

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2010)18-09-0718-04

TNFRSF1B 基因 6 号外显子 rs1061624 多态性与冠心病的相关性

任俊峰, 李俊男, 苏锐, 边云飞

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] TNFRSF1B 基因; 基因多态性; 肿瘤坏死因子; 冠心病

[摘要] 目的 研究中国人群 TNFRSF1B 基因多态性与冠心病的关系。方法 从山西医科大学第二临床医院选取 208 例冠心病患者和 104 例相匹配的对照者, 并记录所有研究对象的病史、体格检查等临床资料及其它流行病学资料, 采用聚合酶链反应和连接酶检测反应检测各组 TNFRSF1B 基因 6 号外显子 rs1061624 位点的基因型, 并统计各组的基因型频率。结果 rs1061624 的 AA 和 GG 等位基因和基因型频率在冠心病组和对照组的分布无统计学差异 (冠心病组 GG 为 33.5%, GA 为 52.8%, AA 为 13.7%; 对照组 GG 为 33.3%, GA 为 48.5%, AA 为 18.2%; $P = 0.52$)。在校正了年龄、性别、高血压病史、糖尿病史、甘油三酯和胆固醇等传统的危险因素后, 以显性遗传模式分析发现 G 等位基因频率在冠心病组与对照组之间差异无统计学意义, 冠心病组和对照组的分布相关性依然存在。结论 TNFRSF1B 基因 rs1061624 位点的等位基因 A/G 与中国人群冠心病发病不相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association of TNFRSF1B Exon 6 rs1061624 Polymorphism and Coronary Heart Disease

REN Jun-Feng, LI Jun-Nan, SU Rui, and BIAN Yun-Fei

(Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] TNFRSF1B Gene; Single Nucleotide Polymorphism; Tumor Necrosis Factor; Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between the single nucleotide polymorphism (SNP) of TNFRSF1B gene and coronary heart disease (CHD) in Chinese population. **Methods** The polymerase chain reaction-ligase detection reaction (PCR-LDR) was used to detect TNFRSF1B gene rs1061624 in the 104 controls and 208 coronary heart disease patients.

Results The frequency of this polymorphism was consistent with the law of Hardy-Weinberg.

The frequency of rs1061624 genotype did not differ between the patients and the controls (13.7% vs 18.2%, $P > 0.05$). These results were independent of age, gender, hypertension, diabetes and hyperlipidemia.

Conclusion The results support that there is no significant correlation between the polymorphism of TNFRSF1B rs1061624 and coronary heart disease.

冠心病是由于冠状动脉粥样硬化使管腔狭窄或阻塞导致心肌缺血、缺氧而引起的心脏病, 其发病过程十分复杂, 遗传基因在冠心病的发生发展中可能起重要作用。炎症反应的过度激活在动脉粥样硬化的发生发展过程中具有举足轻重的作用^[1]。近年来的研究表明, 肿瘤坏死因子 (TNF) 已逐渐成为冠心病及相关疾病的分子标志之一, 研究表明 TNFRSF1B 基因的单核苷酸多态性与冠心病及其相关疾病相关^[2]。TNFRSF1B 基因 3' 端非翻译区的

rs1061624(1663A>G)存在 A[→]G 多态性, 这些基因多态性的存在通过影响 TNF 基因转录及表达水平而与多种疾病相关。研究表明 TNFRSF1B 基因的单核苷酸多态性是导致冠心病及其相关危险因素如糖尿病、高血脂等的遗传易患因素。因此, TNFRSF1B 基因的遗传变异和冠心病发生发展的相关性值得继续深入研究, 目前国内尚未见相关报道^[3]。本研究将以此为切入点, 进行相关的研究。

1 对象和方法

1.1 研究对象

所有入选对象均签知情同意书。冠心病患者 208 例, 选自山西医科大学第二临床医院心内科住院患者, 其中男性 164 例, 女性 44 例, 年龄 57.4 ±

[收稿日期] 2010-06-28 [修回日期] 2010-09-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (20090311057-4)

[作者简介] 任俊峰, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 yangjian_young@sina.com。李俊男, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病的基础与临床。通讯作者边云飞, 博士, 硕士研究生导师, E-mail 为 ganxibaohongxi@sina.com。

10 8岁,均为汉族,彼此无亲缘关系。冠心病依据 1979年 WHO 颁布的缺血性心脏病诊断标准,并经冠状动脉造影术证实确诊(冠状动脉管腔狭窄程度 > 50% 定义为冠心病)。对照者 104 例,为按性别、年龄(不超过 5 岁)、居住地区与冠心病组相应匹配无冠心病的健康人或其它患者,均为汉族,彼此无亲缘关系。其中男性 62 例,女性 42 例,年龄 54.6 ± 10.39 岁。

1.2 调查内容

经过严格培训的工作人员对冠心病患者与对照人群进行与冠心病相关疾病的标准问卷调查,内容包括被调查者的社会学特征、饮食、吸烟和饮酒等生活习惯、神经疾病史、高血压史、糖尿病史,对意识不清或昏迷病例,由其家庭成员接受问卷调查。体格检查包括人体测量、血压测量和体格检查。人体测量包括身高和体重的测量。血压取右臂 3 次坐位血压测量值的平均值。血压升高的标准为 3 次血压测量收缩压 ≥ 140 mmHg 或舒张压 ≥ 90 mmHg 或已接受相应治疗或此前已诊断高血压。空腹血糖升高的标准为空腹血糖 ≥ 110 mg/dL (6.1 mmol/L), 或已接受相应治疗或此前已诊断 2 型糖尿病。研究对象抽血前 12 h 禁食,采集静脉血。

1.3 外周血白细胞 DNA 的制备

5 mL 外周血以 0.5 mol/L EDTA-Na₂ 抗凝后,常规盐析、酚-氯仿法提取外周血白细胞 DNA。

1.4 TNFRSF1B 基因 rs1061624 位点基因型检测

采用聚合酶链反应和连接酶检测反应 (PCR-LDR) 检测 TNFRSF1B 基因 rs1061624 位点基因型,由上海翼和应用生物技术有限公司完成。rs1061624 引物和探针设计取自 1 号染色体 (1p36.2) rs1061624 基因的 1663(A/G) 段,用 Oligo 6.0 软件设计引物。引物序列:上游 5'-GGA TGA AGC CCA GTT AAC CA-3', 下游 5'-GCC TTC CGA GAG GGA CAC-3'。探针序列见表 1。PCR 反应体系 20 μL, 基因组模板 DNA 1 μL, 引物为 0.4 μL, 反应条件: 95°C 预变性 15 min, 扩增 35 个循环 (94°C 30 s → 56°C 1.5 min → 72°C 1 min), 72°C 延伸 7 min。3% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物的片段长度为 250 bp (图 1)。LDR 反应体系 10 μL, 1 × Buffer 1 μL, 连接酶 0.05 μL, PCR 产物 > 1 μL, Probe mix 1 μL, LDR 反应条件: 95°C 预变性 2 min, 扩增 35 个循环 (94°C 30 s → 50°C 2 min)。LDR 片段长度分别为 110 bp 和 112 bp。用测序仪 (ABI PRISM 377 DNA Sequencer) 测序后, Genemapper 进行数据分析。

表 1 rs1061624 探针序列

Probe Name	DNA Sequence
TNFRSF1B_* 1663A > G_	5'-CGCTGCCTCTGCTC
VIC probe	TTGGCCTGCAG-3'
TNFRSF1B_* 1663A > G_	5'-ATGGCAGCAGAGGC
FAM probe A	TTTCCACAACCT-3'
TNFRSF1B_* 1663A > G_	5'-ATGGCAGCAGAGGC
FAM probe G	TTTCCACAACC-3'

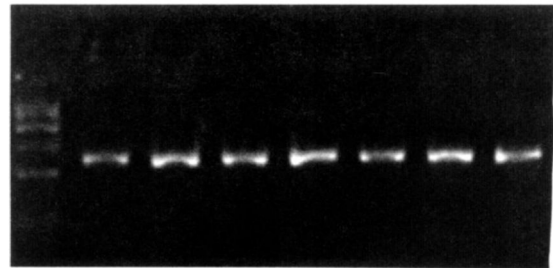


图 1 TNFRSF1B 基因 rs1061624 位点扩增产物电泳图

Marker 标准分子量由上到下分别是 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp 及 100 bp, 可见 250 bp 处有清楚的扩增产物。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 基因型和等位基因频率比较采用 χ^2 检验。用卡方拟和优度检验判断每个多态位点在冠心病组和对照组人群中是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2 结果

2.1 一般临床资料

传统的冠心病危险因素如体质指数 (BMI)、空腹血糖、血压、吸烟及饮酒在冠心病组显著高于对照组。冠心病组年龄大于对照组, 冠心病组男性患者显著高于女性患者 (表 1)。

表 1 冠心病组和对照组的临床资料

项目	对照组 (n=104)	冠心病组 (n=208)
年龄 (岁)	54.6 ± 10.4	57.4 ± 10.8 ^a
男 (例)	62 (60.8%)	164 (78.8%) ^a
女 (例)	42 (39.2%)	44 (21.2%) ^a
BMI (kg/m ²)	66.68 ± 11.40	69.70 ± 11.89 ^a
收缩压 (mmHg)	127.0 ± 17.5	128.9 ± 19.1 ^a
舒张压 (mmHg)	79.5 ± 12.5	76.9 ± 12.0 ^a
血糖 (mmol/L)	5.72 ± 3.18	7.08 ± 2.55 ^a
HDLC (mmol/L)	1.08 ± 0.61	1.01 ± 0.50
LDLC (mmol/L)	2.59 ± 0.79	2.67 ± 0.88
高血压史 (例)	34 (32.7%)	122 (58.7%) ^a
糖尿病史 (例)	7 (6.7%)	41 (19.7%) ^a
吸烟史 (例)	44 (42.3%)	116 (55.8%) ^a
饮酒史 (例)	28 (26.9%)	60 (28.8%) ^a

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

2.2 TNFRSF1B基因 rs1061624位点的基因型判断 在所调查的人群中可检出 rs1061624的 3种基

因型: A/A型、A/G型和 G/G型(图 2)。

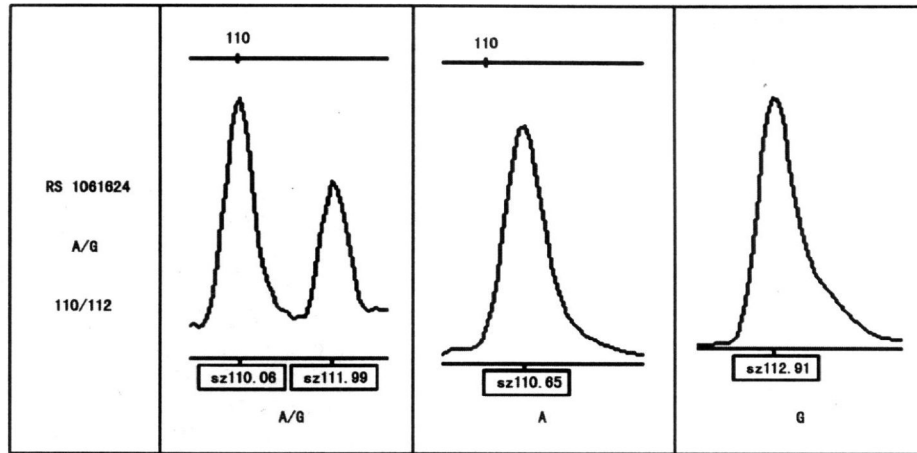


图 2 TNFRSF1B基因 rs1061624位点基因分型

2.3 TNFRSF1B基因 rs1061624位点基因型和等位 基因频率分布

研究人群分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。rs1061624位点基因型和等位基因频率在冠心病组和对照组的分布无统计学差异(表 2)。

表 2 TNFRSF1B基因 rs1061624位点基因型和等位基因频率分布

	对照组	冠心病组
基因型频率(例)		
GG	33(33.3%)	66(33.5%)
GA	48(48.5%)	104(52.8%)
AA	18(18.2%)	27(13.7%)
等位基因频率		
G	57.6%	59.9%
A	42.4%	40.5%

表中所列出的例数为实际有分型的例数。

3 讨论

冠心病的发病过程十分复杂,是环境因素和遗传因素相互作用的疾病。动脉粥样硬化是冠心病的病理基础,它是由内皮损伤、炎症反应、血管平滑肌增生以及基质改变等因素共同作用的结果。炎症反应不仅是冠心病的始动因素,而且参与了冠心病和其它不同临床背景的动脉粥样硬化疾病的所有阶段。炎症导致血管局部炎症细胞浸润,促进脂质沉积,导致动脉粥样硬化脂纹等早期病变的发生^[4]。

TNFRSF1B是在循环 T 淋巴细胞发现的主要的

TNF受体^[5,6],该基因含有 10个外显子,由大约 26 kb的基因组 DNA 构成,由 415个氨基酸编码。胞外区富含大量半胱氨酸,由 3~6个二硫键相连接结构域构成,与重要的配体结合后可以在几种不同类型细胞上表达。这种蛋白产物是由携带 TNFRSF1A 产物的杂合子基因组构成,导致抗凋亡蛋白 c-IAP1 和 c-IAP2的活化,两者具有 E3泛素连接酶活性。C-IAP1可能通过泛素化及使 TNF受体相关因子 2 退化产生抗凋亡信号增强 TNF- α 诱导的细胞凋亡^[7]。TNF是一种多功能细胞因子,可以介导多向性炎症反应和免疫调节反应,具有广泛的生物学活性^[8]。TNF-2由 TNFRSF1B 编码,分为膜型和可溶型两种,膜型表达在免疫细胞表面,可溶型则存在于血浆中。Szalai等^[9]研究发现 TNFRSF1B 基因 6号外显子的 196位点存在 T \rightarrow G 碱基突变,基因产物多态链中的一个甲硫氨酸被精氨酸取代。但是否存在等位基因 A/G 以及 A/G 是否与冠心病的发生发展相关,未见文献报道。

近年来,越来越多的证据表明炎症因子存在基因多态性,而且,这些炎症因子基因多态性可以通过影响自身及其它细胞因子的表达水平及生物学活性导致某些疾病的发生发展。Benjafeld等^[10]研究发现 TNFR2基因第 4外显子上的 CA16等位基因与冠心病有显著的关联,冠心病组 CA16等位基因频率为 33.3%,对照组为 21%。Sankar等^[11]研究发现 TNFR2基因第 6号外显子的 196位点的基因多态性与冠心病的发生相关。而 Matsukura等^[12]报道 rs1061624位点与日本人群中炎症性肠病具有相关

性。Tabassum 等^[5]研究发现 TNFRSF1B 基因与 2 型糖尿病并没有明显的相关作用。TNFR2 的编码基因 TNFRSF1B 定位于 1p36.2 基因敲除研究表明,与 TNFRSF1B^{+/+}且载脂蛋白 A^{-/-}的小鼠相比, TNFRSF1B^{-/-}且载脂蛋白 A^{-/-}的小鼠主动脉根部动脉粥样硬化斑块病变明显减小^[13]。

本研究在中国北方人群中检测了 TNFRSF1B 基因 rs1061624 位点基因型在冠心病中的分布情况。发现冠心病危险因素 BMI、空腹血糖、血压、吸烟及饮酒在冠心病组显著高于对照组,冠心病组年龄大于对照组,冠心病组男性患者显著高于女性患者。TNFRSF1B 基因 rs1061624 位点 A/G 多态性与冠心病的发病不相关,以显性遗传模式分析发现 G 等位基因频率在冠心病组与对照组之间差异无统计学意义, G 等位基因既不是中国人冠心病发病的保护因素,也不是其独立危险因素。主要原因考虑: ①两位点多态性分布在不同种族存在遗传差异; ②本研究的病例均来自于临床诊治机构,未能全面反应该位点在人群中的分布状况; ③本研究样本量有待进一步扩大。

总之,本研究首次在中国人群中研究了 TNFRSF1B 基因的遗传变异与冠心病的关系,对进一步研究冠心病的发生发展机制提供了有益的指导。

[参考文献]

- [1] Hirose M, Kawashina H, Miyasaka M. A functional epitope on P-selectin that supports binding of P-selectin to P-selectin glycoprotein ligand-1 but not

- to sialyl Lewis X oligosaccharides [J]. *Int Immunol* 1998; **10**: 639-651.
- [2] Das UN. Can endogenous lipid molecules serve as predictors and prognostic markers of coronary heart disease [J]? *Lipids Health Dis* 2008; **20**: 7-19.
- [3] 李锐, 邱健, 赵树进, 等. 细胞色素氧化酶 P450 2C9 基因多态性与冠心病及血脂水平的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (5): 395-398.
- [4] Camey RM, Freedland KE, Stein PK. Heart rate variability and markers of inflammation and coagulation in depressed patients with coronary heart disease [J]. *J Psychosom Res* 2007; **62** (4): 3-7.
- [5] Tabassum R, Chavali S, Mahajan A. Association analysis of TNFRSF1B polymorphisms with type 2 diabetes and its related traits in North India [J]. *Genetic Med* 2008; **2** (3-4): 93-100.
- [6] Keso T, Perola M, Laippala P, et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men [J]. *Atherosclerosis* 2001; **154**: 691-697.
- [7] Ferguson LR, Han DY, Huebner C, et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B haplotypes increase or decrease the risk of inflammatory bowel diseases in a New Zealand caucasian population [J]. *Gastroenterol Res Pract* 2009; Epub.
- [8] Van H in-bergh VWM, Koboatra J, Van den berg EA, et al. Tumor necrosis factor increase the production of activator inhibitor in human endothelial cell in vitro and in rate in vivo [J]. *J Blood* 1998; **72**: 1476-480.
- [9] Szalai C, Duba F. Association of polymorphisms and allelic combinations in the tumor necrosis factor a complement MHC region with coronary artery disease [J]. *J Mol Genet* 2002; **39**: 46-51.
- [10] Benjafield AV, Wang XI, Morris BJ. Tumor necrosis factor receptor 2 gene (TNFRSF1B) in genetic basis of coronary artery disease [J]. *J Mol Med* 2001; **79**: 109-115.
- [11] Sankar VH, G irisha KM, G ilmour A, et al. TNFR2 gene polymorphism in coronary disease [J]. *Original article* 2005; **59**: 104-108.
- [12] Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N. Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor receptor superfamily 1A and 1B affect responses to infliximab in Japanese patients with Crohn's disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; **27** (9): 765-770.
- [13] Chandrasekharan UM, Mavrikis L, Bonfield TL, et al. Decreased atherosclerosis in mice deficient in tumor necrosis factor- α receptor-II (p75) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: e16-17.

(此文编辑 文玉珊)