

· 临床流行病学 ·

内皮型一氧化氮合成酶基因 G894T 变异与早发冠心病的关系

贾崇奇 宁艳 刘同涛 刘兆兰

【摘要】 目的 探讨内皮型一氧化氮合成酶基因第 7 外显子 G894T 变异(Glu298Asp)与早发冠心病之间的关系。方法 以医院为基础的病例对照研究,选择新诊断的冠心病患者为研究对象。男性 55 岁以前及女性 65 岁以前患冠心病为早发冠心病。以 132 例早发冠心病患者为病例组,172 例迟发冠心病患者为对照组。运用 PCR-限制性片段长度多态性检测 G894T 变异。结果 G894T 变异基因型频率早发冠心病组(TT、GT、GG 频率分别为 6.06%、20.45%、73.48%)显著高于迟发冠心病组(TT、GT、GG 频率分别为 1.74%、11.63%、86.63%)($P=0.01$)。T 等位基因频率早发冠心病组(16.29%)也显著高于迟发冠心病组(7.56%)($P=0.001$), $OR=2.38$,95% $CI:1.38\sim 4.16$ 。在 $\alpha=0.05$ 显著性水平上,用多元逐步非条件 logistic 回归调整性别、吸烟、饮酒、超重后,G894T 变异对早发冠心病仍具有显著影响($P=0.01$), $OR=2.25$,95% $CI:1.19\sim 4.26$ 。结论 eNOS 基因 G894T 变异可能是早发冠心病发病的重要危险因素之一。

【关键词】 冠心病;一氧化氮合成酶,内皮型;基因

Association between G894T mutation in endothelial nitric oxide synthase gene and premature coronary heart disease JIA Chong-qi*, NING Yan, LIU Tong-tao, LIU Zhao-lan. *Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China

【Abstract】 Objective To assess the association between G894T (Glu298Asp) mutation in exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and premature coronary heart disease (P-CHD). **Methods** Hospital-based case-control study was conducted. Newly-diagnosed CHD patients were recruited as study subjects. 132 CHD patients diagnosed at/before age 55 for males and 65 for females were assigned to P-CHD case group with other 172 CHD patients as the control group. Polymerase chain reaction with Ban II restriction enzyme digestion was performed to detect the G894T mutation. **Results** G894T mutant genotypes in P-CHD group (TT, GT and GG frequencies were 6.06%, 20.45% and 73.48%, respectively) were significant higher than those in control group (TT, GT and GG frequencies were 1.74%, 11.63% and 86.63%, respectively) ($P=0.01$). Mutant T allele frequency in P-CHD group was also significantly higher than that in control group (16.29% versus 7.56%, $P=0.001$, $OR=2.38$, 95% $CI:1.38-4.16$). Stepwise multiple logistic regression analysis at 0.05 significant level with sex, smoking, alcohol drinking, and overweight covariates indicated that G894T mutation also having significant effect on P-CHD ($P=0.01$, $OR=2.25$, 95% $CI:1.19-4.26$). **Conclusion** This study suggested that G894T mutation in endothelial nitric oxide synthase gene might serve as a major risk factor to the pathogenesis of P-CHD in this study population.

【Key words】 Coronary heart disease; Nitric oxide synthase, endothelial; Gene

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是包括我国在内世界许多国家的主要死因与疾病负担,因此深入探讨该病的发病机理,对该病的防制与诊治具有重要意义。众多研究证实,遗传因素在冠心病发

病中具有重要作用,但早发和迟发病例在遗传背景方面存在巨大差异。有资料显示^[1],遗传度估计值在早发冠心病病例家庭中为 90%~100%,而在迟发病例家庭中则仅为 15%~30%。内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)通过合成一氧化氮(NO)在心血管系统中具有重要作用近年来颇受关注。动物实验研究表明^[2],除去 eNOS 基因的小鼠,易患动脉粥样硬化,导致冠心病的发生。eNOS 基因第 7 外显子

作者单位:250012 济南,山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学研究所(贾崇奇、宁艳、刘兆兰);山东大学齐鲁医院心内科(刘同涛)

G894T 变异(Glu298Asp)与人群冠心病及心肌梗死关系研究较多,但结果不一。然而该变异是否与早发冠心病相关,目前报道罕见,我们对其进行初步探讨,现报道如下。

对象与方法

1. 研究对象:本研究所有冠心病患者均为 2002 年 6 月至 2004 年 1 月期间,来齐鲁医院心内科就诊而确诊的新发病例。早发冠心病与迟发冠心病的年龄界定按参考文献[3]。以早发冠心病为病例组,以迟发冠心病为对照组。

2. 血样采集:取研究对象的空腹肘静脉血 5 ml,其中 1 ml 用 EDTA-Na₂ 抗凝,用于基因组 DNA 提取;4 ml 分离血清,用于血脂指标检测。

3. 基因组 DNA 提取:用常规的十二烷基硫酸钠(SDS)及蛋白酶 K 消化,酚/氯仿提纯,乙醇沉淀。

4. G894T 变异检测:方法详见参考文献[4]。

5. 血清生化指标检测:血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)用酶法测定,试剂由北京中生生物工程高技术公司提供。

6. 统计学分析:用 Stata 8.0 软件,计数资料用 χ^2 检验,选用 Fisher's 确切概率;计量资料用方差分析;多因素分析用多元逐步非条件 logistic 回归分析。

结 果

1. 早发与迟发冠心病组一般资料比较:结果见表 1。性别构成、吸烟、饮酒、体重指数(BMI)、TG 两组之间差异有统计学意义,而 TC 两组之间差异无统计学意义。

2. 早发与迟发冠心病组 eNOS 基因 G894T 变异基因类型和等位基因频率分析:结果见表 2。G894T 变异基因型及 T 等位基因频率早发冠心病

组皆显著高于迟发冠心病组。

表1 早发与迟发冠心病组一般资料比较

变 量	早发组(n=132)	迟发组(n=172)	P 值
性别(男/女)	80/52	129/43	<0.010
年龄(岁)	49.84 ± 7.63	68.59 ± 7.82	<0.001
吸烟(吸/不吸)	55/77	48/124	<0.050
饮酒(饮/不饮)	36/96	20/152	<0.001
BMI(kg/m ²)	26.55 ± 3.27	25.16 ± 3.60	<0.001
TG(mmol/L)	1.95 ± 1.31	1.64 ± 1.09	<0.050
TC(mmol/L)	5.42 ± 1.15	5.25 ± 1.20	>0.050

注:年龄、BMI、TG、TC 为 $\bar{x} \pm s$,余为例数

3. eNOS 基因 G894T 变异与早发冠心病关系的多因素分析:在 $\alpha = 0.05$ 显著性水平上,以多元逐步非条件 logistic 回归分析,调整性别、吸烟、饮酒、超重后,G894T 变异对早发冠心病仍具有显著性影响,结果见表 3。

讨 论

内源性 NO 是由一氧化氮合成酶(NOS)催化 L-精氨酸末端胍基中的一个氮原子氧化生成。在心血管系统中,NO 具有扩张血管^[5]、抑制血小板粘附与聚集^[6]、抑制平滑肌细胞增殖^[7]、抑制低密度脂蛋白氧化^[8]等重要生理功能。eNOS 是心血管系统中合成 NO 的主要酶,因而其在冠心病的发病中具有重要作用。动物实验研究表明^[2],敲除 eNOS 基因的小鼠易患动脉粥样硬化,导致冠心病的发生。抑制 NOS 可加速早期动脉粥样硬化斑块的形成^[9]。

eNOS 基因第 7 外显子第 78 位碱基即编码序列第 894 位碱基发生 G 突变为 T(G894T),导致第 298 位氨基酸残基发生谷氨酸被天门冬氨酸替代(Glu298Asp)。有研究表明^[10-12],Glu298Asp 变异与冠心病及急性心肌梗死的发生显著相关,但也有研究显示^[13,14],该变异与冠心病的发病无相关关系。

表2 早发与迟发冠心病组 G894T 基因型与等位基因频率比较

基因型(例数)	男 性		女 性		合 计	
	早发组	迟发组	早发组	迟发组	早发组	迟发组
TT	5	2	3	1	8	3
GT	17	18	10	2	27	20
GG	58	109	39	40	97	149
三组比较的确切概率	0.059		0.050		0.011	
TT+GT 与 GG 比较的确切概率	0.050		0.027		0.005	
等位基因频率(%)						
T	16.88	8.53	15.39	4.65	16.29	7.56
G	83.12	91.47	84.61	95.35	83.71	92.44
确切概率	0.012		0.018		0.001	
OR 值(95% CI)	2.18(1.14~4.18)		3.73(1.13~15.86)		2.38(1.38~4.16)	

注:GG 为 894G 纯合子;GT 为 G894T 杂合子;TT 为 894T 纯合子

表3 G894T 变异与早发冠心病关系的
多元 logistic 回归分析

变 量	β	$s_x(\beta)$	Z 值	P 值	OR 值(95% CI)
G894T 变异	0.81	0.33	2.48	0.013	2.25(1.19~4.26)
性别	-1.70	0.33	5.16	0.000	0.18(0.10~0.35)
吸烟	0.98	0.32	3.10	0.002	2.68(1.44~4.99)
饮酒	1.17	0.36	3.27	0.001	3.21(1.59~6.46)
超重	1.10	0.30	3.68	0.000	3.00(1.67~5.38)

推测各个研究所选择的研究对象年龄组的不同可能是导致上述研究结果不一致的原因之一,因为资料表明,冠心病早发和迟发病例在遗传背景方面存在巨大差异,早发冠心病病例家庭中遗传度估计值为 90%~100%,而在晚发病例家庭中则仅为 15%~30%^[1]。

本研究选择冠心病新发病例为研究对象,对比分析了 eNOS 基因 G894T 变异基因类型及等位基因频率在早发与迟发冠心病病例组的分布情况。结果显示,G894T 变异基因型及 T 等位基因频率早发冠心病组皆显著高于迟发冠心病组。在 $\alpha=0.05$ 显著性水平上,以多元逐步非条件 logistic 回归分析,调整性别、吸烟、饮酒、超重后,G894T 变异对早发冠心病仍具有显著性影响,表明 eNOS 基因 G894T 变异是早发冠心病的重要危险因素。Gardemann 等^[15] 研究显示,在选择的 3250 名研究对象中(包括 2717 例病例及 533 名健康对照),G894T 变异 T 等位基因频率与冠心病患病无显著相关,但在该样本年轻人中(年龄 ≤ 61 岁),G894T 变异 T 等位基因频率与冠心病患病及冠心病严重程度显著相关,与我们的研究结果一致。

对于 G894T 变异,尽管目前尚无充分证据表明,此变异可引起 eNOS 活性的改变,但有资料显示,由于 Glu298Asp 的变异,可使 eNOS 蛋白的构象发生改变^[16],298Asp 基因型的 eNOS 在细胞及组织中稳定性降低,易被水解^[17],由此看来,eNOS 基因 G894T 变异为早发冠心病的重要危险因素是合理的。

参 考 文 献

- Rissanen AM. Familial occurrence of coronary heart disease: effect of age at diagnosis. *Am J Cardiol*, 1979, 44: 60-66.
- Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*, 2001, 104: 448-454.
- 中华心血管病杂志编委会血脂异常防治对策组. 血脂异常防治

建议. *中华心血管病杂志*, 1997, 25: 169-172.

- 贾崇奇,赵仲堂,王立华,等. 一氧化氮合酶基因 G894T 变异与高血压病关系的研究. *中华流行病学杂志*, 2003, 24: 36-39.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288: 373-376.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 1987, 2: 1057-1058.
- Sarker R, Meinberg EG, Stabley JC, et al. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1996, 78: 225-230.
- Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, et al. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide: potential role in atherogenesis. *FEBS Lett*, 1993, 334: 170-174.
- Cayatte A, Palacino JJ, Horten K, et al. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 753-759.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 1999, 100: 1515-1520.
- Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*, 2003, 49: 389-395.
- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, 1998, 32: 521-526.
- Cai H, Wilcken DEL, Wang XL. The Glu-298→Asp (894G→T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med*, 1999, 77: 511-514.
- Wang CL, Hsu LA, Ko YS, et al. Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese. *J Formos Med Assoc*, 2001, 100: 736-740.
- Gardemann A, Lohre J, Cayci S, et al. The T allele of the missense Glu (298) Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile. *Atherosclerosis*, 2002, 160: 167-175.
- Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate versus glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2832-2835.
- Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 2003, 5: 19-25.

(收稿日期: 2004-04-26)

(本文编辑: 张林东)