

载脂蛋白 A5 c.553G>T 基因多态性与新疆汉族人群冠心病相关性研究

袁山 马依彤 谢翔 杨毅宁 付真彦 马翔 李晓梅 刘芬 陈邦党

【摘要】 目的 研究新疆汉族人群载脂蛋白 A5(ApoA5) c.553G>T 多态性与冠心病及血脂水平的相关性。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法,检测 486 例冠心病患者和 501 例对照的 ApoA5 c.553G>T 多态性,同时测定血脂水平。结果 ApoA5 c.553G>T 的不同基因型在冠心病组和对照组分布频率的差异具有统计学意义($\chi^2=8.757, P=0.013$)。通过非条件 logistic 回归校正年龄、性别、吸烟史、血脂、高血压和糖尿病史等影响因素后, T 等位基因携带者(TT+GT 基因型)的个体患冠心病的风险是 GG 型的 1.753 倍($OR=1.753, 95\%CI: 1.030 \sim 2.983, P<0.05$)。冠心病组和对照组 c.553G>T 基因型亚组间甘油三酯(TG)水平的差异有统计学意义($t=-5.242, P<0.01; t=-3.499, P=0.001$), T 等位基因携带者较 GG 型有更高的 TG 水平;冠心病组 T 等位基因携带者较 GG 型有更高的胆固醇(TC)水平($t=-2.465, P=0.014$)。结论 ApoA5 c.553G>T 多态性对新疆汉族人群血清 TG、TC 水平有影响,且与冠心病的发生有一定相关性, T 等位基因可能是冠心病的一个危险因素。

【关键词】 冠心病; 载脂蛋白 A5; 血脂; 基因多态性

Association between apolipoprotein A5 gene polymorphism and coronary heart disease in the Han population from Xinjiang YUAN Shan¹, MA Yi-tong^{1,2}, XIE Xiang^{1,2}, YANG Yi-ning^{1,2}, FU Zhen-yan^{1,2}, MA Xiang^{1,2}, LI Xiao-mei^{1,2}, LIU Fen¹, CHEN Bang-dang¹. 1 Key Laboratory of Cardiovascular Disease Research of Xinjiang, Urumqi 830054, China; 2 Department of Coronary Artery Disease, Heart Center, the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University

Corresponding author: MA Yi-tong, Email: myt-xj@163.com

This work was supported by a grant from the Science and Technology of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 200733146-3).

【Abstract】 Objective The aim is to investigate the association between coronary heart disease (CHD) and c.553G>T polymorphism of apolipoprotein A5 (ApoA5) gene and the influence of serum lipid level in the Han ethnic population of Xinjiang. Methods The polymorphism of ApoA5 gene in 486 patients with CHD and 501 controls was analyzed by methods of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Level of serum lipid in each patient was detected at the same time. Results There was significant difference in the distribution of genotypes between CHD group and controls group ($\chi^2=8.757, P=0.013$). Non-conditioned logistic regression analyses, after adjusted for age, gender, smoking, total serum cholesterol, presence of hypertension and diabetes, revealed that individuals who carried T allele (TT+GT genotype) had an increased risk of CHD, compared to GG genotype ($OR=1.753, 95\%CI: 1.030 \sim 2.983, P<0.05$). There was also a remarkable difference noticed in the level of serum triglyceride by genotypes in CHD group and control group ($t=-5.242, P<0.01; t=-3.499, P=0.001$). Individuals in the two groups who carried T allele had higher level of serum triglyceride than those carried GG genotype. Individuals in CHD group who carried T allele had higher level of serum total cholesterol than those carried GG genotype ($t=-2.465, P=0.014$). Conclusion It seemed that the c.553G>T polymorphism of ApoA5 gene had influenced on the level of serum triglyceride and the total cholesterol among Han population in Xinjiang. c.553G>T polymorphism was associated with the development of CHD, while T allele might be an influencing risk factor on CHD.

【Key words】 Coronary heart disease; Apolipoprotein A5; Serum lipids; Gene polymorphism

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.01.013

基金项目:新疆维吾尔自治区重大科技专项课题(200733146-3)

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学心血管病研究重点实验室(袁山、马依彤、谢翔、杨毅宁、付真彦、马翔、李晓梅、刘芬、陈邦党),第一附属医院心脏中心(马依彤、谢翔、杨毅宁、付真彦、马翔、李晓梅)

通信作者:马依彤, Email: myt-xj@163.com

目前研究证实,血脂代谢紊乱与冠心病的关系极其密切。血清甘油三酯(TG)升高与冠心病的关系目前还存在争议,但已有流行病学调查显示TG升高可作为冠心病的独立危险因素^[1-3]。载脂蛋白A5(ApoA5)是新发现的有明显影响血清TG水平的载脂蛋白^{4,5},目前发现的ApoA5基因多态性主要是单核苷酸多态性,多项研究已经表明⁶⁻⁹,ApoA5基因多态性与TG代谢及冠心病关系密切;其中对位于启动子区的-1131T>C,分别位于第2、第4外显子的c.56C>G和c.553G>T位点研究比较多。本研究旨在探讨新疆地区汉族人群ApoA5 c.553G>T(rs2075291)位点多态性与冠心病及血脂代谢的关系。

材料与方法

1. 临床资料:冠心病组共486例,选择2006年1月至2010年1月在新疆医科大学第一附属医院心脏中心住院的患者,均由冠状动脉造影检查阳性(至少一支血管直径狭窄≥50%)确诊。对照组共501例,选择同期入院冠状动脉造影结果阴性的入院患者。体格检查及胸片、标准12导联心电图、肝胆B超、血尿粪常规均未见异常。以上两组入选对象均为无血缘关系的新疆汉族人群,各组间性别、年龄等一般资料经统计学检验无差异,具有可比性。在纳入之前告知并签署知情同意书。资料不全及合并主动脉夹层、风湿性心脏病、先天性心脏病、心力衰竭、多脏器功能衰竭等疾病之一者均予以排除。

2. 方法:收集临床资料包括身高、体重由专门人员测量,病史及生活习惯通过问卷调查方式获得;体重指数(BMI)=体重/身高²(kg/m²)。血清总胆固醇(TC)、TG、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等指标均由新疆医科大学第一附属医院检验中心统一测定,采用贝克曼LX20全自动生化分析仪,试剂为贝克曼原装配套血脂检测试剂。

(1)DNA提取及PCR扩增:空腹抽取静脉血5 ml,充分抗凝处理后-80℃保存,统一采用全基因组提取试剂盒(天根生化有限公司生产),按照说明书步骤提取外周静脉血白细胞DNA。引物使用Primer premier 5.0软件设计:上游:P1:5'-TCTCGG CGT ATG GGT GGA A-3',下游:P2:5'-ATC TGA TGG AGC AGG TGG C-3'(由上海生物工程有限公司合成)。反应体系为15 μl,包括,2×PowerTaq PCR MasterMix(北京百泰克生物技术有限公司)7.5 μl,引物P1、P2各0.3 μl(10 pmol/μl),DNA模板1.0 μl,不足部分由双蒸水补足。PCR扩增条件:

95℃预变性5 min,95℃变性20 s,56℃退火20 s,72℃延伸20 s,循环35次,最后72℃延伸7 min。

(2)酶切分型:采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,酶切体系共20 μl,包括10 μl PCR产物,10×缓冲液1 μl,Msp I内切酶4 U(10 U/μl, Fermentas公司,识别片段C↓CGG),剩余由三蒸水补足;37℃水浴6 h,2%琼脂糖凝胶(核酸染料GELVIEW染色),110 V电泳30 min,紫外线下观察,摄影。将PCR产物及酶切产物与DNA片段长度标准物比较以鉴定基因型。

3. 统计学分析:数据处理利用SPSS 16.0软件完成,用Hardy-Weinberg平衡检验样本群体代表性;各组基因型和等位基因频率差异比较用χ²检验;连续变量比较用t检验;综合评价各因素与冠心病关系采用非条件logistic回归分析;不符合正态分布的指标,如TG等偏态分布资料经对数转换达到近似正态分布后进行数据分析(为使结果简明仍以变换前数据表示);以P<0.05认为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般临床资料及血脂水平比较:冠心病组性别、年龄、饮酒史与对照组间的差异无统计学意义(P>0.05);冠心病组的吸烟、合并高血压和糖尿病的比例及BMI、TG较对照组均明显升高,冠心病组HDL-C则低于对照组,差异均有统计学意义(P<0.05);冠心病组的TC、LDL-C与对照组间的差异无统计学意义(P>0.05),可能与冠心病患者广泛使用降脂药物有关(表1)。

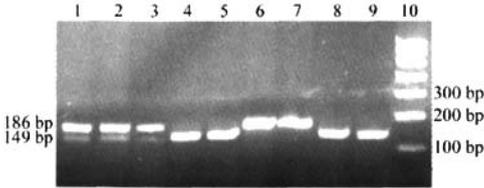
表1 两组患者临床资料比较

变量	冠心病组 (n=486)	对照组 (n=501)	χ ² 或t值	P值
性别(男/女)	381/105	395/106	0.029	0.864
年龄(岁)	59.96±10.76	59.29±11.09	-0.812	0.417
吸烟	212(43.62)	168(33.53)	10.604	0.001
饮酒	95(19.55)	95(18.96)	0.054	0.816
高血压	170(34.98)	150(29.94)	2.859	0.091
糖尿病	132(27.16)	33(6.59)	75.001	<0.01
BMI(kg/m ²)	26.38±3.22	25.49±3.17	-3.713	<0.01
TG(mmol/L)	2.05±1.65	1.70±1.28	-3.187	0.001
TC(mmol/L)	4.71±1.03	4.61±1.04	-1.307	0.192
HDL-C(mmol/L)	1.24±0.32	1.41±0.42	5.956	<0.01
LDL-C(mmol/L)	3.14±0.88	3.12±0.99	-0.360	0.719

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%),其他为 $\bar{x} \pm s$

2. ApoA5 c.553G>T位点多态性分析:PCR扩增产物片段长度为186 bp,GG基因型(野生纯合子)的扩增产物可被Msp I限制性内切酶完全切断,电泳可见149 bp的片段(37 bp片段由于相对分子质量小,泳动

速度快,早已跑出胶外,故图中未显示);GT 基因型为杂合子,可见 186 bp 和 149 bp 两种片段,TT 基因型(突变纯合子)不能被酶切断,仅见 186 bp 一种片段(图 1)。



注:1~3:GT; 4,5,8,9:GG; 6,7:TT;10:Marker

图 1 ApoA5 c.553G>T PCR 产物酶切片段电泳结果

3. Hardy-Weinberg 平衡检验:基因型分布在两组均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2=0.207, P=0.901$ 和 $\chi^2=1.047, P=0.593$),具有群体代表性。

4. ApoA5 基因型频率及等位基因频率分布:如表 2 所示,两组 3 种基因型频率及等位基因频率分布差异有统计学意义 ($\chi^2=8.757, P=0.013$),冠心病组 T 等位基因携带者(GT+TT 基因型)的频率为 14.61%,高于对照组的 8.98%,差异有统计学意义 ($\chi^2=7.531, P=0.006$);T 等位基因携带者患冠心病的危险是 GG 基因型携带者的 1.734 倍($OR=1.734, 95\%CI:1.166 \sim 2.577$)。

表 2 两组患者 ApoA5 c.553G>T 多态性分布

组别	基因型				等位基因	
	GG	GT	TT	GT+TT	G	T
冠心病组	415(85.39)	69(14.2)	2(0.04)	71(14.61)	899(92.49)	73(7.51)
对照组	456(91.02)	45(8.98)	0(0)	45(8.98)	957(95.51)	45(4.49)
χ^2 值	-	8.757	-	7.531	8.002	-
P 值	-	0.013	-	0.006	0.005	-
OR 值	1	-	-	1.734	-	-
95%CI	-	-	-	1.166 ~ 2.577	-	-

注:同表 1

5. ApoA5 基因多态性和冠心病关系的相关性分析:将是否患冠心病作为因变量,年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病、BMI、TG 及 ApoA5 基因多态性作为自变量,做非条件 logistic 回归分析 ($\alpha=0.05$)。分别建立 3 个模型,除了代入年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病、BMI 外,模型 1 只代入血清 TG;模型 2 只代入 ApoA5 基因多态性;模型 3 将二者全都代入。如表 3 所示,在校正了上述因素后,模型 1 中 TG 在两组间的差异无统计学意义 ($P>0.05$);模型 2 中 T 等位基因携带者患冠心病的风险为 GG 基因型的 1.797 倍 ($P<0.05$);模型 3 中 TG 在两组间的差异仍然不具有统计学意义 ($P>$

0.05),T 等位基因携带者患 CHD 的风险为 GG 基因型的 1.753 倍 ($P<0.05$)。另外在 3 个模型中,高血压、糖尿病、吸烟均是冠心病的危险因素 ($P<0.05$)。

6. 不同基因型间血脂水平比较:如表 4 所示,冠心病组 ApoA5 c.553G>T 多态性不同基因型亚组间 TG、TC 水平的差异有统计学意义;T 等位基因携带者(GT+TT 基因型)亚组的 TG 和 TC 水平明显高于 GG 型亚组 ($t=-5.242, P<0.01$; $t=-2.465, P=0.014$);其他血脂、生化指标的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。对照组 T 等位基因携带者亚组的 TG 水平同样高于 GG 型亚组 ($t=-3.499, P=0.001$),T 等位基因携带者亚组的 TC 水平虽然高于 GG 型亚组,但差异不具有统计学意义 ($t=-0.851, P=0.395$),其他血脂指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

讨论

ApoA5 是在 2001 年由两个独立课题组通过不同研究途径发现的载脂蛋白家族的新成员。尽管其血清浓度很低(125 ~ 180 ng/ml),但却是有力的 TG 调节子^[10]。ApoA5 自发现后就引起了广泛关注,对其基因多态性的研究也越来越多,对 ApoA5 基因多态性的研究显示在不同人种中都与 TG 关系密切。其中位于第 4 外显子 c.553G>T(rs2075291)位点由 Kao 等^[11]首先报道,是一个非同义突变,由 G 到 T 的突变会导致半胱氨酸转变为甘氨酸残基(G185C);在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 中,该位点在中国汉族人的突变频率为 0.022,日本人为 0.023,而欧洲白人为 0.008,非洲尤鲁巴人中的突变频率为 0。在人类 HapMap 计划数据库 (<http://www.hapmap.org/>) 中,收录了人类 ApoA5 基因的 11 个 SNP,其中有 3 个 SNP 位于功能区,c.553G>T 即为其中之一,还有位于启动子调控区的-1131T>C、第 2 外显子的非同义突变 c.56C>G。c.553G>T 与其他 SNP 之间存在强烈的连锁不平衡^[8],多项研究显示这些 SNP 与血清 TG 及 CHD 关系密切^[6-9,11-13],所以 c.553G>T 可以代表 ApoA5 基因多态性大部分的遗传信息。在对 c.553G>T 与冠心病的相关性研

表 3 多因素非条件 logistic 回归分析

危险因素	模型 1		模型 2		模型 3	
	P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)
GT+TT 基因型			0.023	1.797(1.085 ~ 2.976)	0.038	1.753(1.030 ~ 2.983)
TG	0.141	1.091(0.971 ~ 1.226)			0.314	1.063(0.944 ~ 1.198)
高血压	<0.01	4.280(2.982 ~ 6.143)	<0.01	4.354(3.073 ~ 6.168)	<0.01	4.282(2.980 ~ 6.152)
糖尿病	<0.01	4.631(2.835 ~ 7.565)	<0.01	4.967(3.064 ~ 8.051)	<0.01	4.773(2.913 ~ 7.820)
吸烟	0.001	1.964(1.310 ~ 2.945)	<0.01	2.198(1.484 ~ 3.256)	0.001	1.995(1.329 ~ 2.996)

注:logistic 回归模型 1 只代入血清 TG,模型 2 只代入 ApoA5 基因多态性,模型 3 将二者全部代入

表4 两组不同基因型间血脂水平比较($\bar{x} \pm s$)

血脂水平 (mmol/L)	基因型		t值	P值
	GG	GT+TT		
冠心病组				
TG	1.84±1.06	2.94±1.72	-5.242	<0.01
TC	4.64±1.02	5.10±1.04	-2.465	0.014
HDL-C	1.22±0.27	1.31±0.51	-1.478	0.141
LDL-C	3.15±0.89	3.01±0.84	0.339	0.735
对照组				
TG	1.65±1.25	2.33±1.39	-3.499	0.001
TC	4.59±1.02	4.73±1.23	-0.851	0.395
HDL-C	1.42±0.42	1.42±0.38	0.017	0.987
LDL-C	3.11±0.97	3.21±1.17	-0.667	0.505

究中, Tang等^[12]发现, 中国汉族人冠心病组和对照组的T等位基因频率分别为7.76%和3.97%, T等位基因携带者相对GG纯合子携带者患冠心病的风险增加(OR=2.089, 95% CI: 1.140~3.830, P=0.017)。Hsu等^[13]对台湾地区汉族人研究发现, 只有c.553G>T与冠心病有统计学意义的相关性(OR=1.79, 95% CI: 1.07~3.00, P=0.028), 而-1131T>C、c.56C>G则无。这两项研究均发现c.553G>T的T等位基因携带者比GG型携带者具有更高的血清TG水平。以上发现都提示c.553G>T的重要性, 对c.553G>T的研究可以提供比较充分的基因信息, 进行ApoA5基因多态性与CHD关联性研究。

本研究对新疆地区486名汉族冠心病患者和501名正常对照人群的ApoA5 c.553G>T多态性研究表明, 在新疆汉族人群中存在c.553G>T多态性位点, 在对照组中T等位基因的频率为0.045, 高于NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)的数据, 但差异无统计学意义(P<0.05), 且与Tang等^[12]对中国汉族人的研究结果相似。通过对血清TG及c.553G>T多态性与冠心病相关性分析表明, 在校正了其他影响因素后, 血清TG在冠心病组和对照组间的差异消失(P>0.05)。而c.553T等位基因携带者(TT+GT)亚组的频率明显高于对照组(P<0.01), 且在校正其他影响因素后这种差异仍存在, T基因型携带者患冠心病的风险是GG型的1.753倍(OR=1.753, 95% CI: 1.030~2.983, P<0.05)。通过建立3个logistic回归模型提示, c.553G>T多态性与冠心病的关系与TG是相互独立的。冠心病组和对照组T等位基因携带者亚组的血清TG水平明显高于GG组(P<0.01)。冠心病组T等位基因携带者亚组的血清TC水平高于GG组(P<0.05), 对照组T等位基因携带者的血清TC水平虽然高于GG组, 但差异无统计学意义(P>0.05)。由于c.553G>T多态性是一个非同义突变, 由G到T的突变会导致编码的氨基酸改变, 可能会影响到ApoA5的功能, 使

血脂水平尤其是TG发生变化。但是logistic回归模型提示c.553G>T多态性与CHD的关系与TG相互独立, 究其原因: ①由于目前大部分冠心病患者都在服用降血脂药物, 可能使血脂水平下降, 从而影响了结果。②目前TG与冠心病的关系尚无定论, 所以c.553G>T多态性与冠心病的关联可能不是通过TG形成的, 而是存在其他未知的效应。③由于本研究没有进行ApoA5浓度及活性的测定, 无法证实ApoA5基因与冠心病的关联是否为ApoA5所致, 也可能该基因与其他遗传标志物存在上位效应, 从而与冠心病产生关联, 需要进一步研究证实。另外ApoA5基因多态性与TG水平密切相关, 已经在不同人种的多项研究中得到证实, 但其与TC水平相关的报道并不多见, 本研究在新疆汉族冠心病人群中发现的c.553G>T多态性与TC的关系还需要更多的研究证实, 而其中的机制仍需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am J Cardiol*, 2000, 86: 943-949.
- [2] Wang W, Zhao D, Wu ZS, et al. Study of triglyceride distribution aged 35-64, and their association with other cardiovascular disease risk factors in 11 provinces. *Chin J Epidemiol*, 2001, 22(1): 26-29. (in Chinese)
王薇, 赵冬, 吴兆苏, 等. 中国11省市35~64岁人群血清甘油三酯分布特点及与其他心血管病危险因素关系的研究. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(1): 26-29.
- [3] Jacobson TA, Miller M, Schaefer EJ, et al. Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction. *Clin Ther*, 2007, 29(5): 763-777.
- [4] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*, 2001, 294: 169-173.
- [5] van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *Biol Chem*, 2001, 276: 44512-44520.
- [6] Hodoglugil U, Tanyolac S, Williamson DW, et al. Apolipoprotein A-V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. *J Lipid Res*, 2006, 47: 144-153.
- [7] Wright WT, Young IS, Nicholls DP, et al. SNPs at the ApoA5 gene account for the strong association with hypertriglyceridemia at the ApoA5/A4/C3/A1 locus on chromosome 11q23 in the Northern Irish population. *Atherosclerosis*, 2006, 185: 353-360.
- [8] Matsunaga A, Arishima H, Niimura H, et al. Strong linkage disequilibrium and association of -1131T>C and c.553G>T polymorphisms of the apolipoprotein A5 gene with hypertriglyceridemia in a Japanese population. *Circ J*, 2007, 71: 746-752.
- [9] Jang Y, Paik JK, Hyun YJ, et al. The apolipoprotein A5 -1131T>C promoter polymorphism in Koreans: Association with plasma ApoA5 and serum triglyceride concentrations, LDL particle size and coronary artery disease. *Clin Chim Acta*, 2009, 402: 83-87.
- [10] Rensen PC, van Dijk KW, Havekes LM. Apolipoprotein AV: low concentration, high impact. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(12): 2445-2447.
- [11] Kao JT, Wen HC, Chien KL, et al. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet*, 2003, 12: 2533-2539.
- [12] Tang Y, Sun P, Guo D, et al. A genetic variant c.553G>T in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and altered triglyceride levels in a Chinese population. *Atherosclerosis*, 2006, 185: 433-437.
- [13] Hsu LA, Ko YL, Chang CJ, et al. Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis*, 2006, 185: 143-149.

(收稿日期: 2010-05-13)
(本文编辑: 张林东)