

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-04

• 临床研究 •

血红素氧合酶 1 基因 - 413A / T 位点多态性与 血脂异常个体冠心病患病风险密切相关

张国红¹, 陈宋明², 王东明², 黄贤生²

(汕头大学医学院 1 病理教研室, 广东省汕头市 515031; 2 汕头大学医学院附属第一医院心血管内科, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 冠心病; 血红素氧合酶 1; 基因多态性; 血脂异常

[摘要] 目的 检测血红素氧合酶 1 基因启动子区 - 413A / T 位点多态性, 阐明血红素氧合酶 1 基因多态性与冠心病易感性的关联。方法 选择经冠状动脉造影确诊的冠心病患者 200 例为病例组, 冠状动脉无明显狭窄、年龄、性别与病例组相仿的 120 例个体为对照。启动子区直接测序方法检测 - 413 A / T 单核苷酸多态性基因型。以冠心病危险因素作为协变量, 统计血红素氧合酶 1 基因 - 413 A / T 位点多态性与冠心病的相关性。结果 研究人群 - 413 位点为单核苷酸多态性位点, 且携带 TT 基因型的血脂异常患者冠心病患病风险明显减少 (校正后 OR = 0.179, 95% CI = 0.05 ~ 0.642)。结论 血红素氧合酶 1 基因启动子区 - 413 A / T 可能是评价血脂异常个体冠心病易感性风险的重要标记。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

- 413A / T Polymorphism in Heme Oxygenase-1 Gene Promoter is Related to Susceptibility of Coronary Artery Disease in Patients with Dyslipidemia

ZHANG GuoHong¹, CHEN SongMing², WANG DongMing², and HUANG Xian-Sheng²

(1 Department of Pathology, Medical College, Shantou University, Shantou, Guangdong 515031, China; 2 Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College, Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

[KEY WORDS] Coronary Artery Disease; Heme Oxygenase-1; Gene Polymorphism; Dyslipidemia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between - 413A / T single nucleotide polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) gene promoter and susceptibility of coronary artery disease. **Methods** 200 patients who were diagnosed as having coronary artery disease by coronary angiography were selected in this study. 120 subjects without evidence of coronary artery disease under coronary angiography with their sex and age similar to coronary artery disease patients were selected as controls. Sequencing was carried out on the ABI 3730 DNA analysis platforms to determine the genotypes of - 413A / T. **Results** A single nucleotide polymorphism A (- 413) T was found in the HO-1 gene promoter. Genotype T / T was protective against coronary artery disease in patients with dyslipidemia (adjusted OR = 0.179, 95% CI = 0.05 ~ 0.642). **Conclusion** A (- 413) T single nucleotide polymorphism may be an important marker to evaluate susceptibility to coronary artery disease in patients with dyslipidemia.

冠心病是由多个遗传易感基因与环境因素相互作用引起的复杂性疾病。基因多态性与动脉粥样硬化相关性疾病的研究已成为研究热点^[1]。近年研究发现, 血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 基因是抗氧化应激基因^[2,3], 其表达产物 HO-1 在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥主要作用。我们的前期研究发现, HO-1 表达水平与冠心病严重程度密切相关^[4]。HO-1 基因启动子区包含着 (GT)_n

短串联重复序列 (short tandem repeat STR) 多态性以及单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 (- 413 A / T), 两者均可影响 HO-1 的表达^[3,5]。本研究通过检测 HO-1 基因启动子区 - 413 A / T 位点多态性, 结合冠心病危险因素, 旨在阐明 HO-1 基因多态性与中国人群冠心病易感性的关联, 为冠心病易感个体的筛选和预防性干预提供遗传易感标记。

[收稿日期] 2009-09-10 [修回日期] 2010-01-06

[基金项目] 广东省自然科学基金 (07008215)

[作者简介] 张国红, 博士, 讲师, 研究方向为食管癌易感性研究和食管癌遗传流行病学、食管癌癌变过程中微环境 (炎症反应) 研究, Email 为 g_ghzhang@stu.edu.cn。通讯作者陈宋明, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的基础及临床研究, Email 为 csm1002@126.com。王东明, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病影像学诊断及介入、心律失常的机制探讨以及新疗法的探索。

1 材料与方法

1.1 病例来源、血样收集及细胞分离

以 2007 年 9 月以来, 在汕头大学医学院附属第一医院心导管室行冠状动脉造影的患者为研究对象, 造影过程死亡或造影未成功者除外, 同时排除合

并肿瘤或其他重症者。选择冠状动脉(左前降支、左回旋支、右冠状动脉或左主干)最少有一处直径狭窄 $\geq 50\%$ 的200例个体列入病例组。选择性别、年龄与病例组相仿,造影未发现冠状动脉明显病变的120例个体列入对照组。记录患者性别、年龄、早发冠心病家族史、糖尿病病史、高血压病史、高脂血症病史和吸烟史。取研究对象外周抗凝血5 mL,按文献[4]方法分离淋巴细胞和单核细胞。

1.2 血红素氧合酶1基因单核苷酸多态性基因型检测

分离单个核细胞后,采用QIAGEN试剂盒提取细胞基因组DNA。primer5.0软件设计扩增启动子区引物。引物序列如下:正向5'-GGA TTC CAG CAG GTG ACA TT-3',反向5'-ACA GCT GAT GCC CAC TTT CT-3';单向测序引物5'-CAC ACA AAA CCT TTA AGG AAA-3'。25 μ L体系进行PCR反应,反应条件为95℃预变性2 min,95℃变性15 s,55℃退火15 s,72℃延伸2 min,35个循环,72℃延伸10 min。PCR产物纯化后ABI 3730XL单向测序;Phred/Phrap软件比对与SNP基因分型。

1.3 统计学处理

采用SPSS11.0软件包,计量资料比较用独立样本 t 检验或单因素方差分析,计数资料比较用 χ^2 检验。 2×2 列联表 χ^2 检验病例-对照组之间等位基因、基因型频率的分布差异,OR值以及95%可信区间。多因素Logistic回归模型分析HO-1基因型与危险因素交互作用对冠心病的影响。

2 结果

2.1 研究人群的基线特征

根据实验设计,病例组及对照组患者入选时年龄、性别相仿,两组患者男性比和年龄差异无显著性。冠心病传统危险因素糖尿病、高血压、吸烟、血脂异常在病例组的比例明显高于对照组(表1)。

表1. 病例组与对照组患者合并危险因素情况比较

分 组	对照组 ($n=120$)	病例组 ($n=200$)	P 值
年龄	62.68 $\pm$ 6.10	61.17 $\pm$ 5.60	0.86
男性(例)	100(83%)	168(84%)	0.79
血脂异常(例)	26(21.7%)	66(33.0%)	0.021
糖尿病(例)	16(13.3%)	41(20.5%)	0.015
吸烟(例)	42(35.0%)	121(60.5%)	0.016
高血压病(例)	55(45.8%)	107(53.5%)	0.017

注: P 值为 T 检验结果。

2.2 -413 A/T位点多态性与冠心病易感性的关联

通过测序,证实研究人群HO-1基因启动子区也存在-413 A/T位点单核苷酸多态性(图1),Phrap/phred比对结果见图2。根据个体携带该位点碱基不同,分为携带AA、AT、TT基因型三组。研究对象总体基因型分布以及按冠心病危险因素分层后的个体基因型分布如表2所示。基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡定律,具有群体代表性。

经 χ^2 检验,我们发现病例组与对照组-413 A/T SNP位点基因型分布无明显差异($P=0.801$)。经分层,发现血脂异常患者中,病例组和对照组-413 A/T位点基因型分布差异有显著性($P=0.007$),与AA+AT基因型相比,TT基因型可显著减少血脂异常个体冠心病的发病风险,非条件Logistic回归分析纠正性别、年龄、冠心病危险因素后的OR值为0.179(95% CI=0.05~0.642)。但对于吸烟患者、糖尿病患者和高血压病患者-413 A/T位点基因型分布在病例组与对照组差异无显著性(表2)。

表2. 血红素氧合酶1基因启动子区-413 A/T位点基因型分布(例)

	AA	AT	TT	P 值
总体				
对照 (n= 120)	28(23.3%)	80(66.7%)	12(10.0%)	0.801
病例 (n= 200)	40(20.0%)	137(68.5%)	23(11.5%)	
吸烟				
对照 (n= 42)	10(23.8%)	30(71.4%)	2(4.8%)	0.189
病例 (n= 136)	29(21.3%)	88(64.7%)	19(14.0%)	
血脂异常				
对照 (n= 26)	5(19.2%)	13(50.0%)	8(30.8%)	0.007
病例 (n= 75)	15(20.0%)	54(72.0%)	6(8.0%)	
糖尿病				
对照 (n= 16)	4(25.0%)	10(62.5%)	2(12.5%)	0.427
病例 (n= 46)	7(15.2%)	35(76.1%)	4(8.7%)	
高血压				
对照 (n= 55)	10(18.2%)	40(72.7%)	5(9.1%)	0.542
病例 (n= 121)	20(16.5%)	82(67.8%)	19(15.7%)	

3 讨论

近年研究表明,冠心病发病年龄呈逐渐年轻化趋势、家族聚集的特点。冠心病家族史阳性人群患冠心病的危险性是普通人群的10倍以上,且亲属冠心

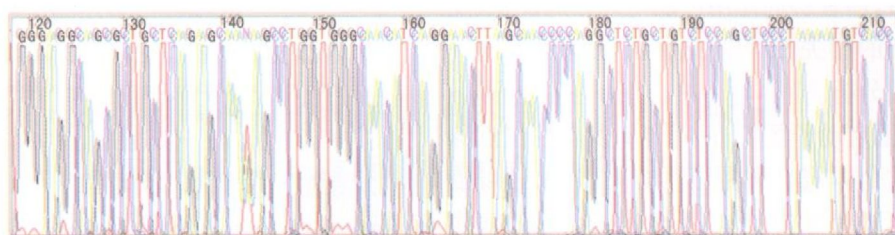


图 1 测序结果峰型图



图 2 血红素氧合酶 1 基因启动子区 - 413A/T 单核苷酸多态性位点 Phrap/phred 比对图

病发病年龄越早, 亲缘关系越近, 患病亲属越多, 其冠心病危险性越高, 这些表明遗传因素在冠心病发病机制中起重要作用^[6]。SNP 为研究基因多态性的新一代遗传标志, 它直接以序列的差异作为标记, 比其它遗传标志更能真实的反映人种、人群及个体之间的遗传差异。日本学者的研究发现^[5], HO-1 基因启动子区 T(-413)A 多态性位点 AA 基因型与心肌局部缺血密切相关。本研究未见 T(-413)A 多态性位点基因型与冠心病易感性的关联, 可能与不同人群有关。

冠心病的发生、发展是遗传因素和环境因素共同作用的结果, 迄今已提出的冠心病主要危险因素包括年龄、性别、家族史等不可改变的危险因素, 和高血压、高胆固醇血症、糖尿病和吸烟等可改变的危险因素。基因型分析除了可以预示个体冠心病易感性, 做到早期预防外^[7], HO-1 启动子区基因型与危险因素可能存在交互作用, 共同促进冠心病的发生

和发展。

本研究未发现 T(-413)A 多态性位点与研究人群总体冠心病发病有相关性, 但却发现携带 TT 基因型的血脂异常个体冠心病患病风险减少, 提示 -413 A/T 可能是评价血脂异常个体冠心病易感风险的重要标志, 也说明了基因-危险因素交互作用能增加冠心病患病风险。T(-413)A 基因型对合并危险因素的心血管病易感性是否通过影响 HO-1 表达而实现, 有待于进一步探讨。本研究未检测到 T(-413)A 多态性位点与糖尿病患者、高血压病患者和吸烟个体冠心病易感性的相关性, 更准确的结论有待于扩大样本量研究。

除了 -413A/T 多态位点以外, 人类 HO-1 基因启动子区还存在 (GT)_n 多态性和 G(-1135)A 多态位点^[8], (GT)_n 多态性的功能以及与冠心病的相关性已见报道^[9], G(-1135)A 位点功能尚未阐明。-413A/T SNP 位点和 (GT)_n 多态性对 HO-1 转录

起周密的调节,两者协同作用可能与冠心病发生、发展有更加密切的相关性^[10]。这种关联有待于进一步的单倍体型分析。

HO-1基因启动子区 T(-413)A 多态性位点除了与血脂异常个体冠心病易感性有关以外,还可能与冠心病临床表现有关,该多态性是否与冠心病病情严重性相关,以及与冠状动脉造影下冠状动脉病变严重程度相关,将是我们进一步研究的课题。

[参考文献]

- [1] 许伟伟, 范乐明. 基因多态性与动脉粥样硬化性心血管疾病相关性的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (12): 943-946
- [2] Bach FH. Heme oxygenase-1 as a protective gene [J]. *Wien Klin Wochenschr* 2002 114 (Suppl 4): 1-3
- [3] Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, et al. Heme oxygenase-1 genotype is a vascular anti-inflammatory factor following balloon angioplasty [J]. *J Endovasc Ther* 2002 9 (4): 385-394
- [4] Chen SM, Li YG, Wang DM. Study on changes of heme oxygenase-1 expression and in patients with coronary heart disease [J]. *Clin Cardiol* 2005 28 (4): 197-201
- [5] Ono K, Goto Y, Takagi S, et al. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese [J]. *Atherosclerosis* 2004 173 (2): 315-319
- [6] Topol EJ, Smith J, Plow EF, et al. Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease [J]. *Hum Mol Genet* 2006 15 (2): R117-123
- [7] Funk M, Endler G, Schillinger M, et al. The effect of a promoter polymorphism in the heme oxygenase-1 gene on the risk of ischemic cerebrovascular events: the influence of other vascular risk factors [J]. *Thromb Res* 2004 113 (3-4): 217-223
- [8] Ono K, Mannan T, Iwai N. Association of a promoter variant of the heme oxygenase-1 gene with hypertension in women [J]. *J Hypertens* 2003 21 (8): 1497-503
- [9] 王迎洪, 马依彤, 付真彦, 等. 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 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (10): 834-837
- [10] Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism [J]. *Tohoku J Exp Med* 2003 200 (4): 167-186

(此文编辑 许雪梅)