

CYP4F2 基因单体型与心肌梗死的相关性研究

黄定 付真彦 杨毅宁 谢翔 王迎红 马依彤

【摘要】 目的 研究 CYP4F2 基因单体型与心肌梗死的关系。方法 250 例心肌梗死患者和 250 例对照分别分为整体组、男性组、女性组。选择 CYP4F2 基因的 5 个 SNPs (rs3093105、rs3093135、rs1558139、rs2108622、rs3093200), 应用 TaqMan SNP 基因分型方法进行基因分型, 并应用病例对照单体型分析方法进行相关性研究。结果 对于男性, 心肌梗死患者 rs2108622 的 G 等位基因频率远远高于对照 ($P=0.005$); 心肌梗死患者和对照相比较, 单体型的总体分布在男性组显著不同 ($P=0.002$); 男性组心肌梗死患者的 T-C-G 单体型频率显著高于对照 ($P=0.002$), 男性组心肌梗死患者的 T-C-A 单体型频率显著低于对照 ($P=0.003$)。结论 CYP4F2 基因 rs2108622 的 G 等位基因可能与男性心肌梗死相关, T-C-G 单体型可能是男性心肌梗死的遗传标记。

【关键词】 心肌梗死; CYP4F2; 单体型; 病例对照

Association on the haplotypes of CYP4F2 gene and myocardial infarction HUANG Ding, FU Zhen-yan, YANG Yi-ning, XIE Xiang, WANG Ying-hong, MA Yi-tong. The Cardiovascular Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumuqi 830054, China

【Abstract】 **Objective** The aim of this study was to assess the association between human CYP4F2 gene and myocardial infarction (MI), using a haplotype-based case-control study. A separate analysis on gender was also carried out. **Methods** There were 250 MI patients and 250 control subjects genotyped for 5 SNPs of the human CYP4F2 gene (rs3093105, rs3093135, rs1558139, rs2108622, rs3093200). Data were assessed on 3 separate groups: the total subjects, men and women. **Results** For men, G allele was significantly higher in the MI patients than in the control subjects and the overall distribution of the haplotypes was significantly different between the MI patients and the control subjects ($P=0.002$). Also in men, the frequency of T-C-G haplotype was significantly higher for MI patients than for control subjects ($P=0.002$), and the frequency of T-C-A haplotype was significantly lower for MI patients than for control subjects ($P=0.003$). **Conclusion** Data from the present results indicated that MI was associated with G allele of rs2108622 in men, suggesting that T-C-G haplotype might serve as genetic marker for MI in men.

【Key words】 Myocardial infarction; CYP4F2; Haplotype; Case-control study

研究证实, 一些细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 亚家族与冠心病的发病机制有关, 例如 CYP1A1、CYP1A2 (代谢多环芳烃和多环芳胺)^[1,2]、CYP2C8、CYP2C9、CYP2J2 (合成环二十碳三烯酸)^[3-5]、CYP8A (合成前列腺素)^[6]、CYP11B2 (合成醛固酮)^[7]、CYP17 和 CYP19 (合成性激素) 均证实与心肌梗死 (心梗) 相关^[8]。CYP4F2 主要功能是催化花生四烯酸生成 20-羟二十烷四烯酸 (20-HETE)^[9], 20-HETE 在调节心血管动力学方面具有重要的作用。近来 Stec 等^[10]证实 CYP4F2 基因的一个单核苷酸多态性 (rs2108622, V433M) 可减少花生四烯酸生成 20-HETE, CYP4F2 基因的这个功能变化是否与心梗有关, 本研究目的就是应用单体型病例对照的研究

方法探讨 CYP4F2 基因与心梗的关系。

对象与方法

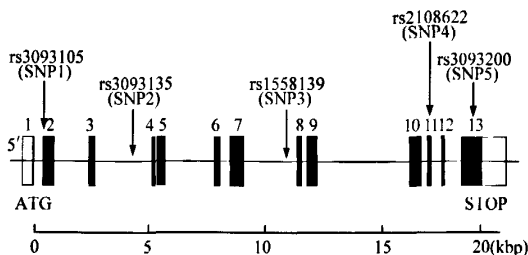
1. 研究对象: 选择 2005 年 1 月至 2008 年 6 月收住新疆医科大学第一附属医院心脏中心的汉族急性心梗患者 250 例 (其中男性 197 例, 女性 53 例, 平均年龄 61.8 岁 ± 8.3 岁) 为心梗组。心梗的确定标准: 有缺血症状 (如胸痛); 肌钙蛋白阳性, 肌酸激酶和肌酸激酶同工酶升高至正常水平 3 倍以上; 心电图相邻 2 个导联以上的 ST 动态演变。具备上述 3 个特征中的 2 个, 即诊断心梗。对照组汉族 250 例 (其中男性 125 例, 女性 125 例, 平均年龄 62.5 岁 ± 7.5 岁), 由同期以胸闷、胸痛待查收住心脏中心的患者组成, 上述患者经冠状动脉造影检查正常。其中一些人也有冠心病的危险因素, 如高血压、糖尿病、血脂异常, 但无心梗病史, 改良 Rankin 量表评分均为 0 分。

两组入选对象均是长期(≥20年)居住在乌鲁木齐市及周边城镇的居民,并排除肿瘤或自身免疫性疾病者。每个受试者均接受详细的问卷调查以获得冠心病危险因素的相关信息。

2. 研究方法:

(1)DNA 提取:按常规酚-氯仿抽提法提取上述病例及对照外周血白细胞 DNA, 稀释 DNA 样本并用紫外可见分光光度计检测 DNA 浓度, 保证各 DNA 样本浓度基本一致。

(2) 选择 SNP 位点:在 NCBI 数据库最新登记的 CYP4F2 基因人类 SNP 有 225 个(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)。登录人类 HapMap 计划数据库查找标签 SNP(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), 如设置条件为 r² ≥ 0.5, 最小基因频率(MAF) ≤ 0.1, 可获得 3 个 CYP4F2 基因的标签 SNP(Tag SNPs), 分别是 rs3093135、rs1558139、rs2108622。rs3093135 和 rs1558139 位于内含子,rs2108622 位于外显子,这个使氨基酸发生变化的非同义替换 SNP 能够改变 20-HETE 的产量。选择 rs3093105 和 rs3093200, 二者位于外显子,也是非同义 SNP。根据这些 SNPs 在 CYP4F2 基因内距离 5' 端的远近分别命名为 SNP1(rs3093105)、SNP2(rs3093135, C_27482167_10)、SNP3(rs1558139, C_2583813_10)、SNP4(rs2108622, C_16179493_40)、SNP5(rs3093200)。见图 1。



注:由 13 个外显子和 12 个内含子组成,箭头标记 SNPs 的位置

图 1 人类 CYP4F2 基因模式图

(3) TaqMan 法检测 SNP:在 ABI7000 型实时定量荧光 PCR 仪上先进行 96 孔板的绝对定量 PCR 扩增, 反应液为: 引物/探针混合液 1.25 μl (其中每条引物 18 μmol/L, 每条探针 4 μmol/L 终浓度), PCR 反应混合液: 12.5 μl, 基因组 DNA: 1 ~ 3 ng, 加 H₂O 至 25 μl; 反应条件为: 95℃ 10 min 预变性, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min(40 个循环)。

3. 主要仪器及试剂: ABI7000 型实时定量荧光 PCR 仪(ABI 公司); UNICO WFZ UV-2102 型紫外可见分光光度计(尤尼柯公司); TaqMan Universal PCR master Mix 试剂盒(含 dNTP、PCR 缓冲液和

AmpliTaq Gold DNA 聚合酶), SNP Genotyping Product 试剂盒(含引物和探针)均购自 ABI 公司。

4. 统计学分析:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;心肌梗组和对照组之间的差别, 计量资料应用 Mann-Whitney U 检验, 计数资料应用 Fisher 检验; χ^2 检验检测基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律;心肌梗组和对照组之间基因型频率和等位基因频率分析应用 Fisher 检验;连锁不平衡分析(LD)和单体型分析应用 EM 运算软件和 SNPalyze3.2 软件(Dynacore Co., Ltd., Yokohama, Japan)。

在 SNP5 的基因分型中,心肌梗组和对照组 CA 杂合子和 AA 纯合子均无发现,因此 SNP5 不能用于单体型病例对照研究,故以 SNP1、SNP2、SNP3 和 SNP4 进行配对连锁不平衡分析。 $|D'| > 0.25$ 意味这些 SNPs 在一个单体型区域内, $r^2 < 0.5$ 意味着这些 SNPs 可用于单体型分析。在单体型病例对照分析中,单体型频率 < 0.02 者予以剔除。心肌梗组和对照组的单体型频率分布差异应用 χ^2 检验分析。统计分析均在 SPSS 13.0 软件上完成(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)。所有统计检验均为双侧检验,显著性水平为 $P < 0.01$ 。

结 果

1. 患者临床资料:心肌梗组和对照组年龄匹配(表 1)。

2. SNPs 基因型和等位基因的分布:5 个基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。对于男性,心肌梗患者 rs2108622 的 G 等位基因频率远远高于对照 ($P = 0.005$),见表 2。

3. CYP4F2 基因的连锁不平衡分析: $|D'| > 0.25$ 说明用来组建单型型的 4 个 SNPs 在同一个单体型区域(表 3)。因为 SNP1-SNP2 组建的单体型,其 $r^2 > 0.5$,说明 SNP1、SNP2 不适宜同时用来组建单体型,本研究选择 SNP2、SNP3 和 SNP4 组建单体型。

4. 单体型病例对照分析:应用 SNP2、SNP3 和 SNP4 共组建 4 个单体型,在男性和女性中共组建 5 个单体型。对于男性,心肌梗组和对照组的单体型整体分布的差异有统计学意义 ($P = 0.002$),同样对于男性,心肌梗组的 H1 单体型频率显著高于对照组的 H1 单体型频率 ($P = 0.002$),心肌梗组的 H5 单体型频率显著低于对照组的 H5 单体型频率 ($P = 0.003$),见表 4。

讨 论

已有研究表明,很多 CYP 亚家族在心脏、血管

表 1 两组病例临床资料

项目	合计			男性			女性		
	心梗组(n=250)	对照组(n=250)	P值	心梗组(n=197)	对照组(n=125)	P值	心梗组(n=53)	对照组(n=125)	P值
年龄(岁)	61.8±8.3	62.5±7.5	0.059	60.8±8.8	62.2±6.9	0.145	62.9±6.5	63.5±5.3	0.081
BMI(kg/m ²)	23.8±3.1	22.5±2.7	<0.01	24.0±2.9	22.7±2.7	<0.01	22.6±3.8	22.3±2.7	0.649
SBP(mm Hg)	134.8±22.4	134.9±15.1	0.975	134.9±20.8	134.6±14.0	0.911	134.5±28.6	135.1±16.2	0.876
DBP(mm Hg)	81.5±14.9	77.9±9.9	0.003	81.9±14.6	77.9±9.5	0.010	79.6±16.2	77.9±10.4	0.451
TC(mg/dl)	199.3±44.6	215.5±34.9	<0.01	197.9±43.0	202.3±32.7	0.355	205.9±51.8	228.8±32.1	0.002
高血压(%)	17	6	<0.01	18	8	0.012	13	5	0.051
糖尿病(%)	27	3	<0.01	28	4	<0.01	27	2	<0.010
高脂血症(%)	38	17	<0.01	39	7	<0.01	38	27	0.195
吸烟(%)	50	40	0.201	55	55	0.961	26	23	0.779

表 2 5 个 SNPs 基因型和等位基因的分布

SNPs		合计			男性			女性			
		心梗组	对照组	P值	心梗组	对照组	P值	心梗组	对照组	P值	
rs3093105(SNP1)	基因型	T/T	205	190	0.083	162	96	0.271	43	94	0.295
		T/G	41	58		32	28		9	30	
		G/G	4	2		3	1		1	1	
	等位基因	T	451	438	0.046	356	220	0.173	95	218	0.139
		G	49	62	38	30	11	32			
rs3093135(SNP2)	基因型	T/T	202	188	0.111	160	94	0.088	42	94	0.335
		T/A	44	59		34	31		10	28	
		A/A	4	3		3	0		1	3	
	等位基因	T	448	435	0.051	354	219	0.187	94	216	0.143
		A	52	65	40	31	12	34			
rs1558139(SNP3)	基因型	C/C	115	113	0.432	96	49	0.163	19	64	0.075
		C/T	109	102		81	57		28	45	
		T/T	26	35		20	19		6	16	
	等位基因	C	339	328	0.438	273	155	0.047	66	173	0.177
		T	161	172	121	95	40	77			
rs2108622(SNP4)	基因型	G/G	147	136	0.055	120	63	0.033	27	73	0.199
		G/A	85	81		62	42		23	39	
		A/A	18	33		15	20		3	13	
	等位基因	G	379	353	0.040	302	168	0.005	77	185	0.859
		A	121	147	92	82	29	65			
rs3093200(SNP5)	基因型	C/C	250	250	-	197	125	-	53	125	-
		C/A	0	0		0	0		0	0	
		A/A	0	0		0	0		0	0	
	等位基因	C	500	500	-	394	250	-	106	250	-
		A	0	0	-	0	0	-	0	0	-

表 3 CYP4F2 基因的连锁不平衡分析

	D'									
	心梗组				对照组					
SNP	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP1	SNP1	SNP2	SNP3	SNP3	SNP4
r ²	SNP1	1.000	1.000	1.000	SNP1	0.962	1.000	0.804		
	SNP2	0.922	0.819	0.927	SNP2	0.860	0.909	0.737		
	SNP3	0.043	0.031	0.471	SNP3	0.074	0.066	0.340		
	SNP4	0.292	0.273	0.145	SNP4	0.215	0.195	0.092		

注: |D'| > 0.25; r² > 0.5

内皮细胞、平滑肌中表达。而且越来越多的研究证实 CYP 的内源性代谢产物, 如环二十碳三烯酸(EETs)、羟二十烷四烯酸(HETEs)、前列环素(PGI₂)、醛固酮、性激素在维护心血管系统健康方面起着重要的作用。CYP 的表达、活性与心血管疾病(如高血压、冠心病、心功能衰竭、脑卒中、心肌病、心率失常)之间的关系已经得到证实。CYP4F2 主要功能之一是代谢花生四烯酸生成 20-HETE, 到日前为

止已经证实 20-HETE 具有多种生理功能^[11-14]。

近来证实 CYP4F2 基因的一个 SNP(rs2108622, V433M) 会改变该基因的功能, 影响花生四烯酸生成 20-HETE。本研究首先假设 CYP4F2 基因的多态性与心梗的发生有关, 发现新疆汉族男性心梗患者 rs2108622 的 G 等位基因频率显著高于对照组, 这意味着携带 rs2108622 G 等位基因的男性患有心梗的风险增加。结合 Stec 等^[10]的研究结果, 即 G-to-A 的突变会减少 20-HETE 的生成, 推测携带 G 等位基因的男性比携带 A 等位基因的男性具有更高的合成 20-HETE 的能力。

Morris 和 Kaplan^[15] 发现对于多重易感基因, 单体型分析要比单个 SNP 分析有更大的优越性, 尤其是当 SNP 之间的连锁不平衡很弱的情况下。在此基础上, 我们推测应用单体型分析基因多态性与疾病之间的关系可能有更大价值。本研究中, 应用

表 4 单体型频率(%)病例对照分析

单体型	CYP4F2 多态性			合计		P 值	男性		P 值	女性		P 值
	SNP2	SNP3	SNP4	心梗组	对照组		心梗组	对照组		心梗组	对照组	
H1	Mj T	Mj C	Mj G	0.597	0.528	0.051	0.609	0.471	0.002	0.553	0.552	0.653
H2	Mj T	Mn T	Mj G	0.170	0.175	0.493	0.157	0.189	0.286	0.183	0.170	0.523
H3	Mn A	Mj C	Mn A	0.079	0.108	0.179	0.090	0.120	0.321	0.070	0.113	0.378
H4	Mj T	Mn T	Mn A	0.163	0.181	0.369	0.140	0.183	0.068	0.210	0.153	0.212
H5	Mj T	Mj C	Mn A	-	-	-	0.000	0.031	0.003	-	-	-
H6	Mn A	Mj C	Mj G	-	-	-	-	-	-	0.000	0.030	0.110

注:全体 P=0.223, 其中男性 P=0.002, 女性 P=0.256

CYP4F2 基因的 3 个 SNPs (SNP2、SNP3 和 SNP4) 成功地在全体组中建立了 4 个单体型, 在男性和女性组中建立了 5 个单体型。在新疆汉族男性组中, 发现了一个心梗易感单体型 (T-C-G, SNP2-SNP3-SNP4) 和一个心梗抵抗单体型 (T-C-A, SNP2-SNP3-SNP4), 单体型分析的结果与等位基因分析结果一致, 即携带 G 等位基因心梗风险增加, 携带 A 等位基因心梗风险减小。

高血压、冠心病等一些心血管疾病的发病存在性别差异是不争的事实, 动物实验研究也表明 CYP 的表达存在性别差异^[16, 17]。本研究显示等位基因、单体型分布在心梗组和对照组之间存在性别(男性)差异。推测雄性激素可能介导了 CYP4F2 活性, 雄激素与心梗和血栓性疾病密切相关, 因为雄激素能够促进动脉血管内血小板的聚集和胶原纤维、胶原蛋白的增加^[18]。近来有研究证实, 雄激素能够增加急性心梗的炎症反应, 影响心梗后心脏的早期重塑, 促进心脏破裂和心脏功能恶化^[19]。而 rs2108622 T-C-G、T-C-A 单体型可能与雄性激素介导的 CYP4F2 活性有关。

总之, CYP4F2 基因 rs2108622 的 G 等位基因可能与新疆男性汉族心梗相关, T-C-G 单体型可能是新疆男性汉族心梗的遗传标记。当然还需要更多的研究来证实 CYP4F2 基因的功能突变与心梗相关, 并评价是否 CYP4F2 的功能变化与性激素代谢有关。

参 考 文 献

[1] Wang XL, Greco M, Sim AS, et al. Effect of CYP1A1 Msp I polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. Atherosclerosis, 2002, 162:391-397.
 [2] Cornelis MC, El-Sohemy A, Campos H. Genetic polymorphism of CYP1A2 increases the risk of myocardial infarction. J Med Genet, 2004, 41: 758-762.
 [3] Yasar U, Bennet AM, Eliasson E, et al. Allelic variants of cytochromes P450 2C modify the risk for acute myocardial infarction. Pharmacogenetics, 2003, 13: 715-720.
 [4] Funk M, Endler G, Freitag R, et al. CYP2C9*2 and CYP2C9*3 alleles confer a lower risk for myocardial infarction. Clin Chem,

2004, 50: 2395-2398.
 [5] Spiecker M, Darius H, Hankeln T, et al. Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2. Circulation, 2004, 110: 2132-2136.
 [6] Nakayama T, Soma M, Saito S, et al. Association of a novel single nucleotide polymorphism of the prostacyclin synthase gene with myocardial infarction. Am Heart J, 2002, 143: 797-801.
 [7] Hengstenberg C, Holmer SR, Mayer B, et al. Evaluation of the aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism in patients with myocardial infarction. Hypertension, 2000, 35: 704-709.
 [8] Letonja M, Peterlin B, Bregar D, et al. Are the T/C polymorphism of the CYP17 gene and the tetranucleotide repeat (TTTA) polymorphism of the CYP19 gene genetic markers for premature coronary artery disease in Caucasians? Folia Biol (Praha), 2005, 51: 76-81.
 [9] Lasker JM, Chen WB, Wolf I, et al. Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of CYP4F2 and CYP4A11. J Biol Chem, 2000, 275: 4118-4126.
 [10] Stec DE, Roman RJ, Flasch A, et al. Functional polymorphism in human CYP4F2 decreases 20-HETE production. Physiol Genomics, 2007, 30: 74-81.
 [11] Muthalif MM, Karzoun NA, Gaber L, et al. Angiotensin II-induced hypertension: contribution of Ras GTPase/Mitogen-activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. Hypertension, 2000, 36: 604-609.
 [12] Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. Physiol Rev, 2002, 82: 131-185.
 [13] McGiff JC, Quilley J. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids and blood pressure. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10: 231-237.
 [14] Nithipatikom K, Gross ER, Endsley MP, et al. Inhibition of cytochrome P450omega-hydroxylase: a novel endogenous cardioprotective pathway. Circ Res, 2004, 95: e65-71.
 [15] Morris RW, Kaplan NL. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles. Genet Epidemiol, 2002, 23: 221-233.
 [16] Waxman DJ, Ram PA, Pampori NA, et al. Growth hormone regulation of male-specific rat liver P450s 2A2 and 3A2: induction by intermittent growth hormone pulses in male but not female rats rendered growth hormone deficient by neonatal monosodium glutamate. Mol Pharmacol, 1995, 48: 790-797.
 [17] Muller DN, Schmidt C, Barbosa-Sicard E, et al. Mouse CYP4A isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation. Biochem J, 2007, 403: 109-118.
 [18] Ferenchick GS. Are androgenic steroids thrombogenic? N Engl J Med, 1990, 322: 476.
 [19] Cavasin MA, Tao ZY, Yu AL, et al. Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290: H2043-2050.

(收稿日期: 2008-12-03)
(本文编辑: 张林东)