

[文章编号] 1007-3949(2010)18-04-0283-04

· 临床研究 ·

MEF2A 基因 CAG 三核苷酸重复序列与冠状动脉病变及严重程度相关性

贾娜¹, 蔡剑平², 戴大鹏², 孙福成¹, 许峰¹, 季福绥¹, 周晓阳², 何青¹

(1. 卫生部北京医院心内科; 2 卫生部北京老年医学研究所分子生物实验室, 北京市 100730)

[关键词] 冠心病; 肌细胞增强因子 2A; 遗传因素; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨北京地区汉族人群中 MEF2A 基因 CAG 三核苷酸重复序列与冠状动脉病变及严重程度的相关性。方法 用聚合酶链反应产物直接测序法对所有研究对象进行 MEF2A 基因 11 号外显子测序, 用病例-对照方法研究 CAG 重复序列与冠状动脉病变支数的相关性。结果 在 473 例冠心病病例和 303 例对照中, MEF2A 基因 11 号外显子 CAG 重复序列存在多态性, 按照不同遗传模式分析, 4~8 个 CAG 重复序列均与冠状动脉病变支数无明显相关性。结论 MEF2A 基因 11 号外显子 4~8 个 CAG 重复序列和北京地区汉族人群中冠状动脉病变的严重程度无明显相关性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Association Between CAG Repeat Number Polymorphism in MEF2A Gene and Severity of Coronary Artery Disease

JIA Na¹, CAI Jian-Ping², DAIDA-Peng², SUN Fu-Cheng¹, XU Feng¹, JI Fu-Su¹, ZHOU Xiao-Yang², and HE Qing¹
(1 Department of Cardiology, Beijing Hospital; 2 the Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730 China)

[KEY WORDS] Coronary Artery Disease; MEF2A; Heredity Factor; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between CAG polymorphism sites of MEF2A and severity of coronary artery disease in Han nationality of Beijing. **Methods** Using PCR sequencing method to investigate the genotype of exon 11 of MEF2A of all subjects. Case-control study was used to detect the association of the genotype of 4~8 CAG repeat number with the severity of coronary artery disease. **Results** In 473 coronary artery disease patients and 303 control individuals, CAG repeat number of exon 11 of MEF2A had polymorphism. Under different heredity mode, there was no significant association between 4~8 CAG repeat number and severity of coronary artery disease. **Conclusion** The genotype of 4~8 CAG repeat number of the exon 11 of MEF2A gene has no significant association with severity of coronary artery disease in Han nationality of Beijing.

冠心病的发病机制十分复杂, 外在的环境因素和内在的遗传因素共同参与致病。2003年 11月《科学》杂志发表了美国克里夫兰心血管病中心 Eric J Topol 实验室 Wang 等^[1]的研究工作, 用详尽的数据阐述了 MEF2A 是冠心病、心肌梗死的致病基因, 引起世界学者的广泛关注。在随后的几年时间里, 中国和其他国家均对这一基因展开研究, 但结论存在争议^[2-14]。MEF2A 上有一段 CAG 三核苷酸重复序列, 位于 MEF2A 蛋白转录激活区附近。对于 MEF2A 基因的 CAG 重复序列是否为冠心病的遗传易感因素, 目前也存在不同的研究结果。为了解

MEF2A 基因与中国北京地区人群冠心病发病的相关性, 我院从 2004 年 ~ 2007 年入选了一批研究对象, 通过病例-对照研究发现 CAG 等位基因与冠心病可能存在一定相关性^[15]。本研究旨在探讨 MEF2A 上 CAG 三核苷酸重复序列与冠状动脉病变及严重程度的相关性。

1 对象和方法

1.1 研究对象

共有 776 例非亲缘关系个体参加了本次研究, 均为北京地区的汉族人群。研究对象为 2004 年 4 月 ~ 2006 年 10 月期间在我院心内科就诊的人群, 以冠状动脉造影作为分组标准。病例组为冠状动脉造影显示至少 1 支冠状动脉主要血管狭窄 $\geq 75\%$ 的患者; 对照组为冠状动脉造影显示冠状动脉最严重狭窄处 $\leq 25\%$ 的人群。经过性别、年龄匹配后, 病例

[收稿日期] 2009-12-03 [修回日期] 2010-04-04

[基金项目] 国家高技术研究发展计划资助 (2006AA02Z476)

[作者简介] 贾娜, 硕士, 住院医师, E-mail 为 stefly@yeah.net 蔡剑平, 博士, 研究员, 教授, 研究方向为临床分子生物学。通讯作者何青, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为心血管介入, E-mail 为 heqing-12001@yahoo.com。

组 473 人, 男性 272 人, 女性 201 人, 年龄 58.93 ± 9.77 岁; 对照组 303 人, 男性 156 人, 女性 147 人, 年龄 57.55 ± 10.99 岁。所有患者同意参加研究并签署书面知情同意书。

1.2 材料

flaq, ExTaq DNA 聚合酶、dNTP、DNA 分子量梯度标准 Marker PCR 仪 (TaKaRa 公司); DTCSIM Quick Start 测序试剂盒、CEQTM 8000 DNA 测序仪 (Beckman-Coulter 公司); 微量进样器 (Gilson 公司); 电泳仪及水平电泳槽 (北京六一仪器厂); 凝胶成像仪 (上海复日科技公司); 紫外分光光度计 (日本岛津公司)。所有常规耗材均购自 Axygen 公司, 引物由日本 TaKaRa 大连宝生物公司合成。

1.3 方法

用 EDTA 抗凝管真空采集外周血 5 mL, 采用盐酸胍法提取 DNA, -20°C 储存备用。PCR 扩增采用 10 μL 反应体系, 内含 10 × PCR 缓冲液 1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 0.8 μL, 上下游引物 0.15 μL, flaq DNA 聚合酶 0.2 μL, 50~100 ng 基因组 DNA。PCR 扩增循环参数: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 30 个循环后再延伸 5 min。从基因组 DNA 中特异性扩增 MEF2A 基因 11 号外显子。取 PCR 产物 2 μL, 上样于 2% 琼脂糖凝胶, 200 V 电泳 5~10 min。紫外灯下定出下一步测序 PCR 的模板量。将剩余的 PCR 产物取 5 μL, 加入 0.3 μL 消化液, 以消化引物及 dNTP。参照 DTCSIM Quick Start 测序试剂盒使用说明, 以 PCR 反向引物进行扩增反应, CEQ 8000 自动序列分析仪进行核苷酸序列测定。

1.4 统计学方法

计量资料比较采用 *t* 检验, 计数资料比较用 χ^2 检验。Logistic 多元回归分析各因素与冠心病之间的关系。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究人群基线资料

两组人群已经过性别、年龄匹配。冠心病组人群中高血压病和糖尿病的患病率、吸烟者比率、白细胞计数、血糖、血清总胆固醇 (TC)、血清低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 及血浆纤维蛋白原 (FIB) 水平明显高于对照组, 血清高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 水平明显低于对照组, 而血脂异常患病率、血小板计数、血清甘油三酯 (TG) 水平、左心室射血分数 (LVEF) 在两组间分布没有统计学差异 (表 1)。

表 1 两组人群的基线资料比较

临床特征	冠心病组 (n = 473)	对照组 (n = 303)
年龄 (岁) 范围	34~78	35~87
平均年龄	58.93 ± 9.77	57.55 ± 10.99
性别 (例) 男性	272 (57.5%)	156 (51.5%)
女性	201 (42.5%)	147 (48.5%)
高血压病 (例)	322 (70.2%) ^a	171 (56.4%)
糖尿病 (例)	146 (30.9%) ^a	47 (15.5%)
血脂异常 (例)	145 (30.7%)	102 (33.8%)
吸烟 (例)	248 (52.4%) ^a	104 (34.6%)
白细胞 (×10 ⁹)	7.73 ± 4.10 ^a	6.79 ± 4.99
血小板 (×10 ¹²)	208.09 ± 71.16	207.81 ± 56.73
血糖 (mmol/L)	6.30 ± 2.59 ^a	5.57 ± 4.03
TC (mmol/L)	4.89 ± 1.26 ^a	4.66 ± 0.91
TG (mmol/L)	2.02 ± 1.25	1.86 ± 1.44
LDLC (mmol/L)	2.86 ± 0.83 ^a	2.63 ± 0.69
HDL (mmol/L)	1.04 ± 0.33 ^a	1.20 ± 0.64
FIB (g/L)	3.63 ± 1.94 ^a	3.26 ± 0.83
LVEF 值	73.45% ± 5.05%	73.22% ± 10.18%

a 为 P < 0.05 与对照组比较。

2.2 PCR 产物测序情况

测序发现在 MEF2A 基因第 11 号外显子上存在一段 CAG 三核苷酸重复序列, CAG 重复次数从 4~15 个不等, 存在 CAG 三核苷酸的多态性分布 (表 2)。9~11 个 CAG 重复序列为野生型, 4~8 个 CAG 重复序列和 10~15 个 CAG 重复序列均为多态性。各等位基因分布频率没有统计学差异 (P = 0.529)。由于携带 10~15 个 CAG 重复序列的人太少, 无法单独分析, 我们将重点放在 4~8 个 CAG 重复序列与冠状动脉病变支数的相关性分析上。

表 2 各等位基因的分布频率 (人数)

CAG 等位基因	冠心病组	对照组	总计
4	34 (3.6%)	14 (2.3%)	48 (3.1%)
5	2 (0.2%)	2 (0.3%)	4 (0.3%)
6	3 (0.3%)	2 (0.3%)	5 (0.3%)
7	16 (1.7%)	4 (0.7%)	20 (1.3%)
8	11 (1.2%)	6 (1.0%)	17 (1.1%)
9	397 (42.0%)	253 (41.7%)	650 (41.9%)
10	179 (18.9%)	110 (18.2%)	289 (18.6%)
11	298 (31.5%)	212 (35.0%)	510 (32.9%)
12	3 (0.3%)	1 (0.2%)	4 (0.3%)
14	0 (0.0%)	1 (0.2%)	1 (0.1%)
15	3 (0.3%)	1 (0.2%)	4 (0.3%)
总计	946 (100%)	606 (100%)	1552 (100%)

2.3 相关性分析

由于目前不知道这段 CAG 三核苷酸重复序列

的致病模式是单基因模式还是多基因模式。我们按照不同的遗传模式进行分析。结果显示, 无论按照

常染色体显性模式、常染色体隐性模式还是多基因模式进行分析, 均未有统计学差异 ($P > 0.05$, 表 3)。

表 3 4~8个 CAG 基因型与冠状动脉病变支数的相关分析

遗传模式	基因型	病变支数				x ² 值	P 值
		无	1支	2支	3支		
常染色体显性模式	aa	271(89.4%)	120(87.6%)	130(87.2%)	160(85.6%)	1.676	0.642
	AA + Aa	32(10.6%)	17(12.4%)	19(12.8%)	27(14.4%)		
常染色体隐性模式	Aa + aa	303(100%)	136(99.3%)	148(99.3%)	186(99.5%)	2.015	0.569
	AA	0(0%)	1(0.7%)	1(0.7%)	1(0.5%)		
多基因模式	aa	271(89.4%)	120(87.6%)	130(87.2%)	160(85.6%)	3.321	0.769
	Aa	32(10.6%)	16(11.7%)	18(12.1%)	26(13.9%)		
	AA	0(0%)	1(0.7%)	1(0.7%)	1(0.5%)		

注: A 为 4~8 个 CAG, a 为 9~11 个 CAG; aa 为 9~11 个 CAG 纯合子基因型; Aa 为 4~8 个 CAG / 9~11 个 CAG 杂合子基因型; AA 为 4~8 个 CAG 纯合子基因型。

2.4 多元回归分析

以是否患冠心病为因变量, 以性别、年龄、高血压病、糖尿病、血脂异常、吸烟、血清 TC、TG、LDLC、HDLc、血浆 FIB、EF 值和基因型等因素为自变量,

进行 Logistic 多元回归分析。结果显示 4~8 个 CAG 基因型不是冠心病发病的独立危险因素, 而性别、吸烟、高血压病、糖尿病、血脂异常、LDLC、HDLc、FIB 是冠心病发病的独立危险因素 (表 4)。

表 4 Logistic 多元回归分析

	回归系数	标准误	Wald 值	P 值	OR	95% 可信区间
性别	0.149	0.300	0.246	0.620	1.160	0.645~2.089
年龄	-0.028	0.013	4.737	0.030	0.973	0.949~0.997
吸烟	0.885	0.279	10.101	0.001	2.424	1.404~4.184
高血压病	0.670	0.233	8.277	0.004	1.955	1.238~3.087
糖尿病	1.118	0.276	16.446	0.000	3.058	1.782~5.250
血脂异常	0.541	0.233	5.377	0.020	1.718	1.087~2.714
TC	-0.033	0.223	0.021	0.884	0.968	0.625~1.499
TG	0.129	0.102	1.587	0.208	1.137	0.931~1.389
LDLC	-0.687	0.254	7.331	0.007	0.503	0.306~0.827
HDLc	2.135	0.524	16.575	0.000	8.457	3.026~23.637
FIB	-0.342	0.125	7.506	0.006	0.710	0.556~0.907
基因型	-0.227	0.324	0.488	0.485	0.797	0.422~1.506

注: 基因型设定 1 为 9~11 个 CAG 纯合子, 2 为 4~8 个 CAG 杂合子, 3 为 4~8 个 CAG 纯合子。

3 讨论

MEF2A 中文名叫肌细胞特异性增强因子 2A, 位于染色体 15q26。MEF2A 是 MEF2 家族中的一员。每一个 MEF2 蛋白以二聚体的形式结合在靶 DNA 序列上, 这个序列存在于大量的肌肉特异性基因的启动子中。MEF2 还参与神经细胞、T 细胞等细胞的发育。许多证据都显示 MEF2 是有丝分裂信号途径中一个重要的下游效应器。MEF2 可以调节细胞的增殖、分化和凋亡^[16]。

研究发现, MEF2A 的 mRNA 在骨骼肌、心脏和大脑中表达量最高。体外实验表明, MEF2 可以增加肌细胞的转化程度, MEF2A 参与肌细胞发育。2003 年 Wang 等^[1]检测到在人类正在增殖的平滑肌细胞核中有 MEF2A 蛋白的表达。有研究显示 MEF2A 基因缺失小鼠大多数在出生后第一周就突然死亡了, 表现出显著的右室扩张、肌纤维细胞的断裂、线粒体的破坏和致命性心脏基因程序的启动。极少数 MEF2A 缺失的小鼠活到了成年期, 也表现出心肌细胞线粒体的缺失和容易猝死。从而推断

MEF2A的作用是在心脏中维持适当的线粒体结构和细胞结构完整性^[17]。国外研究发现,用免疫组化法可以在冠状动脉内皮层检测到大量的MEF2A信号。MEF2A对于内皮细胞的发育和功能有重要作用。MEF2A的基因缺陷会导致血管内皮的发育缺陷,促使单核细胞渗出和内皮下基质的暴露,继发粥样斑块和血栓形成^[11]。

2003年Wang等提出MEF2A是冠心病致病基因的说法以后,许多国家和地区均对这一基因展开研究,但结论却不一致^[11-9]。国内学者在2006~2007年间公布相关的研究结果,阐述对这一基因的看法,但存在争议^[10-14]。我院前期研究采用SSCP分析的方法对MEF2A基因进行全基因扫描,共筛查到4处多态性位点,其中3处为单核苷酸多态性位点(891C/T、1305G/A、1353G/T),1处为三核苷酸缺失多态性位点(1294~1296CCC/-)。这4个多态性位点与冠心病的发生可能均无显著相关性^[18]。MEF2A基因第11号外显子上存在一处CAG三核苷酸重复序列。CAG三核苷酸重复序列并非此基因所特有,现在已经知道人类至少有15种疾病是由不稳定的CAG重复扩增引起的^[19]。

国内外也有文献报道散发冠心病人群中MEF2A基因CAG重复序列的多态性和冠心病的关系,在日本、西班牙、爱尔兰、德国等^[5-9]人群中未见到相关性。袁洪等^[13]研究认为CAG重复序列多态性与冠心病发病无关联性,但其旁边的CCG重复序列多态性位点与冠心病存在关联性。Han等^[14]研究认为4~8个CAG重复序列与冠心病无关联性,但重复9次的CAG多态性可能是一个预测因子。我院前期研究显示,4~8个CAG等位基因可能是冠心病的易患因素^[15]。

本研究中,在匹配了年龄、性别后,两组高血压病、糖尿病、吸烟这几个因素仍有显著性差异。TC、TG、LDLC水平在冠心病组中更高,HDLC水平在冠心病组中更低。采用Logistic多元回归的方法将所有因素进行强迫回归。虽然4~8个CAG的基因型有增加冠心病发病风险的趋势,但未达到统计学意义。4~8个CAG重复序列随着冠状动脉病变支数的增多有增加的趋势,但没有显示出统计学差异。在常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传、多基因不同的遗传模式下,4~8个CAG重复序列与冠状动脉病变支数无明显关联性。

研究最后我们也应该考虑到,统计学意义和生物学意义不同。各基因型和等位基因分布频率的差

异,可能仅仅是一种基因多态性的表现,并不一定具有生物学意义。我院前期研究结果显示,4~15个CAG各基因型分布频率是符合Hardy-Weinberg平衡的。生物学意义需要通过后续的基因功能研究进一步证实。

[参考文献]

- [1] Wang L, Fan C, Topol SE, et al. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease [J]. *Science*, 2003, **302**: 1578-1581.
- [2] Bhagavatula MR, Fan C, Shen GQ, et al. Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, **13**: 181-188.
- [3] Weng L, Kavazlar N, Ustaszewska A, et al. Lack of MEF2A mutations in coronary artery disease [J]. *J Clin Invest*, 2005, **115**: 1016-1020.
- [4] Alshuler D, Hirschhorn JN. MEF2A sequence variants and coronary artery disease: a change of heart [J]? *J Clin Invest*, 2005, **115**: 831-833.
- [5] Kajimoto K, Shioji K, Tago N, et al. Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients [J]. *Circ J*, 2005, **69**: 1192-1195.
- [6] Gonzalez P, Garcia-Castro M, Reguero JR, et al. The Pro279Leu variant in the transcription factor MEF2A is associated with myocardial infarction [J]. *J Med Genet*, 2006, **43**: 167-169.
- [7] Horan PG, Allen AR, Hughes AE, et al. Lack of MEF2A Δ 7aa mutation in Irish families with early onset ischaemic heart disease: a family based study [J]. *BMC Med Genet*, 2006, **7**: 63.
- [8] Gulec S, Akar AR, Akar N. MEF2A sequence variants in Turkish population [J]. *Clin Appl Thromb Haemost*, 2008, **14** (4): 465-467.
- [9] Lieb W, Mayer R, König R, et al. Lack of association between the MEF2A gene and myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2008, **117** (2): 185-191.
- [10] 李婧, 陈汉想, 杨钧国, 等. 冠心病新致病基因 MEF2A 第一、第八外显子突变的检测 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2000, **14** (1): 19-21.
- [11] 李婧, 陈汉想, 杨钧国, 等. 冠状动脉粥样硬化性心脏病新致病基因 MEF2A 第 7 外显子突变的检测 [J]. *中国临床康复*, 2006, **10** (24): 72-74.
- [12] 李婧, 杨钧国, 李伟, 等. 中国冠状动脉粥样硬化性心脏病患者 MEF2A 基因的新突变研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2006, **23** (3): 165-168.
- [13] 袁洪, 周宏伟, 胡靖, 等. 中国人群 MEF2A 基因与冠状动脉疾病的易感性 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2006, **31** (4): 453-457.
- [14] Han Y, Yang Y, Zhang X. Relationship of the CAG repeat polymorphism of the MEF2A gene and coronary artery disease in a Chinese population [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, **45** (8): 987-992.
- [15] 戴大鹏, 何青, 周晓阳, 等. MEF2A 基因 CAG 三联核苷酸重复序列与冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2006, **8** (10): 671-674.
- [16] McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, **27**: 40-47.
- [17] Naya FJ, Black BL, Wu H, et al. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor [J]. *Nat Med*, 2002, **8**: 303-309.
- [18] 肖尧, 何青, 戴大鹏, 等. 我国汉族人群 MEF2A 基因多态性位点的检测及其与冠状动脉粥样硬化性心脏病相关性的研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, **29** (11): 975-979.
- [19] Tam M, Erin Montgomery S, Kekis M, et al. Slipped (CTG) \cdot (CAG) repeats of the myotonic dystrophy locus: surface probing with anti-DNA antibodies [J]. *J Mol Biol*, 2003, **323** (3): 585-600.

(此文编辑 文玉珊)