

· 论 著 ·

脂联素基因 +45 位核苷酸 T/G 多态性与冠心病的相关性研究

罗素新¹, 雷 寒^{1Δ}, 柳 青², 马康华¹, 向 林², 曹娟娟²

(重庆医科大学附属第一医院: 1. 心血管内科; 2. 临床研究中心 400016)

摘要:目的 探讨脂联素基因 +45 位核苷酸 T/G 多态性与冠心病的相关性。方法 对 365 例研究对象进行选择性地冠状动脉造影, 根据造影结果和临床资料分为 3 组: 冠心病(CHD)组 221 例, 冠状动脉粥样硬化(CAS)组 44 例和正常对照(NC)组 100 例; 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法检测脂联素基因 +45 位核苷酸 T/G 多态性的基因型。结果 (1)所有研究对象中, 脂联素基因 +45 位核苷酸 TT 基因型占 46.85%, TG 基因型占 42.47%, GG 基因型占 10.68%。T 等位基因频率为 68.08%, G 等位基因频率为 31.92%。(2)CHD 组 TT、TG、GG 基因型和 T、G 等位基因频率与非 CHD 组及正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 脂联素基因 +45 位核苷酸 T/G 多态性与冠心病无明显相关, 提示脂联素基因可能不是冠心病的易感基因。

关键词:脂联素; 基因多态性; 冠心病

中图分类号: R541.402

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)12-1517-03

Study on the relationship between adiponectin +45 nucleotide T/G polymorphism and coronary heart disease

LUO Su-xin¹, LEI Han^{1Δ}, LIU Qing², et al.

(1. Department of Cardiology; 2. the Clinical Research Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genotype distribution of adiponectin +45 nucleotide T/G polymorphism and the relationship between the polymorphism and coronary heart disease. **Methods** 365 subjects were included; 221 coronary heart disease patients (CHD group), 44 coronary artery atherosclerosis patients (CAS group) and 100 healthy subjects (normal control, NC group). All subjects were confirmed by coronary angiography, and were genotyped for the polymorphism of adiponectin by polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. **Results** (1) The TT, TG and GG genotype frequencies of adiponectin +45 nucleotide T/G polymorphism among all subjects were 46.85%, 42.47% and 10.68%, respectively. The allelic frequencies were 68.08% for T allele and 31.92% for G allele. (2) The frequencies of TT, TG and GG genotype between CHD group and non-CHD group or NC group had no significant difference ($P>0.05$). The frequencies of T and G allele had no significant difference, too. **Conclusion** There was no relationship of the gene polymorphism of adiponectin +45 nucleotide T/G with coronary heart disease, and adiponectin gene may not be a susceptibility gene to coronary heart disease.

Key words: adiponectin; gene polymorphism; coronary heart disease

脂联素(adiponectin)是近年新发现的一种由脂肪细胞特异分泌的细胞因子, 一种具有重要保护作用的激素; 其基因位于染色体 3q27, 全长 16 kb, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成。目前已发现 10 余个脂联素基因常见的单核苷酸多态性(SNPs)及一些罕见的错义突变, 其中位于外显子 2 上的脂联素基因 +45 核苷酸位点存在 T→G 转换(Gly15Gly), 该多态性最为常见。已有研究表明该多态性与 2 型糖尿病和代谢综合征有关, 而与冠心病的相关性研究报道较少。本研究旨在了解该多态性与冠心病的相关关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择在本院心血管内科住院并连续进行冠状动脉造影的 398 例患者, 选取其中的 365 例患者进行了本研究。男 251 例, 女 114 例, 年龄 29~79 岁, 平均(64.15±10.34)岁。对所有研究对象询问病史并进行体格检查, 测量身高、体质量和血压, 并询问吸烟、高血压(hypertension, HP)、2 型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)、高脂血症病史。计算体质量指数(body mass index, BMI)=体质量/身高²(kg/m²)。入院次日清晨空腹 8 h 以上经前臂静脉采血, 测定血糖和血脂, 包括总

胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等。所有研究对象采用 INNOVA2000/2000S 数字减影血管造影机, 采用 Judkins 穿刺法经股动脉途径进行冠状动脉造影, 根据造影结果采用定量计算机分析(QCA)系统测定冠状动脉狭窄程度。根据冠状动脉造影结果及临床资料将研究对象分为 3 组: 冠心病(coronary heart disease, CHD)组; 冠心病的诊断系指冠状动脉造影至少有 1 支冠状动脉血管从两个以上不同角度均可以观察到直径减少大于或等于 50% 和临床上诊断为心肌梗死, 共 221 例, 男 166 例, 女 55 例, 其中中心绞痛 118 例, 急性或陈旧性心肌梗死 85 例, 其他类型 18 例。冠状动脉粥样硬化(coronary artery atherosclerosis, CAS)组: 冠状动脉造影血管狭窄程度达不到 50% 同时又不能诊断为心肌梗死者纳入该组。男 28 例, 女 16 例, 主要包括原因不明的胸痛、胸闷、心律失常、阵发性室上速行射频消融术前等共 44 例。正常对照组(normal control, NC): 冠状动脉造影血管完全正常者。共 100 例, 男 57 例, 女 43 例, 主要包括原因不明的胸痛、胸闷和阵发性室上速行射频消融术前, 已排除 HP、T2DM、高脂血症、痛风等疾病的人群。冠状动

^Δ 通讯作者, E-mail: qingliu5566@yahoo.cn。

脉造影时,通过放置的股动脉鞘采血 10 mL,加入已有适量 EDTA 的 50 mL 离心管中,混匀,置于一 20 ℃ 冰箱保存,用于提取基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 抽提 采用改进的 MILLER 盐析法提取基因组 DNA,根据 DNA 的线状分子大小(即总 DNA 的多少)加入 0.3~1.0 mL 不等的 TE 溶液。置于 4 ℃ 冰箱,待 DNA 充分溶解后,将其转移至 1 mL 小离心管中置于一 20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 脂联素基因的 PCR 扩增 以基因组脱氧核糖核酸(DNA)作为模板进行 PCR 扩增,扩增引物序列参照文献设计^[1],由上海英骏生物技术有限公司合成。上游引物:5'-GAA GTA GAC TCT GCT GAG ATG G-3',下游引物:5'-TAT CAG TGT AGG AGG TCT GTG ATG-3'。PCR 反应体系总体积 30 μL,包括上游引物(10 μM)0.6 μL,下游引物(10 μM)0.6 μL,DNA 模板 1.0 μL,Taq 酶(5 u/μL)0.3 μL,MgCl₂ (25 mM)1.8 μL,dNTP(2 mM)3.0 μL。充分混匀,瞬时离心后放入 PCR 仪进行扩增。反应条件为:预变性 95 ℃ 5 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 58 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 1 min,共 30 个循环,终末延伸 72 ℃ 10 min。取 5 μL PCR 产物,2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下呈现 372 bp 特异 PCR 扩增产物。

1.2.3 限制性片段长度多态性(RFLP)方法检测脂联素基因 Gly15Gly 多态性 取 PCR 扩增产物 8 μL,加入限制性核酸内切酶 Sma I (4 u)1 μL,10× 缓冲液 2 μL,30 ℃ 水浴箱酶切 2 h。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(90 V,30 min),凝胶成像系统扫描成像。

1.3 统计学方法 资料分析采用 SAS8.02 统计分析软件。以 Hardy-Weinberg 平衡检测样本的群体代表性。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析,两两比较用 SNK 检验;计数资料采用卡方分析(χ^2),Fisher 精确概率检验计算 P 值,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。用基因计数法计算各组基因型频率和等位基因频率。等位基因数计算:采用平衡法: $T = 2TT + TG, G = 2GG + TG$ 。等位基因频率计算:采用平衡法: $T = TT + 1/2 TG, G = GG + 1/2 TG$ 。

2 结 果

2.1 CHD、CAS 患者和 NC 组的临床和生化特点 由表 1 可见,3 组研究对象间年龄和体质量指数具有可比性,冠心病组男性比例、TG 和 LDL-C 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$);冠心病组男性比例也高于 CAS 组。冠心病组和 CAS 组伴随的高血压病、高脂血症和 2 型糖尿病比例与正常对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。CHD 组除男性比例更高外 ($P < 0.05$),其余各项与 CAS 组比较差异无统计学意义。以上结果

说明 CHD 组和 CAS 组均存在相似的脂代谢紊乱、高胰岛素血症和高血压。

2.2 脂联素基因的 PCR 扩增和酶切结果 脂联素基因 PCR 扩增产物为 372 bp 的片段。PCR 扩增产物经限制性核酸内切酶 Sma I 酶切后,可出现 3 种片断大小的组合,分别为野生纯合子 TT 显示 1 条带(372 bp);突变纯合子 GG 显示为两条带 GG(216 bp 和 156 bp);突变杂合子 TG 显示 3 条带 TG(372 bp、216 bp 和 156 bp)。脂联素基因外显子 2 上+45 位核苷酸存在 T/G 多态性为同义突变即 GGT→GGG(Gly15Gly)。当+45 位核苷酸为 G 时,存在 Sma I 限制性内切酶的酶切位点,而为 T 时则该酶切位点消失。因此,当基因型为 GG 时,酶切产物电泳后有 156 bp 和 216 bp 2 条带;基因型为 TT 时,只有 372 bp 1 条带;基因型为 TG 时,有 156 bp、216 bp 和 372 bp 3 条带(图 1)。本组 365 例研究对象用 PCR-RFLP 方法确定基因型,其中 TT 基因型有 171 例,占 46.85%,TG 基因型有 155 例,占 42.47%,GG 基因型 39 例,占 10.68%。T 等位基因频率为 68.08%,G 等位基因频率为 31.92%。

表 1 研究对象的临床和生化特点

组别/指标	CAD (n=221)	CAS (n=44)	NC (n=100)
性别(男/女)	166/55 ^{Δ*}	28/16	57/43
年龄(岁)	64.90±10.50	64.05±8.98	62.52±9.10
BMI(kg/m ²)	24.20±3.08	24.35±3.62	23.89±2.99
TC(mmol/L)	4.51±1.05	4.35±0.88	4.19±0.80
TG(mmol/L)	2.06±1.73 ^Δ	1.81±1.27	1.49±0.98
HDL(mmol/L)	1.10±0.31	1.12±0.52	1.21±0.39
LDL(mmol/L)	2.62±0.89 ^Δ	2.36±0.62	2.14±0.54
HP(%)	129(58.37) ^Δ	28(63.64) [#]	0
高脂血症(%)	97(43.89) ^Δ	17(38.64) [#]	0
T2DM(%)	48(21.72) ^Δ	5(11.36) [#]	0

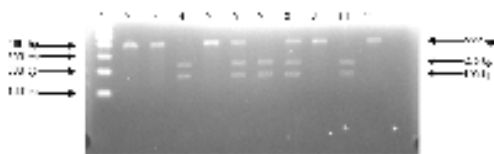
CHD 与 NC 组比较差异有统计意义,^Δ: $P < 0.05$;CHD 与 CAS 组比较差异有统计学意义,* : $P < 0.05$;CAS 与 NC 组比较差异有统计意义,[#] : $P < 0.05$ 。

2.3 各组脂联素基因型频率和等位基因频率的分布(表 2) 因 CAS 组病例数较少,将其和 NC 组合并为非 CHD 组进行分析,统计结果表明 CHD 组和非 CHD 组以及 CHD 组和 NC 组之间脂联素基因型频率和等位基因频率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 3 组脂联素基因型频率和等位基因频率比较

组别	n	脂联素基因型(基因数/频率)			等位基因(基因数/频率)	
		TT	TG	GG	T	G
CHD	221	100(45.25)	99(44.80)	22(9.95)	299(67.65)	143(32.35)
Non-CHD	144	71(49.31)	56(38.89)	17(11.80)	198(68.75)	90(31.25)
NC	100	50(50.00)	41(41.00)	9(9.00)	141(70.50)	59(29.50)

CHD 组表示冠心病组,Non-CHD 组表示非冠心病组,NC 组表示正常对照组;TT,TG,GG 表示基因型,T,G 表示等位基因;CHD 与 Non-CHD 比较, $P > 0.05$,CHD 与 NC 比较, $P > 0.05$ 。



1 为 DNA 分子 Marker;2、3、5、9、11 为 TT 基因型;6、8 为 TG 基因型;4、7、10 为 GG 基因型。

图 1 脂联素基因+45 位多态性分型结果

3 讨论

脂联素作为脂肪细胞特异分泌的细胞因子,在多种疾病状态中其血清水平明显降低,提示脂联素具有多方面的保护作用。多项临床研究^[2-3]发现冠心病患者脂联素的水平显著低于无冠心病者,提示脂联素水平下降可能是冠状动脉粥样硬化发生发展的重要危险因素。

实验研究^[4]表明脂联素可能通过参与动脉粥样硬化形成的各个环节而对冠状动脉疾病起到保护作用。在对转基因小鼠-脂联素缺陷[adipo(-/-)]小鼠的研究^[5]发现,adipo(-/-)小鼠血管受到球囊扩张损伤后,发生了较野生型小鼠更为严重的内膜增厚,为脂联素在生物体内抗动脉粥样硬化的作用提供了直接证据。

脂联素基因定位于染色体 3q27,由 3 个外显子和 2 个内含子组成,脂联素由 2 号及部分 3 号外显子编码。目前已经发现脂联素基因存在多个突变位点。有研究^[6]认为脂联素基因可能是 T2DM 的易感基因。多数研究表明脂联素基因多态性与 T2DM、胰岛素抵抗及肥胖相关^[6-7]。

脂联素基因的突变与冠心病的相关报道较少。有研究^[8]发现在脂联素基因内含子 276 位上为 G/G 基因型的个体患冠心病的危险性比 T/T 基因型的个体明显增加,即 276 位上 G→T 变异可减少冠心病的发生。但 Filippi 等^[9]报道脂联素基因内含子 276 位上为 G/G 基因型的个体只在早发(≤50 岁)患者中患冠心病的危险性增加,在晚发冠心病患者中起决定作用的则是其他的心血管危险因素。

Dhashi 等^[10]对 383 例血管造影确诊的冠状动脉疾病者及 368 例非冠状动脉疾病者取血样,通过 Tapman PCR 来检测脂联素基因的单核苷酸多态性,或 PCR 分析检测法来分析限制性酶切片段的多态性,结果发现 SNP276 与冠状动脉疾病的发生及血浆脂联素水平不相关。同时发现冠状动脉疾病患者和代谢综合征患者 I164T 的突变率明显高于对照组,I164T 的突变者血浆脂联素水平明显低于无突变者,无体质量指数依赖性,故认为在日本人群中脂联素基因 I164T 突变是代谢综合征及冠状动脉疾病发生的共同基因背景,但 I164T 突变率极低,在 CHD 患者为 2.9%,在正常人群为 0.8%。

对脂联素基因外显子 2 上最为常见的+45 位 T/G 多态性与冠心病发病之间的关系报道结果亦不尽一致。本研究对 221 例通过冠脉造影和临床证实的冠心病患者采用 PCR-RFLP 方法分析脂联素基因+45 位 T/G 多态性。结果表明,冠心病组和非冠心病组之间及冠心病组和正常对照组之间脂联素基因型频率和等位基因频率差异均无统计学意义,与文献报道^[8-10]基本一致。Bacci 等^[8]研究发现脂联素 SNP+45 与意大利 T2DM 患者是否伴发冠心病无相关关系。Filippi 等^[9]研究发现无论在早发(≤50 岁)还是晚发冠心病患者中脂联素基因 SNP+45 与冠心病的发病风险无明显相关。但 Lacquemant 等^[11]对高加索人中单纯的 T2DM 和合并有冠心病的 T2DM 患者之间比较脂联素 SNP+45 的研究发现,不论单变

量分析还是多变量分析,SNP+45 即 T→G 变异均与冠心病发病显著相关($P<0.01$),而且 SNP+45T→G 易患冠心病的风险独立于其他的传统心血管危险因素。虽然脂联素基因 SNP+45 在冠心病的发生发展中的作用还需要进一步的研究来证实,该作者也认为,脂联素可能促成了高风险人群如 T2DM 患者更易患冠状动脉粥样硬化疾病。

本研究结果表明脂联素基因+45 位核苷酸 T/G 多态性与重庆地区汉族人群中冠心病无明显相关性,提示脂联素基因可能不是冠心病的易感基因。究竟脂联素基因+45 位 T/G 多态性与冠心病的关系如何,可能需要更大样本、分层、分亚组进一步研究验证。

参考文献:

- [1] Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, 24(7): 861.
- [2] 罗素新, 雷寒. 脂联素与冠心病及其危险因素的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2006, 35(14): 1318.
- [3] 罗素新, 雷寒, 马康华, 等. 急性冠脉综合征患者血清脂联素与高敏 C 反应蛋白的关系 [J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(6): 791.
- [4] Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30 [J]. *Nat Med*, 2002, 8: 731.
- [5] Matsuda M, Shimomura I, Sata M, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 37487.
- [6] Hara K, Boutin P, Mori Y. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population [J]. *Diabetes*, 2002, 51(2): 536.
- [7] Stumvoll M, Tschrirter O, Fritsche A, et al. Association of the T→G polymorphism in adiponectin (Exon2) with obesity and insulin sensitivity [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 37.
- [8] Bacci S, Menzaghi C, Ercolino T, et al. The +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with coronary artery disease in type 2 diabetic patients [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(8): 2015.
- [9] Filippi E, Sentinelli F, Romeo S, et al. The adiponectin gene SNP+276G>T associates with early-onset coronary artery disease and with lower levels of adiponectin in younger coronary artery disease patients (age <or= 50 years) [J]. *J Mol Med*, 2005, 83(9): 711.
- [10] Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, et al. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(7): 1195.
- [11] Lacquemant C, Froguel P, Lobbens S, et al. The adiponectin gene SNP+45 is associated with coronary artery disease in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus [J]. *Diabet Med*, 2004, 21(7): 776.