

内皮型一氧化氮合酶基因第 4 内含子基因多态性与冠状动脉扩张症的关系

崔少楠¹, 陈欣²

(1. 天津医科大学一中心临床学院, 天津市 300070; 2. 天津市第一中心医院心血管内科, 天津市 300192)

[关键词] 冠状动脉扩张症; 一氧化氮合酶; 基因多态性

[摘要] **目的** 探究内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因第4内含子基因多态性与冠状动脉扩张症(CAE)的关系。**方法** 纳入71例住院患者,采用病例对照研究方法选择冠状动脉扩张组30例和冠状动脉正常组41例。收集患者年龄、性别、吸烟史、饮酒史等一般资料。采用聚合酶链反应(PCR)技术,分析比较两组患者一氧化氮合酶基因第4内含子基因多态性。**结果** 冠状动脉扩张组患者病变累及单支冠状动脉最多,共14例(46.7%);累及2支、3支冠状动脉患者分别为8例(26.7%)、8例(26.7%)。病变累及右冠状动脉最多,占44.4%;累及前降支、回旋支分别占31.5%和24.1%。冠状动脉扩张组与冠状动脉正常组aa、ab、bb基因型分布频率分别为13.3%、33.3%、53.3%和4.9%、17.1%、78%($P>0.05$)。冠状动脉扩张组与冠状动脉正常组a等位基因分布频率为30%、13.4%($P<0.05$)。经Logistic回归分析显示,内皮型一氧化氮合酶基因第4内含子a等位基因是冠状动脉扩张症发生的独立危险因素($P<0.05$, OR=3.327, 95%CI=1.083~10.226)。**结论** 内皮型一氧化氮合酶基因第4内含子a等位基因可能是冠状动脉扩张症发病的独立危险因素。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

The association between endothelial nitric oxide synthase intron 4a/b gene polymorphisms and coronary artery ectasia

CUI Shao-Nan¹, CHEN Xin²

(1. First Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Cardiology, First Central Clinical Hospital of Tianjin, Tianjin 300192, China)

[KEY WORDS] Coronary artery ectasia; Endothelial nitric oxide synthase; Gene polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between intron 4a/b gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and coronary artery ectasia (CAE). **Methods** The research was performed by case-control study. The CAE group included 30 patients with coronary artery ectasia on coronary angiogram. The control group contained 41 patients with normal coronary artery. The study collected the data of patients'gender, age, smoking history, drinking history, ect. Polymorphism chain reaction (PCR) technique was used to identify the eNOS intron 4a/b gene polymorphisms. **Results** The lesion involved single coronary artery in most cases was 46.7% (14 cases), the lesions involved in two and three vessels were 26.7% (8 cases) and 26.7% (8 cases), respectively. The right coronary artery (RCA) was the most frequently involved vessel (44.4%), the left anterior descending artery (LAD) and the left circumflex artery (LCX) were 31.5% and 24.1%, respectively. The frequencies of eNOS gene phenotypes in CAE group and control group for "aa", "ab", "bb" were 13.3%, 33.3%, 53.3% and 4.9%, 17.1%, 78% ($P>0.05$), respectively. The presence of "a" type allele of eNOS gene in CAE group and control group were 30% and 13.4% ($P<0.05$), respectively. Logistic regression analysis showed that "a" type allele of eNOS gene was an independent risk factor for CAE ($P<0.05$, OR = 3.327, 95% CI = 1.083 ~ 10.226). **Conclusion** The "a" type allele of eNOS gene may be an independent risk factor for the occurrence of CAE.

[收稿日期] 2017-03-31

[修回日期] 2017-07-26

[基金项目] 天津市卫生和计划生育委员会科技基金(2015KZ023)

[作者简介] 崔少楠, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为冠心病治疗, E-mail 为 584149153@qq.com。通讯作者陈欣, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病及介入治疗, E-mail 为 chenxin966@126.com。

冠状动脉扩张症 (coronary artery ectasia, CAE) 指冠状动脉血管局部或弥漫发生非梗阻性病变, 使病变血管扩张直径超过临近正常冠状动脉血管 1.5 倍以上^[1], 由 Hill 等^[2]于 1983 年首次报道, 随后 Markis 等^[3]根据冠状动脉血管造影结果将其分为 4 型: I 型: 两支或两支以上冠状动脉血管弥漫性扩张; II 型: 单支冠状动脉血管弥漫性扩张合并另一支冠状动脉血管局限性扩张; III 型: 仅一支冠状动脉血管弥漫性扩张; IV 型: 局限性或节段性血管扩张。内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 通过调节释放一氧化氮 (nitric oxide, NO) 使血管舒张, 防止内皮功能紊乱及动脉硬化^[4]。其活性降低易导致 NO 释放减少, 血管内皮损伤, 形成血管痉挛和血栓。本文研究 eNOS 基因第 4 内含子基因多态性与 CAE 的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象

纳入 2016 年 1 月至 11 月于天津市第一中心医院心内科住院治疗并行冠状动脉造影检查的患者 71 例, 采用病例对照研究方法, 分别纳入为冠状动脉扩张组和冠状动脉正常组。冠状动脉扩张组 (扩张组) 包括 30 例 CAE 患者; 冠状动脉正常组 (正常组) 选取 41 例冠状动脉造影结果提示无明显冠状动脉扩张或狭窄 (狭窄 < 50%) 患者。所有纳入研究对象排除急性心肌梗死、既往行冠状动脉介入或冠状动脉搭桥治疗、心功能失代偿、合并其他心脏疾病 (如扩张型心肌病、肥厚性心肌病、肺源性心脏病)、严重肝肾功能不全、炎症性疾病、急性感染、近期有外伤或手术史患者及妊娠妇女。同时收集受试者一般临床资料, 包括性别、年龄、吸烟、饮酒史、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、收缩压、舒张压。

1.2 DNA 提取

采集受试者外周血 2 mL, 经 DNA 提取试剂盒 (北京天根公司) 提取 DNA, 稀释 DNA 提取物, 紫外分光光度计测定提取物在 260 nm、280 nm 处吸光度, 计算 DNA 浓度及纯度, 比值在 1.8~2.0 之间表明所提取 DNA 无蛋白质或 RNA 污染, 属于纯度合格样本, 可选为 PCR 模板, 于 -20℃ 保存备用。纯度

不合格 DNA 样本需重新提取。

1.3 PCR 反应

引物序列 eNOS 基因第 4 内含子基因位点上游引物: 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3', 下游引物: 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3'。采用 PCR 扩增提取 DNA, 反应体系总体积 50 μ L, 其中 DNA 片段 1 μ g, 上、下游引物各 2 μ L, 2 \times Taq Master-Mix 25 μ L, 无菌水 20 μ L。

PCR 扩增条件: 预变性 94℃ 2 min, 之后反复于 94℃ 变性 30 s, 55~65℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共持续 25~35 个循环, 终延伸 72℃ 2 min。取 PCR 扩增产物 10 μ L 经 1.5% 琼脂糖凝胶点样后于 80 V 电压下电泳 20 min, 在紫外线灯下与 DNA marker 对照观察结果, 并根据电泳后条带长度、数量进行进一步基因分析 (图 1)。

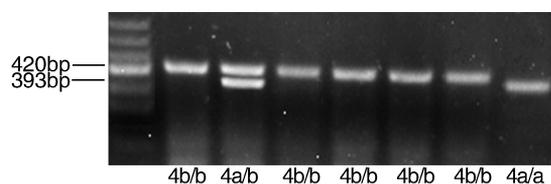


图 1. 扩增目的基因片段产物电泳图

Figure 1. The electrophoregram of PCR products of purpose gene

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 采用基因技术法计算基因型及等位基因频率, 采用 χ^2 检验对基因型进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经正态分布检验符合正态分布后, 采用两样本均数 t 检验比较, 计数资料两组间比较采用 χ^2 检验, 采用 Logistic 回归分析影响 CAE 的危险因素, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料的比较

冠状动脉扩张组和冠状动脉正常组性别、年龄、吸烟史、饮酒史、TG、TC、LDLC 和 HDLC 水平、收缩压、舒张压均无明显统计学差异 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 CAE 血管累计情况

从表 2 可见, CAE 病变累及以单支动脉最多见 (46.7%), 病变累及血管以右侧冠状动脉最多见 (44.4%)。

表 1. 扩张组与正常组患者一般资料的比较

Table 1. Comparison of clinical general data in two groups

指 标	扩张组(n=30)	正常组(n=41)	P 值
年龄(岁)	59.23±10.45	60.95±8.08	0.43
男/女(例)	20/10	21/20	0.23
吸烟史[例(%)]	12(40.0)	13(31.7)	0.62
饮酒史[例(%)]	10(33.3)	8(19.5)	0.27
TG(mmol/L)	1.99±1.18	1.77±0.82	0.36
TC(mmol/L)	4.17±0.75	4.49±0.72	0.07
LDLC(mmol/L)	2.61±0.71	2.97±0.78	0.05
HDLC(mmol/L)	1.16±0.35	1.27±0.38	0.26
收缩压(mmHg)	132.37±21.45	129.56±18.67	0.56
舒张压(mmHg)	83.13±10.55	80.56±11.67	0.34

表 2. 扩张组冠状动脉血管累及部位及支数情况

Table 2. Condition of the coronary artery lesions and the number of branches in CAE group

累及情况	次数	频率
血管支数		
单支	14	46.7%
两支	8	26.7%
三支	8	26.7%
病变部位		
右侧冠状动脉	24	44.4%
左侧前降支	17	31.5%
左侧回旋支	13	24.1%

2.3 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验

根据遗传平衡定律公式: $p^2+2pq+q^2=1$ 。基因型 aa 频率为 p^2 , bb 频率为 q^2 , ab 频率为 $2pq$ 。扩张组 a 等位基因分布频率为: $(4 \times 2 + 10) / 60 \times 100\% = 30\%$, b 等位基因分布频率为: $(16 \times 2 + 10) / 60 \times 100\% = 70\%$ 。正常组 a 等位基因分布频率为: $(2 \times 2 + 7) / 82 \times 100\% = 13.4\%$, b 等位基因分布频率为: $(32 \times 2 + 7) / 60 \times 100\% = 86.6\%$ 。与同组期望值比较,实际值无明显统计学差异($P > 0.05$),说明研究对象基因型符合遗传平衡定律,群体研究具有代表性(表 3)。

表 3. 扩张组与正常组 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验

Table 3. Hardy-Weinberg Law test in two groups

基因型	扩张组(n=30)		正常组(n=41)	
	实际频数	期望频数	实际频数	期望频数
aa	4	2.7	2	0.74
ab	10	12.6	7	9.52
bb	16	14.7	32	30.74

2.4 eNOS 基因第 4 内含子基因型及等位基因分布比较

eNOS 第 4 内含子基因根据 27 bp 碱基序列重复次数分为 4a、4b 两种等位基因,其中 4a 为缺失型,含 4 次重复序列;4b 为插入型,含 5 次重复序列。纯合子 aa、bb 片段分别为 393 bp 和 420 bp,杂合子

ab 为 393 bp 和 420 bp 2 个片段。两组基因型分布无统计学差异($P > 0.05$),两组等位基因分布有统计学差异($P < 0.05$,表 4)。

表 4. 扩张组与正常组 eNOS 第 4 内含子基因多态性分布

Table 4. The distribution of eNOS 4a/b gene polymorphism in two groups

分 组	n	基因型[例(%)]			等位基因[次(%)]	
		aa	ab	bb	a	b
扩张组	30	4(13.3)	10(33.3)	16(53.3)	18(30.0)	42(70.0)
正常组	41	2(4.9)	7(17.1)	32(78.0)	11(13.4)	71(86.6)
χ^2		4.94			5.86	
P		0.09			0.02	

2.5 eNOS 基因第 4 内含子基因多态性与 CAE 多因素分析

采用 Logistic 回归分析,以有无 CAE(0=无,1=有)为应变量,以基因型为自变量(0=bb,1=aa 或 ab),在控制性别、年龄、吸烟史、饮酒史、总胆固醇、甘油三酯等混杂因素后,结果显示 a 等位基因是影响 CAE 发生的独立危险因素($P < 0.05$,表 5)。

表 5. eNOS 第 4 内含子基因多态性与 CAE Logistic 回归分析

Table 5. Logistic regression analysis for factors associated with eNOS 4a/b gene polymorphism

变 量	B	S.E	P	OR	95%CI
性别	-0.435	0.692	0.529	0.647	0.167~2.512
年龄	-0.012	0.031	0.707	0.988	0.930~1.051
吸烟史	-0.301	0.708	0.671	0.74	0.185~2.965
饮酒史	0.918	0.851	0.280	2.505	0.473~13.280
TG	0.117	0.307	0.702	1.125	0.616~2.054
TC	-0.145	0.909	0.874	0.865	0.146~5.142
LDLC	-0.422	0.808	0.601	0.656	0.135~3.193
HDLC	-0.05	0.909	0.956	0.952	0.160~5.647
a 等位基因	1.202	0.573	0.036	3.327	1.083~10.226

3 讨 论

CAE 是冠状动脉硬化性心脏病的一种特殊形式,具有局部或弥漫性冠状动脉血管扩张的特点。其在冠状动脉造影检查中的检出率约为 1.2%~4.9%^[5]。其发病机制目前尚未完全清楚,既往研究发现 CAE 的发病可能与先天性因素、动脉硬化、炎症性疾病、结缔组织疾病有关^[6]。NO 能够扩张血管,降低内皮通透性、减少细胞表面黏附分子、抑制平滑肌细胞的增殖及血小板黏附聚集,从而抑制动脉硬化的进展。eNOS 是 NO 合成的关键酶,以 L-精氨

酸为底物催化合成 NO。定位在第 7 号染色体 7q35-q36 区, 包含有 26 个外显子和 25 个内含子, 翻译生成含 1203 个氨基酸的蛋白质产物^[7]。其基因的多态性能够导致 eNOS 结构和活性改变, 使 NO 生成减少, 造成心血管事件的发生。

现阶段国内外已进行大量关于 eNOS 与冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary artery disease, CHD) 发病关系间的研究, 大量结果表明 eNOS 可能与 CHD 的发病有关系^[8-10]。结果虽然存在不一致, 但大部分研究及 Meta 分析证明 eNOS 基因的多态性可能会导致心血管系统的动脉粥样硬化。Abdel-Aziz 等^[11]通过对埃及人群研究认为 eNOS 基因多态性是 CHD 发病的独立危险因素, Hooper 等^[12]对非州裔美国人群调查发现 eNOS 基因第 4 内含子基因是发生急性心肌梗死的危险因素, 其 a 等位基因在非洲裔美国人群分布频率 (26%) 明显高于澳大利亚人群 (14%) 和日本人群 (10%)。Zhang 等^[13]通过 Meta 分析得出 eNOS 可能是亚裔人群中 CHD 发生的危险因素。但对于 eNOS 多态性与 CAE 发病方面的研究甚少, 目前仅有国外 Arif 等^[14]、Ekmekci 等^[15]曾有报道。

本实验属于国内首次研究 eNOS 基因第 4 内含子多态性与 CAE 发病的关系, 研究得出 eNOS 基因第 4 内含子基因型与 CAE 发病无明显联系, 但通过 Logistic 回归分析进一步得出其 a 等位基因是 CAE 发病独立危险因素的结论, 这与 Ekmekci^[15]等研究结果一致。CAE 患者冠状动脉累及情况与 Arif 等^[14]、Valente 等^[16]结论一致, 以累及单支动脉最为多见, 病变累及血管以右冠状动脉较为多见。但 Ekmekci 等^[15]研究认为病变主要累及左前降支 (63%), 造成结果差异的原因可能与人群种族差异有关。本研究仍有很多不足之处, 由于冠状动脉扩张病变作为一种受到遗传及环境等多种因素共同作用影响的疾病, 本实验并不能完全明确影响冠状动脉扩张的因素, 如仅探究 eNOS 第 4 内含子与 CAE 发病之间的关系, 而 eNOS 上其他涉及可能影响冠状动脉血管的基因, 如 T-786C、G894T 基因多态性与 CAE 发病的关系并未包含在内。此外本研究涉及样本量较小, 仅仅涉及本地区人群基因类型, 不包含其他地区及种群基因情况。同时炎症因子、氧化应激、细胞外基质降解等化验结果指标未能包含统计在内, 下一步研究希望增加样本量以及相关化验结果指标, 并能够探究其他基因型多态性与 CAE 发病之间的联系。

[参考文献]

[1] Yolcu M, Ipek E, Turkmen S, et al. The relationship between ele-

vated magnesium levels and coronary artery ectasia[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2016, 27(5): 294-298.

[2] Hill JA, Margolis JR, Feldman RL, et al. Coronary arterial aneurysm formation after balloon angioplasty [J]. *Am J Cardiol*, 1983, 52(3): 261-264.

[3] Markis JE, Joffe CD, Cohn PF, et al. Clinical significance of coronary arterial ectasia[J]. *Am J Cardiol*, 1976, 37(2): 217-222.

[4] Zeng WP, Zhang R, Li R, et al. Association of the endothelial nitric oxide synthase gene T786C polymorphism with in-stent restenosis in Chinese Han patients with coronary artery disease treated with drug-eluting stent[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e170964.

[5] 黄巧娟, 陈蒙华. 冠状动脉扩张发病相关因素的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(3): 315-318.

[6] Amirzadegan AR, Davoodi G, Soleimani A, et al. Association between traditional risk factors and coronary artery ectasia: a study on 10057 angiographic procedures among iranian population[J]. *J Tehran Heart Cent*, 2014, 9(1): 27-32.

[7] Sivri N, Unlu A, Palabiyik O, et al. Endothelial nitric oxide synthase intron 4a/b polymorphism in coronary artery disease in Thrace region of Turkey[J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2014, 28(6): 1115-120.

[8] Mahmoodi K, Nasehi L, Karami E, et al. Association of nitric oxide levels and endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism with coronary artery disease in the iranian population[J]. *Vasc Specialist Int*, 2016, 32(3): 105-112.

[9] Yang Y, Du K, Liu Z, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 4b/a gene polymorphisms and coronary artery disease: evidence from a meta-analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 7987-8003.

[10] Kallel A, Sbai MH, Sediri Y, et al. Polymorphisms of the NOS3 gene and risk of myocardial infarction in the Tunisian population [J]. *Cytokine*, 2013, 64(3): 646-651.

[11] Abdel-Aziz TA, Mohamed RH. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with classical risk factors in development of premature coronary artery disease[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(4): 3065-071.

[12] Hooper WC, Lally C, Austin H, et al. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans[J]. *Chest*, 1999, 116(4): 880-886.

[13] Zhang K, Bai P, Shi S, et al. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased coronary heart disease among Asia population: evidence from a Meta analysis[J]. *Thromb Res*, 2012, 130(2): 192-197.

[14] Arif YA, Faruk AI, Celik O, et al. Coronary artery ectasia is associated with the c.894 > T (Glu298Asp) polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2014, 232(2): 137-144.

[15] Ekmekci A, Ozcan KS, Abaci N, et al. The relationship between coronary artery ectasia and eNOS intron 4a/b gene polymorphisms [J]. *Acta Cardiol*, 2013, 68(1): 19-22.

[16] Valente S, Lazzeri C, Giglioli C, et al. Clinical expression of coronary artery ectasia[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2007, 8(10): 815-820.

(此文编辑 朱雯霞)