

内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性与冠心病关系的 Meta 分析

李 敏, 贾崇奇

(山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学研究所, 山东省济南市 250012)

[关键词] 流行病学; 内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性与冠心病的关系; Meta 分析; 冠心病; 内皮型一氧化氮合酶; 基因多态性

[摘要] 目的 综合评价不同国家人群内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性(Glu298Asp)与冠心病的关系。方法 以冠心病组和对照组基因型频数的比值比为统计量,全面检索相关文献,剔除不符合要求的文献;应用 Meta 分析软件包 REVMAN4.2 对各研究结果进行一致性检验及数据合并,并评估发表偏倚的影响。结果 总共 12 篇文献纳入 Meta 分析,包括 5 891 例冠心病患者和 3 392 例对照者。各研究之间存在显著异质性($\chi^2 = 63.40, P < 0.00001$),故采用随机效应模型 D-L 法进行数据合并,合并 TT/(GT+GG) OR 为 1.52, 95% CI 为 1.02~2.25 ($P = 0.04$)。结论 内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性的 TT 基因型能适度增加冠心病的发病危险,可能是冠心病的遗传危险因素之一。

[中图分类号] R18

[文献标识码] A

Meta Analysis on the Association of G894T Polymorphism in Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Coronary Heart Disease

LI Min, and JIA Chong-Qi

(Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Gene Polymorphism; Risk Factors; Genotype Frequencies

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the relationship between G894T polymorphism (Glu298Asp) in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and coronary heart disease (CHD) in population from various countries. **Methods** Odds ratios (OR) of genotype frequencies in CHD group against control group were analyzed. All the relevant studies were identified, those unqualified studies were excluded and the publication bias was evaluated. The Meta-analysis software (REVMAN4.2) was applied for investigating the heterogeneity among individual studies and for summarizing all the studies. **Results** Finally 12 studies entered the present study, including 5 891 cases and 3 392 controls. There was significant difference among individual studies ($\chi^2 = 63.40, P < 0.00001$), so the random effect model was used to summarize all the studies. The pooled TT/(GT+GG) OR was 1.52, 95% CI was 1.02~2.25 ($P = 0.04$). **Conclusion** The TT genotype of G894T polymorphism in eNOS gene is at moderately increased risk of CHD and may be one of the genetic risk factors of CHD.

冠心病发生尽管与环境因素密不可分,但是遗传因素也起着一定作用。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)在冠心病发病中的作用近年来颇受关注,由它催化合成的 NO 能够调节白细胞对血管内皮的粘附、抑制血小板聚集、抑制平滑肌细胞增殖和迁移等,是心血管系统中的重要保护因子。动物实验表明,缺乏 eNOS 基因的小鼠易患动脉粥样硬化^[1]。eNOS 基因已被认为冠心病的一个候选基因。

近年来,国内外许多学者对该基因第 7 外显子

G894T 多态性与冠心病的关系进行了研究,但是单个研究间的结果差异较大。本研究对所获得的相关研究进行了 Meta 分析,旨在客观评价 G894T 多态性在冠心病发病中的作用,为冠心病遗传易感性提供循证医学依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

利用所获得的有关 eNOS 基因 G894T 多态性与冠心病关系的研究,系统评价冠心病组与对照组间 G894T 基因型分布有无差异。病例组为冠心病患者,且患者年龄、性别、合并疾病、家族史均无特殊限定;对照组大部分是健康体检者,也包括随机选择的

[收稿日期] 2006-05-29

[修回日期] 2006-10-08

[作者简介] 李敏,硕士研究生,研究方向为心血管疾病流行病学, E-mail 为 limin1999@sohu.com。贾崇奇,副教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病流行病学。

社区居民、经冠状动脉造影排除冠心病者及外科住院者。观察指标为两组基因型频数的比值比(odds ratio, OR), 即 $TT/(GT+GG)$ OR。

1.2 资料来源

联合检索中国生物医学文献数据库和中国学术期刊全文数据库获得全部中文文献; 并检索 Medline 获得相关的英文文献, Medline 检索采用主题词法, 检索词为: “nitric oxide synthase”、“ischemic heart disease”、“coronary heart disease”和“myocardial infarction”, 合并“genetic”、“polymorphism”、“mutation”和“genes”。检索时间为 1994 年 1 月~2006 年 3 月。

1.3 对文献的筛选标准

所有选入的文献必须是病例对照研究, 研究对象之间无血缘关系, 且文中数据报告完整或根据报告结果能推算出分析所需的数据。重复报道的文献、研究的亚组资料及以文摘形式报道的文献(提供的信息不全)予以排除。

1.4 冠心病的诊断标准

冠心病被定义为冠状动脉疾病(经冠状动脉造影证实至少一支冠状动脉狭窄程度 $\geq 50\%$)或心肌梗死(有典型胸痛症状、特征性心电图变化及血清酶学升高)。

1.5 资料的输入

将各研究结果的相关信息输入 Meta 分析软件时, 采用双份输入的方法, 以便核对, 避免资料输入错误。

1.6 统计学处理

对各研究的基因型分布进行 Hardy-Weinberg (H-W) 遗传平衡检验, 对照组不符合遗传平衡规律的研究予以剔除。用 SPSS11.5 软件包计算不同人群间基因型及等位基因频率的差异。应用 Meta 分析软件包 REVMAN4.2 进行数据分析, 包括各研究结果的一致性检验、各研究的 OR 值及其 95% CI, 并根据一致性检验结果采用相应的数据合并方法。若各研究结果间无显著异质性, 则采用 Peto Mante-Haenszel 固定效应模型(Peto 法)进行数据合并, 计算合并 OR 值及 95% CI。以各研究的 OR 值为横坐标, 以 SE (logOR) 为纵坐标绘制漏斗图, 通过观察其对称性, 评估发表偏倚的影响。

2 结果

2.1 文献检索情况

根据文献的筛选标准初步检索到 20 篇相关文献, 但只有 13 篇进入本研究。2 篇^[2,3] 因为不能获

得基因型频率而被排除, 另外 5 篇^[4-8] 因为对照组没有检出 TT 基因型而被排除, 其中包括 4 篇^[4-7] 亚洲人群和 1 篇^[8] 非亚洲人群。

2.2 文献基本情况

对纳入的 13 篇文献(14 个研究结果) 进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验, 其中 1 个研究^[14] 对照组不符合遗传平衡规律, 该文献被剔除。最后共有 12 篇文献纳入 Meta 分析, 包括 5 891 例冠心病患者和 3 392 例对照者。1 篇文献的研究对象是亚洲人群(日本), 另外 11 篇是非亚洲人群; 而且 894TT 基因型频率在亚洲人群(0.16%) 与非亚洲人群(10.77%) 之间存在显著差异($P=0.000$), T 等位基因频率在亚洲人群(6.75%) 与非亚洲人群(32.42%) 之间也存在显著差异($P=0.000$; 表 1)。

2.3 Meta 分析

2.3.1 各研究 OR 值及其 95% CI 这些 OR 值是以 eNOS 基因隐性遗传模式计算的。Hingorani 等^[18] 的研究有两个结果, 一个是冠状动脉疾病, 一个是急性心肌梗死。在所有估计的 OR 值中, 有 4 个^[10, 12, 13, 20] 显示 TT 基因型能降低冠心病的发病危险, 但仅有 1 个^[10] 有统计学意义; 另外 9 个^[9, 11, 15-19, 21] 显示 TT 基因型能增加冠心病的发病危险, 其中 4 个^[11, 15, 18] 有统计学意义(图 1)。

2.3.2 各研究结果的一致性检验 各研究结果间存在显著异质性($\chi^2=63.40$, $P<0.00001$), 故采用随机效应模型 D-L 法进行数据合并, 合并 OR 为 1.52, 95% CI 为 1.02~2.25 ($Z=2.07$, $P=0.04$), 提示 TT 基因型携带者患冠心病危险是 GT+TT 基因型携带者的 1.52 倍(图 1)。此外, 本研究也对 eNOS 基因显性遗传模式的 OR 值进行了估计, 即 (GT+TT)/GG OR, 合并 OR 为 1.23, 95% CI 为 1.00~1.51 ($Z=2.00$, $P=0.05$), 与冠心病的关联也有统计学意义。

2.3.3 按种族进行亚组分析 因为 894TT 基因型频率及 T 等位基因频率在亚洲人群与非亚洲人群之间存在显著性差异, 因此按种族进行亚组分析。仅有 1 篇文献是亚洲人群, 其 OR 为 2.13, 95% CI 为 0.13~34.24 ($Z=0.54$, $P=0.59$); 非亚洲人群内部各研究结果之间存在显著异质性($\chi^2=63.25$, $P<0.00001$), 其合并 OR 为 1.51, 95% CI 为 1.01~2.25 ($Z=2.01$, $P=0.04$), 与所有研究结果合并 OR 值相近, 提示非亚洲人群内部遗传结构不同可能是所有研究结果之间存在异质性的主要来源之一。

2.3.4 发表偏倚的评估 观察发现, 漏斗图对称性较好, 表明发表偏倚对 Meta 分析结果影响不大。

表 1. 文献的基本情况

研究者	国家	G894T 基因型分布						研究结果
		冠心病组 (例)			对照组 (例)			
		TT	GT	GG	TT	GT	GG	
非亚洲人群								
Afrasyap 等 ^[9]	西班牙	33	103	114	14	62	74	冠状动脉疾病
Agema 等 ^[10]	荷兰	79	333	343	88	270	216	冠状动脉疾病
Berdeli 等 ^[11]	土耳其	34	37	44	2	24	57	冠状动脉疾病
Cai 等 ^[12]	澳大利亚	6	35	54	37	197	244	心肌梗死
Cai 等 ^[13]	澳大利亚	70	249	286	22	70	66	冠状动脉疾病
Colombo 等 ^[14]	意大利	32	78	91	7	59	48	冠状动脉疾病
Colombo 等 ^[15]	意大利	43	116	109	10	72	65	冠状动脉疾病
Gardemann 等 ^[16]	德国	234	927	924	50	227	256	冠状动脉疾病
Heltianu 等 ^[17]	罗马尼亚	26	60	22	18	48	36	冠心病
Hingorani 等 ^[18]	联合王国	107	71	120	14	58	66	冠状动脉疾病
Hingorani 等 ^[18]	联合王国	45	107	97	16	81	86	急性心肌梗死
Pulkkinen 等 ^[19]	芬兰	59	237	263	11	45	54	冠心病
Rios 等 ^[20]	巴西	26	110	83	18	52	59	冠状动脉疾病
亚洲人群								
Shimasaki 等 ^[21]	日本	1	59	225	1	80	526	心肌梗死

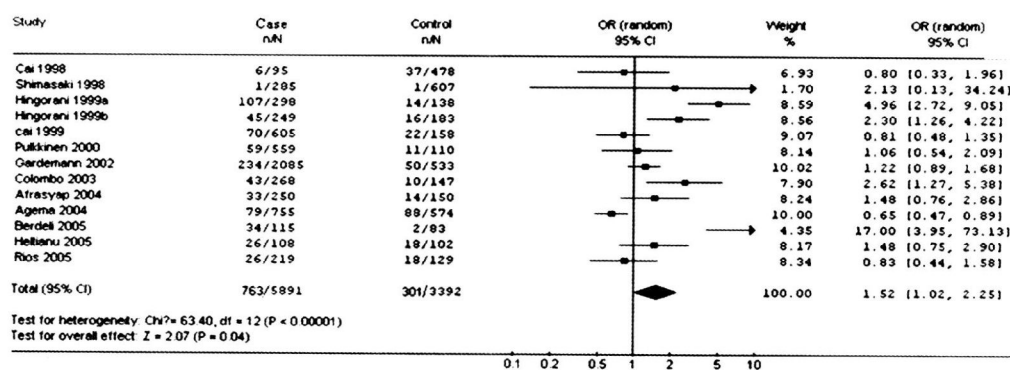


图 1. Meta 分析结果

3 讨论

本研究通过 Meta 分析对 11 个国家的 13 个研究结果进行了合并,发现 894TT 基因型能适度增加冠心病的发病危险,从而更客观地评价了 G894T 多态性在冠心病发病中的作用,为冠心病遗传易感性提供了循证医学依据,同时也为在中国开展 G894T 多态性与冠心病关系的研究提供了基础。

按种族进行亚组分析,发现非亚洲人群各研究结果之间存在显著异质性,其合并 OR 值与所有研

究结果的合并 OR 值相近,表明非亚洲人群内部遗传结构不同可能是各研究结果之间存在异质性的主要原因之一。通过对纳入 Meta 分析的各研究进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验发现,有 1 篇文献的对照组不符合遗传平衡定律,表明该研究的对照组随机性不够或样本量不足,即对照组没有代表性,应将该文献剔除。选择对照组是否符合遗传平衡定律作为评价各研究质量的一个重要指标,是因为对照组不存在明显的选择因素影响遗传平衡。冠心病组个别研究存在遗传不平衡,则认为是真实的,因为如果

eNOS 基因 G894T 多态性与冠心病有关联, 部分携带 TT 基因型的冠心病患者可因死亡率较高等选择因素而导致遗传不平衡的发生。

Meta 分析实质上是一种观察性研究, 可能产生抽样偏倚(Meta 分析中主要是发表偏倚)、选择偏倚和研究内偏倚。本研究从资料的收集、筛选到输入、分析等各个阶段对这些偏倚进行了控制。在资料收集阶段, 采用三种有效的文献检索途径, 尽可能全面地检索到相关文献以减少发表偏倚, 并采用 REV-MAN4.2 软件进行分析, 通过观察漏斗图的对称性, 未发现显著偏倚; 在筛选阶段, 制定了严格的文献纳入和排除标准, 去除了不合格文献, 所以选择偏倚较小; 在输入阶段, 采用双份输入的方法, 并在输入完成后进行核对, 以避免资料输入错误造成的误差; 但是, 由于纳入的各研究来自不同的国家, 可能因实验室条件、检测水平不一等原因, 会产生一定的研究内偏倚。

此外, 本研究发现 TT 基因型和 T 等位基因频率在亚洲人群与非亚洲人群之间均有显著差异, 亚洲人群突变频率较低。中国在这方面的研究不多, 2 篇^[7,8] 都因为在对照组没有检出 TT 基因型而被排除, 表明在中国开展此项研究需要更大的样本量, 以对该多态性的效应做出正确评估。

[参考文献]

- [1] Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice [J]. *Circulation*, 2001, **104** (4): 448-454
- [2] Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease[J]. *Hypertension*, 2001, **38** (5): 1 054-061
- [3] Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41** (6): 930-937
- [4] Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction [J]. *Hypertension*, 1998, **32** (3): 521-526
- [5] Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease[J]. *Clin Chem*, 2000, **46** (10): 1 626-630
- [6] 魏丹宏, 单江, 陈志妹, 施育平. 内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 突变与中国人冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, **19** (6): 471-474
- [7] 齐霁, 代春华, 黄涛, 马跃, 袁大军, 曾定尹. 内皮型 NO 合酶基因多态性与冠心病、吸烟的关系[J]. *中国临床康复*, 2003, **7** (9): 1 476-477
- [8] Nagib El-Kilanya GE, Nayel E, Hazzaa S. Nitric oxide synthase gene G298 allele, Is it a marker for microvascular angina in hypertensive patients[J]? *Cardiovascular Radiation Medicine*, 2004, **5** (3): 113-118
- [9] Afrasyap L, Ozturk G. NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, **36** (10): 661-666
- [10] Agema WR, de Maat MP, Zwinderman AH, Kastelein JJ, Rabelink TJ, van Boven AJ, et al. An integrated evaluation of endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphisms and coronary artery disease in men[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2004, **107** (3): 255-261
- [11] Berdeli A, Sekuri C, Cam FS, Ercan E, Sagcan S, Tengiz I, et al. Association between the eNOS (Glu298Asp) and the RAS genes polymorphisms and premature coronary artery disease in a Turkish population[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, **351** (1-2): 87-94
- [12] Cai H, Wang XL, Colagiuri S, Wilcken DEL. A common Glu298 $\rightarrow$ Asp (894G $\rightarrow$ T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and vascular complications in type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 1998, **21** (12): 2 195-196
- [13] Cai H, Wilcken DEL, Wang XL. The Glu298 $\rightarrow$ Asp (894G $\rightarrow$ T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease [J]. *J Mol Med*, 1999, **77** (6): 511-514
- [14] Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298 $\rightarrow$ Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease[J]. *Heart*, 2002, **87** (6): 525-528
- [15] Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease[J]. *Clinical Chemistry*, 2003, **49** (3): 389-395
- [16] Gardemann A, Lohre J, Cayci S, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The T allele of the missense Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile[J]. *Atherosclerosis*, 2002, **160** (1): 167-175
- [17] Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, et al. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, **9** (1): 135-142
- [18] Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298 $\rightarrow$ Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK[J]. *Circulation*, 1999, **100** (14): 1 515-520
- [19] Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Vauhkonen I, Laakso M. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease[J]. *J Mol Med*, 2000, **78** (7): 372-379
- [20] Rios DLS, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, **362** (1-2): 138-146
- [21] Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31** (7): 1 506-510

(此文编辑 文玉珊)