

脂联素及其基因多态性与某地冠心病的相关性研究

刘运端(广西壮族自治区玉林市红十字会医院检验科 537000)

【摘要】 目的 探讨某地瑶族冠心病(CHD)患者血清脂联素(APN)水平及其基因位点+45 T/G 和-11377 C/G 的多态性与该地区瑶族健康者、汉族 CHD 患者、汉族健康者的差异。**方法** 采用酶联免疫吸附(ELISA)方法检测瑶族 CHD 患者、瑶族健康者、汉族 CHD 患者和汉族健康者(各 100 例)血清 APN 水平;使用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 APN 基因位点+45T/G 和-11377C/G 的多态性。**结果** (1)2 组 CHD 患者血清 APN 水平明显低于 2 组健康对照者,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。2 组 CHD 患者血清 APN 水平差异无统计学意义($P = 0.076$)。(2)在 H-W 平衡检验中,4 组研究对象 APN 基因位点+45T/G 和-11377C/G 均有群体代表性(均 $P > 0.05$)。(3)瑶族 CHD 患者 ANP+45TG、GG 基因型频率均高于瑶族健康者,但差异无统计学意义($P > 0.05$);汉族 CHD 患者 ANP+45 基因型等位基因频率略高于瑶族 CHD 患者,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。(4)CHD 患者 ANP-11377 基因型和等位基因频率与同民族健康者比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);瑶族 CHD 患者 APN-11377 基因杂合程度略低于汉族 CHD 患者,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 血清低 APN 水平和 APN-11377 位点是瑶族 CHD 患者的危险因素,与汉族 CHD 患者相同。

【关键词】 脂联素; 基因多态性; 瑶族; 冠心病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.11.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)11-1567-03

Study on relations between adiponectin and its gene polymorphism and Yao coronary heart disease of Guangxi district
LIU Yun-duan (Department of Laboratory, Yulin Red Cross Hospital in Guangxi District, Yulin, Guangxi 537000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the difference of serum levels of adiponectin and its gene polymorphism in Yao patients with CHD of Guanxi district and Han CHD patients and Yao normal people in same region. **Methods** The levels of serum adiponectin in Yao CHD patients, Han CHD patients, Yao normal people and Han normal people (each of 100 cases) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, and APN+45 and APN-11377 genotyping were conducted by using PCR-RFLP. **Results** The levels of adiponectin in two groups of CHD patients were significantly lower than same race normal group, the difference were statically significant ($P = 0.000$; $P = 0.000$). The adiponectin levels of two CHD groups was not statically significant difference ($P = 0.067$); (2) The APN+45 and APN-11377 of four groups conform the Hardy-Weinberg population genetic equilibrium law (all $P > 0.05$); (3) The TG and GG genotype frequency of APN+45 In two CHD groups were higher than same race normal group, but the difference of Yao CHD group and Yao normal group was no statically significant ($\chi^2 = 8.122$, $P = 0.017$; $\chi^2 = 5.121$; $P = 0.077$), and the difference of Yao CHD group and Han CHD group were not statically significant ($\chi^2 = 1.750$; $P = 0.417$); (4) The CG and GG genotype frequency of APN-11377 in two CHD groups were higher than same race normal group, the difference of Yao CHD group and Yao normal group was statically significant ($\chi^2 = 12.522$, $P = 0.002$; $\chi^2 = 17.275$; $P = 0.000$), and the difference of Yao CHD group and Han CHD group were not statically significant ($\chi^2 = 0.363$; $P = 0.834$). **Conclusion** As with Han CHD patients, serum low APN level and APN-11377 loci may be risk factors of Yao CHD patients.

【Key words】 adiponectin; polymorphism; Yao nationality; coronary heart disease

冠心病(CHD)是由冠状动脉发生动脉粥样硬化病变而引起血管狭窄、供血不足、心肌缺血、缺氧而导致的心脏病,是致死致残率较高的疾病之一。目前,我国 CHD 发病率有升高、发病年龄有提前的趋势。CHD 是由遗传因素、环境因素和不良生活习惯相互作用导致的复杂疾病,其中易感基因可能对 CHD 的发生起非常重要的作用。脂联素(APN)是由脂肪细胞特异性分泌的活性因子,具有抗炎性、抗动脉粥样硬化、抗血小板聚集等生物作用。近年来研究发现 APN 所在基因区域与心血管疾病相关,且基因多态性具有地区、种族的特异性。本研究旨在通过检测广西瑶族 CHD 患者 APN 水平及其基因位点+45 T/G 和-11377C/G 基因多态型及等位基因的分布频率,探讨 APN 水平及 2 个基因位点与广西瑶族 CHD 的关系,

从而为临床治疗提供实验室数据。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 瑶族 CHD 患者、瑶族健康者、汉族 CHD 患者和汉族健康者,各 100 例。瑶族 CHD 患者(瑶族 CHD 组):男 53 例,女 47 例,年龄 49~75 岁,平均年龄 58.3 岁。瑶族健康者(瑶族健康对照组):男 52 例,女 48 例,年龄 44~71 岁,平均年龄 56.9 岁。汉族 CHD 患者(汉族 CHD 组):男 55 例,女 45 例,年龄 46~78 岁,平均年龄 57.5 岁。汉族健康者(汉族健康对照组):男 54 例,女 46 例,年龄 47~69 岁,平均年龄 58.1 岁。瑶族入选标准:(1)居住在广西瑶族主要分布区的瑶族个体。(2)3 代中未有与外族通婚的瑶族家族,选择第 3 代个体为研究对象,且尽可能确保研究对象在其可追踪的历史上

没有与外族通婚。(3)无遗传性疾病家族史及其他急、慢性病史。CHD 诊断标准^[1]:选择冠状动脉造影显示左主干狭窄大于或等于 30%或其他 3 支至少有 1 支冠状动脉狭窄大于或等于 50%者。瑶族 CHD 患者须符合上述 2 个人选标准,且动态心电图 ST 段下移。4 组研究对象的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。采样过程遵循知情同意原则,通过询问确保样本间无血缘关系。

1.2 标本采集 抽取所有研究对象的静脉血 4 mL,分别注入干燥管和 EDTA 抗凝管中,并充分混匀。30 min 后,干燥管 3 000 r/min,离心 10 min,分离血清-20℃冰箱保存,采用酶联免疫吸附(ELISA)方法检测血清 APN 水平,严格按照试剂说明书操作。EDTA 管用于 APN 基因位点多态性检测。

1.3 仪器与试剂 9700 扩增仪(美国 ABI 公司);RT-6000 酶标仪(深圳雷杜生命科学有限公司);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像仪(珠海黑马生物公司)。APN 试剂(美国 GBD 公司提供);DNA 抽提试剂(深圳益生堂生物有限公司)。

1.4 DNA 制备 采用离心柱法,严格按照试剂说明书进行,最后将 DNA 溶于 TE 缓冲液,-20℃保存备用。

1.5 APN 基因检测 (1)反应体系:在 50 μ L 总体积中进行,每孔反应体系内含 8 μ L PCR 混合反应液(含 d NTP、buffer)、Taq 酶 0.5 μ L、无菌水 37.5 μ L、上下游引物各 1 μ L、DNA 模版 2 μ L,充分混匀。(2)APN 基因位点+45 扩增条件和限制性片段长度多态性:94℃ 5 min 预变性;94℃ 1 min,55℃ 45 s,72℃ 1 min,35 个循环,最后 72℃延伸 7 min。取 PCR 后产物 20 μ L、BspHI 内切酶 1 μ L,buffer 3 μ L,无菌水 6 μ L,37℃环境酶切 1 h。APN+45 (T/G) PCR 产物为 745 bp,酶切后为 291 bp 和 454 bp 的 2 个片段(G 等位基因)。在 2%琼脂糖凝胶上点样,电压 100 V,电泳 60 min 后自动凝胶图像分析仪观察电泳结果并摄像保存。(3)APN 基因位点-11377 扩增条件和限制性片段长度多态性:94℃ 5 min 预变性;94℃ 1 min,62℃ 45 s,72℃ 1 min,35 个循环,最后 72℃延伸 5 min。取 PCR 产物 20 μ L、AlwNI 内切酶 1 μ L,buffer 3 μ L,无菌水 6 μ L,37℃酶切 1 h。SNP-11377C/G 的 PCR 产物长度为 450 bp(C 等位基因),酶切后为 95 bp 和 355 bp(G 等位基因)2 个片段。在 2%琼脂糖凝胶上点样,电压 100 V,电泳 30 min 后自动凝胶图像分析仪观察电泳结果并摄像保存。见表 1。

表 1 APN+45 和-11377 基因位点引物序列

基因位点	引物序列	产物长度(bp)
APN+45 位点	上游引物:5'-CTTGGTGAGGAAAG GAGAC-3'	745
	下游引物:5'-GAGGAATCAGAATA TGAATG-3'	
APN-11377 位点	上游引物:5'-TGTCTTGTGTAAGT TGGTGCTG-3'	450
	下游引物:5'-GCTTGTGGCCTCGAA TCGTG-3'	

1.6 统计学处理 采用统计软件 SPSS 16.0 进行数据处理,同民族间和 CHD 组间的 APN 水平比较使用 t 检验;APN 等位基因进行 Hardy-Weinberg(H-W)平衡检验;4 组间 APN 基因频率分布的差异,采用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组研究对象血清 APN 水平结果比较 瑶族 CHD 组患者血清 APN 水平明显低于瑶族健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。汉族 CHD 组患者 APN 水平也显著低于汉族健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。瑶族 CHD 组患者血清 APN 水平略高于汉族 CHD 组患者,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

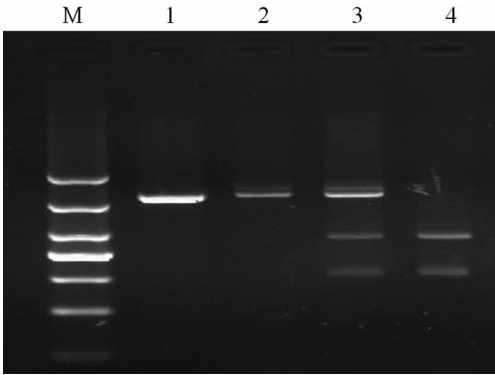
表 2 4 组研究对象血清 APN 水平结果比较

组别	<i>n</i>	APN(mg/L)
瑶族 CHD 组	100	7.30(3.65~10.35) Δ
瑶族健康对照组	100	10.56(5.99~15.67)
汉族 CHD 组	100	6.74(3.02~10.62)*
汉族健康对照组	100	10.29(5.67~16.04)

注:与同民族健康对照组比较,* $P<0.05$; $\Delta P<0.05$ 。

2.2 4 组 APN 基因分型结果比较 野生型是 2 组健康对照者 APN+45 和-11377 位点的主要型别,APN+45 和-11377 基因位点杂合程度最高的是汉族 CHD 组患者。经 H-W 平衡检验,比较观察值和期望值,4 组 APN 2 个位点均无统计学意义($P>0.05$),符合 H-W 群体遗传平衡法则,具有群体代表性。见表 3。

2.3 4 组研究对象 APN+45 基因多态性的结果比较 使用卡方检验比较 4 组研究对象 APN+45 等位基因频率,提示汉族 CHD 组 TG 和 GG 基因频率明显高于汉族健康对照组,差异有统计学意义($\chi^2=8.122,P=0.017$);瑶族 CHD 组 TG 和 GG 基因频率明显高于瑶族健康对照组,但差异无统计学意义($\chi^2=5.121;P=0.077$);瑶族 CHD 组 APN+45 基因杂合程度也略低于汉族 CHD 组,但差异无统计学意义($\chi^2=1.750;P=0.417$)。见图 1。



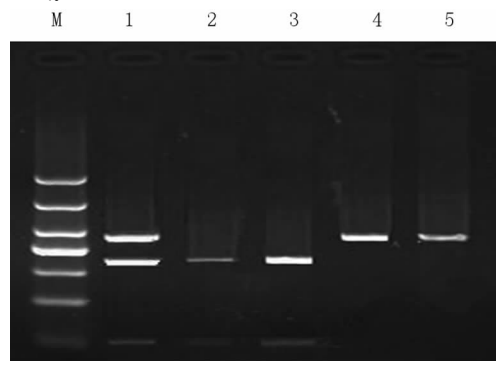
注:M:marker;1,2:TT 型;3:TG 型;4:GG 型。

图 1 APN 基因+45 位点 T/G 扩增产物酶切电泳图

表 3 4 组研究对象 APN 基因检测结果比较

组别	<i>n</i>	ANP+45					H-W 值		ANP-11377					H-W 值	
		TT	TG	GG	T	G	P	MP	CC	CG	GG	C	G	P	MP
瑶族 CHD 组	100	42	44	14	0.64	0.36	0.652	0.355	41	42	17	62	38	0.360	0.277
瑶族健康对照组	100	58	32	10	0.74	0.26	0.244	0.311	62	26	12	75	25	0.298	0.219
汉族 CHD 组	100	40	39	21	0.595	0.405	0.056	0.366	37	44	19	59	41	0.367	0.365
汉族健康对照组	100	57	34	9	0.74	0.26	0.508	0.311	66	26	8	79	21	0.096	0.277

2.4 4 组 APN-11377 基因多态性的比较 4 组研究对象 APN-11377 基因多态性分布显示,2 组 CHD 患者的等位基因频率明显高于 2 组健康对照者,差异有统计学意义($\chi^2 = 12.522, P = 0.002; \chi^2 = 17.275; P = 0.000$);瑶族 CHD 组患者 APN-11377 基因杂合程度也略低于汉族 CHD 组,但差异无统计学意义($\chi^2 = 0.363, P = 0.834$)。见图 2。



注:M:marker;1:CG 型;2,3:CC 型;4,5:GG 型。

图 2 APN 基因-11377 位点 C/G 扩增产物酶切电泳图

3 讨 论

APN 是近年来发现的一种具有抗炎性、抗动脉粥样硬化、抗血小板聚集、由脂肪组织特异性分泌的活性因子。可通过自分泌、旁分泌和内分泌方式影响葡萄糖转化、脂质代谢、血管内皮功能、炎性反应和胰岛素抵抗。APN 对动脉粥样硬化的保护作用机制可能为:(1)抑制巨噬细胞转化为泡沫细胞^[2]。(2)通过环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 途径发挥抑制内皮细胞的炎性反应^[3]。(3)抑制血管平滑肌细胞增殖^[4]。(4)促进肝脏合成高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)而发挥胆固醇逆转运功能、抗氧化功能和抗炎性等作用^[5]。(5)通过对血管舒张因子一氧化氮(NO)增强血管舒张、抑制血小板聚集、单核细胞黏附以及血管平滑肌细胞增殖等作用,从而对血管系统起保护作用^[6]。李长江等^[7]研究表明,APN 通过抑制血管壁黏附分子的表达,达到抗动脉粥样硬化的目的。APN 还通过上调泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达,促进泡沫细胞内胆固醇的外流,分解发挥其抗动脉粥样硬化的作用^[8]。APN 基因位于人染色体 3q27 区域,该区域包括 3 个外显子和 2 个内含子,具有丰富的多态性,也是 2 型糖尿病、代谢综合征、CHD 的易感基因区域^[9-12]。但 APN 基因 SNP 在不同种族、地区分布差异较大,以致于国内外研究结果不一致,甚至对同一种族不同地区人群的研究也会有不同结果^[13]。

本研究结果表明,与瑶族健康对照组比较,瑶族 CHD 组和汉族 CHD 组血清 APN 水平显著降低,这与 Kizer 等^[14]和徐丽等^[15]的研究结果相似,证实血清低 APN 水平可能是 CHD 的危险因素。瑶族 CHD 组 APN 水平略高于汉族 CHD 组,这可能跟瑶族 CHD 组体质质量指数略低于汉族 CHD 组相关。APN+45 基因比较,瑶族 CHD 组和汉族 CHD 组 APN+45 的 T/G、G/G 基因型明显高于瑶族健康对照组,虽然瑶族 CHD 组与瑶族健康对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),原因可能与实验例数较少有关。等位基因频率显示 G 等位基因在广西地区 CHD 患者中较多见,提示携带 SNP+45G 基因型更易发展为 CHD,是 CHD 的一个危险因素,与国内外研究相似^[9,14]。对 APN-11377 基因进行比较,瑶族 CHD 组和汉族 CHD 组 APN-11377 基因杂合程度明显区别于瑶族健康对照组,提示 APN-11377 基因多态性与 CHD 相关,也是 CHD 的一个危险因素。2 组 CHD 患者比较差异无统计学意义($P >$

0.05),提示 APN-11377 是该地区瑶族和汉族 CHD 的易感基因。

综上所述,血清低 APN 水平和 APN-11377 基因位点是广西地区汉族、瑶族 CHD 患者的易感因素。APN+45 基因位点是否是瑶族 CHD 的易感基因,还需增加样本量作进一步研究。

参考文献

- [1] 宋来凤. 冠心病[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:47.
- [2] Takemura Y, Uochi N, Shibata R, et al. Adiponectin, modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies[J]. J Clin Invest, 2007, 117(86):375-386.
- [3] Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2006, 12(2):163-168.
- [4] Wang Y, Lam KS, Xu JY, et al. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner [J]. Biol Chem, 2005, 280(18):341-347.
- [5] Matsuura F, Oku H, Koseki M, et al. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprote in assembly in the liver[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 58(4):1091-1095.
- [6] Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction[J]. Curr Hypertens Rep, 2003, 5(6):473-480.
- [7] 李长江, 张梅, 孙惠文, 等. 血管局部转染脂联素基因的抗动脉硬化作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(7):549-550.
- [8] 徐萍, 陈连凤, 王晋峰, 等. 脂联素对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达及细胞内胆固醇含量的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(6):427-430.
- [9] 孙琳, 廖羽, 叶琳, 等. FADS1/FADS2 基因多态性与冠心病发病的关联性分析[J]. 吉林大学学报:医学版, 2012, 38(1):115-118.
- [10] 何慧婧, 卫大英, 王淳秀, 等. 四川凉山汉族 2 型糖尿病与脂联素基因多态性[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(3):302-304.
- [11] 王遂军, 贾伟平, 包玉倩, 等. 脂联素基因多态性与代谢综合征相关性研究[J]. 中华实用诊断和治疗杂志, 2012, 26(7):659-661.
- [12] 陈芳, 武海亮, 王洁, 等. 脂联素水平及基因多态性与冠心病的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2011, 27(4):284-286.
- [13] 徐丽, 凌文华. 脂联素基因多态性研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2005, 4(25):1-3.
- [14] Kizer JR, Barzilay JI, Kuller LH, et al. Adiponectin and risk of coronary heart disease in older men and women [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(24):3357-3364.
- [15] 徐丽, 凌文华. 脂联素基因 SNP+45TG 单核苷酸多态性与冠心病的相关性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6):1064-1068.