

LOX-1 基因多态性与浙东地区汉族人群冠心病不相关

周军波 许丽敏 杨 曦 徐卫峰 陈治奎 姜庆军 胡万英 廉姜芳 葛世俊 周建庆

摘要 目的 本研究在中国浙东地区汉族人群中,探讨氧化低密度脂蛋白受体基因单核苷酸多态性与冠心病患病风险的关联性。**方法** 对 159 例冠心病患者和 106 例非冠心病者样本采用 4 管 SYBR-PCR 结合融解曲线方法进行 G501C 等位基因型的检测,进而作出基因诊断。随机选取 50 份经荧光定量 PCR 分型的标本进行 DNA 测序鉴定。**结果** 4 号外显子上的 G501C 基因多态性在冠心病患者组和对照组中的基因型分布和等位基因频率差异无统计学意义($P>0.05$)。经过荟萃分析,也没有发现 G501C 与 CAD 的关联性。**结论** G501C 基因位点多态性可能与浙东地区汉族人群 CAD 的发病无相关性,不能作为冠心病的遗传易感标志。

关键词 冠心病 血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 单核苷酸基因多态性 关联分析 荟萃分析

Negative Association Between Variants of LOX-1 Gene and Coronary Artery Disease in Han Population of Eastern Area of Zhejiang Province. Zhou Junbo, Xu Limin, Yang Xi, Xu Weifeng, Chen Zhikui, Jiang Qingjun, Hu Wanying, Lian Jiangfang, Ge Shijun, Zhou Jianqing. Medical Centre of Ningbo, Lihuili Hospital, Zhejiang 315040, China

Abstract Objective To investigate the association of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene polymorphisms with coronary artery disease (CAD) in Han population of eastern area of Zhejiang Province. **Methods** The polymorphisms of gene LOX-1 G501C were measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with SYBR-Green I (SYBR-PCR) combined with dissociation curve (DC) analysis in 159 patients with CAD (CAD group) and 106 non coronary artery disease patients (control group). Fifty samples were chosen to determine the genotype by DNA sequencing. **Results** The frequencies of G501C gene polymorphism in CAD group were not significantly different from those in control group ($P>0.05$). Through the meta-analysis, we found that G501C was not associated with CAD. **Conclusion** G501C gene polymorphism may have no association with the pathogenesis of CAD in Han population of eastern area of Zhejiang Province. It is not the hereditary susceptible sign of CAD.

Key words Coronary artery disease; The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1; Single nucleotide polymorphism; Association analysis; Meta-analysis

已有大量证据表明血凝素样氧化低密度脂蛋白受体(lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1)与血管炎症、动脉粥样硬化斑块形成、进展和不稳定有关。国内外的多个研究均证实,LOX-1 可以被氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)、血管紧张素 II 等多种介质所诱导,并且在糖尿病、高血压、血脂紊乱等疾病状态中表达增加。国外已有多个对 LOX-1 基因多态性与冠心病发病风险的研究,但由于种族、病例数等的差别,得到的结果有较大差异,特别是针对国内人群

所开展的相关研究,目前还较少,因此开展这方面的深入研究很有必要。本研究旨在研究 LOX-1 基因外显子 4 G501C 单核苷酸多态性与冠心病发病的相关性,初步探讨遗传因素对冠心病的影响。

材料与方法

1. 对象:选择 2008 年 5 月~2010 年 4 月于宁波市医疗中心李惠利医院心内科住院的患者。其中 CAD 患者 159 例为 CAD 组(男性 116 例,女性 43 例,平均年龄 64.0 ± 10.1 岁),所有病例均经冠状动脉造影证实至少一支冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 。选择经冠状动脉造影排除冠心病者 106 例为对照组(男性 49 例,女性 57 例,平均年龄 $\geq 59.0 \pm 10.0$ 岁)。以上受检者均为浙东地区汉族人,排除先天性心脏病、心肌病和严重肝、肾疾病。

2. 方法:(1)提取基因组 DNA:取得患者知情同意后,于冠脉造影时抽取动脉血 10ml, EDTA 抗凝。常规苯酚-氯仿法抽提白细胞基因组 DNA, TE 溶解。紫外分光光度计(Amersham, 美国热电)测定 DNA 纯度与浓度后, -20°C 保存。(2)PCR 扩增:采用 4 管 SYBR-PCR 结合融解曲线方法,对

基金项目:宁波市医学科技计划项目(200802);宁波市自然科学基金资助项目(2008A610081)

作者单位:315040 宁波市医疗中心李惠利医院(周军波、杨曦、徐卫峰、陈治奎、姜庆军、胡万英、廉姜芳、葛世俊、周建庆);315211 宁波大学医学院(许丽敏)

通讯作者:廉姜芳,电子邮箱:hjmpin@163.com

G501C 进行等位基因型的检测,具体引物序列及样品设置参见文献[1]。根据人 *Lox-1* 基因(GenBank:DQ314885)序列,利用 Primer 5.0 对引物进行验证。引物序列由大连宝生物工程技术服务公司合成。每个样品设立 4 个定量 PCR 检测管,分别加入不同的上下游引物用于检测健康和突变的等位基因,同时设立阳性和阴性对照。PCR 反应体系为:mix 9ml(已加入 SYBR GREEN 染料),上下游引物各 0.4 μ l, DNA 模板 1 μ l,加双蒸水至总体积 20 μ l(荧光定量 PCR 试剂盒购自天根生化科技有限公司)。在 iCycler iQ PCR 扩增仪(BIO-RAD, 美国)进行 PCR 扩增。两个位点 PCR 反应条件均为:95 $^{\circ}$ C 预变性 1min,然后按 94 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 40s 进行 40 个循环,终末延伸 72 $^{\circ}$ C 5min。扩增循环结束后,对 PCR 产物以 0.5 $^{\circ}$ C/s 做 55 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 的融解曲线分析。根据定量 PCR 仪的分析软件获得的 Ct 值和融解曲线分析结果来判定样品的 SNP 类型。反应结束后,取 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪(BIO-RAD Quantity one,美国)验证 PCR 扩

增产物的单一性。(3)样本测序:随机选取 50 例样本,提供引物及 PCR 产物,由南京金斯瑞生物科技有限公司测序,以验证荧光定量 PCR 检测结果。G501C 位点测序引物为上游:5'-CACAAACATAACTGACTGATGAG-3',下游:5'-TAGAGATACTACAGAGCCTGTCC-3',PCR 产物:356bp。

3. 统计学方法:数据用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,*P* 值用 CLUMP22 软件计算。各组基因型及等位基因频率用 χ^2 检验,利用拟合优度 χ^2 检验的方法检验基因频率是否符合 Hardy Weinberg 遗传平衡定律。计量资料组间均数比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 对两组冠心病危险因素进行比较:结果显示,吸烟史和高血压史在冠心病组显著高于对照组(*P* < 0.01),而糖尿病史和冠心病家族史两组之间的差异无统计学意义(*P* > 0.05)(表 1)。

表 1 两组冠心病危险因素的比较

组别	<i>n</i>	高血压史		吸烟史		糖尿病史		家族史	
		有	无	有	无	有	无	有	无
CAD 组	159	106	53	75	84	25	134	4	155
对照组	106	53	53	30	76	14	92	2	104
χ^2		7.36		9.46		0.32		1.28	
<i>P</i>		<0.01		<0.01		>0.05		>0.05	

2. 每个样品进行 4 个平行的定量 PCR 反应:分别获得阳性、阴性对照及两种等位基因扩增产物的 Ct 值和融解曲线分析结果。图 1A 显示,检测突变型和阳性对照的 PCR 产物的 Ct 值一致,而检测野生型和阴性对照的 PCR 产物的 Ct 值接近,融解曲线分析结果一致, DNA 测序结果显示该样品 DNA 等位基因是 501CC。图 1B 显示检测野生型、突变型和阳性对照的 PCR 产物的 Ct 值一致,融解曲线分析结果一致, DNA 测序结果显示该样品 DNA 等位基因是 501GC。图 1C 显示,检测野生型和阳性对照的 PCR 产物的 Ct 值接近,大约是 23.7;而检测突变型和阴性对照的 PCR 产物的 Ct 值接近,大约是 28.2。融解曲线分析结果与 Ct 值一致。DNA 测序结果显示该样品等位基因是 501GG。定量 PCR 的基因分型结果与 DNA 测序结果均相符。

3. 研究对象的 G501C 位点的基因型分布:经拟合优度 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 平衡,表明患者来自同一群体。

4. G501C 基因多态性在 CAD 组及对照组中均存在 G/G、G/C、C/C 3 种基因型:其中 G/G、G/C、C/C 3 种基因型在 CAD 组与对照组分别占 62.3%、35.8%、

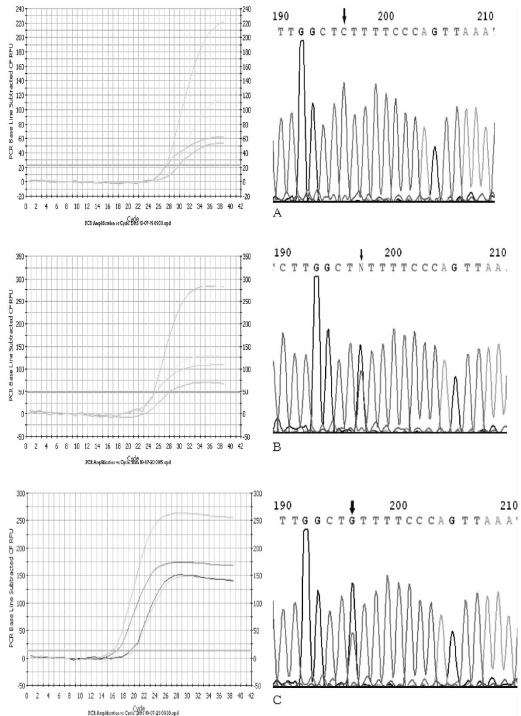


图 1 SYBR-GREEN 荧光定量 PCR 对 LOX-1 外显子 4501G > C 的基因分型及对应的 DNA 测序

荧光定量 PCR 结果和 DNA 测序结果相对应,A、B、C 图依次对应的是 CC、GC、GG 型

1.9% 和 64.2%、33.0%、2.8%, 进行 χ^2 检验。CAD 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 CAD 组与对照组 G501C 基因多态性基因型及等位基因频率分布

组别	基因型			等位基因	
	GG	GC	CC	G	C
CAD 组	99 (62.3%)	57 (35.8%)	3 (1.9%)	255 (80.2%)	63 (19.8%)
对照组	68 (64.2)	35 (33.0%)	3 (2.8%)	171 (80.7%)	41 (19.3%)
χ^2	0.43			0.02	
P	0.759			0.912	

讨 论

人 LOX-1 由 273 个氨基酸组成, 包括胞质内 N 端, 跨膜区, 胞外的颈区和 C 型血凝素样结构域。多个证据支持 LOX-1 对动脉粥样硬化形成起作用。Aoyama 等研究了人的 LOX-1 基因 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1, OLR-1), 发现它是一个单拷贝基因, 位于 12 号染色体短臂的 p12.3 ~ p13.2 区域, 由 6 个外显子和 5 个内含子组成, 共 7000 个碱基对。外显子 4 G501C 的基因变化导致了 K167N 的错义突变。167 位氨基酸残基位于 LOX-1 胞外的 C-血凝素样区域, 已经有实验表明血凝素样区域对配体的识别和结合很重要^[2]。Ohmori 等人检测了 586 名进行冠脉造影的患者 G501C 的基因多态性发现, 病例组 CC + CG 基因型频率明显低于正常/轻微狭窄组 (36% vs 49%, $P < 0.01$)。按照冠心病严重程度分级, CC + CG 基因型频率分别为: 正常/轻微狭窄 (狭窄 < 25%) 组 49%, 轻度狭窄 (狭窄 26% ~ 50% 之间) 组 41%, 狭窄 > 50% 的 3 个亚组中单支病变组 39%, 2 支病变组 35%, 3 支病变组 32%, 多因素分析显示 CC + CG 基因型频率与狭窄严重程度呈负相关 ($OR = 0.61$; 95% CI: 0.41 ~ 0.92)^[3]。但在本研究中, G501C 基因位点基因型频率和等位基因频率在冠心病组和对照组之间差异均无统计学意义, 这与

Elisabetta Trabetti、Sentinelli 等人的研究结果相符^[4,5]。不同的研究得出的结果不同, 可能与种族差异、病例数不同有关。

CAD 的发病存在着遗传异质性并且受环境因素的影响, 不同的基因突变均可能导致 CAD, 但不同的基因突变引起的临床表型可能不同, 如性别差异、CAD 中存在的某些特殊的病理或生物学特征即中间表型 (这些中间表型能反映其发展早期或中期病理变化的一系列生化或生理性状)、发病年龄和疾病的严重程度等, 从而可导致易感基因研究结果的不一致。在多基因疾病中, 仅仅一个易感基因并不意味着高风险。事实上, 大多数的携带者虽然存在着某些生物学缺陷即中间表型, 但并不表现任何的临床症状。

经过搜索 PUBMED, EMBASE, SpringLink 等数据库, 以及参考一些研究的文献, 将一些研究成果与本研究的结果进行比较, 表 3 列举了 G501C 基因多态性与 CAD 相关性的部分研究。从 2003 年至今选取了 10 份病例-对照组的研究与本研究的结果进行分析比较, 总共分析了 5679 个病例和 15511 个对照的情况。

表 3 和表 4 分别呈现了显性模式和隐性模式下 G501C 基因多态性和 CAD 的关联性。在显性模式

表 3 在荟萃分析 (显性模式) 中 G501C 和 CAD 的关系

研究团队	病例组		对照组		OR (95% CI)	P
	GC + CC	总数	GC + CC	总数		
Mango, et al ^[6]	13	150	18	103	0.45 (0.21 ~ 0.96)	0.051
Tatsuguchi, et al ^[7]	39	102	18	102	2.89 (1.51 ~ 5.52)	0.002
Ohmori, et al ^[3]	151	419	63	128	0.58 (0.39 ~ 0.87)	0.009
Trabetti, et al ^[4]	52	350	84	637	1.15 (0.79 ~ 1.67)	0.494
Shan, et al ^[1]	58	202	60	161	0.68 (0.44 ~ 1.05)	0.097
Morgan, et al ^[8]	795	803	646	649	0.46 (0.12 ~ 1.75)	0.364
Knowles (ADVANCE study), et al ^[9]	301	1,808	409	1731	0.65 (0.55 ~ 0.76)	<0.00001
Knowles (ARIC study), et al ^[9]	347	1,470	2299	11755	1.27 (1.12 ~ 1.45)	<0.00001
Kurnaz, et al ^[10]	23	91	33	72	0.40 (0.21 ~ 0.78)	0.008
Predazzi, et al ^[11]	36	265	13	67	0.65 (0.32 ~ 1.32)	0.248
本研究	60	159	38	106	1.08 (0.65 ~ 1.80)	0.794

表 4 在荟萃分析(隐性模式)中 G501C 和 CAD 的关系

研究团队	病例组		对照组		OR(95% CI)	P
	CC	总共	CC	总共		
Mango, <i>et al</i> ^[6]	0	150	1	103	0.23(0.01 ~ 5.63)	0.402
Tatsuguchi, <i>et al</i> ^[7]	3	102	1	102	3.06(0.31 ~ 29.93)	0.619
Ohmori, <i>et al</i> ^[3]	25	419	10	128	0.75(0.35 ~ 1.60)	0.523
Trabetti, <i>et al</i> ^[4]	2	350	6	637	0.60(0.12 ~ 3.01)	0.719
Shan, <i>et al</i> ^[1]	9	202	5	161	1.45(0.48 ~ 4.43)	0.599
Morgan, <i>et al</i> ^[8]	649	803	543	649	0.8(0.63 ~ 1.08)	<0.00001
Knowles (ADVANCE study), <i>et al</i> ^[9]	18	1,808	28	1731	0.61(0.34 ~ 1.11)	0.109
Knowles (ARIC study), <i>et al</i> ^[9]	25	1,470	234	11755	0.85(0.56 ~ 1.29)	0.479
Kurnaz, <i>et al</i> ^[10]	2	91	2	72	0.79(0.11 ~ 5.72)	1.000
Predazzi, <i>et al</i> ^[11]	36	265	3	67	3.35(1.00 ~ 11.25)	0.050
本研究	3	159	3	106	0.70(0.13 ~ 3.38)	0.681

下,7 个研究(1,3,6,8 ~ 11)显示突变降低了 CAD 的风险,3 个已有研究(4,7,9)和本研究显示突变能增加 CAD 的风险。在隐性模式下,7 个已有研究(3,4,6,8 ~ 10)和本研究显示突变降低了 CAD 的风险,而 3 个研究(1,7,11)显示突变能增加 CAD 的风险。经过荟萃分析,不管是在显性模式还是隐性模式中,G501C 与 CAD 都没有显著的关联性。

可以发现,不同时期和不同国家的研究结果差异很大,这可能跟病例数较少以及种族之间的差异有很大的关联性,因此开展这方面的深入研究非常必要。本研究的总病例数仅 265 例,如能开展更大规模的研究,应可以得到更加准确的结果。总之,本研究显示 LOX - 1 基因 G501C 位点的基因多态性与冠心病发病无显著关联。

参考文献

1 单志新,符永恒,周志凌,等. Lox - 1 基因 501G > C 和 3'UTR188C > T 多态性与急性心肌梗死发病的相关性[J]. 热带医学杂志, 2007,7(11):1048 - 1051

2 Chen M, Narumiya S, Masaki T, *et al*. Conserved C - terminal residues within the lectin - like domain of LOX - 1 are essential for oxidized low - density - lipoprotein binding[J]. Biochem J,2001,355: 289 - 296

3 Ohmori R, Momiyama Y, Nagano M, *et al*. An oxidized lowdensity lipoprotein receptor gene variant is inversely associated with the severity of coronary artery disease[J]. Clin Cardiol,2004,27:641 - 644

4 Elisabetta T, Michele B, Ugo C, *et al*. On the association of the oxidised LDL receptor 1(OLR1) gene in patients with acute myocardial

infarction or coronary artery disease[J]. European Journal of Human Genetics,2006,14:127 - 130

5 Sentinelli F, Filippi E, Fallarino M, *et al*. The 3'UTR C > T polymorphism of the oxidized LDL - receptor 1 (OLR1) gene does not associate with coronary artery disease in Italian CAD patients or with the severity of coronary disease[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis,2006, 16:345 - 352

6 Mango R, Clementi F, Borgiani P. Association of single nucleotide polymorphisms in the oxidised LDL receptor 1 (OLR1) gene in patients with acute myocardial infarction[J]. J Med Genet,2003,40: 933 - 936

7 Tatsuguchi M, Furutani M, Hinagata J, *et al*. Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,303:247 - 250

8 Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, *et al*. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a largescale replication study[J]. JAMA,2007,297:1551 - 1561

9 Knowles JW, Assimes TL, Boerwinkle E, *et al*. Failure to replicate an association of SNPs in the oxidized LDL receptor gene (OLR1) with CAD[J]. BMC Med Genet,2008, 9:23

10 Kurnaz O, Aydogan HY, Isbir CS, *et al*. Is LOX - 1. K167N polymorphism protective for coronary artery disease? [J]. In Vivo,2009,23: 969 - 973

11 Predazzi IM, Martinez - Labarga C, Vecchione L, *et al*. Population differences in allele frequencies at the OLR1 locus may suggest geographic disparities in cardiovascular risk events[J]. Ann Hum Biol, 2010,37:136 - 148

(收稿:2011 - 11 - 11)
(修回:2012 - 04 - 05)