

124 例冠心病患者三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因启动子区-477C/T 单核苷酸多态性分析

刘胜林, 郭志刚, 刘凌, 李欣, 赖文岩, 屠燕

(南方医科大学南方医院心内科, 广东省广州市 510515)

[关键词] 内科学; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因多态性与血脂及冠心病的关系; 聚合酶链反应; 三磷酸腺苷结合盒转运体; 单核苷酸多态性; 高密度脂蛋白胆固醇; 冠心病

[摘要] 目的 研究三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因启动子区-477C/T 单核苷酸多态性与血浆高密度脂蛋白胆固醇和冠心病的关系。方法 用聚合酶链反应限制片段多态性检测 124 例冠心病患者和 111 例正常人的三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因启动子区-477 位点基因型, 并比较基因型在冠心病组与正常人组间、冠心病组中不同临床表现型之间分布的差异性及三种基因型与冠心病相关临床指标的关系。结果 TT 基因型及 T 等位基因在冠心病组中的分布频率明显高于正常人组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。急性冠状动脉综合征组 TT 基因型及 T 等位基因明显高于稳定型心绞痛组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。多支病变组 TT 基因型明显高于单支病变组 ($P < 0.05$)。在冠心病组中, TT 基因型血浆高密度脂蛋白胆固醇水平明显低于 CC 基因型 ($P < 0.001$)。结论 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因启动子区-477C/T 单核苷酸多态性可显著影响中国冠心病患者血浆高密度脂蛋白胆固醇水平, 而且与冠状动脉病变程度及冠心病严重程度相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Analysis of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in Promoter Region of ATP Binding Cassette Transporter (ABCA1) Gene in 124 Patients with Coronary Heart Disease

LIU Sheng-Lin, GUO Zhi-Gang, LIU Ling, LI Xin, LAI Wen-Yan, and TU Yan

(Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[KEY WORDS] ATP Binding Cassette Transporter A1; Single Nucleotide Polymorphism; High Density Lipoprotein Cholesterol; Coronary Heart Disease; Acyl I Enzyme

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of -477C/T single nucleotide polymorphism (SNP) in promoter region of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) gene on plasma levels of high density lipoprotein cholesterol (HDL) and its relationship with coronary heart disease (CHD). **Methods** -477C/T genotypes in promoter region of ABCA1 gene was detected in 124 CHD individuals and 111 healthy individuals by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and distribution of the -477C/T genotypes was compared between CHD group and healthy group, and also between different CHD clinical situations. The clinical indexes associated with CHD were also compared among the three genotypes. **Results** The higher proportion of the TT genotype and T allele was verified in CHD group than that in healthy group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). In CHD group, the higher proportion of the TT genotype and the T allele was further affirmed in ACS group than that in SAP group ($P < 0.01$). The proportion of the TT genotype in multi lesions group was higher than that in single lesion group ($P < 0.05$). The plasma levels of HDL were differed significantly between the TT genotype and the CC genotype ($P < 0.001$) in CHD group. **Conclusions** The plasma levels of HDL may be influenced by the -477C/T SNP in the promoter region of ABCA1 gene in CHD group. The -477C/T SNP in the promoter region of ABCA1 gene may associate with the severity of coronary atherosclerosis and CHD.

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 是近年来新发现的涉及胆固醇逆转运初始环节和高密度脂蛋白胆固醇

(high density lipoprotein cholesterol, HDL) 形成的关键调节蛋白。大量流行病学研究亦表明 HDL 水平与冠心病呈明显负相关。HDL 对心血管具有保护作用, 其主要机制是增加胆固醇逆转运。

ABCA1 基因突变可导致 Tangier 病 (TD) 和家族性低 α 脂蛋白血症 (FHA)^[1, 2]。两者均主要表现为血浆 HDL、载脂蛋白 A IV 严重减低、早发冠心病。最近多项研究表明, 在普通人群中, 部分位于 ABCA1 基因编码区和基因调控序列的单核苷酸多态性

[收稿日期] 2004-09-27

[修回日期] 2005-03-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30171028、30471929)和广东省自然科学基金(010616)资助

[作者简介] 刘胜林, 硕士研究生, 主要从事冠心病临床及基础研究。通讯作者郭志刚, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事临床血脂学与冠心病的研究, E-mail 为 guodocor@hotmail.com。刘凌, 主治医师, 主要从事冠心病临床及基础研究。

(single nucleotide polymorphism, SNP) 与血脂水平、冠状动脉狭窄程度和冠心病事件相关^[3, 4]。我们对中国汉族人群中冠心病患者、正常人 ABCA1 基因启动子区-477C/T 位点 SNP 进行检测, 以分析 ABCA1 基因 SNP 与血浆 HDLC 及冠心病的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

冠心病组 124 例, 其中男性 93 例, 女性 31 例, 年龄 62.50 ± 8.89 岁, 根据临床表现、平板运动心电图、心肌灌注 ECT 显像、冠状动脉造影确诊, 均排除严重肝、肾、肿瘤等疾病。此外, 冠心病组根据临床表现或冠状动脉病变范围又进一步分为: 稳定型心绞痛 (SAP) 组 (90 例) 和急性冠状动脉综合征 (ACS) 组 (34 例) 以了解基因多态性与冠心病严重程度有无关系; ④冠心病组中有 90 例行冠状动脉造影检查, 分为单支病变组 (49 例) 和多支病变组 (41 例), 以明确 ABCA1 基因型与冠状动脉病变程度有无关系。正常对照组 111 例, 其中男性 72 例, 女性 39 例, 年龄 60.62 ± 8.45 岁, 经询问病史、体检、实验室检查、心电图、胸片等检查排除冠心病、肿瘤和严重的肝、肾疾病。两组年龄、性别无显著性差异。

1.2 基因组 DNA 的提取

外周静脉血 3 mL, EDTA-Na₂ 抗凝, 提取白细胞基因组 DNA, 用作 PCR 扩增模板。

1.3 聚合酶链反应限制片长多态性检测三磷酸腺苷结合转运体 A1 基因型

引物由上海生物工程公司合成, 上游为 5'-CTC GGG TCC TCT GAG GGA CCT-3', 下游为 5'-CCG CAG ACT CTC TAG TCC AG-3'。PCR 反应体系 50 μ L, 含提取 DNA 2 μ L、10 \times Buffer 5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L、Taq 酶 2.5 u、2.5 mmol/L dNTP 4 μ L、10 μ mol/L 引物各 2 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 120 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 退火 60 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min。Aci iv 酶切反应体系 20 μ L, 含 PCR 产物 10 μ L、限制性内切酶 Aci iv 1 μ L、1 \times Buffer 2 μ L、去离子水 7 μ L。置于 37 $^{\circ}$ C, 过夜。

1.4 基因型检测

Aci iv 限制性核酸内切酶酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 分离后置于紫外灯下观察。以 ϕ X174-Hinc Ⅲ消化的 DNA 为标记物。

1.5 临床指标检测

空腹 12 h 以上, 清晨抽取静脉血 3 mL, 分离血

清测定血脂, 酶法测定总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG), 直接一步法测定 HDLC、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、极低密度脂蛋白胆固醇 (very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC), 采用欧林巴斯 AU-800 全自动生物化学仪测定, 符合国家质检标准。体质指数 (body mass index, BMI) = 体重/身高², 空腹血糖、肝、肾功能均由全自动生化分析仪测量。

1.6 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用 One Way ANOVA 检验。基因型或等位基因与不同分组之间的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因-477C/T 基因型的分布

ABCA1 基因启动子区 PCR 扩增产物长度为 351 bp。凝胶分析显示为一条 351 bp 的 DNA 条带 (图 1, Figure 1)。经 Aci iv 酶切后为三种基因型, 分别是 CC、CT、TT 基因型。CC 基因型有 148 bp、130 bp、73 bp 三个片段, 其中 148 bp 和 130 bp 两条带因为分子量接近而显示为一条带。CT 基因型含 278 bp、148 bp、130 bp、73 bp 四个片段, 显示为三条带。TT 基因型含 278 bp、73 bp 两个片段, 显示为两条带 (图 2, Figure 2)。从表 1 (Table 1) 可见, 冠心病组和正常组三种基因型分布差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 冠心病组 TT 基因型、T 等位基因比例明显高于正常组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。



图 1. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因聚合酶链反应产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 1-4 为正常组, 5-8 为冠心病组。

Figure 1. Electrophoresis of PCR products of ABCA1 gene

2.2 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因-477C/T 基因型在冠心病临床分型中的分布

从表 1 (Table 1) 可见, ACS 组和 SAP 组三种基因型分布差异有显著性意义 ($P < 0.05$), ACS 组 TT 基

因型、T 等位基因比例明显高于 SAP 组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。

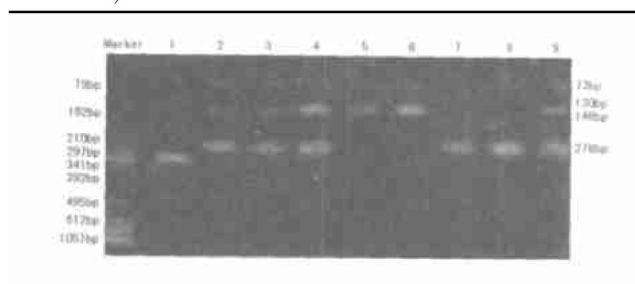


图 2. 聚合酶链反应产物及 Aci iv 酶切产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 1 为聚合酶链反应产物, 3、5、7、9 为稳定型心绞痛组酶切产物, 2、4、6、8 为急性冠状动脉综合征组酶切产物。

Figure 2. Electrophoresis of PCR and restriction enzyme digestive products of ABCA1 gene

表 1. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因-477C/T 基因型在冠心病组和正常组的分布

Table 1. Distribution of -477C/T genotypes in CHD and healthy individual group

分 组	基因型			等位基因	
	CC	CT	TT	C	T
冠心病组	37	54	33 ^a	128	120 ^c
ACS 组	23	37	30 ^b	83	97 ^d
SAP 组	14	17	3	45	23
正常组	46	51	14	143	79

a: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与正常组比较; b: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与 SAP 组比较。

2.3 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因-477C/T 基因型与冠状动脉病变程度的关系

单支病变组和多支病变组三种基因型分布差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 多支病变组 TT 基因型明显高于单支病变组 ($P < 0.05$), 见表 2 (Table 2)。

2.4 冠心病组三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因-477C/T 基因型与相关临床指标的关系

冠心病组 TT 基因型与 CT 基因型和 CC 基因型 HDLC 水平差异有显著性意义 ($P < 0.001$), 而 CT 基因型与 CC 基因型 HDLC 水平差异无显著性意义。而 BMI、TG、TC、LDLC 和 VLDLC 在三种基因型中差异无显著性意义 (表 3, Table 3)。

3 讨论

冠心病是危害中老年人健康的常见病, 流行病学研究表明低 HDLC 血症是冠心病的一个独立危险

表 2. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因-477C/T 基因型与冠状动脉病变程度的关系

Table 2. Association of -477C/T genotypes with severity of coronary atherosclerosis

分 组	CT	CC	TT
单支病变组	23	17	9
多支病变组	18	6	17 ^a

a: $P < 0.05$, 与单支病变组比较。

表 3. 冠心病组三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因-477C/T 基因型与临床指标的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Association of -477C/T Genotypes with clinic indexes in CAD group

指标	CC (n=37)	CT (n=54)	TT (n=33)
总胆固醇 (mmol/L)	4.92 ± 0.77	4.87 ± 0.96	4.88 ± 0.96
甘油三酯 (mmol/L)	1.69 ± 0.52	1.80 ± 0.68	1.84 ± 0.65
HDLC (mmol/L)	1.31 ± 0.30	1.21 ± 0.25	1.01 ± 0.21 ^a
LDLC (mmol/L)	2.51 ± 0.53	2.48 ± 0.67	2.38 ± 0.62
LDLC (mmol/L)	1.11 ± 0.27	1.15 ± 0.29	1.18 ± 0.35
体重指数 (kg/m ²)	24.41 ± 2.58	24.36 ± 2.52	24.15 ± 4.48

a: $P < 0.001$, 与 CC 和 CT 基因型组比较。

因素, 除运动、饮酒等行为影响外, HDLC 主要受多种基因如载脂蛋白 A iv、SR-BI、ABCA1 等的调控, 其中 ABCA1 基因在启动细胞内胆固醇外流、高密度脂蛋白形成和胆固醇逆转运中起至关重要的作用。

大量实验研究表明, ABCA1 基因与动脉硬化及泡沫细胞形成有关^[5-7]。迄今为止, 已发现 50 多个 ABCA1 基因突变位点与 Tangier 病和家族性低 α 脂蛋白血症相关。我们在三个 Tangier 病家族发现两个新的 ABCA1 基因突变 (点突变与大片段缺损)^[8, 9]。而在普通人 (包括正常人和冠心病患者) 中, ABCA1 基因变异最常见的方式是 SNP。ABCA1 基因编码区 SNP 和位于基因调控序列的 SNP 因具有功能多态性^[10], 已成为目前研究的热点。目前, ABCA1 基因 SNP 的研究多集中在编码区, 而有关启动子区的文献报导较少。

多项研究表明, 特定的 ABCA1 基因编码区 SNP 在不同地域、不同种群中的分布频率明显不同; 对血浆 HDLC 水平和冠心病的发生、严重程度的影响也不同, 其作用可相近、也可截然相反^[3, 4, 11]。还有研究显示, 在美国冠状动脉病变 (coronary artery disease, CAD) 人群中, ABCA1 基因启动子区 SNP 对 HDLC 仅有轻度影响或无影响, 但与冠心病明显相关^[12]; 在

日本 CAD 人群中, 启动子区 SNP 可明显影响血浆 HDLC 水平, 但与冠心病无关^[13]。欧洲人群的研究发现, ABCA1 基因非编码区 SNP 不须改变血脂水平也可明显影响 CAD 的程度, 如启动子区-17C/G 位点 SNP 与 CAD 发病减低相关, 携带-191G/C 患者 CAD 事件增加 3 倍; 而非编码区的-69C/T SNP, CAD 事件增加 2 倍, InsG319 位点 SNP 则更少出现动脉粥样硬化^[14]。由此可见, 非编码区的 SNP 对血浆 HDLC 水平和冠心病的发生、严重程度的影响也大相径庭。

本实验比较了中国汉族人群的 ABCA1 基因启动子区-477C/T SNP 在冠心病组和正常人组中的分布, 结果表明 T 基因可能是冠心病的易患基因, C 基因则可能是冠心病的保护基因。通过比较 ABCA1 基因-477C/T SNP 在冠心病组的不同亚组中的分布, 我们证实 ABCA1 基因-477C/T SNP 不仅与冠心病严重程度相关, 而且与冠状动脉病变严重程度相关。以前的研究结果显示 ABCA1 启动子区的 SNP 即使与冠心病明显相关也往往表现为对 HDLC 和载脂蛋白 A iv 轻度影响或无影响, 或明显影响 HDLC 和载脂蛋白 A iv 水平, 但与冠心病无关^[13, 14]。而我们的结果发现冠心病组中, TT 基因型表现为显著减低的 HDLC 水平 ($P < 0.001$), 且与冠心病事件和冠状动脉病变严重程度相关。这与 Lutucuta 的研究结果不全相同, 可能是由于 ABCA1 基因对不同种族人群的影响不同。

在普通人群中, ABCA1 基因除影响细胞内胆固醇外流, 影响血浆高密度脂蛋白水平外; 也可调节炎症性细胞因子(白细胞介素 1 β)及氧自由基的分泌, 从而在动脉粥样硬化的发生中发挥作用^[15]。-477C/T SNP 对炎症性细胞因子及氧自由基有无影响尚需进一步研究。

上述实验研究了 ABCA1 基因启动子区-477C/T 三种基因型在中国汉族人群中的分布, 及其与血脂和冠心病的关系; 研究有助于发现 ABCA1 启动子区基因型与临床表现型之间的内在联系, 为 ABCA1 基因启动子区 SNP 在冠心病人群中的意义提供一些新的证据。

[参考文献]

- [1] Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Botcher A, Diederich W, et al. The gene coding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 1999, **22** (4): 347-351
- [2] Mott S, Yu L, Marcil M, Boucher B, Rondeau C, Genest J, et al. Decreased cellular cholesterol efflux is a common cause of familial hypoalphalipoproteinemia: role of the ABCA1 gene mutations. *Atherosclerosis*, 2000, **152** (2): 457-468
- [3] Tan JH, Low PS, Tan YS, Tong MC, Saha N, Yang H, et al. ABCA1 gene polymorphism and their associations with coronary disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. *Hum Genet*, 2003, **113** (2): 106-117
- [4] Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwarts KY, Molhuizen HO, Roomp K, et al. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein level and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation*, 2001, **103** (9): 1198-205
- [5] Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem*, 2000, **275** (44): 34508-34511
- [6] 唐朝克, 易光辉, 唐国华, 王佐, 王燕, 刘录山, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在泡沫细胞胆固醇流出中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 304-308
- [7] Lawn RM, Wade DP, Couse TL. Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (3): 378-385
- [8] Guo Z, Inazu A, Yu W, Suzumura T, Okamoto M, Nohara A, et al. Identification of ABC1 gene mutations in three Japanese patients with Tangier disease. *Circulation*, 2000, **102**: 1128-1129
- [9] Guo Z, Inazu A, Yu W, Suzumura T, Okamoto M, Nohara A, et al. Double deletions and missense mutations in the first nucleotide-binding fold of the ATP-binding cassette transporter 1 A1 (ABCA1) gene in Japanese patients with Tangier disease. *J Human Genet*, 2002, **47** (9): 325-329
- [10] Chasman D, Adams RM. Predicting the functional consequences of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. *J Mol Biol*, 2001, **307** (2): 683-706
- [11] Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. *Metabolism*, 2003, **52** (7): 930-934
- [12] Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, Gotto AM Jr, Marian AJ. Novel polymorphisms in promoter region of ATP binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ Res*, 2001, **88** (9): 969-973
- [13] Shioji K, Nishioka J, Naraba H, Kokubo Y, Mannami T, Inamoto N, et al. A promoter variant of the ATP-binding cassette transporter A1 gene alters the HDL cholesterol level in the general Japanese population. *J Hum Genet*, 2004, **49** (3): 141-147
- [14] Zwarts KY, Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Singaraja R, Loubser O, et al. ABCA1 regulatory variants influence coronary artery disease independent of effects on plasma lipid levels. *Clin Genet*, 2002, **61** (2): 115-125
- [15] Zhou X, Engel T, Goepfert C, Erren M, Assmann G, von Eckardstein A. The ATP binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin 1 β from macrophages but not from monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **291** (3): 598-604

(此文编辑 文玉珊)