

雌激素受体 α 基因多态性与冠心病病变程度的关系

金莉子, 肖宏凯, 陈 剑, 林岫芳, 陈筱潮

(中山大学附属第五医院心血管内科, 广东省珠海市 519000)

[关键词] 内科学; 雌激素受体; 冠心病; 基因多态性

[摘要] 目的 探讨中国南方汉族人群中雌激素受体 α 基因 Pvu II 酶切多态性与冠心病病变程度的关系。方法 应用聚合酶链反应限制片段多态性检测 236 例冠心病患者和 117 例对照者雌激素受体 α 基因型, 并比较其与冠心病及其冠状动脉病变支数和冠状动脉积分的关系。结果 雌激素受体 α Pvu II 多态性中的 PP、Pp、pp 三种基因型在冠心病组和对照组中的频率分别为 19.9%、44.5% 和 35.6% 及 9.4%、48.7% 和 41.9%, 冠心病组 PP 基因型频率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 冠心病患者冠状动脉单支、双支、多支病变组之间雌激素受体 α Pvu II 基因型与等位基因频率差异无统计学意义; 冠心病患者 PP 基因型冠状动脉病变程度积分显著高于 Pp 和 pp 基因型 ($P < 0.05$)。结论 雌激素受体 α Pvu II 多态性与中国南方汉族人群冠心病的发生及冠状动脉病变程度存在相关性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association of Estrogen Receptor- α Gene Polymorphisms with Severity of Coronary Artery Disease

JIN Li-Zi, XIAO Hong-Kai, CHEN Jian, LIN Xiufang, and CHEN Xiaochao

(Department of Cardiology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, China)

[KEY WORDS] Estrogen Receptor; Coronary Heart Disease; Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To detect the association of estrogen receptor (ER) α gene Pvu II polymorphisms with severity of coronary heart disease (CHD) of Han nationalities in South China. **Methods** By using PCR-RFLP analysis method, ER gene types in 236 CHD patients and 117 healthy controls were detected, and the association of gene types with severity of CHD and number of involved vessel and Gensini coronary score were compared. **Results** The frequencies of PP, Pp and pp types of Pvu II polymorphism in CHD patients and controls were 19.9%, 44.5% and 35.6% vs 9.4%, 48.7% and 41.9%, the frequency of PP genotype in CHD was significantly higher than that of control ($P < 0.05$). There were no significant differences in the distribution frequency of three genotypes and two alleles of Pvu II among subgroups with different severity of disease ($P > 0.05$), the score in PP homogeneous was significantly higher than those in Pp genotype and pp homogeneous ($P < 0.05$).

Conclusions The ER- α gene Pvu II polymorphism is associated with CHD and severity of CHD in Han nationality of South China.

冠心病是目前我国成人心脏病住院和死亡的第一位原因^[1,2], 其发生发展与多种环境因素和遗传因素相关。目前, 雌激素对心血管系统的保护作用已逐渐被重视。近年来许多研究已证明, 雌激素通过雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 介导的生物学效应是其发挥血管保护作用的重要机制。ER 基因具有多态性, 可能通过影响 ER 的表达和功能而影响雌激素对心血管系统的保护作用。而 Pvu II 多态性是人群中最常见的 ER 基因多态性之一, 因此, 本研究旨在探讨 Pvu II 基因分布特点及其与冠心病和冠状动脉病变程度的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

冠心病患者 236 例, 男性 169 例, 女性 67 例, 年龄 64 ± 11 岁, 其中 169 例患者经冠状动脉造影确诊; 117 例对照选自健康体检者或同期住院的冠心病患者, 男性 75 例, 女性 42 例, 年龄 62 ± 11 岁, 并排除严重肝肾疾病的随机个体。研究对象间无血缘关系, 均为中国南方汉族成人。

1.2 临床资料收集

设计冠状动脉粥样硬化登记调查表, 详细记录每一病例的临床表现、体格检查、辅助检查、生物化学指标及传统的冠心病危险因素。

1.3 冠状动脉病变程度评价

通过冠状动脉造影, 分别对右冠状动脉、左冠状动脉前降支、左旋支和左主干阻塞病变程度进行评

[收稿日期] 2007-12-04

[修回日期] 2008-07-29

[作者简介] 金莉子, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管病研究, E-mail 为 jinlizizhuhai@126.com。陈筱潮, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病电生理及介入治疗研究。肖宏凯, 硕士, 住院医师, 主要从事心血管病研究。

价。各主要分支存在 50% 以上狭窄定义为有意义病变,并根据累及支数定义为单支、双支或多支病变,累及左主干者计作 2 支病变。根据美国心脏协会所规定的冠状动脉血管图像记录分段评价标准和采用 Gensini 积分系统,对每支血管病变程度进行定量评定,每例患者冠状动脉病变程度的最终积分为各分支积分之和^[3]。169 例经冠状动脉造影确诊的患者中,其中 158 例存在 50% 以上狭窄,可分别按照分支病变和积分两种分类方法进行统计分析,11 例不足 50% 病变,无法进行分支病变分类,但可列入积分研究对象。

1.4 基因多态性检测

采集外周静脉血 5 mL,提取基因组 DNA,应用聚合酶链反应限制片段多态性分析法检测冠心病组和对照组 ER α 基因 Pvu Ⅱ多态性。引物由上海生物工程技术有限公司合成,上游 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CIT TTC CTA TTC TCG-3',下游 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'。特异性扩增 ER α 基因第 1 内含子和第 2 外显子的一部分,产物片段 1.3 kb。采用晶美生物工程有限公司提供的试剂盒提取 DNA:取 EDTA-K₃ 抗凝全血 200 μ L,加 400 μ L 溶解液,65 $^{\circ}$ C 孵化 5 min,加入 600 μ L 氯仿,混匀,离心,取上层液,加入 800 μ L 沉淀液,摇匀,离心,取上清液,100 μ L 1.2 mol/L NaCl 溶解 DNA,加入 300 μ L 冷酒精,置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 10 min,离心,倒掉酒精,再用 70% 酒精洗涤,用无菌双蒸水 100 μ L 混匀,置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。反应体系为 50 μ L,反应液 25 μ L(其中含 10 $\times$ Buffer、dNTPs 各 200 μ mol/L),引物 0.4 μ mol/L,模板 DNA 0.1 μ g。置热循环仪(PTC-220 PCR 扩增仪,美国)中 94 $^{\circ}$ C 预变性 6 min,按下列程序循环 35 次,即 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s $\rightarrow$ 56 $^{\circ}$ C 退火 60 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,末次循环后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取产物 10 μ L 经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察扩增结果,鉴定其特异性。分别取 PCR 扩增产物 10 μ L,用 12 u Pvu Ⅱ于 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。反应终止后产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,以 DNA 片段长度标准物为参考,紫外灯下观察结果。ER α 基因型判定参照有关文献,使用 Pvu Ⅱ酶切可区分出三种基因型:PP 型(终产物为 1.3 kb 的一条带)、Pp 型(终产物为 850 bp、450 bp 和 1.3 kb 的三条带)及 pp 型(终产物为 850 bp 和 450 bp 的两条带)。以上大写字母表示存在点突变而使该酶切位点消失,小写字母表示存在该酶切位点。

1.5 统计学分析

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数之间比较用

方差分析或 t 检验,各组频数间差异比较用 χ^2 检验。检验显著性水平设定为 0.05。基因型相对危险度以比数比(odds ratio, OR)表示。所有数据利用 Excel 数据库和 SPSS11.0 软件完成。

2 结果

2.1 临床资料比较

两组年龄、性别构成差异无统计学意义。冠心病组高血压、糖尿病、吸烟史显著高于对照组($P < 0.05$),而高脂血症及总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)含量均显著低于对照组($P < 0.05$),甘油三酯含量在两组中差别无统计学意义(表 1)。

表 1. 一般临床资料

指标	冠心病组 ($n = 236$)	对照组 ($n = 117$)
年龄 (岁)	64 $\pm$ 11	62 $\pm$ 11
男/女 (例)	169/67	75/42
高血压病	114 (59.8%) ^a	53 (45.3%)
糖尿病	43 (18.2%) ^a	11 (9.4%)
吸烟史	116 (53.4%) ^b	32 (27.4%)
血脂异常	139 (58.9%) ^b	86 (73.5%)
总胆固醇 (mmol/L)	4.84 $\pm$ 1.10 ^a	5.14 $\pm$ 1.15
LDLC (mmol/L)	3.00 $\pm$ 0.92 ^b	3.34 $\pm$ 1.00
甘油三酯 (mmol/L)	1.75 $\pm$ 1.36	1.58 $\pm$ 0.97
HDLC (mmol/L)	1.18 $\pm$ 0.33 ^b	1.32 $\pm$ 0.37

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 雌激素受体 α 基因 Pvu Ⅱ多态性

Pvu Ⅱ酶切后可见三种类型:PP 基因型、Pp 基因型和 pp 基因型(图 1)。

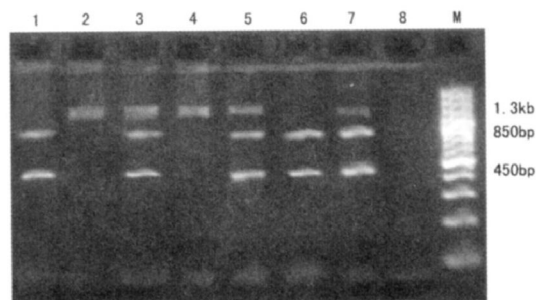


图 1. 雌激素受体 α Pvu Ⅱ基因多态性琼脂糖凝胶电泳图谱

1 和 6 为 pp 基因型, 2 和 4 为 PP 基因型, 3、5 和 7 为 Pp 基因型, M 为 DNA 分子量标志。

2.3 研究对象的 Hardy-Weinberg 平衡检验

计算出对照组和冠心病组 ER α Pvu Ⅱ基因型频率观察数与期望数差异无显著性,表明研究对象符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,本研究资料具有群体代表性。

2.4 Pvu Ⅱ基因多态性的分布与比较

冠心病患者 ER α Pvu Ⅱ基因多态性中存在 PP、

Pp 和 pp 三种基因型。冠心病组 PP 基因型频率显著高于对照组 ($P < 0.05$),而两组 Pp 和 pp 基因型频率差异无显著性;冠心病组 P 等位基因型频率也显著高于对照组 ($P < 0.05$),PP 纯合子与 p 等位基因携带者 (Pp+ pp) 的 OR 为 2.396 (1.192~ 4.817),而 P 与 p 等位基因的 OR 为 1.430 (1.032~ 1.983)。见表 2。

表 2. 雌激素受体 α Pvu Ⅱ基因多态性分布情况

分 组	n	基因型			等位基因	
		PP	Pp	Pp	P	p
冠心病组	236	47(0.199)	105(0.445)	84(0.356)	199(0.422)	273(0.578)
对照组	117	11(0.094)	57(0.487)	49(0.419)	79(0.338)	155(0.662)

2.5 雌激素受体 α 基因多态性与冠状动脉病变程度的比较

冠心病患者冠状动脉病变分为单支、双支和多支病变。不同冠状动脉病变支数 Pvu Ⅱ基因型及等

位基因频率比较均无显著性差异(表 3)。

冠心病患者 PP 纯合子冠状动脉病变程度积分显著高于 Pp 和 pp 基因型 ($P < 0.05$),而 Pp 和 pp 基因型之间差异无统计学意义(表 4)。

表 3. 冠状动脉病变支数与 Pvu Ⅱ基因多态性的关系

病变程度	n	基因型			等位基因	
		PP	Pp	Pp	P	p
单支血管病变	57	8(0.140)	30(0.526)	19(0.333)	46(0.414)	68(0.613)
双支血管病变	54	10(0.185)	21(0.389)	23(0.426)	41(0.380)	67(0.620)
多支血管病变	47	11(0.256)	19(0.442)	17(0.395)	31(0.360)	53(0.616)

表 4. 冠状动脉病变积分与 Pvu Ⅱ基因多态性的关系

基因型	n	Gensini 积分
PP	34	15.50 $\pm$ 10.58
Pp	75	10.75 $\pm$ 8.03
pp	60	10.57 $\pm$ 7.03

3 讨论

雌激素是天然的血管保护剂,通过影响脂蛋白代谢,降低血脂,改善血流动力学参数和凝血纤溶系统功能和抗氧化作用,并且通过刺激内皮细胞一氧化氮合酶活性及其基因表达而直接改善内皮细胞功能、抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移,具有扩血管、抗炎、抗增生等血管保护作用^[4,5]。大量基础实验通过应用雌激素拮抗剂和建立雌激素受体基因敲除的动物模型等方法,证明了雌激素通过 ER α 介导的生物

学效应是其发挥血管保护作用的重要机制。ER 是一类由配基激活的转录因子,介导大部分已知的雌激素效应,目前已克隆了 ER α 和 ER β 。ER α 基因定位于 6 号染色体的 6q25-1 区,由 140 kb 碱基构成,编码 595 个氨基酸的蛋白质。生物学研究发现,人群中 ER α 基因存在 Pvu Ⅱ和 Xba Ⅳ最常见的酶切多态性,因其位于 1 号内含子上,因而在其中发生的点突变将有可能影响到 ER α 的表达与功能,进而影响到体内雌激素的最终生物学效应^[6,7]。孙明晓等^[8]研究提示,Pvu Ⅱ酶切多态性的突变可能是大血管病变的危险因素之一。

本研究中,冠心病组 PP 基因型及 P 等位基因频率显著高于对照组,PP 纯合子与 p 等位基因携带者的 OR 为 2.396 (1.192~ 4.817);P 与 p 等位基因的 OR 为 1.430 (1.032~ 1.983),提示 Pvu Ⅱ基因多态性与中国南方汉族人群冠心病相关,Pvu ⅡPP 纯合子可能是中国南方地区冠心病的遗传危险因素。Pvu

⑦三个基因型与病变程度的关系则按照不同的病变程度评价方法,结果不同,按照支数评价病变程度,则基因型和等位基因之间差异均无统计学意义;而按照 Gensini 积分方法进行评价,则 PP 基因型的病变程度积分高于 p 等位基因携带者,这有可能是积分评价方法对病变程度的描述更精细,同时也提示 ER α 基因多态性可能对冠状动脉病变程度有影响。国外最早研究 ER 基因多态性和冠心病相关性的日本学者 Matsubara 等,通过对日本人群进行系统研究后,结果未发现有显著性差异^[9];Antonio 等^[10]对 142 名对照者和 153 名早发冠心病患者进行对照分析后认为,ER α Pvu ⑦酶切多态性与冠心病有相关性,提示 ER α 基因突变有阻碍冠状动脉粥样硬化的作用。Kastrati 等^[11]对行冠状动脉造影的患者进行冠状动脉病变程度与 ER α 基因调节区域的(TA)n 长度相关性进行研究,结果发现< 55 岁发病的患者中存在相关性,而在 ≥ 55 岁发病的患者中并不存在相关性。国内黄宪章等^[12]认为 ER 基因多态性与血管病变程度无关。综合以上目前国内外研究来看,结果有较大差异,甚至相反。结果差异有多种原因,不同种族、不同环境因素和年龄、性别构成等研究样本选择标准、数量及样本代表程度、试验设计等不同,均可造成报导结果的不同。

本研究中,ER 基因 Pvu ⑦酶切多态性与冠心病及其病变程度存在相关性,提示该基因型可能与冠状动脉粥样硬化进展相关,这将有助于更好地了解南方地区冠心病的发病及冠状动脉粥样硬化病变程

度进行预测,并对冠心病高危人群的筛查与早期重点防治具有一定的临床意义,同时也为从分子水平探讨冠心病的发病机制提供一些思路。

[参考文献]

- [1] 胡大一,马长生(主编). 心脏病学实践—新进展与临床案例[M]. 北京:人民卫生出版社,2005: 3.
- [2] 贾三庆,胡大一,王吉云. 冠心病研究进展——从危险因素到治疗干预[J]. 中国医刊,2002, 37(8): 21-22.
- [3] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease [J]. *Am J Cardiol*, 1983, 51(3): 606-607.
- [4] Farhat MY, Lvigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen [J]. *FASEB J*, 1996, 10: 615-624.
- [5] Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, et al. Production and actions of estrogens [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346: 340-352.
- [6] Zhai P, Eurell K, Cooks PS, et al. Myocardial ischemia reperfusion injury in estrogen receptor alpha knockout and wild-type mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278: H1 640-647.
- [7] Losordo DW, Kearney M, Kim EA, et al. Variable expression of estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women [J]. *Circulation*, 1994, 89: 1 501-510.
- [8] 孙明晓,郭立新,周迎新,等. 男性及绝经后女性雌激素受体基因多态性与糖尿病大血管病变的关系[J]. 中国动脉硬化杂志,2004, 2(12): 189-193.
- [9] Matsubara Y, Murata M, Kawano K, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphism in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 3 006-012.
- [10] Mansur Ade P, Nogueira CC, Strunz CM, et al. Genetic polymorphism of estrogen receptor in patients with premature coronary artery disease [J]. *Arch Med Res*, 2005, 36(15): 511-517.
- [11] Kastrati A, Schömig A, Seyfarth M, et al. PIA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement [J]. *Circulation*, 1999, 99(8): 1 005-010.
- [12] 黄宪章,张平安,李艳,等. 雌激素受体基因多态性与冠心病关系的研究[J]. 中华心血管病杂志,2002, 30(2): 78-81.

(此文编辑 文玉珊)