

# 血红素氧化酶 1 启动子区功能性多态位点与冠心病易感性的关联

麦瑞琴<sup>1</sup>, 张国红<sup>2</sup>, 陈宋明<sup>3</sup>

(汕头大学医学院 1. 第一附属医院检验科; 2. 病理教研室; 3. 第一附属医院心血管内科, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 冠心病; 血红素氧化酶 1; 多态性; 易感性

[摘要] **目的** 血红素氧化酶 1 (HO-1) 是诱导型血红素代谢限速酶, 具有抗氧化与抗炎作用。该基因启动子区 (GT)<sub>n</sub> 重复序列与单核苷酸多态性 (SNP) 影响 HO-1 蛋白的表达。本研究探讨 HO-1 启动子区联合 STR-SNP 多态性与冠心病易感性间的关联。**方法** 毛细管电泳与 Sanger 测序分析 171 例冠心病及 70 例对照个体 HO-1 基因启动子区 (GT)<sub>n</sub> 重复序列与 SNP 分型。分类树模型预测多态性对冠心病患者与对照者的辨析能力, 多因素 Logistic 回归分析多态性与冠心病易感性的关联, 多因素降维法分析多态性与危险因素间的交互作用。**结果** STR、SNP 标记分类树模型对冠心病患者、对照个体的正确分类比例为 71.0% ( $P < 0.001$ )。STR-SNP 单体型是冠心病独立危险因素 (OR: 1.890, 95% CI: 1.162 ~ 3.076,  $P = 0.010$ ), 与吸烟存在交互作用 ( $P = 0.008$ )。STR-SNP 与吸烟交互作用明显增加冠心病患病风险 (OR: 6.994, 95% CI: 3.428 ~ 14.272,  $P = 0.001$ )。**结论** HO-1 基因启动子区功能性 STR、SNP 可作为冠心病易感风险评估的分子标记。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Association of Functional Polymorphisms in Heme Oxygenase-1 Gene Promoter and Susceptibility of Coronary Artery Disease: Evidence from Classification Tree

MAI Rui-Qin<sup>1</sup>, ZHANG Guo-Hong<sup>2</sup>, and CHEN Song-Ming<sup>3</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital; 2. Department of Pathology; 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Heme Oxygenase-1; Polymorphism; Susceptibility

[ABSTRACT] **Aim** Heme oxygenase 1 (HO-1) is a rate-limiting enzyme in the degradation of heme and has potent anti-oxidant and anti-injury effects. The HO-1 gene promoter has different (GT)<sub>n</sub> repeats (STR) and single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with its expression. In this study, we aimed to assess the association between combination of STR and SNP in the HO-1 gene promoter and the susceptibility for coronary heart disease. **Methods** 171 patients with coronary heart disease and 70 control subjects with sex and age matching were collected; Capillary electrophoresis and Sanger sequencing were used for genotyping. Classification tree was performed to distinguish patients from controls. Multiple factors regression was employed to detect the association between genotyping and disease susceptibility, and multifactor dimensionality reduction method was used to identify best factor interacting with STR-SNP haplotype.

**Results** The classification tree distinguished patients with coronary heart disease from controls with 71% of correct prediction ( $P < 0.001$ ). STR-SNP haplotype was an independent risk factor for coronary heart disease (OR: 1.890, 95% CI: 1.162 ~ 3.076,  $P = 0.010$ ), and interacted with smoking to increase risk (OR: 6.994, 95% CI: 3.428 ~ 14.272,  $P = 0.001$ ). **Conclusion** STR and SNP functional polymorphisms in HO-1 promoter could be a marker for screening susceptibility individual of coronary artery disease.

[收稿日期] 2013-09-11

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(07008215)

[作者简介] 麦瑞琴, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为复杂性疾病的研究。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发病基础及临床研究, E-mail 为 csm1002@126.com。张国红, 博士, 副教授, 主要研究方向为复杂性疾病易感性研究。

血红素氧化酶 1 (heme oxygenase, HO-1) 属诱导型内源性抗氧化应激蛋白, 是血红素降解为胆红素、CO 和铁的限速酶之一, 具有抗氧化应激、抗炎反应、抗凋亡和促血管舒张作用, 被认为是一种血管保护因子<sup>[1,2]</sup>。动物模型显示, 低氧预处理和低氧后处理对大鼠心肌细胞的保护作用部分是通过 HO-1 水平增加来实现<sup>[3]</sup>。HO-1 基因启动子存在功能性 (GT)<sub>n</sub> 重复序列与 -413 单核苷酸多态性 (SNP) rs2071746<sup>[4,5]</sup>。(GT)<sub>n</sub> 重复次数 < 25, 转录活性高, 重复次数 > 25, 则相反, 从而影响 HO-1 的抗氧化应激能力。我们先前研究发现 HO-1 蛋白表达水平在冠心病患者与正常对照个体间差异显著, 且 HO-1 蛋白水平差异与冠状动脉病变严重程度也相关<sup>[6]</sup>, 进一步对 HO-1 启动子区 (GT)<sub>n</sub> 重复序列多态性 (STR) 研究发现, 单一 HO-1 基因 (GT)<sub>n</sub> 重复序列多态性在冠心病与对照组中频率分布差异无显著性<sup>[7]</sup>。并且, -413 位点多态性研究发现, 仅血脂异常个体携带 TT 基因型的冠心病患病风险明显减少<sup>[8]</sup>。本研究拟探讨 HO-1 启动子区 STR、SNP 双多态性与冠心病易感性间的关联。

## 1 对象与方法

### 1.1 病例与血样收集

以 2007 年 9 月至 2008 年 12 月期间, 在汕头大学医学院第一附属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。冠心病组入选标准: 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  $\geq 50\%$ 。对照组为造影未发现冠状动脉明显病变。详细记录病例及对照个体性别、年龄、冠心病家族史和糖尿病、高血压、高脂血症病史及吸烟史, 取研究对象外周抗凝血 5 mL。共收集冠心病个体 171 例, 以及年龄与病例相仿的对照个体 70 例。

### 1.2 基因分型

采用 QIAGEN 试剂盒提取基因组 DNA, Primer 5.0 软件设计扩增启动子区引物; STR 扩增正向为 5'-TCCCAGCTTTCTGGAACCTT-3', STR 扩增反向为 5'-ACAGCTGATGCCCCACTTTCT-3'; SNP 扩增正向为 5'-GGATTCCAGCAGGTGACATT-3', SNP 扩增反向为 5'-ACAGCTGATGCCCCACTTTCT-3'; SNP 单向测序引物为 5'-CACACAAAACCTTTAAGGAAA-3'。FAM 荧光标记 STR 引物, 5  $\mu$ L 体系进行 PCR 反应, 产物纯化后 ABI 3730XL 行毛细管电泳; GeneMapper

软件基因分型, GT 重复次数  $\leq 25$ , 为 S 等位基因, GT 重复次数 > 25, 为 L 等位基因, 分别构成 SS、SL、LL 三种基因型。SNP 扩增 PCR 产物纯化后 ABI 3730XL 单向测序; Phred/Phrap 软件比对与 SNP 基因分型, BioEdit 获取测序峰型。

### 1.3 统计分析

采用 SPSS16.0 软件包进行数据处理。计量资料比较采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析, 计数资料比较用  $\chi^2$  检验。分类树模型拆分与合并显著性水准设置为 0.05, 采用 CRT 运算法 (classification & regression test)。多态性与冠心病风险之间的相关性 OR 值及其 95% 可信区间 (95% CI) 以非条件 Logistics 回归模型分析, 且校正冠心病家族史 (有 -2, 无 -1)、糖尿病 (是 -2, 否 -1)、高血压 (是 -2, 否 -1)、高脂血症病史 (是 -2, 否 -1) 和吸烟 (有 -2, 无 -1) 等危险因素。多因素降维法分析危险因素间的交互作用。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

冠心病患者中, 男性 135 例, 女性 36 例; 对照组中男性 38 例, 女性 32 例。冠心病组平均年龄  $60.98 \pm 11.67$  岁, 对照组平均年龄  $63.19 \pm 11.85$  岁, 两组性别构成及年龄差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。冠心病组与对照组吸烟、高脂血症、高血压、糖尿病等危险因素差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

表 1. 冠心病组与对照组危险因素情况比较

Table 1. Comparison of risk factors between coronary heart disease group and control group

危险因素	对照组 ( $n=70$ )	冠心病组 ( $n=171$ )	<i>P</i>
吸烟	22 (31.4%)	106 (62.0%)	0.0001
高脂血症	9 (12.9%)	50 (29.2%)	0.007
高血压	30 (42.9%)	104 (60.8%)	0.009
糖尿病	7 (10.0%)	37 (21.6%)	0.034
家族史	1 (1.4%)	15 (8.8%)	0.038

### 2.2 多态性

在本研究人群中, (GT)<sub>n</sub> 重复次数从 16 到 39 次不等, 呈现明显的多态性。测序结果显示 -413 存在 AA、AT 与 TT 基因型, 该位点在本研究群体中也呈现多态性, 等位基因 A、T 频率为 0.562 与 0.438, AT 杂合基因型频率为 0.668 (图 1)。

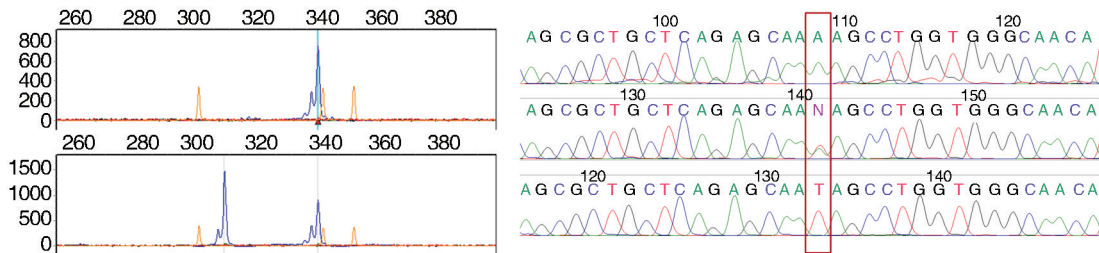


图 1. STR(左)与 SNP(右)分型结果

Figure 1. The results of STR and SNP genotyping

2.3 STR-SNP 是冠心病的独立危险因素

分类树结果显示分类树结构共分 3 层, 每层结构  $P$  值均小于 0.05, 提示在每层结构, 冠心病患者与对照组均能有效的被分开。综合 3 层结构, 总体正确分类比例为 71.0%。树形结构中, 第一层是 SNP, 提示 SNP 分类能力可能优于 STR 标记。SNP AA 基因型、STR LL 基因型与 AT/TT、SL/SS 基因型分开显著(图 2)。

多因素 Logistic 回归分析结果显示, 在校正高血压、高血脂、吸烟等混杂因素的影响后, STR-SNP 单体型(OR: 1.890, 95% CI: 1.162 ~ 3.076,  $P = 0.010$ ) 为冠心病危险因素之一(表 2)。

表 2. 多因素 Logistic 回归分析结果

Table 2. Results of Logistic regression

危险因素	OR	95% CI	P
高脂血症	2.830	1.118 ~ 7.163	0.028
高血压	1.821	0.887 ~ 3.738	0.102
糖尿病	1.077	0.397 ~ 2.925	0.884
家族史	11.615	1.218 ~ 110.739	0.033
吸烟	3.760	1.815 ~ 7.789	0.0003
STR-SNP 单体型	1.890	1.162 ~ 3.076	0.010

2.4 STR-SNP 与吸烟交互作用

多因素降维法分析结果(图 3)发现, STR-SNP 在分类结构中最为紧密, 一致性分析提示二者存在交互作用( $P = 0.003$ ) 提示非偶然事件。STR-SNP 与吸烟一致性分析提示二者存在交互作用( $P = 0.008$ ), 且 STR-SNP L-A 单体型结合吸烟与 S-T 单体型未吸烟个体相比, 其发病风险增加 7 倍(OR: 6.994, 95% CI: 3.428 ~ 14.272,  $P = 0.001$ )。

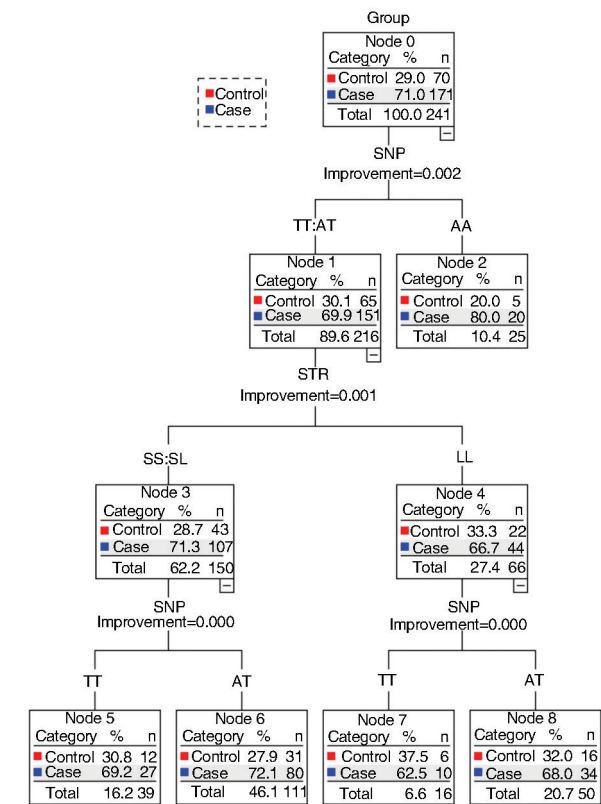


图 2. STR-SNP 分类树结构图

Figure 2. Classification tree for STR-SNP

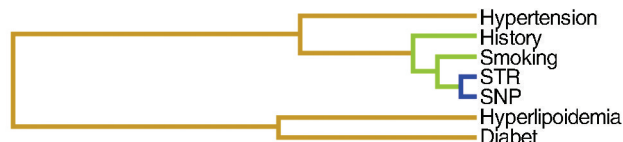


图 3. 多因素降维法交互作用分析结果图

Figure 3. Structure of interaction among risk factors

3 讨论

冠心病是一类由遗传、环境因素及其之间的相互作用引起的复杂疾病, 具有一定的家庭聚集性和遗传倾向。基因组中多个易感位点的“微效作用”累积是致其发病的内因, 而不良环境、饮食则是致其发生的外在因素。本研究前期研究单个 STR 和 SNP 位点与冠心病易感性关联的基础上, 利用分类树策略寻找 STR 与 SNP 联合“微效作用”与冠心病易感性的关联, 以及与环境危险因素的交互作用及

其对冠心病易感性的作用。

分类树分析是一种非参数回归模型,以树形图的方式展现其分析过程以及多水平变量间复杂的相互作用关系,目前在心血管疾病与基因单核苷酸多态性关联研究中运用广泛<sup>[9]</sup>。本研究分类树模型结果发现,联合 STR、SNP 多态性不但提高了 HO-1 基因启动子区多态性与冠心病易感性间关联的解析能力,而且能有效的将冠心病患者与对照个体分析,准确率可到 71.0%。分类树结构还显示 SNP AA 基因型、STR LL 基因型与 AT/TT、SL/SS 基因型分开显著,提示 AA、LL 基因型为冠心病易感性首要基因型。本研究结果与日本人群 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结果一致<sup>[10]</sup>。

在校正高血压、高血脂、吸烟等混杂因素影响后,多因素 Logistic 回归结果发现 STR-SNP 单体型为冠心病的独立危险因素。此结果与日本人群 HO-1 多态性与冠心病关联结果相似<sup>[11]</sup>,同时又充分考虑多位点及其相互影响与冠心病间的关联,更复合复杂性疾病的特点,更为合理。

另外,冠心病属复杂性疾病,其发生、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的主要危险因素包括年龄、性别、家族史等不可以改变的危险因素,和高血压、高胆固醇血症、糖尿病和吸烟等可以改变的危险因素。多因素降维法通过列举多个因素之间所有可能的组合情况,将研究中涉及的多个相关因素看成是一个多因子组合,通过交叉验证,筛选出最佳组合及其因子<sup>[12]</sup>。本研究利用多因素降维法分析,发现 STR-SNP 单体型与吸烟交互作用明显,交互作用增加个体罹患冠心病风险(OR:6.994,95% CI 3.428 ~ 14.272,  $P = 0.001$ )。因此,HO-1 基因多态性联合检测是吸烟人群冠心病风险评估的可靠标记,甚至是治疗的一个靶点标记<sup>[13]</sup>。

综上所述,HO-1 基因启动子区存在 STR 与 SNP 这两种功能性多态性能调控 HO-1 基因的转录活性与表达。联合检测 STR、SNP 基因型,特别是吸烟的个体,可能是有效筛选冠心病易感个体的遗传标记。

#### [参考文献]

[1] Wang CY, Chau LY. Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives

[J]. *Chang Gung Med J*, 2010, 33(1): 13-24.

- [2] 秦静静,张蕴莉. E-选择素 Leu554Phe 基因多态性与冠心病的相关性研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(18): 41-44.
- [3] 赵雅琳,姚宇. 大鼠心肌细胞低氧预处理与低氧后处理血红素氧化酶-1 水平的比较[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(13): 33-35.
- [4] Exner M, Minar E, Wagner O, et al. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(8): 1097-104.
- [5] Tanaka G, Aminuddin F, Akhbar L, et al. Effect of heme oxygenase-1 polymorphisms on lung function and gene expression[J]. *BMC Med Genet*, 2011, 12: 117.
- [6] 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.
- [7] 张国红,麦瑞琴,陈宋明. 血红素氧合酶 1 基因启动子区(GT)<sub>n</sub> 重复序列多态性与广东潮汕人群冠心病易感性的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(10): 807-809.
- [8] 张国红,陈宋明,王东明,等. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(1): 63-66.
- [9] Yao L, Zhong W, Zhang Z, et al. Classification tree for detection of single-nucleotide polymorphism (SNP)-by-SNP interactions related to heart disease: Framingham Heart Study[J]. *BMC Proc*, 2009, 3(Suppl 7): S83.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Moore JH, Williams SM. New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension[J]. *Ann Med*, 2002, 34(2): 88-95.
- [13] Kim YM, Pae HO, Park JE, et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(1): 137-167.

(此文编辑 许雪梅)