

• 临床研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0834-04

血红素加氧酶 1 基因启动子区多态性与冠心病的相关性及其对血清胆红素水平的影响

王迎洪, 马依彤, 付真彦, 杨毅宁, 谢翔, 刘芬

(新疆医科大学附属第一医院心脏中心, 新疆乌鲁木齐市 830054)

[关键词] 内科学; 血红素加氧酶 1; 血清胆红素; 冠心病; 基因多态性

[摘要] 目的 探讨冠心病患者血红素加氧酶 1 启动子区 (GT)_n 重复序列多态性与冠心病的相关性及其对血清胆红素水平的影响。方法 采用聚合酶链反应-非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测 337 例冠心病患者和 240 例健康对照者血红素加氧酶 1 启动子区 (GT)_n 重复序列多态性, 同时测定血清胆红素水平。结果 冠心病组与对照组 LL 基因型及 L 等位基因频率分布差异显著 ($P < 0.05$); L 等位基因频率在冠心病不同病变程度之间分布差异显著 ($P < 0.05$), 且 LL 基因型频率在多支血管病变组较单支和双支血管病变组高 ($P < 0.05$); LL 基因型者胆红素水平较 SS 基因型者明显下降 ($P < 0.001$)。结论 血红素加氧酶 1 启动子区 (GT)_n 重复序列多态性与冠心病的发生发展及冠状动脉狭窄程度有关, L 等位基因是冠心病的一个危险因素, 可能与该基因多态性所致血清胆红素水平降低有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association Between Coronary Heart Disease and Heme Oxygenase-1 Promoter Region Polymorphism and the Influence of the Level of Serum Bilirubin

WANG Ying-Hong MA Yi-Tong FU Zhen-Yan YANG Yi-Ning XIE Xiang and LIU Fen

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[KEY WORDS] Heme Oxygenase-1; Serum Bilirubin; Coronary Heart Disease; Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between coronary heart disease (CHD) and heme oxygenase-1 (HO-1) promoter region (GT)_n repeated sequence polymorphism and the influence of the level of serum bilirubin.

Methods The polymorphism of HO-1 gene in 337 CHD patients and 240 health controls was analyzed by polymerase chain reaction-native polyacrylamide gel electrophoresis and the level of serum bilirubin of each patient at the same time was detected.

Results The HO-1 genotypes were classified into three groups: LL, LS and SS. The LL genotypic frequency and L allele frequency in CHD patients was significantly higher than control group ($P < 0.05$); the L allele frequency had different distribution in single, double and multivessel disease ($P < 0.05$), and the LL genotypic frequency of multivessel disease patients was higher than that of single and double vessel disease patients ($P < 0.05$); bilirubin level of LL genotype patients was significantly lower than that of SS genotype patients ($P < 0.001$).

Conclusions The polymorphism of HO-1 promoter region (GT)_n repeated sequence plays an important role in CHD pathobiology process. L allele frequency is a risk factor of CHD, which may be correlated with its potential ability to decrease the serum bilirubin.

血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是一种应激诱导性酶, 在多种刺激物包括氧化损伤诱导下表达增高并分解血红素释放出游离铁、一氧化碳和胆绿素, 后者在胞液酶-胆绿素还原酶作用下迅速

转化为胆红素, 这三种代谢产物在抑制血管平滑肌细胞增殖、抗炎、抗氧化、防御氧化应激、维持细胞内稳态方面有重要作用^[1,2]。Chen 等^[3]研究发现冠心病患者 HO-1 含量较高, 其表达水平的高低与冠状动脉病变严重程度相关。在 HO-1 基因启动子区有一段 (GT)_n 双核苷酸重复序列, Brydun 等^[4]研究发现其长度多态性与冠心病发病机制具有相关性, 正常或偏高含量的胆红素能使冠心病发病率降低, 而低血清胆红素浓度则使冠心病发病率增加^[5,6]。本研究旨在探讨冠心病患者 HO-1 启动子区 (GT)_n 重复序列多态性与冠心病的相关性及其血清胆红素水平变化。

[收稿日期] 2008-09-12 [修回日期] 2008-10-01

[基金项目] 国家自然科学基金 (30760263) 和新疆自治区重大专项课题 (200733146-3)

[作者简介] 王迎洪, 硕士研究生, 主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病的基因遗传学研究, E-mail: wangyinghong1981@163.com。
通讯作者马依彤, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的诊断及介入治疗, E-mail: mytx@163.com。付真彦, 博士, 主治医师, 主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病基因遗传学及分子生物学研究。

1 对象和方法

1.1 研究对象

冠心病患者 337例,其中男性 175例,女性 162例,年龄 61.14 ± 10.91 岁,依据冠状动脉造影结果分为单支病变 97例,双支病变 96例,多支病变 144例。对照者 240例,选择同期入院行冠状动脉造影结果为阴性者,其中男性 122例,女性 118例,年龄 60.19 ± 11.11 岁,体格检查及胸片、标准 12导联心电图、肝胆 B超、血尿粪常规均未见异常。各组间性别、年龄等一般资料经统计学检验差异无统计学意义,具有可比性。以上两组入选对象排除主动脉夹层、风湿性心脏病、先天性心脏病、心功能衰竭、肝功能异常、胆囊疾病、多脏器功能衰竭、全身免疫系統性疾病、血液系统疾病及感染等疾病。

1.2 冠状动脉造影检查

利用美国 GE公司 INNOVA2000型心血管专用造影 X光机,采用经股动脉法或桡动脉穿刺法进行冠状动脉造影 (coronary angiography, CAG),对每支血管进行最佳的多体位造影,以直径狭窄百分数对其进行评估。直径狭窄百分数 $\geq 50\%$ 诊断为冠心病,未见明显狭窄者为正常。对于主要冠状动脉血管前降支、左回旋支、右冠支及其一级分支对角支、钝缘支等,病变累及其中一支为单支病变,两支为双支病变,三支或累及左主干者为多支病变。

1.3 血生物化学指标检测

总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)及血清胆红素等生物化学指标检测由本院检验中心测定。

1.4 DNA提取及 PCR扩增

采用全血基因组提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司)提取外周静脉血白细胞 DNA。引物上游 5'-AGA GCC TGC AGC TTC TCA GA-3',下游 5'-ACA AAG TCT GGC CAT AGG AC-3' (上海生物工程公司合成)。反应体系为 25 μ L,包括 10 \times PCR Buffer 5 μ L, Mg^{2+} 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L,引物 P1、P2各 1 μ L (10 μ mol/L), DNA模板 1.5 μ L, Pfu DNA聚合酶 2.5 u (0.5 μ L),不足部分由双蒸水补足。PCR扩增条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s,循环 35次,最后 72℃延伸 10 min。

1.5 电泳和银染

PCR产物用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

鉴定,电压 60 V,时间 2~3 h。电泳后,对凝胶分别进行固定、银染液染色、显影,室温下晾干,拍照。

1.6 DNA片段长度的估计

采用列表法,测量加样孔前沿至 DNA条带间的距离,根据文献 [7]计算 (GT) $_n$ 重复拷贝数 n ,依据 n 值不同分两组人群: $n < 27$ 为短串联重复序列 (S), $n \geq 27$ 为长串联重复序列 (L)。

1.7 统计学分析

用 Hardy-Weinberg平衡检验样本群体代表性: 各组基因型和等位基因频率差异比较用 χ^2 检验; 连续变量比较用 t 检验和方差分析; 综合评价各因素与冠心病的关系采用多因素 Logistic回归分析; 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

冠心病组体质指数、血压、甘油三酯、总胆固醇及吸烟、合并高血压和糖尿病的比例较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 而 HDLC略低于对照组,但差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 临床资料比较

指 标	冠心病组 ($n = 337$)	对照组 ($n = 240$)
体质指数 (kg/m^2)	26.09 ± 2.81^a	24.64 ± 2.86
TC (mmol/L)	4.25 ± 1.14^a	3.33 ± 1.75
TG (mmol/L)	2.35 ± 1.55^a	1.94 ± 1.27
HDLC (mmol/L)	1.05 ± 0.52	1.09 ± 0.32
LDLC (mmol/L)	2.41 ± 1.01	2.39 ± 1.05
吸烟 (例)	178 (52.82%) ^a	52 (21.67%)
饮酒 (例)	92 (38.33%)	118 (35.01%)
高血压 (例)	152 (45.10%) ^a	86 (35.83%)
糖尿病 (例)	118 (35.01%) ^a	40 (16.67%)

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.2 Hardy-Weinberg平衡检验

HO-1基因型分布在冠心病组和对照组符合 Hardy-Weinberg平衡,具有群体代表性。

2.3 血红素加氧酶 1基因型频率及等位基因频率分布

冠心病组与对照组 LL基因型频率及 L等位基因频率分布差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 2)。LL基因型频率分布在多支血管病变组较单支和双支血管病变组高 ($P < 0.05$), 且 L等位基因在三组

之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 表 3)。

表 2 血红素加氧酶 1 基因多态性分布 (例)

分 组	n	基因型			等位基因	
		LL	LS	SS	L	S
对照组	240	50 (0.208)	124 (0.517)	66 (0.275)	224 (0.467)	256 (0.533)
冠心病组	337	126 (0.374) ^a	148 (0.439)	63 (0.187)	400 (0.593) ^a	274 (0.407)

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 3 不同冠状动脉病变支数组血红素加氧酶 1 基因型频率及等位基因频率分布 (例)

分 组	n	基因型			等位基因	
		LL	LS	SS	L	S
单支病变组	97	12 (12.4)	67 (69.1)	18 (18.6)	91 (46.9)	103 (53.1)
双支病变组	96	38 (39.6)	39 (40.6)	19 (19.8)	115 (59.9)	77 (40.1)
多支病变组	144	76 (52.8) ^a	42 (29.2)	26 (18.1)	194 (67.4) ^a	94 (32.6)

a为 $P < 0.01$, 与单支及双支病变组比较。

2.4 冠心病组不同基因型血清胆红素浓度比较

SS基因型者胆红素浓度明显高于 LS 和 LL 基因型者 ($23.01 \pm 3.68 \mu\text{mol/L}$ 比 $13.43 \pm 3.66 \mu\text{mol/L}$ 和 $12.11 \pm 4.9 \mu\text{mol/L}$, $P = 0.000$), 而 LS 基因型者与 LL 基因型者胆红素浓度差异无统计学意义。

2.5 多因素 Logistic 回归分析

将冠心病作为因变量, 性别、吸烟史、饮酒史、高血压病、糖尿病、体质指数、TG、TC、脂蛋白 (a)、血清胆红素和 HO-1 基因多态性为自变量, 作多因素非条件 Logistic 回归分析, 逐个选入或剔除 (前进法和后退法) 不显著变量, α 取 0.05。入选主效应模型的变量有吸烟史、高血压、糖尿病、总胆固醇、血清胆红素、脂蛋白 (a) 及 HO-1 基因多态性 (表 4)。

表 4 多因素非条件 Logistic 回归分析

危险因素	β	SE	Wald	P	OR	95% CI
基因型	0.860	0.287	8.982	0.003	2.364	1.347~4.150
高血压	0.455	0.245	3.464	0.063	1.576	0.976~2.546
糖尿病	0.808	0.387	4.365	0.037	2.243	1.051~4.788
吸烟	1.489	0.264	31.852	0.000	4.431	2.642~7.430
总胆固醇	0.829	0.285	8.467	0.004	1.795	1.001~3.219
总胆红素	-0.585	0.298	3.849	0.050	0.436	0.250~0.763
脂蛋白 (a)	0.944	0.322	8.584	0.003	2.570	1.367~4.831

3 讨论

HO-1 又称血红素氧合酶 1, 是一种诱导性细胞

保护酶, 由 Tenhunen 等^[8]于 1968 年发现。利用腺相关病毒 2 在小鼠动物模型中的研究显示, HO-1 过表达能预防心室壁变薄, 抑制炎症反应、心脏衰竭、心肌纤维化和左心室重构, 对于严重的冠心病患者具有重要的治疗意义^[9]。HO-1 基因敲除小鼠则表现出抗氧化应激能力下降、促炎症反应发生的趋势, 同时对粥样硬化性损伤更加敏感^[10]。有实验表明, HO-1 在动脉粥样硬化发展过程中的表达量逐渐增高^[11, 12]。HO-1 基因启动子内存在 GT 双核苷酸重复序列, 又称微卫星多态性, 依照重复次数分为 S 型 (< 27) 和 L 型 (≥ 27)。体外实验表明 GT 重复次数与 HO-1 的转录水平呈负相关^[13]。短 (GT)_n 双核苷酸串联重复序列 (< 25 次) 使 HO-1 表达含量上调, 发挥抗氧化应激、抗炎症损伤、抗细胞凋亡、抗增殖和抑制血小板聚集作用, 保护冠状动脉血管内皮细胞^[14-16]。而长串联重复序列导致 HO-1 转录水平下降, 对血管内皮细胞的保护作用减弱^[17], 从而加重冠心病。本研究发现, 冠心病组主要以 LL 型和 LS 型为主, 对照组主要以 LS 型和 SS 型为主, 两组基因型频率分布差异具有统计学意义; 在进行等位基因频率分布比较时发现, 冠心病组以 L 型为主, 对照组以 S 型为主, 两组等位基因频率分布差异具有统计学意义, 表明 L 等位基因携带者患冠心病的危险性增加。在不同冠状动脉病变支数之间比较, LL 基因型分布频率在多支血管病变组较单支和双支血管病变组高, 表明 HO-1 基因多态性和冠状动脉病变严重程度相关。这些结果与以上研究结论一致。另外, 本研究在平衡了吸烟、高脂血症、糖尿

病和高血压等危险因素的作用后,发现 HO-1 基因多态性仍是冠心病发生的独立危险因素 (OR = 2.364, 95% CI 为 1.347~4.150)。在对日本冠心病患者的研究中发现,当同时合并高胆固醇血症、糖尿病或吸烟等传统冠心病高危因素时,携带 L 型等位基因患者冠心病病变程度较 S 型者要明显加重^[18]。但有报道称相对于亚洲人群,这一相关性在高加索人中并不显著,提示 HO-1 基因多态性对于冠心病的影响机制可能还存在种族差异^[19]。

血清胆红素是 HO-1 的代谢产物之一,是体内含量最丰富的内源性抗氧化剂之一,发挥着清除过氧化物、氧自由基、亚硝酸盐类物质的生物学效应,同时保护脂类和蛋白质免受氧自由基的损害,抑制脂质过氧化物的形成^[20]。Schwertner 等^[21]报道血清胆红素浓度与缺血性心脏病之间呈负相关性。本研究中,随病变程度的加重,LL 基因型冠心病患者血清胆红素含量明显低于 SS 基因型,符合既往研究结果。同时多因素非条件 Logistic 回归分析结果显示,血清总胆红素浓度是冠心病的一个保护因素,血清胆红素浓度水平与冠心病之间呈负相关^[6]。

综上所述,HO-1 基因多态性及其代谢产物血清胆红素浓度与冠心病的发生发展具有相关性,L 型等位基因携带者较 S 型等位基因携带者更易于发生冠心病,对于携带 L 型等位基因的人群,如果同时血清胆红素浓度水平下降,则冠状动脉病变程度也较重。

[参考文献]

- [1] Tulis DA, Dmante W, Liu X, et al. Adenovirus mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation [J]. *Circulation*, 2001, **104** (22): 2710-715.
- [2] Deshane J, Wright M, Agawal A. Heme oxygenase-1 expression in disease states [J]. *Acta Biochim Pa*, 2005, **52** (2): 273-284.
- [3] Chen SM, Li YG, Wang DM. Study on changes of heme oxygenase-1 expression in patients with coronary heart disease [J]. *Clin Cardiol*, 2005, **28** (4): 197-201.
- [4] Brydun A, Watari Y, Yamamoto Y, et al. Reduced expression of heme oxygenase-1 in patients with coronary atherosclerosis [J]. *Hypertens Res*, 2007, **30** (4): 341-348.
- [5] Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease [J]. *Clin Chem*, 2000, **46**: 1723-727.
- [6] Santiago E, Mora L, Bautista M, et al. Granulocyte colony 2 stimulating factor induce neutrophil to secrete macrophage colony 2 stimulating factor [J]. *Cytokine*, 2001, **15**: 299-304.
- [7] Kushiida T, Li Volti G, Quan S, et al. Role of human heme oxygenase-1 in attenuating TNF- α mediated inflammation injury in endothelial cell [J]. *J Cell Biochem*, 2002, **87** (4): 377-385.
- [8] Tenhunen R, Marver HS, Schmitt R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1968, **61** (2): 748-755.
- [9] Pachori AS, Meek LG, Zhang L, et al. Chronic recurrent myocardial ischemic injury is significantly attenuated by pre-emptive adeno-associated virus heme oxygenase-1 gene delivery [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, **47** (3): 635-643.
- [10] Yet SF, Layne MD, Liu X, et al. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling [J]. *FASEB J*, 2003, **17**: 1759-761.
- [11] 喻陆, 何作云. 实验性兔动脉粥样硬化发病过程中内源性一氧化碳及其合成酶基因表达的改变 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 120-124.
- [12] 徐少平, 李鲁光, 程友琴, 等. 血红素加氧酶-一氧化碳系统对家兔动脉粥样硬化发病的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 114-116.
- [13] Chen YH, Chau LY, Lin MW, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with angiographic restenosis after coronary stenting [J]. *Eur Heart J*, 2004, **25** (1): 39-47.
- [14] Manuhashi K, Kasahara Y, Ohta K, et al. Paradoxical enhancement of oxidative cell injury by overexpression of heme oxygenase-1 in an anchorage-dependent cell ECV304 [J]. *J Cell Biochem*, 2004, **93** (3): 552-562.
- [15] Peng L, Mundada L, Stenel M, et al. Induction of heme oxygenase-1 expression inhibits platelet-dependent thrombosis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, **6** (4): 729-735.
- [16] Liu XM, Chapman GB, Wang H, et al. Adenovirus mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2002, **105** (1): 79-84.
- [17] Brydun A, Watari Y, Yamamoto Y, et al. Reduced expression of heme oxygenase-1 in patients with coronary atherosclerosis [J]. *Hypertens Res*, 2007, **30** (4): 341-348.
- [18] Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (10): 1680-685.
- [19] Endler G, Exner M, Schillinger M, et al. A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with increased bilirubin and HDL levels but not with coronary artery disease [J]. *Thromb Haemost*, 2004, **91** (1): 155-161.
- [20] Minetti M, Mallozzi G, Di Stasi AM, et al. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite mediated protein oxidation in human blood plasma [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **352**: 165-174.
- [21] Schwertner HA, Jackson WC, Tolkan G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease [J]. *Clin Chem*, 1994, **40**: 18-23.

(此文编辑 文玉珊)