

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2007)15-08-0630-04

连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性与 中国北方汉族人群早发冠心病的相关性

韩雅玲, 席素雅, 张效林, 闫承慧, 杨 勇, 康 建

(中国人民解放军沈阳军区总医院心内科, 辽宁省沈阳市 110016)

[关键词] 内科学; 连接蛋白 37; 基因多态性; 冠心病早发; 聚合酶链反应; 基因型

[摘要] 目的 探讨连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性与早发冠心病的关系。方法 采用聚合酶链反应—限制片段多态性技术, 对 196 例经冠状动脉造影证实的早发冠心病患者和 218 例健康对照者进行检测, 分析连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性的基因型和等位基因频率分布情况。结果 连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性在冠心病组以 ID 基因型为主, 对照组以 II 基因型为主, 两组中均以 DD 基因型和 D 等位基因为少见型。基因型 (II 型, ID 型和 DD 型) 分布频率在早发冠心病组分别为 44.39%、47.45% 和 8.16%, 在对照组分别为 47.71%、44.04% 和 8.25%, 两组间比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.51, P = 0.77$)。等位基因分布在人群中以 I 等位基因为主, 两组间分布频率相似 (68.11% 比 69.72%, $P = 0.62$, OR = 0.93, 95% 可信区间为 0.70~1.24); D 等位基因携带者 (ID+DD) 在冠心病组和对照组分别为 55.61% 和 52.29%, 与 II 纯合子相比, 冠心病的患病风险在两组间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.46, P = 0.50$, OR = 0.87, 95% 可信区间 = 0.58~1.30)。对心肌梗死患者分层分析显示, I1297D 基因型和等位基因分布频率在心肌梗死组和对照组间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.24, P = 0.89$; $\chi^2 = 0.13, P = 0.72$)。Logistic 回归校正性别、年龄、体重指数、吸烟、高血压、高脂血症、糖尿病等冠心病易患因素后, I1297D 多态性在病例组和对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性与中国北方汉族人群早发冠心病易感性无明显关联。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association of Connexin37 Gene I1297D Polymorphism and Premature Coronary Heart Disease in Northern Han Chinese

HAN Ya-Ling, XI Su-Ya, ZHANG Xiao-Ling, YAN Cheng-Hui, YANG Yong, and KANG Jian

(Department of Cardiology, Shenyang General Hospital, Cardiovascular Research Institute of PLA, Shenyang 110016, China)

[KEY WORDS] Connexin37; Polymorphism; Premature; Coronary Heart Disease; Polymerase Chain Reaction; Genotype

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between connexin37 (CX37) gene I1297D polymorphism and premature coronary heart disease (CHD) in Chinese Han population. **Methods** CX37 genotype was examined with the methods of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 196 patients with CHD and 218 Chinese healthy individuals as control diagnosed by angiogram. **Results** The results showed that CX37 ID genotype in CHD group and CX37 II genotype in control group were dominant genotypes respectively. The DD genotype and D allele were rarity in both groups. The genotype frequencies of II, ID and DD were 44.39%, 47.45% and 8.16% in patients with CHD, 47.71%, 44.04% and 8.25% in the controls respectively, and no difference was found between CHD and healthy subjects ($\chi^2 = 0.51, P = 0.77$). CX37 I allele in the population was significantly higher than D allele, while the distribution of allele frequency was similar between the patients and controls (68.11% vs 69.72%, $P = 0.62$, OR = 0.93, 95% CI = 0.70~1.24). Frequency of the D allele carriers (ID+DD) was 55.61% in the CHD group and 52.29% in the control group. Compared with the II homozygote, no significant difference was found in the CHD risk of the carriers of D allele (ID+DD) ($\chi^2 = 0.46, P = 0.50$, OR = 0.87, 95% CI = 0.58~1.30). Subsequent stratified analysis revealed that the distribution of CX37 I1297D genotype and allele frequency in the myocardial infarction group was also similar to the control group ($P > 0.05$). After adjustment for conventional risk factors, including gender, age, body mass index, smoking status, hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia, a binary logistic regression analysis suggested that no difference was demonstrated between the I1297D polymorphism and CHD ($P > 0.05$). **Conclusions** CX37 gene I1297D polymorphism is not associated with an increased risk of premature CHD in Chinese Han population and might not be considered as an independent predictor factor of the coronary atherosclerotic disease.

[收稿日期] 2007-02-06

[修回日期] 2007-07-05

[作者简介] 韩雅玲, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病的基础、临床及介入治疗研究。席素雅, 硕士研究生, 研究方向为心血管病的基础与临床研究。张效林, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病的基础与临床研究。

冠心病是一种严重威胁人类生命健康的多基因遗传性疾病^[1,2],近年其发病率与死亡率不断攀升,且发病年龄呈现年轻化的趋势。早发冠心病是指冠心病发生时男性 ≤ 55 岁、女性 ≤ 65 岁,是冠心病的一种特殊表现形式^[3]。研究早发冠心病的遗传危险因素针对性地开展人群预防,延缓或防止冠心病的发生发展具有重要的医学意义。近来随着分子生物学的迅速发展及人类基因组计划的实施,从基因水平阐明冠心病尤其是早发冠心病的发病机制日益成为研究热点^[4]。多项研究显示,连接蛋白 37 (connexin37, CX37) 基因 C1019T 多态性与冠心病和心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 的发病密切相关^[5-8],但有关 CX37 基因 I1297D 遗传多态性与冠心病关联性的研究报道甚少。本文旨在观察中国北方汉族地区早发人群 CX37 基因 I1297D 多态性的分布情况并初步探讨其与早发冠心病的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

2005 年 5 月至 2006 年 10 月在沈阳军区总医院心内科行冠状动脉造影确诊为早发冠心病的患者 196 例为早发冠心病组,其中男 152 例,女 44 例,平均年龄 50.3 ± 6.1 岁。全部冠心病病例均经冠状动脉造影确定诊断,诊断标准:至少一支主要冠状动脉或其分支直径狭窄 $\geq 50\%$,且符合 1979 年 WHO 冠心病诊断标准。对照组 218 例中男 122 例,女 96 例,平均年龄 49.9 ± 8.1 岁,为同期于本院行冠状动脉造影正常或动脉管腔狭窄 $< 50\%$ 而临床无相关心肌缺血证据者。研究对象均为无血缘关系的我国北方地区汉族人;除外严重急慢性感染,肿瘤,手术及创伤,肝、肾疾病等系统性疾病,但不除外高血压和糖尿病;全部入选对象均由医师提前征得患者同意并填写知情同意书。

1.2 方法

基因组 DNA 提取,取空腹静脉血 3 mL 置于含乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- Na_2) 1.5 g/L 的抗凝管中,经常规酚/氯仿抽提,无水乙醇沉淀法提取基因组 DNA。连接蛋白 37 基因 I1297D 基因型检测,基因型分析采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性法 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)。引物由上海生物工程公司合成,上游 P1: 5'-GGA GCC TCA TTG CAA GTT GT-3',下游 P2: 5'-TGA CTG TTC CAT AGG GTG AG-3'。25 μL PCR 反应体系为: $10\times$ 缓冲液 2.5 μL , 2.5

mmol/L dNTP 1.0 μL , 引物各 10 pmol, 模板 DNA 0.2 μg , rTaq 酶 2 U, 去离子水加至 25 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s \rightarrow 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 5 min。随后,取 5 μL PCR 扩增产物加入 1 μL 限制性内切酶 Hinf I, 酶切产物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化过夜, 3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

1.3 统计学处理

资料分析采用 SPSS 13.0 软件包完成。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用 t 检验。基因型和等位基因频率通过基因频率计数法计算。 χ^2 检验判断基因型的 Hardy-Weinberg 平衡符合程度, 单个基因型及组间等位基因频率比较采用四格表 χ^2 检验, OR 值和 95% 可信区间 (95% CI) 表示基因与疾病间的关联强度。Binary Logistic 回归用来校正其它冠心病危险因素如性别、年龄、体重指数、吸烟、高血压、糖尿病及高脂血症等混杂因素可能对结果造成的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的临床资料

冠心病组男性、吸烟者及有高血压和糖尿病病史者所占比例均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。两组间年龄、体重指数及伴有高脂血症病史者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血脂各项生化指标中除总胆固醇 (total cholesterol, TC) 在病例组高于对照组外, 甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 两组间差异均无统计学意义 (表 1)。

表 1. 早发冠心病组和对照组的一般临床资料

指 标	早发冠心病组 ($n = 196$)	对照组 ($n = 218$)
年龄 (岁)	50.3 ± 6.1	49.9 ± 8.1
性别例数 (男/女)	152/44 ^a	122/96
体质指数 (kg/m^2)	22.31 ± 3.04	22.07 ± 3.20
吸烟	96 (48.98%) ^a	64 (29.36%)
高血压	101 (51.53%) ^a	89 (40.83%)
糖尿病	38 (19.39%) ^a	19 (8.72%)
高脂血症	94 (47.96%)	95 (43.58%)
TC (mmol/L)	4.69 ± 1.07^a	4.46 ± 0.79
TG (mmol/L)	2.15 ± 1.51	2.01 ± 1.41
LDLC (mmol/L)	2.57 ± 0.58	2.47 ± 0.49
HDLC (mmol/L)	1.45 ± 0.35	1.38 ± 0.35

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 连接蛋白 37 基因型分析

连接蛋白 37 基因 I1297D 位点 PCR 产物扩增片段大小为 214 bp, 研究发现该位点存在 AG 碱基的插入/缺失多态性。经限制性内切酶 Hinf iv 消化后, 电泳结果可见三种基因型: II 型 (含有酶切位点的

AG 纯合型, 酶切产物为 111 bp 和 103 bp), DD 型 (不含酶切位点的 AG 缺失型, 酶切产物为 214 bp), ID 型(杂合型, 产物为 214 bp、111 bp 和 103 bp)。由于酶切后产生的 111 bp 和 103 bp 两条带相距较近, 电泳结果仅显示一条带(图 1)。

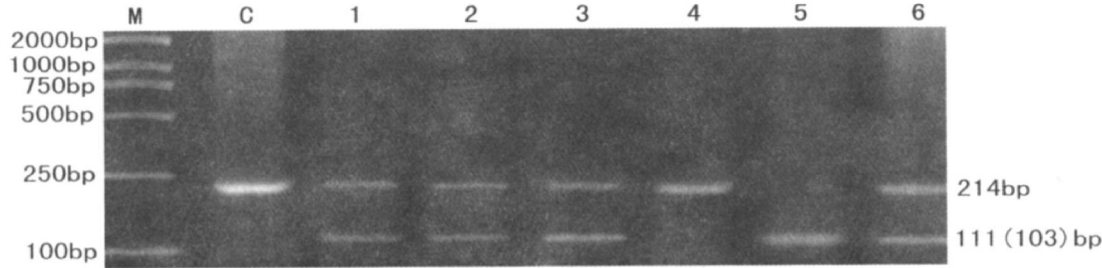


图 1. 连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性 PCR 产物 Hinf iv 酶切电泳结果 M 为 DL 2000 Marker; C 为对照; 1, 2, 3, 6 为杂合子; 4 为 DD 纯合型; 5 为 II 纯合型

2.3 连接蛋白 37 I1297D 多态性基因型和等位基因频率的组间比较及与冠心病关联性分析

连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性基因型(II 型, ID 型, DD 型) 分布频率在早发冠心病组为 44. 39%, 47. 45% 和 8. 16%, 在对照组为 47. 71%, 44. 04% 和 8. 25% ($\chi^2 = 0. 51, P = 0. 77$)。I 等位基因和 D 等位基因分布频率在早发冠心病组为 68. 11% 和 31. 89%, 在对照组为 69. 72% 和 30. 28% ($\chi^2 = 0. 25, P = 0. 62, OR = 0. 93, 95\%$ 可信区间为 0. 70~ 1. 24), 基因型频率和等位基因频率在两组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0. 05$); D 等位基因携带者 (ID+ DD) 在冠心病组和对照组分别为 55. 61% 和 52. 29%, 与 II 纯合子相比, 冠心病的患病风险在两组

间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0. 46, P = 0. 50, OR = 0. 87, 95\%$ 可信区间= 0. 58~ 1. 30)。对 MI 患者进行亚组分析, 结果发现 I1297D 基因型和等位基因分布频率在 MI 组和对照组间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0. 24, P = 0. 89, OR = 0. 89, 95\%$ 可信区间为 0. 55~ 1. 45; $\chi^2 = 0. 13, P = 0. 72, OR = 0. 93, 95\%$ 可信区间为 0. 63~ 1. 38) (表 2 和表 3)。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验, 所有基因型分布在两组人群中均符合遗传平衡, 具有群体代表性。用 Binary Logistic 回归校正性别、年龄、BMI、高血压、糖尿病、高脂血症等冠心病易感因素后发现, 性别、年龄、吸烟是早发冠心病发病的独立危险因素, CX37 基因 I1297D 多态性与早发冠心病无明显相关性。

表 2. 早发冠心病组和对照组 CX37 基因 I1297D 多态性基因型和等位基因频率分布

分组	n	基因型				等位基因	
		II	ID	DD	ID+ DD	I	D
早发冠心病组	196	87 (44. 39%)	93 (47. 45%)	16 (8. 16%)	109 (55. 61%)	267 (68. 11%)	125 (31. 89%)
对照组	218	104 (47. 71%)	96 (44. 04%)	18 (8. 25%)	114 (52. 29%)	304 (69. 72%)	132 (30. 28%)

表 3. 心肌梗死组和对照组 I1297D 多态性基因型和等位基因频率分布

分组	n	基因型				等位基因	
		II	ID	DD	ID+ DD	I	D
心肌梗死组	85	38 (44. 71%)	40 (47. 06%)	7 (8. 23%)	47 (55. 29%)	116 (68. 24 %)	54 (31. 76%)
对照组	218	104 (47. 71%)	96 (44. 04%)	18 (8. 25%)	114 (52. 29%)	304 (69. 72%)	132(30. 28%)

3 讨论

冠心病是一种由遗传因素和环境因素共同作用所致的多基因遗传性疾病, 近年来早发冠心病以其

发病年龄早、危害性大、患病比例日趋增高等特殊性, 受到学术界日益增高的关注^[9, 10]。

近年随着大规模全基因组扫描技术及基因连锁和候选基因研究方法的应用, 发现多种冠心病易感

基因与早发冠心病密切相关^[11-14]。基因表达产物是一种广泛分布于动脉内皮细胞和平滑肌细胞的连接蛋白,主要通过介导平滑肌细胞和内皮细胞间的信号转导通路来调控血管内皮的生长、增殖、衰老及损伤后的再生等过程^[17,18]。近年发现, CX37^{-/-} 载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠与对照组 CX37^{+/+} 载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠相比,更加促进 As 斑块的形成,提示 CX37 基因可能作为内皮损伤后斑块形成过程中的一种保护性标志物参与 As 的发生发展^[19]。

多项研究显示, CX37 基因 C1019T 多态性与冠心病和 MI 的发病密切相关^[5-8],但有关 CX37 基因 I1297D 位点的插入/缺失多态与冠心病的关联性分析除日本学者的一项研究外^[20],目前国内外尚无相关报道。本研究采用候选基因病例-对照研究的遗传学方法,在冠心病高发的东北地区人群进行 CX37 基因 I1297D 位点的基因型检测,结果发现我国北方汉族人群在该位点同样存在着 AG 碱基的插入/缺失多态性,且基因型分布已达到遗传平衡,具有群体代表性。CX37 基因 I1297D 多态性分布在两组间均以 I 等位基因携带者 (II+ ID) 为主, DD 基因型和 D 等位基因为少见型,频率分布趋势与日本研究报道相似。然而,组间比较及对 MI 患者进行亚组分层后显示, I1297D 基因型和等位基因分布频率在病例组和对照组间的差异无统计学意义。本研究中 I1297D 位点经统计学处理未看到趋势,与日本人群研究报道不一致,可能原因为: ①样本的不均一性,如性别、发病年龄、种族及地域差异等; ②病例选择标准、统计学处理方法不同,以及疾病的多样化表型等; ③该位点与中国人早发冠心病和 MI 易感性无关联,该种形式的多态性变异可能不是中国人早发冠心病的独立预测因素。

目前关于 CX37 基因多态性的致病机制尚不清楚。有学者推测, CX37 基因序列的任何多态性变异都有可能改变基因的结合序列,增强或减弱基因转录后的蛋白表达水平,进而影响冠心病的发生过程。然而,由于冠心病是一种多因素、多基因遗传性疾病,单一致病基因和(或)单一多态性位点的影响可能对疾病的发生仅产生微效作用。同时,由于种族、地域差异、发病年龄、饮食和生活方式、遗传背景以及研究终点等因素不同,研究结果可能存在一定的差异性。

本研究中,作者在中国北方汉族人群中首次报道了 CX37 基因 I1297D 多态性与早发冠心病的相关关系,结果发现该位点与早发冠心病的发生无明显相关性,提示 I1297D 多态性可能不是中国北方汉族

人群早发冠心病发病的易感因素。然而,由于本研究侧重于群体遗传学研究的流行病学调查及亚组分层后样本例数偏少,存在人群的种族、地区差异等局限性,因此尚不能提供充分的证据来证实该基因多态性对冠心病的影响。CX37 基因 I1297D 多态性与冠心病的确切关系及在心血管中的预测价值尚需多中心、大样本、前瞻性的研究及在细胞水平和功能学方面的进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 欧阳涛综述, 宋建南审校. 与冠心病相关的脂蛋白基因多态性研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (4): 355-358.
- [2] 姜红菊, 张梅, 李大庆, 张运. 冠心病患者基质金属蛋白酶 1 基因多态性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (5): 589-592.
- [3] 中华心血管病杂志编委会血脂异常防治对策组. 血脂异常防治建议[J]. 中华心血管病杂志, 1997, 25 (3): 169-172.
- [4] Hauser ER, Mooser V, Crossman DC, Haines JL, Jones CH, Winkelmann BR, et al. Design of the genetics of early onset cardiovascular disease (GENECARD) study [J]. Am Heart J, 2003, 145 (4): 602-613.
- [5] Boerema M, Forsberg L, Van Zeijl L, Morgenstern R, Defaire U, Lemne C, et al. A genetic polymorphism in connexin 37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development [J]. J Intern Med, 1999, 246 (2): 211-218.
- [6] Yeh HI, Chou Y, Liu HF, Chang SC, Tsai CH. Connexin37 gene polymorphism and coronary artery disease in Taiwan [J]. Int J Cardiol, 2001, 81 (2-3): 251-255.
- [7] Wong CW, Christen T, Pfenniger A, James RW, Kwak BR. Do allelic variants of the connexin37 1019 gene polymorphism differentially predict for coronary artery disease and myocardial infarction [J]? Atherosclerosis, 2007, 191 (2): 355-361.
- [8] Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes [J]. N Engl J Med, 2002, 347 (24): 1916-923.
- [9] Gurevitz O, Jonas M, Boyko V, Rabinowitz B, Reicher-Reiss H. Clinical profile and long-term prognosis of women ≤ 50 years of age referred for coronary angiography for evaluation of chest pain [J]. Am J Cardiol, 2000, 85 (7): 806-809.
- [10] Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2004, 5: 189-218.
- [11] Hong SH, Rhyne J, Zeller K, Miller M. ABCA1 (Alabama): a novel variant associated with HDL deficiency and premature coronary artery disease [J]. Atherosclerosis, 2002, 164 (2): 245-250.
- [12] 孙屏, 李晓宇, 郭冬平, 陈琪, 范乐明. 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因多态性 R219K 与脂代谢及冠心病易感性的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (1): 13-16.
- [13] 张少敏, 胡应龙, 方卫华. 载脂蛋白 B 等位基因变异与早发 CHD 的关系[J]. 中国心血管杂志, 2003, 8 (2): 77-79.
- [14] 陈忠, 黄峻, 朱铁兵. 早发冠心病 128 例病人脂蛋白酯酶基因多态性、酶活性及血脂关系的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2002, 22 (5): 370-372.
- [15] Yeh H-I, Rothery S, Dupont R, Coppen SR, Severs NJ. Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium [J]. Circ Res, 1998, 83 (12): 1248-263.
- [16] Yeh H-I, Lai Y-J, Chang H-M, Ko YS, Severs NJ, Tse CH. Multiple connexin expression in regenerating arterial endothelial gap junctions [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20 (7): 1753-762.
- [17] Wong CW, Christen T, Foglia B. Eliminating connexin37 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Circulation, 2004, 110 (III): 38-39.
- [18] Iwai N. Association analyses between polymorphism in the GJA4 gene cluster and myocardial infarction in Japanese [J]. Thromb Haemost, 2003, 90 (6): 1226-227.

(此文编辑 李小玲)