	4.74 ± 1.23	5.17 ± 1.33 ^a
LDLC (mmol/L)	2.47 ± 0.99	2.81 ± 0.98 ^b
HDLC (mmol/L)	1.10 ± 0.24	1.17 ± 0.26 ^a
FBG (mmol/L)	6.51 ± 2.25	6.83 ± 2.65
BMI (kg/m^2)	24.77 ± 2.95	24.58 ± 3.03
高血压 (例)	49 (27.7%)	33 (39.3%)
糖尿病 (例)	28 (15.8%)	21 (25.0%)
吸烟 (例)	90 (50.8%)	44 (52.4%)
男性 (例)	144 (81.3%)	64 (76.2%)
女性 (例)	33 (18.7%)	20 (23.8%)
单支病变 (例)	73 (41.2%)	16 (19.1%)
多支病变 (例)	104 (58.8%)	68 (81.0%) ^a
CAD i 评分	42.68 ± 18.12	47.81 ± 15.95 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 RR 基因型比。

2.5 易患基因与冠心病及传统冠心病危险因素的关系

基因型相对风险分析显示, HH 型纯合子 + RH 型杂合子患者患冠心病的风险是 RR 型纯合子的 1.84 倍 (95% CI 为 1.236~2.730, $P < 0.01$; 表 2)。经 Logistic 回归分析校正性别、年龄、体质指数、血糖、血脂及高血压、糖尿病、吸烟史和月经史等相关因素之后, 仍具有统计学意义 ($OR = 1.629$, 95% CI 为 1.015~2.615, $P = 0.043$)。以 R92H 基因型为应变量, 将传统冠心病危险因素引入 Logistic 回归模型, 逐步回归法分析显示, R92H 不同基因型间高血压病史及 LDLC 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

和 $P < 0.01$), 即该位点 RH 和 HH 基因型患者高血压发病率增高, LDLC 水平也较 RR 型患者明显升高。

3 讨论

Lp-PLA2 属于磷脂酶超家族中的重要成员。血清 Lp-PLA2 水平不仅是冠心病的独立危险因素^[5], 并且可预测健康人群未来患冠心病的风险^[1,6], 血浆 Lp-PLA2 活性与基因型密切相关^[7]。本研究主要对汉族人群中 Lp-PLA2 基因多态性位点 R92H 与冠心病易感性进行了探讨。

研究^[8]发现, 冠心病患者 R92H 基因位点上 H 等位基因频率较对照组增多 ($P = 0.015$), 因此提出 R92H 基因多态性可能为冠心病的候选基因。在本研究中, 冠心病患者该位点 RH 基因型和 H 等位基因频率明显高于对照组, 携带 RH 基因型、H 等位基因者冠心病风险明显增高, Logistic 回归分析校正传统危险因素后, 该基因多态性位点仍是冠心病独立危险因素, 提示该位点也可能与汉族人群冠心病的发病有关。本研究中 R92H 基因多态性还与高血压及高 LDLC 独立相关, 且在冠心病患者中 RH + HH 基因型与高 TC、LDLC 及低 HDLC 关系密切, 高血压及脂质代谢异常均为冠心病的危险因素, 故该基因多态性可能不仅增加冠心病的易感性, 亦促进高血压、脂质代谢紊乱发生, 共同促进冠心病的发生与发展。这提示冠心病、高血压及血脂代谢紊乱可能受相同的遗传基因影响, 但其共同遗传分子生物学关联机制尚需深入探讨。

本研究还发现该基因多态性也与血管病变程度有关。冠心病患者中 RH + HH 基因型者 (H 等位基因携带者) 发生多支血管病变的风险增高。采用 CAD 冠状动脉评分量化冠状动脉狭窄程度, RH + HH 基因型者冠状动脉评分值明显升高, 提示该基因多态性可能不仅促进动脉粥样硬化的形成, 而且加速动脉粥样硬化的进展, 即与更严重的冠状动脉病变相关。然而, 杜克大学的研究却发现 R92H 位点 H 等位基因频率在冠心病组显著降低^[2], 与本研究结果相反, 这提示 Lp-PLA2 编码区 R92H 基因多态性在不同种族、不同人群中对冠心病的发病所起的作用存在差异。这也可能与冠心病是多基因遗传病、基因与基因之间以及基因与环境之间相互作用的复杂性有关, 而存在于多数研究中的患者群的异质性、基因异质性、中间表型的选择等问题还有待进一步深入探讨。

遗传学研究显示种族遗传因素对 Lp-PLA2 水平的影响达 62%^[9]。从现有的研究推测, 携带风险等位基因 H 可能会使 Lp-PLA2 酶活性增加, 导致其下游炎症产物溶血磷脂酰胆碱和氧化游离脂肪酸合成增加 (该两者均为水溶性, 具有很强的促炎作用), 增加粘附分子的表达, 诱导炎症因子的活化, 激活蛋白水解酶, 破坏纤维斑块的完整性, 导致血管内皮损伤, 并经过一系列复杂的连锁反应和恶性循环最终形成动脉粥样硬化; 并且由于对其底物血小板活化因子亲和力的降低^[10], 从而导致炎症活动时间延长, 促进炎症发展。

总之, 本研究在汉族人群中发现炎症因子 Lp-PLA2 的遗传变异与冠心病的发生、发展密切相关, 亦从基因水平证实了炎症参与冠心病的发生。Lp-PLA2 及其基因变异在动脉粥样硬化过程中确切的作用机制尚待更深入的研究, 明确他们之间的关系, 筛查高危人群, 将为动脉粥样硬化性疾病的早期诊断及防治提供新的线索。

[参考文献]

- [1] Oei HHS, vander Meer I, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is associated with risk of coronary heart disease and stroke: the rotterdam study [J]. *Circulation*, 2005 **111**: 570-575.
- [2] Sutton BS, Crosslin DR, Shah SH, et al. Comprehensive genetic analysis of the platelet activating factor acetylhydrolase (PLA2G7) gene and cardiovascular disease in case-control and family datasets [J]. *Hum Mol Genet*, 2008 **17**: 318-328.
- [3] Felker GM, Shaw LK, O'Connor CM. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002 **39**: 210-218.
- [4] 罗光华, 郑璐, 张晓鹰, 等. ShindRoar 探针技术检测单核苷酸多态性 [J]. *中华检验杂志*, 2007 **6**: 609-612.
- [5] Garza CA, Montori VM, McConnell JP, et al. Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease: a systematic review [J]. *Mayo Clin Proc*, 2007 **82** (2): 159-165.
- [6] Koenig W, Khuseynova N, Lowel H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany [J]. *Circulation*, 2004 **110**: 1903-908.
- [7] 张绍艳, 王滨有. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (11): 854-856.
- [8] Ninio E, Tregouet D, Carrier JL, et al. PAF-AH and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2004 **13**: 341-351.
- [9] Guerra R, Zhao B, Mooser V, et al. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins [J]. *J Lip Res*, 1997 **38**: 2281-288.
- [10] Knuse S, Mao XQ, Heinemann A, et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasma PAF-acetylhydrolase in pair catalytic activities and are associated with atopy and asthma [J]. *Am J Hum Genet*, 2000 **66**: 522-530.

(此文编辑 许雪梅)