

# 醛固酮合成酶基因单核苷酸多态性与心房颤动的关系

曹菲菲 陈兴栋 王群山 李蕾 王笑峰 吕明 金力

**【摘要】** 目的 探讨醛固酮合成酶(CYP11B2)基因的单核苷酸多态性与中国汉族人群非家族性心房颤动(房颤)的关系。方法 采用 1:1 配对的病例对照研究方法,选择 297 例住院房颤患者作为病例组,同时期、同病房的 297 例非房颤患者作为对照组。应用 GenomeLab™ SNPstream 基因分型系统,对 CYP11B2 基因的两个标签单核苷酸多态位点(tSNPs-rs4545、rs3802228)进行多态性检测。结果 两位点多态性的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。病例组患者左心房直径(LA)显著高于对照组( $P < 0.0001$ ),两个 tSNPs 的基因型频率及等位基因频率分布在病例组和对照组的差异均无统计学意义,但在病例组 3' 端非编码区(3' UTR)的 rs3802228 位点中,具有 GG 基因型患者的 LA 显著高于其他型者。多元 logistic 回归模型在校正年龄、吸烟、BMI、高血压之后,未发现 CYP11B2 基因两位点基因多态性与房颤发病相关联。两个位点间也不存在连锁不平衡。结论 CYP11B2 基因的 rs4545tSNPs 位点多态性可能与房颤无相关性,位于 3' 端非编码区的 rs3802228 tSNPs 位点可能与心房结构重构有关。

**【关键词】** 心房颤动;醛固酮合成酶;基因多态性;单核苷酸多态性

**Associations of the genetic polymorphisms in CYP11B2 gene with nonfamilial structural atrial fibrillation** CAO Fei-fei, CHEN Xing-dong, WANG Qun-shan, LI Lei, WANG Xiao-feng, LU Ming, JIN Li. *Clinical Epidemiology Unit, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China*  
Corresponding author: LU Ming, Email: lu.ming528@gmail.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate whether polymorphisms in CYP11B2 gene are associated with nonfamilial structural atrial fibrillation(AF) in Chinese Han population. **Methods** A fine-designed pair-matched hospital based case-control study was performed in 297 cases and 297 controls. We investigated two tagging single nucleotide polymorphisms (tSNPs)-rs4545, rs3802228 in CYP11B2 gene by using GenomeLab™ SNPstream technique. **Results** Two tSNPs were consistent with Hardy-Weinberg expectations in case and control groups. Compared with controls, the left atrial diameter of cases was significantly higher( $P < 0.0001$ ). No significant difference in genotype or allele frequencies of tSNPs in CYP11B2 gene was observed. However, at the site of rs3802228 in 3' UTR of the case group, the left atrial diameter in AF patients with GG genotype was significantly higher than others. After adjusted for covariates age, smoking, Body mass index and hypertension, we did not observe the association of rs4545, rs3802228 with AF. **Conclusion** Our result suggested that polymorphisms of rs4545 in CYP11B2 gene might not be associated with atrial fibrillation but polymorphism of 3' UTR rs3802228 locus in CYP11B2 gene might be associated with atrial structural remodeling.

**【Key words】** Atrial fibrillation; CYP11B2; Polymorphism; Single nucleotide polymorphisms

心房颤动(AF)是临床上最常见的心律失常之一,近几十年来,随着人均寿命的增加,AF的发病率显著上升<sup>[1]</sup>。国内首次 AF 大规模的流行病学调查发现,在 14 个自然人群 29 079 人中,AF 患病率为

0.61%,其中 50~59 岁人群中 AF 患病率为 0.5%,80 岁以上人群上升至 7.5%<sup>[2]</sup>。国内外多项研究显示,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)在心脏重构和 AF 发生中扮演重要角色<sup>[3-5]</sup>,但目前关于醛固酮与 AF 关系的报道不多。Darbar 等<sup>[6]</sup>发现 914 例 AF 患者中,36%是孤立性 AF,其中家族性 AF 占 15%(占有 AF 的 5%),可见非家族性 AF 占 AF 患者的大部分。将非家族性 AF 患者与对照在年龄、性别匹配后进行巢式病例对照研究,对 AF 的遗传基础有了一定的认识<sup>[7]</sup>。为深入了解非家族性 AF 的分子遗

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.010.022

基金项目:山东省自然科学基金(Y2007C047);山东省科技攻关计划(2007GG20002006)

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院临床流行病学研究室(曹菲菲、陈兴栋、吕明);上海交通大学附属新华医院心内科(王群山);复旦大学现代人类学教育部重点实验室(李蕾、王笑峰、金力)

通信作者:吕明, Email: lu.ming528@gmail.com

传学机制,从而为 AF 的预防和诊治提供依据,本研究选取醛固酮合成酶(CYP11B2)基因的 2 个标签单核苷酸多态性(tSNPs-rs4545、rs3802228),观察其是否与非家族性 AF 的发生存在关联。

### 对象与方法

1. 研究对象:①病例组:连续收集 2007 年 1 月至 2008 年 7 月在上海新华医院(上海交通大学附属医院)心内科治疗的 AF 患者,所有患者为无亲缘关系的汉族人群,AF 确诊通过对患者病史及心电图(ECG)获得,剔除年龄<65 岁的孤立性 AF 病例、家族性 AF 病例及合并甲状腺功能亢进(甲亢)病例。②对照组:收集同时期、同病房的非 AF 病例,病例组与对照组以 1:1 配比,两组在性别、年龄(±5 岁)、居住地、左室功能受损(射血分数<55%)、入院时间(±1 个月)、有明显心瓣膜病(至少为轻度或中度的)方面进行个体匹配。

2. 问卷调查:在获得受试者知情同意的前提下,采用统一设计的调查表,由经过培训的临床医师对入选的研究对象逐项进行询问和测量并认真填写。调查内容包括性别、年龄、AF 病史、血钾、心电图、左心房内径(LA)、左心室射血分数(LVEF)、左心室收缩末期内径(LVESD)、左心室舒张末期内径(LVEDD)、电生理检查、冠状动脉造影结果等。

3. 人体基本参数测定:测定身高、体重,以体重(kg)/身高(m)<sup>2</sup>计算 BMI。外周动脉血压的检测,被检者在安静环境下休息 5~10 min,取坐位,使用汞柱式血压计测量右上肢肱动脉血压。以非同日 3 次测量值的均值为所得血压值。

4. SNP 检测:受检者抽取外周血 5 ml,用 2%依地酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)抗凝,应用酚-氯仿法抽提基因组 DNA,定量标化至 10 ng/μl,应用 GenomeLab™ SNPstream 技术平台及 SNPstream 软件进行基因分型。用 Beckman 公司提供的基于网页的设计软件(www.AutoPrimer.com)设计的 PCR 和延伸引物(表 1)。

SNPstream 技术是一种引物延伸反应结合基因芯片进行 SNP 分析的新方法,可将含有所检测 SNP 位点的目的片段进行 12 重或 48 重复 PCR 扩增,即对多个样本的 12 个或 48 个位点的 SNP 同时进行多通路检测<sup>[8]</sup>。扩增后的产物纯化后进行单碱基引物延伸,在延伸反应中加入 TAM-RA 和 Bodipy 双荧光标记的 ddNTP,然后应用延伸引物带有的标签序列,与一种新型的玻璃板底的 384 孔板上人工合成的对应寡核苷酸微阵列进行杂交,双色扫描后可以看到野生型和突变型样本分别在绿色荧光或蓝色荧光有信号,杂合型样本在绿色荧光和蓝色荧光都存在信号。

5. 统计学分析:对于 AF 病例组和对照组间临床资料的比较,所有计量资料经正态性检验均服从正态或近似正态分布,采用  $\bar{x} \pm s$  表示,数值变量用非配对的 *t* 检验和方差分析,分类变量应用  $\chi^2$  检验。计算 CYP11B2 基因两位点基因型频率及等位基因频率,确定其是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,通过  $\chi^2$  检验来进行组间频率比较。多元 logistic 回归模型用于分析不同基因型频率分布与 AF 的关系,以上分析均采用 SAS9.1 软件进行数据处理。运用 Haploview 软件分别计算 2 个多态性位点间的配对连锁不平衡常数(*D*)和 *r*<sup>2</sup>。

### 结 果

1. 一般临床资料:研究对象均来自上海新华医院心内科患者,病例组 297 例(男 161 例,女 136 例),年龄 37~90 岁,平均 65.93 岁 ± 11.80 岁。对照组 297 例(男 161 例,女 136 例),年龄 35~89 岁,平均 65.79 岁 ± 12.15 岁。其中,病例组中高血压者有 165 例(55.6%),糖尿病者 43 例(14.5%),风湿性心瓣膜病者 96 例(32.3%)。病例组的 LA 高于对照组,差异有统计学意义;而两组间在 BMI、LVEDD、LVESD、合并高血压、糖尿病、风湿性心瓣膜病、SBP、DBP、吸烟、饮酒等临床资料及生化指标方面差异无统计学意义(表 2)。

2. CYP11B2 基因 2 个位点基因型频率及等位基因频率分布特点:病例和对照组 rs4545 位点观察到的基因型频率,  $\chi^2$  值分别为 0.09 和 1.15 (*P*>0.05),均符合 Hardy-Weinberg 平衡;rs3802228 位点的基因型频率,  $\chi^2$  值分别为 1.39 和 3.08 (*P*>0.05),符合 Hardy-Weinberg 平衡。

CYP11B2 基因 rs4545 位点各基因型频率在病例组与对照组间分布的差异无统计学意义,AA、GA、GG 基因型的频率分别为 28.4%、48.7% 和 22.8%,  $\chi^2=1.03, P=0.60$ ;等位基因 A、G 的频率分别

表 1 tSNPs-rs4545、rs3802228 位点的 PCR 和延伸引物序列

SNP 位点	寡聚类型	引物序列
rs4545	PCR	CCTGAGCGGTATAATCCCC
	PCRL	ACTGGCGCATGCCAAAGC
	SNPU	GCGGTAGGTTCCCGACATATGCGCTGGCTA GACATCAGGGGCTCC
rs3802228	PCR	TCACAGGGTGACTGGCCT
	PCRL	TGATGAGGATCAGAGCGTTT
	SNPU	GGCTAGATTTCGCAATGCTTTGAACACACCT GGAATGATTACCTA

表2 AF病例组和对照组的一般临床资料比较

项目	病例组	对照组	P值
年龄(岁)	65.93±11.80	65.79±12.15	0.889
性别(男/女)	161/136	161/136	Match
身高(cm)	166.26±8.56	165.76±8.14	0.487
体重(kg)	66.62±11.30	67.22±10.65	0.517
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.97±3.12	24.26±3.26	0.160
LA(mm)	39.37±7.25	35.34±4.50	<0.0001
LVEF(%)	65.27±10.18	66.72±8.13	0.174
LVEDD(mm)	49.63±5.84	49.87±5.97	0.683
LVESD(mm)	30.69±6.77	30.50±6.20	0.766
风湿性心瓣膜病(有/无)	96/201	96/201	Match
高血压(有/无)	165/132	182/115	0.157
糖尿病(有/无)	43/254	56/241	0.152
SBP(mm Hg)	137.85±20.97	140.77±19.56	0.097
DBP(mm Hg)	81.95±11.81	81.70±10.61	0.800
饮酒(是/否)	43/254	43/254	1.000
吸烟(有/无)	87/210	95/202	0.476
血钾(mmol/L)	4.13±0.54	4.06±0.46	0.110

为52.8%和47.2%, P=0.82, 差异无统计学意义。rs3802228位点基因型及等位基因的频率在病例与对照组间分布的差异均无统计学意义(表3)。

表3 tSNPs-rs4545、rs3802228位点基因型与等位基因频率分布(χ<sup>2</sup>检验)

位点	基因型			P值	等位基因		P值
	AA	GA	GG		A	G	
rs4545				0.597			0.815
病例组	82(27.9)	149(50.7)	63(21.4)		313(53.2)	275(46.8)	
对照组	85(29.0)	137(46.8)	71(24.2)		307(52.4)	279(47.6)	
rs3802228				0.807			0.700
病例组	145(48.8)	131(44.1)	21(7.1)		421(70.9)	173(29.1)	
对照组	147(49.8)	131(44.4)	17(5.8)		425(72.0)	165(28.0)	

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%)

3. 病例组2个位点不同基因型间临床资料的比较:除病例组中rs3802228位点具有GG基因型者的LA显著高于其他型者外,rs4545和rs3802228位点不同基因型在各个临床资料观察项中分布的差异均无统计学意义(表4)。

表4 病例组rs3802228、rs4545位点不同基因型间临床资料的比较

临床资料	AA	GA	GG	P值
BMI(kg/m <sup>2</sup> )				
rs4545	24.29±3.19	23.98±3.29	23.48±2.49	0.328
rs3802228	24.26±3.33	23.69±2.91	23.74±2.74	0.324
LA(mm)				
rs4545	38.00±6.69	39.60±7.56	39.98±6.74	0.260
rs3802228	39.27±7.79	38.70±6.52	43.53±6.47	0.033
LVEF(%)				
rs4545	66.64±8.98	67.91±9.74	65.00±11.15	0.217
rs3802228	67.27±9.57	66.53±10.93	63.76±10.59	0.401
风湿性心瓣膜病(有/无)				
rs4545	77/1	144/2	58/2	0.635
rs3802228	137/3	126/1	19/1	0.634
高血压(有/无)				
rs4545	33/49	63/86	35/28	0.134
rs3802228	61/84	61/70	10/11	0.721
糖尿病(有/无)				
rs4545	68/14	128/21	56/7	0.594
rs3802228	122/23	113/18	19/2	0.705

4. 多元logistic回归分析和2个位点间的连锁分析:逐步回归拟合模型,变量选入和剔除水平均为0.1,在排除混杂因素作用之后,未发现CYP11B2两位点基因多态性与AF发病相关联。将三种基因型定义哑变量,分别为(1,0,0),(0,1,0),(0,0,1),进行多元logistic回归分析,rs4545位点GA、GG基因型携带者患病风险与AA基因型携带者没有差别,P值分别为0.54和0.72;rs3802228位点GA、GG基因型携带者患病风险与AA基因型携带者也无差别,P值分别为0.94和0.52。

2个位点间的连锁不平衡程度结果显示,在病例组与对照组之间不存在连锁不平衡。

### 讨论

AF是脑卒中、心力衰竭(心衰)和致死的重要危险因素,其中脑卒中是AF最严重的并发症;AF也是心衰再次住院和心衰致死的重要独立危险因素,发生AF的心衰患者死亡率高于窦性心律的心衰患者<sup>[9]</sup>,明显影响患者的生活质量。

AF的致病因素复杂,常见的危险因素有心瓣膜病、高血压、冠心病、肺心病、心衰、病态窦房结综合征、甲亢等<sup>[10]</sup>。AF发病的遗传机制较为复杂,它包括离子通道、自主神经调节、心脏结构、体液调节系统等诸多方面。近年来积累的证据提示,RAAS与AF的发病有密切关系<sup>[11]</sup>,其机制可能与其促进心房重构,尤其是心房结构重构有关。在人类及AF狗模型也都发现AF与心房激活的RAAS有关<sup>[12,13]</sup>。心房结构重构主要是指心房扩张、心房肌细胞肥厚和心房肌纤维化<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,病例组的LA明显高于对照组,说明病例组发生了左心房结构重构。

RAAS主要由肾素、血管紧张素II、醛固酮等组成。醛固酮有保钠排钾、使交感神经激活儿茶酚胺增多,在血压的调节中起着重要的作用,而且可以刺激心肌胶原纤维合成,促进心肌纤维化及左室重构。大量实验和临床研究也已证明,醛固酮有强烈的致心肌纤维化和心肌重构作用<sup>[15]</sup>。Rebsamen等<sup>[16]</sup>研究发现醛固酮可直接或间接作用于心肌细胞与成纤维细胞,使环氧化酶-2、前列腺素E<sub>2</sub>、白细胞介素-6增加。醛固酮增多能够增加还原型辅酶II(NADPH)氧化酶的表达,促进超氧阴离子产生,促进氧化、应激反应<sup>[17]</sup>。因此,醛固酮可通过促进炎症和氧化应激引起心房肌纤维化。Suzuki等<sup>[18]</sup>发现,选择性醛固酮受体拮抗剂依普利酮(eplerenone)显著抑制了基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9

(MMP-9)的升高,减轻心肌纤维化。多个临床试验研究表明血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素 II (Ang II)受体阻断剂(ARB)可以降低房颤的发生率<sup>[9]</sup>。但目前关于醛固酮合成酶与AF关系的报道不多。

CYP11B2 属于细胞色素氧化酶(cytochrome P-450, CYP)基因超家族,位于8号染色体(8q22)<sup>[20]</sup>,它含有9个外显子和8个内含子,是体内合成醛固酮中最后一步生化反应的催化酶。如果CYP11B2活性增强或启动CYP11B2基因表达的因素增加,都可能引起醛固酮合成数量的增加,进而影响到心房结构重构。为了研究CYP11B2与AF的关系,我们根据HAPMAP数据库选择CYP11B2基因的2个tSNPs,即位于外显子8的rs4545和位于外显子9的rs3802228进行研究。

本研究结果显示,CYP11B2基因rs4545位点AA、GA、GG基因型的频率分别为28.4%、48.7%和22.8%,等位基因A、G的频率分别为52.8%和47.2%,基因型频率和等位基因频率分布的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。rs3802228位点AA、GA、GG基因型的频率分别为49.3%、44.3%和6.4%,等位基因A、G的频率分别为71.5%和28.5%,基因型频率和等位基因频率分布的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究的病例组和对照组均为有器质性病变的患者,也可能是由于CYP11B2基因多态性与某种疾病有关系,掩盖了其AF的关系,在今后的研究中应增加其他的对照组,进一步研究。由于研究条件和经费的限制,本研究只选择了CYP11B2基因的2个tSNPs进行研究,不排除其他tSNPs与AF的相关性。

本研究通过多元logistic分析,未发现CYP11B2 2个位点基因多态性与AF发病相关联,rs4545和rs3802228位点间也不存在连锁不平衡。对病例组2个位点不同基因型间临床资料的比较发现,病例组中rs3802228位点具有GG基因型者的LA显著高于其他型者,而rs3802228位点又位于3' UTR调控区,提示其可能是心房结构重构的一个影响因素。近年来,更多的研究发现AF具有高度的遗传异质性,不同民族、地区的人群AF的相关基因也有明显的差异<sup>[21,22]</sup>,而本研究资料主要来源于上海市及其周边地区,因此需要在更多的人群中验证。

综上所述,目前有关CYP11B2基因遗传多态性对AF影响的研究资料尚十分有限,要阐明这种机制,还需深入研究。同时AF是一种多基因和多环境因素疾病,单一基因的作用不足以成为其致病因素,

或许对AF的发生发展只产生微弱的影响,因此并不能完全排除CYP11B2基因多态性在AF发生中的作用,这还有待更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, et al. Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *Am Coll Cardiol*, 2001, 37(2):371-378.
- [2] 周白强, 胡大一, 陈捷, 等. 中国心房颤动现状的流行病学研究. *中华内科杂志*, 2004, 43(7):491-494.
- [3] Ogimoto A, Hamada M, Nakura J, et al. Relation between angiotensin-converting enzyme II genotype and atrial fibrillation in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Genet*, 2002, 47(4):184-189.
- [4] Bettoni M, Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*, 2002, 105(23):2753-2759.
- [5] Zaman AG, Kearney MT, Schecter C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors as adjunctive therapy in patients with persistent atrial fibrillation. *Am Heart J*, 2004, 147(5):823-827.
- [6] Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, et al. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *Am Coll Cardiol*, 2003, 41(12):2185-2192.
- [7] Asselbergs FW, Moore JH, van den Berg MP, et al. A role for CETP TaqIB polymorphism in determining susceptibility to atrial fibrillation: a nested case control study. *BMC Medical Genetics*, 2006, 7:39(Open Access).
- [8] Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, et al. SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. *Biotechniques*, 2002, Suppl:S70-77.
- [9] Santini M, Ricci RP. The worldwide social burden of atrial fibrillation: What should be done and where do we go? *J Interv Card Electrophysiol*, 2006, 17:183-188.
- [10] 曾治宇, 浦介麟, 谭琛, 等. 心房颤动患者KCNQ1、KCNE1和KCNE4基因单核苷酸多态性研究. *中华心血管病杂志*, 2005, 33(11):987-991.
- [11] Dilaveris P, Giannopoulos G, Synetos A, et al. The role of renin angiotensin system blockade in the treatment of atrial fibrillation. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2005, 5(5):387-403.
- [12] Goette A, Staack T, Rocken C, et al. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *Am Coll Cardiol*, 2000, 35(6):1669-1677.
- [13] Li D, Shinagawa K, Pang L, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation*, 2001, 104(21):2608-2614.
- [14] Everett TH, Li H, Mangrum JM, et al. Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 2000, 102(12):1454-1460.
- [15] Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *Endocrinol*, 2005, 186(1):1-20.
- [16] Rebsamen MC, Perrier E, Gerber-Wicht C, et al. Direct and indirect effects of aldosterone on cyclooxygenase-2 and interleukin-6 expression in rat cardiac cells in culture and after myocardial infarction. *Endocrinology*, 2004, 145(7):3135-3142.
- [17] Virdis A, Neves MF, Amiri F, et al. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*, 2002, 40(4):504-510.
- [18] Suzuki G, Morita H, Mishima T, et al. Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation*, 2002, 106(23):2967-2972.
- [19] Healey JS, Morillo CA, Connolly SJ. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in atrial fibrillation and cardiac remodeling. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20(1):31-37.
- [20] 陈爱华, 张文秀, 唐晓明, 等. 醛固酮合成酶基因多态性与高血压及左室肥厚的关系. *中华内科杂志*, 2002, 41(5):298-301.
- [21] Chugh SS. Confronting the genetic complexity of atrial fibrillation: This too shall pass. *Heart rhythm*, 2007, 12:476-477.
- [22] Carlquist JF, Anderson JL. Gene mutations, atrial fibrillation, and the elusive cigar. *Nature*, 2007, 8:26-28.

(收稿日期:2009-01-16)

(本文编辑:张林东)