

[文章编号] 1007-3949(2017)25-07-0701-04

· 临床研究 ·

# 载脂蛋白 M 基因 rs707921 位点多态性与冠心病易感性的关系

俞天虹<sup>1</sup>, 于洋<sup>2</sup>, 郑璐<sup>2</sup>, 柯海燕<sup>1</sup>, 杨晓宇<sup>1</sup>, 杨玲<sup>1</sup>, 孙晋亮<sup>1</sup>, 邵山<sup>1</sup>, 罗光华<sup>2</sup>, 周瑞珏<sup>1</sup>

(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] 载脂蛋白 M; 冠心病; 单核苷酸多态性

[摘要] **目的** 检测载脂蛋白 M(ApoM) 基因 rs707921 位点的基因多态性, 探讨其与冠心病(CHD) 的相关性。**方法** 采用单荧光标记探针技术检测 111 例 CHD 患者及 248 例对照组的 ApoM rs707921 位点单核苷酸多态性, 分析其基因型和等位基因频率的分布情况。**结果** ApoM rs707921 位点 3 种基因型(AA 型、AC 型和 CC 型) 在 CHD 组中分布频率为 1.8%、13.5% 和 84.7%, 在对照组中分布频率为 2.0%、25.4% 和 72.6%, 两组差异有统计学意义( $P=0.039$ ); ApoM rs707921 位点 A、C 等位基因的频率在 CHD 组和对照组中分布频率分别为 8.6%、91.4% 和 14.7%、85.3%, 两组比较差异有统计学意义( $P=0.023$ )。CHD 组中 AC+AA 基因型者甘油三酯水平显著低于 CC 基因型者( $P=0.043$ )。CHD 组 rs707921 位点多态性不同基因型间冠状动脉病变严重程度差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** ApoM 基因 rs707921 位点 A 等位基因可能降低 CHD 的发病风险, 但与 CHD 的严重程度无关。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

## Association between apolipoprotein M gene rs707921 site polymorphism and susceptibility to coronary heart disease

YU Tian-Hong<sup>1</sup>, YU Yang<sup>2</sup>, ZHENG Lu<sup>2</sup>, KE Hai-Yan<sup>1</sup>, YANG Xiao-Yu<sup>1</sup>, YANG Ling<sup>1</sup>, SUN Jin-Liang<sup>1</sup>, SHAO Shan<sup>1</sup>, LUO Guang-Hua<sup>2</sup>, ZHOU Rui-Jue<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Comprehensive Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein M; Coronary heart disease; Single nucleotide polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between apolipoprotein (ApoM) gene and coronary heart disease (CHD) by detecting the polymorphism of ApoM rs707921 site. **Methods** The polymorphism of ApoM rs707921 site was detected by single fluorescent labeling probe technique in 111 cases of CHD patients and 248 cases of control group. The distribution of genotype and allele frequency was analyzed. **Results** The frequencies of ApoM rs707921 genotype (AA, AC and CC) were 1.8%, 13.5% and 84.7% in CHD group, 2.0%, 25.4% and 72.6% in control group, respectively, there was significant difference between the two groups ( $P=0.039$ ). The frequencies of A and C allele in ApoM rs707921 site were 8.6% and 91.4% in CHD group, 14.7% and 85.3% in control group, respectively, the difference between the two groups was statistically significant ( $P=0.023$ ). Triglyceride level of AC+AA genotype was significantly lower than that of CC genotype in CHD group ( $P=0.043$ ). There was no significant difference in the severity of coronary artery lesion between different genotypes of rs707921 polymorphism in CHD group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** A allele of ApoM gene rs707921 site may reduce the risk of CHD, but has nothing to do with the severity of coronary heart disease.

载脂蛋白 M(apolipoprotein M, ApoM) 主要存在于高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL), 仅少量存在于低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)

中<sup>[1-3]</sup>。有研究证实, ApoM 可能通过影响 HDL 代谢促进 Pre- $\beta$ -HDL 颗粒的形成<sup>[4]</sup>, 保护 LDL 免受  $\text{Cu}^{2+}$  诱导的氧化, 并提高 HDL 的抗炎功能<sup>[5-6]</sup>。ApoM 可通过调

[收稿日期] 2016-12-14

[修回日期] 2017-03-03

[基金项目] 常州市科技局科技支撑(社会发展)项目(20135063)

[作者简介] 俞天虹, 硕士, 中医师, 研究方向为心血管疾病, E-mail 为 yutianhong919@163.com。通讯作者罗光华, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为分子生物学, E-mail 为 shineroar@163.com。通讯作者周瑞珏, 主任医师, 教授, 研究方向为心血管疾病, E-mail 为 rjzhou0131@126.com。

节前β-HDL影响HDL参与胆固醇的逆向转运<sup>[7]</sup>,并能通过调节HDL的免疫和抗炎功能,减少动脉粥样硬化的相关炎症,从而预防动脉粥样硬化的发生<sup>[1,8]</sup>。

目前认为冠心病(coronary heart disease,CHD)是一种多因素多基因紊乱的疾病,并且受个体遗传基因和多种复杂环境因素影响。流行病学发现,多个基因的改变可能会增加患CHD的风险,如血管紧张素转化酶<sup>[9]</sup>和载脂蛋白E<sup>[10]</sup>等。目前研究表明ApoM基因启动子区778T/C、855T/C、1065C/A位点存在单核苷酸多态性,而随着分子生物学技术的发展,人们发现内含子在基因表达中具有相当重要的作用<sup>[11]</sup>,rs707921位点多态性位于第5内含子,为第1871个碱基的C→A突变。有研究表明,ApoM rs707921位点多态性不同基因型的汉族女性血清中高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)含量存在差异<sup>[12]</sup>,但该位点基因多态性与CHD的发生以及冠状动脉狭窄程度是否存在关联,尚未见报道。本研究对中国汉族人群CHD和对照组ApoM基因内含子区该位点的基因多态性进行检测,并探讨其与CHD发生发展的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

本研究共纳入393名研究对象,其中经冠状动脉造影证实1支或1支以上血管直径狭窄50%以上者111例,此为CHD组,其中男性79例,女性32例,平均年龄63.89±10.63岁;对照组248例,为健康体检者及冠状动脉造影无病变者,男性135例,女性113例,平均年龄62.27±11.35岁。以上研究对象均为常州市第一人民医院无血缘关系的汉族人,且排除肿瘤和肝、肾等系统性疾病以及高血压和糖尿病。

1.2 生物化学指标检测

所有入选对象均空腹12 h采集肘静脉血2 mL,乙二胺四乙酸抗凝,测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、HDLC、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC),以上生物化学指标均使用全自动生物化学分析仪检测。

1.3 外周血DNA制备

采血前禁食12 h,采集肘静脉血2 mL,乙二胺四乙酸抗凝,采用天根生物化学科技有限公司的血液基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,TE缓冲溶液(Tris-EDTA buffer solution)溶解并于-80℃冰箱保存。

1.4 ApoM rs707921 多态性基因型检测

采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)并根据碱基淬灭探针技术<sup>[13]</sup>检测单核苷酸多态性。应用Primer 5.0软件分析设计引物及探针,上游引物:5'-GCATCTCTGTTCTCATACTTCTCCC-3',下游引物:5'-CTCTTTTGAGTAGCCCAGAACCC-3',探针:CAGGATTAGGACTCACCAAGTCTT-FAM。上述引物及探针由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR总反应体系为25 μL,其中DNA模板2 μL,10×PCR缓冲液2.5 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL,10 mmol/L 4×dNTPs 0.5 μL,5 U/μL Taq DNA聚合酶0.25 μL,100 μmol/L上、下游引物各0.1 μL,10 μmol/L探针0.1 μL,双蒸水补足至25 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃ 2 s,60℃ 1 min,共40个循环;熔解曲线程序:95℃ 30 s,25℃ 4 min,逐渐升温至70℃(温度转换率为0.1℃/s,持续收集荧光数据)。以上所有反应在Light Cycler 480 II PCR扩增仪上进行。根据熔解曲线判断基因型。

1.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有研究对象均经Hardy-Weinberg平衡分析检验。两组人群一般资料的比较采用t检验。等位基因频率、基因型频率均采用χ<sup>2</sup>检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

CHD组与对照组性别、年龄、FBG、收缩压、舒张压、TG、TC、LDLC差异无统计学意义(P>0.05)。CHD组HDLC低于对照组,差异有统计学意义(P<0.05;表1)。

表1. 两组临床资料比较

Table 1. Comparison of clinical data between the two groups

项 目	对照组 (n=248)	CHD组 (n=111)	P 值
男/女(例)	135/113	79/32	0.091
年龄(岁)	62.27±11.35	63.89±10.63	0.222
FBG(mmol/L)	5.58±1.73	5.72±1.46	0.063
收缩压(mmHg)	134.39±20.38	136.85±20.40	0.099
舒张压(mmHg)	76.74±12.34	81.46±11.42	0.069
TC(mmol/L)	4.60±0.89	4.36±1.08	0.104
TG(mmol/L)	1.92±1.62	2.00±1.15	0.062
HDLC(mmol/L)	1.22±0.30	1.05±0.30	<0.05
LDLC(mmol/L)	2.25±0.53	2.19±0.95	0.088

2.2 ApoM rs707921 多态性基因型的判别

根据碱基淬灭探针技术,基因序列的差异可通过探针熔解温度(temperature of melting, TM)的变化进行检测<sup>[12]</sup>。根据 TM 值的不同,判定该位点 3 种不同的基因型:AA 型、AC 型、CC 型。CC 型在 TM 值左右出现熔解谷,AA 型在 TM 值偏差 7℃左右出现熔解谷,而 AC 型则在两个温度均出现熔解谷(图 1)。

2.3 两组 ApoM rs707921 位点基因型和等位基因比较

CHD 组和对照组 ApoM rs707921 位点多态性基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P>0.05$ ),说明研究人群具有群体代表性。3 种基因型 AA 型、AC 型、CC 型在 CHD 组和对照组分布不同,差异具有统计学意义( $\chi^2=6.479, P=0.039$ );CHD 组 A 等位基因频率明显低于对照组,差异具有统计学意义

( $\chi^2=5.208, P=0.023$ ;表 2)。

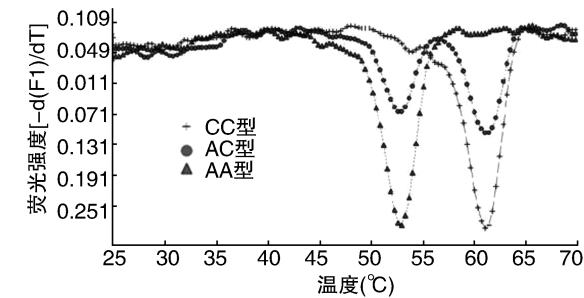


图 1. ApoM 基因 rs707921 位点多态性熔解曲线分析 用荧光强度对温度的一次负倒数 $[-d(F1)/dT]$ 作图,显示不同 TM 值的熔解谷。  
Figure 1. Analysis of melting curve of ApoM gene polymorphism at rs707921 locus

表 2. 两组 ApoM rs707921 多态性分布比较

Table 2. Comparison of distribution of ApoM rs707921 polymorphism between the two groups

分 组	n	基因型[ 例(%) ]			等位基因[ 例(%) ]	
		AA	AC	CC	A	C
CHD 组	111	2(1.8)	15(13.5)	94(84.7)	19(8.6)	203(91.4)
对照组	248	5(2.0)	63(25.4)	180(72.6)	73(14.7)	423(85.3)

2.4 两组 ApoM rs707921 位点多态性与血脂水平的关系

CHD 组 AC+AA 基因型 TG 水平显著低于 CC

基因型( $P=0.043$ ;表 3),其他指标差异无统计学意义;对照组 AC+AA 基因型血脂水平与 CC 基因型差异无统计学意义。

表 3. ApoM rs707921 多态性与血脂水平的关系

Table 3. Relationship between ApoM rs707921 polymorphism and serum lipid levels

项 目	CHD 组			对照组		
	CC	AC+AA	P 值	CC	AC+AA	P 值
TC(mmole/L)	4.21±1.14	4.08±0.98	0.557	4.60±0.89	4.41±0.64	0.338
TG(mmole/L)	2.87±2.75	1.96±0.77	0.043	1.92±1.62	1.70±1.39	0.302
HDLc(mmole/L)	1.06±0.31	1.03±0.20	0.959	1.22±0.30	1.24±0.41	0.400
LDLc(mmole/L)	2.06±0.89	1.90±0.67	0.292	2.25±0.53	2.14±0.48	0.292

2.5 ApoM rs707921 位点多态性与冠状动脉狭窄程度的关系

CHD 组不同基因型间冠状动脉病变支数无明显差异( $P>0.05$ ;表 4);不同基因型间冠状动脉病变 Gensini 积分无明显差异( $P>0.05$ ;表 5)。

表 4. CHD 组不同基因型冠状动脉病变支数的比较

Table 4. Comparison of the number of coronary artery lesions with different genotypes in the CHD group

基因型	例数	冠状动脉病变支数[ 例(%) ]		
		1 支	2 支	3 支
AA	2	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)
AC	15	6(40.0)	5(33.3)	4(26.7)
CC	94	38(40.4)	19(20.2)	37(39.4)
合计	111	45(40.5)	25(22.5)	41(36.9)

3 讨 论

ApoM 最早在富含甘油三酯的脂蛋白中发现,

表 5. CHD 组不同基因型 Gensini 积分比较  
Table 5. Comparison of Gensini score of different genotypes in the CHD group

基因型	例数	Gensini 积分
AA	2	28.50±21.92
AC	15	44.25±44.17
CC	94	43.58±33.29

分子量 26 kDa,在血浆中主要存在于 HDL 中,它通过参与相关脂代谢的途径,进而影响动脉粥样硬化的发病进程。有研究发现 HDL 各亚类的组成改变与动脉粥样硬化有相关<sup>[14]</sup>,而 ApoM 是构成 HDL 的一种重要成分,ApoM 基因结构的变化可能会影响 HDL 亚类组成的改变,从而影响 HDL 在动脉粥样硬化中的作用。ApoM 可通过对前 β-HDL 的调节来影响胆固醇逆向转运的过程<sup>[6,15]</sup>,这表明 HDL 的心血管保护作用主要是通过胆固醇逆向转运机制来实现的。

本研究中的 ApoM 基因多态性位点 rs707921 在内含子区域内,距 5 号外显子 3'端间隔 40 个碱基。我们比较了 CHD 组和对照组 ApoM 基因内含子区该位点基因型和单核苷酸的差异,结果表明该位点存在单核苷酸多态性。3 种基因型(AA、AC、CC)在 CHD 组和对照组分布不同,其中 CHD 组中 A 等位基因频率明显低于对照组( $P=0.023$ ),提示此位点 A 等位基因可能是 CHD 的保护性因子。对患者血脂水平与 rs707921 位点多态性的相关性分析结果提示,CHD 组中 AC+AA 型人群 TG 水平明显低于 CC 基因型人群( $P=0.043$ ),提示该位点 A 等位基因可能通过调节 ApoM 表达影响 TG 的代谢,参与了 CHD 的病理生理过程。

在 CHD 组中进一步研究 rs707921 位点不同基因型与冠状动脉病变严重程度的关系,结果发现不同基因型间冠状动脉病变严重程度无显著性差异,提示 ApoM rs707921 等位基因可能是 CHD 的遗传易感基因,其基因多态性与 CHD 发病有关,但与 CHD 严重程度无关。

综上所述,本研究发现,ApoM 基因 rs707921 位点存在单核苷酸多态性,该位点 A 等位基因可能是 CHD 的保护性因子之一,提示位于 ApoM 内含子区域 rs707921 位点的单核苷酸多态性可能参与了 CHD 的发生,为 CHD 易感人群的早期筛选诊断和临床分子治疗提供了理论基础。

[参考文献]

[1] Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (ApoM) [J].

Biol Chem, 1999, 274(44): 31 286-290.

[2] Zhang P, Gao J, Pu C, et al. Effects of hyperlipidaemia on plasma apolipoprotein M levels in patients with type 2 diabetes mellitus: an independent case-control study [J]. Lipids Health Dis, 2016, 15 (1): 158.

[3] Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 (23): 9 613-618.

[4] Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for pre beta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis [J]. Nature Med, 2005, 11(4): 418-422.

[5] Christoffersen C, Nielsen LB, Axler O, et al. Isolation and characterization of human apolipoprotein M-containing lipoproteins [J]. Lipid Res, 2006, 47(8): 1 833-843.

[6] Christoffersen C, Nielsen LB. Apolipoprotein M--a new biomarker in sepsis [J]. Crit Care, 2012, 16(3): 126.

[7] Bjrn D, Nielsen LB. Apolipoprotein M: a novel player in high density lipoprotein metabolism and atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2006, 17(3): 291-295.

[8] Galvani S, Sanson M, Blaho VA, et al. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation [J]. Sci Signal, 2015, 8 (389): ra79.

[9] Sun P, Zhang W, Zhu W, et al. Expression of renin-angiotensin system on dendritic cells of patients with coronary artery disease [J]. Inflammation, 2009, 32(6): 347-356.

[10] Chukkapalli SS, Velsko IM, Rivera-Kweh MF, et al. Polymicrobial oral infection with four periodontal bacteria orchestrates a distinct inflammatory response and atherosclerosis in ApoE null mice [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0 143 291.

[11] Martin S, Bellora N, González-Vallinas J, et al. Preferential binding of a stable G3BP ribonucleoprotein complex to intron-retaining transcripts in mouse brain and modulation of their expression in the cerebellum [J]. J Neurochem, 2016, 139(3): 349-368.

[12] Aung LH, Yin RX, Wu DF, et al. Association of the apolipoprotein M gene polymorphisms and serum lipid levels [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 1 843-853.

[13] Luo G, Zheng L, Zhang X, et al. Genotyping of single nucleotide polymorphisms using base-quenched probe: a method dose not invariably depend on the deoxyguanosine nucleotide [J]. Anal Biochem, 2009, 386(2): 161-166.

[14] Flores-Castillo C, Zamora-Perez JA, Carreon-Torres E, et al. Atorvastatin and fenofibrate combination induces the predominance of the large HDL subclasses and increased apo AI fractional catabolic rates in New Zealand white rabbits with exogenous hypercholesterolemia [J]. Fund AMC Lin Pharmacol, 2015, 29(4): 362-370.

[15] Hu YW, Zheng L, Wang Q, et al. Vascular endothelial growth factor downregulates apolipoprotein M expression by inhibiting Foxa2 in a Nur77-dependent manner [J]. Rejuvenation Res, 2012, 15 (4): 423-434.

(此文编辑 曾学清)