

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-09-0944-05

黄三角地区人群中 PDGF-D 基因多态性与冠心病的相关性

高 静, 刘相飞, 陈玉东

(胜利油田中心医院心血管内科, 山东省东营市 257034)

[关键词] 血小板源性生长因子-D; 基因多态性; 冠心病

[摘要] **目的** 探讨黄河三角洲地区人群中血小板源性生长因子-D (PDGF-D) (rs3809021 和 rs7950273 位点) 基因多态性与冠心病遗传易感性之间的关系。**方法** 冠心病组 158 例, 均经冠状动脉造影 (CAG) 确诊; 对照组 120 例, 均经 CAG 或冠状动脉 CTA 排除。两组均对 PDGF-D rs3809021 及 rs7950273 位点进行基因型检测, 应用的检测方法是聚合酶链反应-限制性片段长度多态性和测序法。并根据冠状动脉造影结果采用冠状动脉病变支数和 Gensini 评分来评估冠状动脉病变严重程度。**结果** PDGF-D 基因 rs3809021 位点多态性在冠心病组和对照组的分布差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而 PDGF-D 基因 rs7950273 位点多态性在两组人群中的分布差异有统计学意义 ($P<0.05$), 冠心病组 rs7950273 位点不同基因型的冠状动脉病变严重程度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** PDGF-D rs7950273 等位基因可能是冠心病的遗传易感基因, 其基因多态性与冠心病发病有关, 但与冠心病严重程度无关。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Correlation of PDGF-D Gene Polymorphism with Coronary Artery Disease in Huangsanjiao Population

GAO Jing, LIU Xiang-Fei, and CHEN Yu-Dong

(Department of Cardiology, Central Hospital of Shengli Oil Field, Dongying, Shandong 257000, China)

[KEY WORDS] Platelet-derived Growth Factor-D; Gene Polymorphism; Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between platelet-derived growth factor-D (PDGF-D) (rs3809021 and rs7950273) genetic polymorphisms and the risk of coronary heart disease (CHD). **Methods** A total of 158 cases confirmed by coronary arteriography (CAG) were included in CHD group and 120 healthy subjects confirmed by CAG or coronary CTA were included in control group. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques and gene sequencing analysis was used to analyze the polymorphism of rs3809021 and rs7950273 of PDGF-D gene and to compare its relationship with coronary artery disease between the two groups. The severity of CHD was evaluated by the number of stenotic coronary arteries and the Gensini scores respectively. **Results** The distributions of PDGF-D gene rs3809021 polymorphism was not significantly different between case of CHD and control group ($P>0.05$), but the PDGF-D gene rs7950273 polymorphism was significantly different ($P<0.05$). However, there was no statistical difference with the severity of CHD in CHD cases ($P>0.05$). **Conclusion** PDGF-D gene rs7950273 allele is an important genetic susceptibility gene for CHD. It is associated with CHD, but is not associated with the severity of CHD.

冠心病作为一种最常见的心脏病, 近年来随着我国人口出现老龄化趋势, 其发病率也明显增加, 且出现越来越年轻化的趋势。其发病机制极其复杂, 而动脉粥样硬化是其发生发展的病理基础。血

小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 是血清中的一种强有丝分裂原分子, 可由多种细胞通过自分泌及旁分泌作用分泌, 与其受体结合后, 促进血管平滑肌细胞 (Vascular Smooth muscle

[收稿日期] 2015-08-11

[修回日期] 2015-10-15

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2011HW075)

[作者简介] 高静, 博士, 主要从事冠心病的临床及基础研究, E-mail 为 slgaojing@sohu.com。通讯作者刘相飞, 硕士, 主治医师, 主要从事冠心病的临床及基础研究, E-mail 为 zhaoyang20023903@126.com。陈玉东, 硕士, 主任医师, 主要从事冠心病的临床及基础研究, E-mail 为 oliviayou@126.com。

Cell, VSMC) 增生、迁移、促进新生血管形成, 在多种组织损伤修复及疾病发生发展过程中发挥重要作用^[1]。2005 年 Pontén 等^[2]通过对 PDGF-D 转基因鼠研究发现, PDGF-D 转基因后可引起动脉平滑肌细胞增殖, 导致血管结构重塑, 进一步证实了 PDGF-D 是动脉粥样硬化的危险因素。PDGF-D 基因多态性与冠心病的发生是否存在关联, 尚未见报道, 本研究旨在探讨本地区人群中 PDGF-D (rs3809021 和 rs7950273 位点) 基因多态性与冠心病的关系。由于基因多态性在人群种族、遗传背景、生活环境等不同时, 其表达会有所不同。黄河三角洲作为中国最年轻的土地, 其独特的地理位置、水文、气候等因素可能会引起患者基因多态性与其他地区不同的表达, 故我们选择久居本地的患者作为研究对象。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择 2013 年 1 月至 2014 年 12 月在胜利油田中心医院心内科住院并久居本地的患者 278 例 (包括: 冠心病组 158 例和对照组 120 例), 冠心病组按照世界卫生组织制定的缺血性心脏病的诊断标准, 选择经冠状动脉造影证实有一支或多支血管狭窄程度 $\geq 50\%$ 的冠心病患者。对照组的入选标准为: 住院行冠状动脉造影检查或冠状动脉 CTA 检查排除冠心病且年龄、性别、民族与冠心病组相匹配。所有研究对象均排除严重肝肾功能不全、肿瘤、吸毒或酗酒、既往血运重建、存在导致预期寿命 ≤ 6 个月的严重并存疾病。

1.2 冠状动脉狭窄程度评定

由 2 名经验丰富的医生进行冠状动脉造影 (coronary arteriography, CAG) 操作, 然后由至少 2 名高年资医生仔细阅读 CAG 结果, 评定冠状动脉血管病变狭窄程度; 以紧邻狭窄段近端和远端的“正常”血管区的直径作为 100%, 以主要血管及其分支直径狭窄 $\geq 50\%$ 为标准以确定冠状动脉病变支数。按病变累及左主干、左前降支、回旋支、右冠状动脉的支数分别定义为 1 支、2 支、多支病变, 其中累及左主干记为 2 支。并采用 Gensini 积分系统对冠状动脉狭窄程度进行定量判断, 其中狭窄 $< 25\%$ 计 1 分, $25\% \leq$ 狭窄 $< 50\%$ 计 2 分, $50\% \leq$ 狭窄 $< 75\%$ 计 4 分, $75\% \leq$ 狭窄 $< 90\%$ 计 8 分, $90\% \leq$ 狭窄 $< 99\%$ 计 16 分, 99% 计 32 分。

1.3 基因分析方法

1.3.1 全血标本基因组 DNA 提取 研究对象于入院后即刻 EDTA 抗凝管采集 3 mL 静脉血于 -80°C 冰箱备用, 用血液基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取。

1.3.2 目的基因的扩增 采用 Oligo 6.0 软件设计并合成两对引物。PDGF-D rs3809021 位点的上游和下游序列分别是: $5' \text{-GCCTCTTCCTATGGACTGTGA-3'}$, $5' \text{-GGGATGTGGGACAGGGA-3'}$, 聚合酶链反应扩增片段长度是 317 bp。rs7950273 位点的上游和下游序列分别是: $5' \text{-GCCACATTTAGCCATTCT-3'}$, $5' \text{-TGTTGGGATGAAGAAAGG-3'}$, 聚合酶链反应扩增片段长度是 320 bp。

1.3.3 PCR 产物的酶切 将 PCR 扩增产物分别用限制性内切酶 (Hinf I 和 BsmA I) 进行酶切。

1.3.4 基因型分析 3% 琼脂糖凝胶电泳对酶切后的 PCR 扩增产物进行分离, 凝胶成像仪器进行拍照, 进而得到基因型。随机抽取不同基因型 PCR 扩增产物进行基因测序。

1.4 统计学方法

收集信息录入计算机, Excel 2007 建立数据库。所有数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料, 用独立样本 t 检验比较两组间均数的差异; 计数资料如性别、吸烟、高血压史、糖尿病史等进行 χ^2 检验; 各基因型频率及等位基因频率分布的差异情况进行 χ^2 检验分析, 用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律进行等位基因确认, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。同时运用多因素 Logistic 回归分析纠正混杂因素对冠心病的影响, 研究 rs3809021 和 rs7950273 位点基因多态性与冠心病的独立关系。最后, 比较 rs7950273 位点各基因型病变支数/冠状动脉狭窄程度的差异, 分析 rs7950273 位点基因多态性对冠状动脉病变程度的影响。

2 结 果

2.1 两组基本临床资料比较

对两组病人年龄、性别、吸烟比例、高血压比例、糖尿病比例、甘油三酯、总胆固醇水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 1), 排除这些因素对结果造成的影响。

2.2 基因型检测结果

rs3809021 位点 PCR 产物出现 3 种基因型: AA 基因型 (263、54 bp 2 条带), CC 基因型 (317 bp 1 条

带), 杂合子 AC 基因型(317、263、54 bp 3 条带), 在琼脂糖凝胶上呈现的是 317 bp 和 263 bp 大小的 2 个条带(图 1)。rs7950273 位点 PCR 产物出现 3 种基因型: CC 基因型(320 bp 1 条带), GG 基因型(192、128 bp 2 条带), 杂合子 CG 基因型(320、192、128 bp 3 条带)。在琼脂糖凝胶上呈现的是 320 bp、192bp 和 128 bp 大小的 3 个条带(图 2)。基因测序结果与酶切结果完全一致(图 3 和图 4)。

表 1. 两组患者临床资料比较
Table 1. Comparison of clinical data between the two groups

分 组	<i>n</i>	年龄(岁)	男(例)	吸烟(例)	高血压(例)	糖尿病(例)	甘油三酯(mmol/L)	总胆固醇(mmol/L)
对照组	120	59.8±79.39	74(61.7%)	43(35.8%)	64(53.3%)	38(31.7%)	1.67±0.91	4.56±1.03
冠心病组	158	60.31±10.01	104(65.8%)	58(36.7%)	88(55.7%)	52(32.9%)	1.79±0.96	4.72±1.23

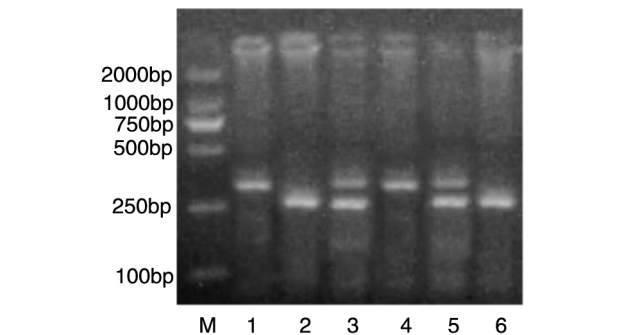


图 1.rs3809021 基因 PCR 产物酶切片段电泳结果 1,4 为 CC 基因型,2,6 为 AA 基因型,3,5 为 AC 基因型,M 为 Marker。
Figure 1. Enzymolysis electrophoretic of rs3809021 gene PCR products

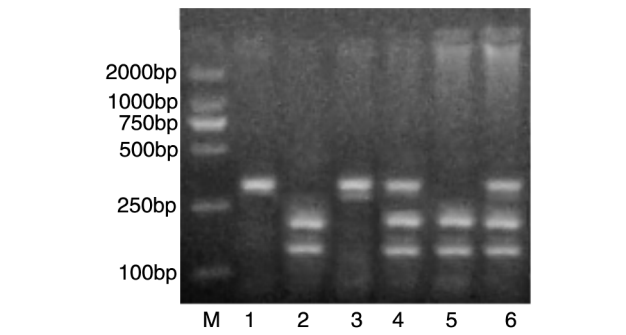


图 2.rs7950273 基因 PCR 产物酶切片段电泳结果 1,3 为 CC 基因型,2,5 为 GG 基因型,4,6 为 CG 基因型,M 为 Marker。
Figure 2. Enzymolysis electrophoretic of rs7950273 gene PCR products

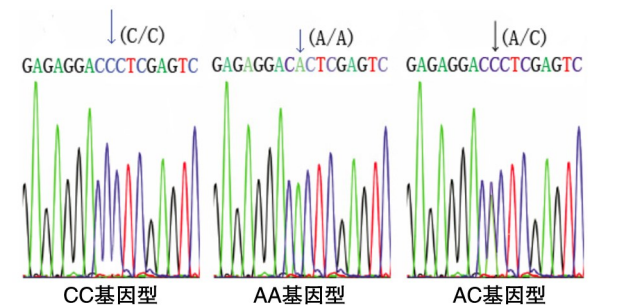


图 3. rs3809021 的基因测序图
Figure 3. Gene sequencing analysis of rs3809021 PCR products

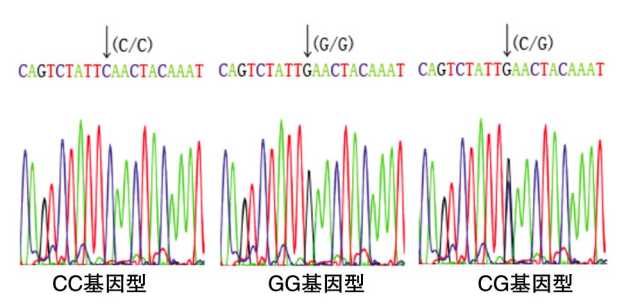


图 4. rs7950273 的基因测序图
Figure 4. Gene sequencing analysis of rs7950273 PCR products

2.3 PDGF-D 基因多态性与冠心病的关系
统计分析发现各组 PDGF-D 基因的 2 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点 rs3809021 和 rs7950273 的基因型频率在两组患者中均符合 Hardy-Weinberg 平衡,无统计学差异 ($P>0.05$)。对照组与冠心病组比较,rs3809021 位点的 AA、AC 及 CC 基因型及等位基因频率分布情况分别进行比较,无统计学意义 ($P>0.05$;表 2)。而 rs7950273 位点 CC 基因型频率冠

心病组 (25.9%) 高于对照组 (14.2%); C 等位基因频率冠心病组 (53.8%) 也高于对照组 (39.6%), 均有统计学意义 ($P<0.05$;表 3)。
2.4 PDGF-D 基因 rs7950273 位点多态性与冠状动脉狭窄程度的关系
冠心病组不同基因型间冠状动脉病变支数无明显不同 (表 4), 不同基因型间冠状动脉病变 Gensini 积分无明显不同 (表 5)。

表 2. 两组 PDGF-D 基因 rs3809021 位点基因型频率及等位基因频率分布的比较

Table 2. Distributions of genotype and allele frequencies of PDGF-D gene rs3809021 polymorphism between the two groups

分组	n	基因型(例)			等位基因频率	
		CC	AA	AC	C	A
对照组	120	56(46.6%)	14(11.7%)	50(41.7%)	67.5%	32.5%
冠心病组	158	75(47.5%)	16(10.1%)	67(42.4%)	68.7%	31.3%

表 3. 两组 PDGF-D 基因 rs7950273 位点基因型频率及等位基因频率分布的比较

Table 3. Distributions of genotype and allele frequencies of PDGF-D gene rs7950273 polymorphism between the two groups

分组	n	基因型(例)			等位基因频率	
		CC	GG	CG	C	G
对照组	120	17(14.2%)	42(35.0%)	61(50.8%)	39.6%	60.4%
冠心病组	158	41(25.9%) ^a	29(18.4%)	88(55.7%)	53.8% ^a	46.2%

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较。

表 4. 不同基因型冠状动脉病变支数的比较(例)
Table 4. Comparison of rs7950273 polymorphism with CAD significant culprits (cases)

基因型	n	冠状动脉病变支数		
		1 支	2 支	多支
CC	41	17(41.5%)	10(24.4%)	14(34.1%)
GG	29	13(44.8%)	8(27.6%)	8(27.6%)
CG	88	39(44.3%)	19(21.6%)	30(34.1%)
合计	158	72(45.6%)	40(25.3%)	46(29.1%)

表 5. 不同基因型冠状动脉积分的比较($\bar{x}\pm s$)
Table 5. Comparison of rs7950273 polymorphism with Gensini score($\bar{x}\pm s$)

基因型	n	冠状动脉积分
CC	41	31.02±23.69
GG	29	27.73±12.58
CG	88	31.36±18.07

3 讨 论

冠心病作为一类病因极其复杂的疾病,其中遗传因素在其发生发展过程中居于极其重要的地位^[3-5]。自人类基因组计划及国际人类单倍型图计划实施以来,我们对冠心病的认识逐渐深入,遗传因素在冠心病发病过程中的贡献可达 50%^[6]。

目前认为冠心病是遗传-遗传、遗传-环境因素共同作用的结果。除传统的风险因素外,如何从基因水平早期乃至胚胎期间即辨识高危患者,评估发病风险;给予高危患者积极有效的早期干预,一旦发病根据患者基因型选择最优化的药物或手术治疗,从根本上降低冠心病的发病率及死亡率,减少经济损失,成为冠心病遗传易感性研究的主要目标。单核苷酸多态性(SNP)主要表现为基因组核苷酸水平上的变异导致的 DNA 序列多态性,在人类遗传学研究中有重要意义^[7]。目前 SNP 已经被认为是能够在复杂性疾病中发挥最重要作用的因素之一。自 2002 年开始,以 SNP 为基础的全基因组相关分析成为冠心病遗传易感性研究的主流方法^[8]。与以往的候选基因研究及家系研究相比,其研究范围更广,所获结果更可靠,且不同研究所得数据可实现共用,进一步提高了检验效力^[9-10]。

ROSS 在二十世纪七十年代首先从血小板中提取并命名了 PDGF,并研究发现,一旦动脉粥样硬化病变开始,该部位的巨噬细胞和 VSMC 可增加 PDGF 含量,促进病变的扩展。其作为一种常见的肽类调节因子,具有很强的丝裂作用,可以激活静止状态的细胞,促 VSMC 增生、迁移,发挥强大的 VSMC 化学趋化因子作用。PDGF-D 是 PDGF 家族的新成员,由平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞等分泌后,从无活性的酶原形式经过水解形成同源二聚体 PDGF-DD,再与细胞表面的受体结合,导致自身和受体磷酸化反应,参与多种信号转导通路,从而促进成纤维细胞、平滑肌细胞及血管内皮细胞和神经元等细胞增殖与分化,在动脉粥样硬化、动脉损伤后的修复、纤维增生性疾病和恶性肿瘤的发生中起重要作用^[11-13]。

当前研究已经证实 PDGF-D 参与动脉粥样硬化的发生发展过程,而动脉粥样硬化是冠心病重要的发病机制,因此提示 PDGF-D 可能是诱发冠心病的候选基因。国内徐希奇等^[14]对 PDGF-D 与脑卒中的关联性 & 功能进行了研究,其观察的位点为 rs3809021、rs7950273,但未见 PDGF-D 与冠心病的相关性研究。已有研究表明冠心病患者血清 PDGF-D 水平明显高于对照组,并发现血浆 PDGF-D 水平是 ACS 发生的独立预测因素。为了更好地对冠心病的发生进行早期预警和干预,我们对 PDGF-D 基因多态性与冠心病的相关性进行了研究。本研究以冠心病患者和正常对照组静脉血为研究对象,选择 PDGF-D 为候选基因,通过病例对照方法,采用 PCR-RFLP 技术,研究了 rs3809021、rs7950273 位点

多态性与冠心病发病的关系。统计分析发现,冠心病组和对照组的基线资料比较无统计学差异。两组中 PDGF-D 基因 rs3809021 位点的基因型频率及等位基因频率差异无统计学意义。rs7950273 位点的 CC 基因型频率和 C 等位基因频率冠心病组显著高于对照组,差异有统计学意义。在 Logistic 回归分析排除其他混杂因素作用后,仍显示 C 等位基因携带者的冠心病发病率明显升高,是冠心病的独立危险因素之一。提示 rs7950273 位点多态性与冠心病的患病可能相关,其中 rs7950273 位点 C 等位基因可能是冠心病的遗传易感基因。其具体机制可能与 C 等位基因干预了 PDGF-D 基因 rs7950273 蛋白翻译效率,影响 PDGF 的表达有关。在冠心病组进一步研究 rs7950273 位点不同基因型与冠脉病变严重程度关系,结果发现不同基因型间冠脉病变严重程度无显著性差异,PDGF-D rs7950273 等位基因可能是冠心病的遗传易感基因,其基因多态性与冠心病发病有关,但与冠心病严重程度无关。

本研究对 PDGF-D 基因多态性与冠心病的发病关系提供了有力的证据,对冠心病的早期诊断和冠心病易感人群的筛选和保护起到了非常有利的作用,针对不同个体的基因多态性采取相应的干预措施,为冠心病的防治做出了贡献。

[参考文献]

- [1] Kurasawa K, Arai S, Owada T, et al. Autoantibodies against platelet-derived growth factor receptor α in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Mod Rheumatol*, 2010, 20(5): 458-465.
- [2] Pontén A, Folestad EB, Pietras K, et al. Platelet-derived growth factor D induces cardiac fibrosis and proliferation of vascular smooth muscle cells in heart-specific transgenic mice.[J]. *Circ Res*, 2005, 97(10): 1 036-045.
- [3] Twigg MW, Freestone K, Homer-Vanniasinkam S, et al. The LOX-1 Scavenger Receptor and Its Implications in the Treatment of Vascular Disease [J]. *Cardiol Res Pract*, 2012, 2012(4): 632 408.
- [4] Nichols M, Townsend N, Scarborough P, et al. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update[J]. *J Eur heart*, 2013, 34(39): 3 028-034.
- [5] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive Summary: Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 399-410.
- [6] Hoffmann MM, Renner W. Insight from genome-wide association studies into coronary heart disease [J]. *Pharmacogenomics*, 2012, 13(4): 361-363.
- [7] Soneson C, Lilljebjörn H, Fioretos T, et al. Integrative analysis of gene expression and copy number alterations using canonical correlation analysis[J]. *Bmc Bioinformatics*, 2010, 11(8): 191.
- [8] Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*[J]. *Nat Genet*, 2002, 32(4): 650-654.
- [9] Schunkert H, König IR, Kathiresan S, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(4): 333-338.
- [10] Lee JY, Lee BS, Shin DJ, et al. A genome-wide association study of a coronary artery disease risk variant [J]. *J Hum Genet*, 2013, 58(3): 120-126.
- [11] Hellberg C, Östman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 180: 103-114.
- [12] Christensen M, Najy AJ, Snyder M, et al. A Critical Role of the PTEN/PDGF Signaling Network for the Regulation of Radiosensitivity in Adenocarcinoma of the Prostate[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 88(1):151-158.
- [13] Awazu Y, Mizutani A, Nagase Y, et al. A novel pyrrolo [3, 2-d]pyrimidine derivative, as a vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows potent antitumor activity by suppression of tumor angiogenesis[J]. *Cancer Science*, 2012, 103(5): 939-944.
- [14] 徐希奇, 赵红, 蕙汝太, 等. PDGF-D 基因多态与脑卒中的关联及功能研究[D].北京:中国协和医科大学, 2006; 3-26.

(此文编辑 李小玲)