

内皮型一氧化氮合酶基因 4A4B 插入多态性与冠心病的相关性

朱娜¹, 胡金飞²

(金华市中心医院 1. 心血管内科, 2. 放疗科, 浙江省金华市 321037)

[关键词] 内皮型一氧化氮合酶; 冠心病; 基因多态性

[摘要] **目的** 探讨内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因 4A4B 多态性位点与冠心病的相关性。**方法** 采用 PCR 和凝胶电泳技术检测 842 例冠心病患者和 842 例性别和年龄匹配的健康对照者 eNOS 基因 4A4B 位点基因型, 并分析其与冠心病的关系。**结果** 冠心病组吸烟、糖尿病、高血压、肥胖以及血脂代谢异常患者比例明显高于对照组; 对照组 4A4B 位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律; 此位点 4A 等位基因(10.2% 比 6.9%, OR = 2.03, 95% CI = 1.39 ~ 2.44)、AA 基因型(3.0% 比 0.9%, $P = 0.001$, OR = 2.08, 95% CI = 1.45 ~ 2.67)和 AA + AB 基因型(17.4% 比 13.1%, $P = 0.045$, OR = 1.58, 95% CI = 1.08 ~ 1.94)与冠心病显著相关。分层分析结果显示, AA 基因型和 4A 等位基因在吸烟、糖尿病、高血压和肥胖等各分层亚组和饮酒亚组人群中与冠心病呈明显的相关性, 而且糖尿病、高血压和肥胖亚组人群中 AA 基因型和 4A 等位基因携带者的冠心病发病风险分别是 BB 基因型和 4B 等位基因携带者发病风险的 2.34、2.59、3.13 倍和 2.55、2.77 和 3.10 倍。**结论** eNOS 基因 4A4B 位点参与冠心病的发病过程, 4A 等位基因和 AA、AA + AB 基因型可能是冠心病的遗传易感因子, 上述遗传因子可与吸烟、饮酒、糖尿病、高血压和肥胖等因素相互作用, 进一步提高冠心病的发病风险。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association Between 4A4B Insert/Deletion Polymorphism of eNOS and Susceptibility to Coronary Heart Disease

ZHU Na¹, and HU Jin-Fei²

(1. Cardiovascular Department of Jinhua Central Hospital, 2. Radiotherapy Department of Jinhua Central Hospital, Jinhua, Zhejiang 321037, China)

[KEY WORDS] Endothelial Nitric Oxide Synthase; Coronary Heart Disease; Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To explore the association between 4A4B insert/deletion polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and coronary heart disease. **Methods** Genotypes of 4A4B locus were detected in 842 coronary heart disease patients and 842 age and gender matched healthy individuals using polymerase chain reaction and Gel electrophoresis and the association between them was analyzed. **Results** The frequency distributions of patients with smoking, diabetes, hypertension, obesity and lipid metabolic abnormality were significantly higher than those in controls. Genotype distributions in controls were in consistence with Hardy-Weinberg inheritance model. Allele 4A (10.2% vs. 6.9%, OR = 2.03, 95% CI = 1.39 ~ 2.44), genotype AA (3.0% vs. 0.9%, OR = 2.08, 95% CI = 1.45 ~ 2.67) and AA + AB (17.4% vs. 13.1%, OR = 1.58, 95% CI = 1.08 ~ 1.94) of the locus were significantly associated with coronary heart disease. Stratifying analysis results showed that genotype AA and 4A allele were significantly associated with the disease in each subgroup excluding non-drinking subgroup, respectively, and the disease risk of individuals carrying AA genotype and 4A allele were 2.34, 2.59, 3.13 fold and 2.55, 2.77, 3.10 fold than those with BB genotype or 4B allele in diabetes, hypertension, and fact subgroups, respectively. **Conclusions** 4A allele and AA, AA + AB genotypes of 4A4B locus within eNOS gene might be genetic susceptible factors for coronary heart disease, and these genetic factor of the locus could interact with status of smoking, drinking, diabetes, hypertension and fat to further increase susceptibility to the disease.

冠心病是一类严重危害人类身体健康的最主要心脑血管疾病^[1-2]。吸烟、饮酒、高血压、糖尿病和肥

胖等都属于此病的主要危险因素^[3]。大量研究证实,与血脂代谢、血压、肥胖和氧化应激相关基因的遗传变异在冠心病的发生过程中发挥重要作用^[4,6]。其中由血管内皮细胞合成释放的一氧化氮信号分子不仅可清除血管内超氧化物抑制氧化应激产生,而且在抗动脉粥样硬化、抑制血栓形成、维持血管功能中发挥重要作用^[7]。此分子是由内皮细胞合成释放的内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)催化 L-精氨酸产生,eNOS 基因的遗传变异可以影响其产物的合成与分泌,影响血管内一氧化氮含量的稳态,最终导致血管功能的改变和粥样硬化斑块的形成^[8]。因此,我们推断 eNOS 基因单核苷酸多态性可能是冠心病的潜在风险因子。为探讨 eNOS 基因 4A4B 多态性位点与冠心病的关系,本研究利用 PCR 和琼脂糖凝胶电泳技术检测 842 例冠心病患者和 842 例健康对照者 4A4B 位点的基因型频率分布,为探讨其与冠心病的相关性、冠心病危险人群的筛选和防治提供实验依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

收集 2012 年 1 月至 2014 年 6 月在金华市中心医院心血管内科就诊的 842 例冠心病确诊患者和 842 例同期在本院体检且年龄、性别相互匹配的健康对照者的肝素抗凝外周血(冠心病组和对照组纳入人数按 1:1 匹配,两组纳入人群的性别和年龄也是一一对应)。冠心病组是依据《临床冠心病诊断与治疗标准》进行筛选的冠心病患者,所有纳入患者都属于冠状动脉造影阳性患者(至少存在一支冠状动脉直径狭窄 $\geq 50\%$)^[9];对照者属于同期健康体检中已排除高血压、糖尿病和其他脑血管病、无胸痛、无心肌梗死病史、心电图正常的健康人群。

1.2 DNA 提取与 PCR 检测

采用人外周血 DNA 提取试剂盒(北京天根公司)提取 200 μL 肝素抗凝外周血全基因组 DNA,并用 Bio-Rad 紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度和纯度, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 区间内的样本为合格样本,-20℃ 保存备用。依据文献^[10],由上海吉玛公司合成 eNOS 基因 4A4B 位点的上下游引物,上游引物为 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCT-3',下游引物为 5'-TCTCTTAGTGCCTGTGGTCAC-3'。PCR 扩增体系总体积为 25 μL ,其中基因组 DNA 模板 100 ng,dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$,上下游引物各 10 pmol,10 \times PCR buffer

2.5 μL ,1.5 mmol/L MgCl_2 和 1 U Taq 酶(大连宝生物公司)。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s 和 72℃ 延伸 30 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。此位点的扩增产物采用 3% 琼脂糖凝胶电泳(100V,30 min)进行基因分型,电泳结束后放置紫外分光台上观察结果,其中 AA 基因型为 393 bp 条带,BB 基因型为 420 bp 条带,而共同存在 393 bp 和 420 bp 条带则为 AB 基因型。

1.3 统计学分析

计算冠心病组和对照组 eNOS 基因 4A4B 位点基因型和等位基因频率,Hardy-Weinberg 遗传平衡定律用于分析抽样基因型的群体代表性, $P>0.05$ 被认为样本具有群体代表性。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用独立样本 t 检验。两组间基因型或等位基因的频率比较采用 χ^2 检验,二元非条件 Logistic 回归分析计算其优势比(odds ratio,OR)和 95% 可信区间(confidential interval,CI), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 纳入人群的基本特征

本研究共纳入 842 例冠心病患者和 842 例性别和年龄相匹配的健康对照者,其中男性占 51.3%,女性占 48.7%,年龄为 62.0 ± 9.2 岁,其中冠心病组吸烟、糖尿病、高血压和肥胖比例显著高于对照组,冠心病组血浆甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平也显著高于对照组(表 1)。

表 1. 纳入人群的基本特征

Table 1. Baseline characteristics of included cases and controls

项 目	冠心病组($n=842$)	对照组($n=842$)	P 值
男性(例)	432	432	>0.05
年龄(岁)	62.0 ± 9.2	62.0 ± 9.2	>0.05
吸烟(例)	341	223	<0.001
饮酒(例)	332	311	0.292
糖尿病(例)	187	67	<0.001
高血压(例)	248	100	<0.001
肥胖(例)	150	87	<0.001
甘油三酯(mmol/L)	2.04 ± 1.23	1.58 ± 0.84	0.021
总胆固醇(mmol/L)	7.71 ± 0.64	5.52 ± 0.48	0.034
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.42 ± 0.21	1.39 ± 0.51	0.21
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	3.76 ± 0.23	2.79 ± 0.47	<0.001

2.2 eNOS 基因 4A4B 位点基因型、等位基因频率分布

冠心病组 AA 基因型 25 例,AB 基因型 121 例,

BB 基因型 696 例;对照组 AA 基因型 7 例,AB 基因型 103 例,BB 基因型 732 例。对照组基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律($P=0.117$)。4A 等位基因、AA 基因型和 AA + AB 基因型与冠心病明显相关,但 AB 基因型在两组中的频率分布无显著差

表 2. eNOS 基因 4A4B 位点基因型和等位基因频率分布

Table 2. Genotype and allele frequency distributio~~s~~ns of 4A4B locus within eNOS gene

4A4B 位点		对照组	冠心病组	P 值	OR(95% CI)	校正 OR(95% CI)
基因型	BB	732(86.9%)	696(82.6%)		1	1
	AB	103(12.2%)	121(14.4%)	0.142	0.87(0.67~1.34)	0.91(0.71~1.56)
	AA	7(0.9%)	25(3.0%)	0.001	2.10(1.58~2.43)	2.08(1.45~2.67)
	AB + AA	110(13.1%)	138(17.4%)	0.045	1.46(1.12~1.87)	1.58(1.08~1.94)
等位基因	4B	1567(93.1%)	1513(89.8%)		1	1
	4A	117(6.9%)	171(10.2%)	0.001	1.98(1.32~2.35)	2.03(1.39~2.44)

2.3 eNOS 基因 4A4B 位点与冠心病发病风险的分层分析

将两组人群按照吸烟、饮酒、糖尿病、高血压和肥胖等相关危险因素进行分层分析,结果显示,AA 基因型和 4A 等位基因在吸烟、糖尿病、高血压和肥胖等各

表 3. eNOS 基因 4A4B 位点与冠心病发病风险的分层分析

Table 3. Stratifying analysis between 4A4B locus of eNOS gene and risk of coronary heart disease

指标		例数	校正 OR(95% CI)				
			BB 基因型	AB 基因型	AA 基因型	4B 等位基因	4A 等位基因
吸烟	是	564	1	0.98(0.76~1.45)	1.98(1.54~2.39)	1	1.88(1.44~2.21)
	否	1120	1	0.71(0.67~1.32)	1.56(1.08~1.87)	1	1.66(1.21~1.95)
饮酒	是	643	1	1.04(0.82~1.54)	1.55(1.01~1.76)	1	1.59(1.21~1.88)
	否	1041	1	0.82(0.77~1.09)	1.34(0.88~1.63)	1	1.44(0.98~1.76)
糖尿病	是	254	1	1.54(0.98~1.76)	2.34(1.88~2.65)	1	2.55(1.78~2.98)
	否	1430	1	1.03(0.66~1.34)	1.35(1.05~1.65)	1	1.56(1.21~1.88)
高血压	是	348	1	1.44(0.93~1.57)	2.59(1.78~3.04)	1	2.77(1.89~3.10)
	否	1336	1	1.39(0.76~1.55)	1.55(1.23~1.79)	1	1.58(1.32~1.88)
肥胖	是	237	1	1.66(0.97~1.88)	3.13(2.36~4.09)	1	3.10(2.59~3.41)
	否	1443	1	1.12(0.88~1.45)	1.49(1.23~1.67)	1	1.51(1.21~1.72)

3 讨 论

全球心血管疾病的发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[1]。据世界卫生组织估计,2020 年我国心血管疾病的死亡人将达到全国总死亡人数的 50%,到 2030 年冠心病将跃居成为全球严重危害人类健康的首位疾病^[2]。冠心病是由遗传和环境因素共同作用所致的复杂疾病,此病相关基因的遗传变异在发病过程中发挥单一作用或联合作用,还可与环境因素共同作用增加其发病风险^[11-13]。eNOS 基因位于人类 7q35-36 区,包含 26 个外显子和 25 个内含子,全长为 21~22 kb 的单拷贝基因。此基因可以

异。当校正了性别、年龄、吸烟、饮酒、糖尿病、高血压、肥胖和血脂四项指标后,AA 和 AA + AB 基因型携带者的冠心病发病风险分别是 BB 基因型携带者的 2.08 倍和 1.58 倍,而 A 等位基因携带者的冠心病发病风险是 B 等位基因携带者的 2.03 倍(表 2)。

分层亚组和饮酒亚组人群中与冠心病呈明显的相关性,而且糖尿病、高血压和肥胖亚组人群中 AA 基因型和 4A 等位基因携带者的冠心病发病风险分别是 BB 基因型和 4B 等位基因携带者发病风险的 2.34、2.59、3.13 倍和 2.55、2.77 和 3.10 倍(表 3)。

翻译合成含有 1203 个氨基酸的 eNOS,此酶主要在血管内皮细胞、肾小管上皮细胞中表达,是血管内维持一氧化氮信号分子稳态的关键酶。有研究报告 eNOS 基因的第 4 个内含子的 4A4B 位点与个体内血清一氧化氮合酶活性水平相关^[14]。因此,我们推测此位点可能与冠心病相关。

本研究中,我们对 842 例冠心病患者和 842 例健康对照人群的基本特征进行了分析比较,结果发现,冠心病患者中吸烟、糖尿病、高血压和肥胖以及血脂代谢异常比例明显高于对照组,提示吸烟、糖尿病、高血压、肥胖和血脂代谢异常可能是冠心病发病的危险因素。通过比较分析 eNOS 基因 4A4B

位点基因型和等位基因在两组中的频率分布发现,此位点 4A 等位基因与冠心病明显相关,提示 4A 等位基因、AA 基因型和 AA + AB 基因型可提高此病的发病风险。多因素回归分析表明此位点 4A 等位基因、AA 基因型和 AA + AB 基因型与冠心病相关,提示其可能是此病的遗传发病风险因子。进一步通过相关环境因素进行分层分析发现,AA 基因型和 4A 等位基因在吸烟、糖尿病、高血压和肥胖等各分层亚组和饮酒亚组人群中与冠心病呈明显的相关性,而且糖尿病、高血压和肥胖亚组人群中 AA 基因型和 4A 等位基因携带者的冠心病发病风险分别是 BB 基因型和 4B 等位基因携带者发病风险的 2.34、2.59、3.13 倍和 2.55、2.77 和 3.10 倍,说明此位点可与糖尿病、高血压和肥胖等环境因素相互交互作用,提示患有糖尿病、高血压和肥胖等慢性疾病的 AA 基因型或 4A 等位基因携带者可明显提高冠心病的发病风险。本研究结果与崔勤涛等^[15]和贺颖等^[16]报道结果一致。此位点是一个插入/缺失多态性位点,包括 AA、AB 和 BB 基因型,其中 AA 基因型为第 4 个内含子的 27 bp 的 4 次重复、BB 基因型为 27 bp 的 5 次重复、AB 基因型则共同存在 4 次和 5 次重复状态。研究显示 4A 等位基因携带者一氧化氮血浆浓度明显低于 4B 等位基因携带者^[17]。Thomas 等^[18]研究发现携带 BB、AB 和 AA 基因型个体呼出的一氧化氮浓度依次降低,其中 AA 基因型者呼出一氧化氮水平显著低于 BB 基因型者,说明此位点可能影响内皮细胞 eNOS 水平和细胞内一氧化氮合成效率。同时研究显示 4A4B 位点 27 bp 重复区域属于 eNOS 基因上的顺式作用原件,其可结合核蛋白因子调控此基因的转录效率,4A 等位基因、AA 和 AA + AB 基因型影响其与核蛋白转录因子结合,最终导致一氧化氮合酶基因的转录效率,抑制体内一氧化氮的产生^[18]。而低浓度的一氧化氮影响血管舒张,调节血流、清除超氧化物、还可促进血小板黏附、白细胞趋化作用和抑制低密度脂蛋白胆固醇氧化等过程,促进冠状动脉粥样硬化和血栓形成^[7],最终引发冠心病。

本研究结果表明 eNOS 基因 4A4B 位点的 4A 等位基因、AA 和 AA + AB 基因型与冠心病显著相关,此位点可与吸烟、饮酒、糖尿病、高血压和肥胖等因素发生交互作用,进一步提高冠心病的发病风险。上述结果提示 eNOS 基因 4A4B 位点参与冠心病的发病过程,4A 等位基因和 AA、AA + AB 基因型是冠心病发病的风险易感因子。

[参考文献]

- [1] Finegold JA, Asaria P, Francis DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organization and United Nations [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168 (2): 934-945.
- [2] Lopez AD, Mathers CD. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030 [J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 2006, 100 (5-6): 481-499.
- [3] 杨进, 贺红娟, 董靖, 等. 冠心病的风险评估研究 [J]. *西北大学学报*, 2012, 42 (5): 787-793.
- [4] 姜衡, 刘兵, 李涛, 等. 冠心病基因多态性研究进展 [J]. *国际心血管病杂志*, 2011, 38 (2): 75-77.
- [5] 毕楠, 鄢盛恺, 李国平, 等. 冠心病患者载脂蛋白 A5 和载脂蛋白 C3 基因多态性的研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33 (2): 116-121.
- [6] 屈会起, 林珊, 邱明才, 等. 国人 ACE 基因插入/缺失多态性与冠心病关联性 Meta 分析 [J]. *天津医药*, 2002, 30 (4): 201-204.
- [7] 吴淳淳, 杜心清. 内皮型一氧化氮合酶与冠心病的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19 (10): 1756-758.
- [8] Ben Ali M, Messaoudi S, Ezzine H, et al. Contribution of eNOS variants to the genetic susceptibility of coronary artery disease in a tunisian population [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19 (4): 203-208.
- [9] 颜红兵. 临床冠心病诊断与治疗指南 [M]. 人民卫生出版社, 北京, 2010, 28-192.
- [10] Ying HQ, Pu XY, Liu SR, et al. Genetic variants of eNOS gene may modify the susceptibility to idiopathic male infertility [J]. *Biomarkers*, 2013, 18 (5): 412-417.
- [11] 王晓玲, 顾东风. 冠心病遗传因素的研究进展 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2000, 17 (6): 452-454.
- [12] 张晓明, 徐耕, 单江, 等. 吸烟者细胞色素 P4501A1 基因多态性与冠心病的相关性分析 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 19 (6): 536-539.
- [13] 马晓伟, 顾楠, 李建平, 等. 中国 2 型糖尿病患者人群脂联素受体 1 基因多态性与冠心病风险的相关性研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2010, 9 (1): 18-23.
- [14] Polat F, Diler SB, Azazi I, et al. T-786C, G894T, and intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in bladder cancer cases [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16 (6): 2199-202.
- [15] 崔勤涛, 韩培立, 付庆林, 等. 内皮型一氧化氮合酶基因多态性与冠心病的关联研究 [J]. *中华临床医师杂志*, 2011, 5 (1): 46-51.
- [16] 贺颖, 杨冬之, 于辉, 等. 河南汉族人群 eNOS 基因 27bpVNTR、G894T 多态性与冠心病的相关性研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18 (5): 523-527.
- [17] Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245 (1): 190-193.
- [18] Thomas BN, Thakur TJ, Yi L, et al. Extensive ethnogenomic diversity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms [J]. *Gene Regul Syst Bio*, 2013, 7: 1-10.

(此文编辑 文玉珊)