

甲硫腺苷磷酸化酶基因单核苷酸多态性与汉族人群心肌梗死的关系

张琦 成双双 阎杰 陈兴栋 王笑峰 杨新春

【摘要】 目的 探讨甲硫腺苷磷酸化酶(MTAP)基因单核苷酸多态性(SNP)与中国汉族人群心肌梗死(MI)的关系。方法 选取432例初发MI患者及430例同期住院的外科对照患者。选取MTAP基因9个标签SNP,采用PCR-SNP Stream技术对所选标签SNP位点进行分型。并对分型结果进行统计学分析。结果 在总体样本中未发现所选SNP位点与MI患病存在关联,经性别分层后,在男性组rs7027989位点的G等位基因在MI组分布频率增高,差异有统计学意义($P=0.003$);在显性遗传模型中,GG基因型较AG+AA基因型的男性对象患MI的风险增加了26%,差异有统计学意义($P=0.005$),经校正混杂因素后其统计学显著性仍然存在。结论 MTAP基因同汉族人群MI患病相关。

【关键词】 心肌梗死; 甲硫腺苷磷酸化酶; 单核苷酸多态性; 遗传

Association between methylthioadenosine phosphorylase gene single nucleotide polymorphisms and myocardial infarction in Chinese Han ethnicity ZHANG Qi¹, CHENG Shuang-shuang², YAN Jie¹, CHEN Xing-dong³, WANG Xiao-feng³, YANG Xin-chun². 1 Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China; 2 Heart Center, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences; 3 School of Life Sciences and Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai

Corresponding author: YANG Xin-chun, Email: zqheart@hotmail.com

This work was supported by a grant from the National Science Fund of China (No. 30971237) and a grant from Tangshan Municipal Science and Technology Bureau Fund (No. 09130202A-3-23)

【Abstract】 Objective To investigate the association between methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) gene single nucleotide polymorphisms (SNP) and myocardial infarction (MI) in the Chinese Han ethnicity. Methods 432 patients suffered from myocardial infarction and 430 controls were involved for case and control groups, respectively. Nine tag SNPs in MTAP gene were selected and genotyped. Results We found no significant association of selected tag SNPs with MI in all of the samples. However, in stratified analysis, significant association was observed at rs7027989 in male subjects. The risk of MI increased by 26% ($P=0.005$) for male subjects of minor allele carriers in a dominant model. The increased risk of MI at rs7027989 remained significant after adjusting for confounding factors. Conclusion MTAP gene might be involved in the etiology of MI in Chinese Han ethnicity.

【Key words】 Myocardial infarction; Methylthioadenosine phosphorylase; Single nucleotide polymorphism; Genetics

心肌梗死(MI)是冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)的严重临床类型。国际最新全基因组关联研究在高加索人CAD或MI病因学上取得突破性的发现,多项全基因组关联研究均将高加索人的CAD/

MI易感基因指向染色体9p21区域^[1-3]。然而在此区域尚无已知的CAD/MI的候选基因,且染色体9p21上发现的这些SNP位点均不在任何一个已知的基因内,而处于基因之外的非编码区。这些危险位点是通过什么机制来影响CAD/MI患病尚不清楚。我们认为这些位点作为遗传标记,很可能通过改变邻近功能基因的常规表达来影响疾病的发生发展。因此,我们将存在于该区域的甲硫腺苷磷酸化酶(methylthioadenosine phosphorylase, MTAP)基因作为新候选基因,采用标签单核苷酸多态性(tag

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.020

基金项目: 国家自然科学基金(30971237); 唐山市科技局基金(09130202A-3-23)

作者单位: 063000 唐山, 华北煤炭医学院附属医院内科(张琦、阎杰); 首都医科大学附属北京朝阳医院心脏中心(成双双、杨新春); 复旦大学生命科学院遗传学研究所(陈兴栋、王笑峰)

第一作者现工作单位: 063000 河北医科大学附属医院唐山工人医院心内科
通信作者: 杨新春, Email: zqheart@hotmail.com

single nucleotide polymorphism, tagSNP)策略,探索 MTAP 基因 SNP 对汉族人群 MI 患病的影响。

对象与方法

1. 研究对象: MI 组为连续收集 2007 年 1 月至 2008 年 3 月入住北京朝阳医院心内科的初发 MI 汉族患者 432 例,年龄 < 75 岁。所有患者均经冠状动脉造影证实存在至少一支血管狭窄 > 50% 以上。对照组为同期外科住院的汉族患者 430 例,年龄 > 45 岁。除外心脑血管病史、外周血管病史、恶性肿瘤史、心电图存在缺血改变、心脏彩超存在室壁运动异常或射血分数 < 50%。所有研究对象抽取外周静脉血 3 ~ 5 ml,采用酚氯仿法抽提 DNA。保存于 -20 °C 冰箱。

2. 标签 SNP 的选择:在本研究中利用 HapMap (<http://www.hapmap.org>) 数据库中的中国汉族人 SNP 分型结果 (release19/PhaseII/Oct05),以 $r^2 > 0.8$, MAF > 0.05 的标准选取 MTAP 基因中的 tag SNP 位点,共检索出 9 个 SNP 位点:rs7023474、rs7027989、rs4399022、rs7850937、rs10118757、rs3802392、rs7047648、rs4129861、rs10117507。

3. SNP 分型: SNP 位点的引物由 www.autoprimer.com 在线设计,由上海英骏公司合成。用双蒸水将 DNA 稀释到 10 ng/μl。将 PCR 引物及延伸引物稀释到终浓度 10 μmol/L。依次加入引物、dNTP、缓冲液、氯化镁、Taq 酶及稀释后的 DNA,扩增条件:95 °C 变性 15 min,然后循环 40 次 (94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min),最后 4 °C 保温。在扩增产物中加入 3 μl 纯化液,纯化反应条件:37 °C 30 min,96 °C 10 min,4 °C 保温。再向每个样本中加入 7 μl 引物延伸反应混合物,延伸引物,延伸反应条件:96 °C 3 min,然后进入 40 次循环 (94 °C 20 s,40 °C 11 s),4 °C 保温。取 10 μl 延伸产物加入杂交板,42 °C 杂交 2 h。应用 SNP Stream 基因分型系统 (Beckman Coulter 公司) 进行扫描分析。实验所用的 dNTP 购自 TaKaRa 公司,PCR 缓冲液、氯化镁、Taq 酶均购自 Roche 公司,其余试剂购自 Beckman Coulter 公司。

4. 统计学分析:计量资料比较采用 t 检验,病例组与对照组间不同基因型及等位基因分布频率比较采用 χ^2 检验,多因素分析采用 logistic 回归。所有数据处理均采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。用 Haploviewv 4.0 软件分析位点间的连锁不平衡强度并划分单倍型,再用 χ^2 检验分析各单倍型频率在 MI

组和对照组之间的差异。

结果

1. 研究对象的一般特征: 432 例 MI 患者年龄 26 ~ 75 (60.99 ± 10.87) 岁,其中男性 317 例,女性 115 例; 430 例对照组患者年龄 45 ~ 90 (60.34 ± 10.90) 岁,其中男性 300 例,女性 130 例。性别、年龄比较,差异均无统计学意义 (表 1)。

表 1 研究对象的一般特征

特征	MI 组 (n=432)	对照组 (n=430)	P 值
男/女 (%)	317/115(73.4/26.6)	300/130(69.8/30.2)	0.240
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	60.99 ± 10.87	60.34 ± 10.90	0.382
BMI ($\bar{x} \pm s$)	25.17 ± 3.42	24.56 ± 3.39	0.011
吸烟史	264(61.1)	97(22.6)	0.000
饮酒史	91(21.1)	69(16.0)	0.058
高血压病史	247(57.2)	101(23.5)	0.000
糖尿病史	238(55.1)	92(21.4)	0.000
高脂血症	191(44.2)	122(28.4)	0.000

注:括号内数据为构成比 (%)

2. 基因型和等位基因频率分析:本研究选取的 9 个 SNP 位点在所有样本中的分型成功率都在 97.0% ~ 98.8%。MTAP 基因 9 个 tag SNP 位点经检验均符合 Hardy-Weinberg 平衡,具有群体代表性。在总体样本中,未能发现各位点基因型和等位基因分布频率的差异 ($P > 0.05$)。以研究对象的性别分层后进行关联分析发现,在男性组,MTAP 基因中的 rs7027989 位点同男性 MI 患病相关,差异有统计学意义,其突变型等位基因 G 等位基因在 MI 组的分布频率高于对照组 ($P = 0.003$) (表 2 ~ 4),检验效能为 0.79,而对女性样本的分析后得到其检验效能仅为 0.62。

3. SNP 点的 MI 患病风险比较:采用 logistic 回归分析推断各 SNP 位点与 MI 之间的关联性。对男性人群进行 logistic 回归分析,发现在显性遗传模型 (mm/Mm + MM),rs7027989 同 MI 患病存在关联,最小等位基因 (G 等位基因) 男性纯合子携带者患 MI 的风险提高了 26% (OR 值 95% CI : 1.07 ~ 1.48, $P = 0.005$),经对年龄、性别、BMI、吸烟史、饮酒史、高血压病、糖尿病、高脂血症等因素进行校正后,rs7027989 位点 GG 基因型增加 MI 患病的风险仍然有统计学意义 ($OR = 1.28$, 95% CI : 1.04 ~ 1.59, $P = 0.022$),在本次研究的指标中,吸烟史、高血压病史、糖尿病史和高脂血症也均提示与 MI 的患病相关 (表 5)。

4. 各位点间的连锁分析:采用 Haploviewv 4.0 软件计算基因内所有 tag SNP 位点两两之间的连锁

表2 研究SNP位点基因型和等位基因的分布频率比较

SNP		基因型 (%)			P值	等位基因 (%)		P值
		MM	Mm	mm		M	m	
rs7023474	MI组	212(51.2)	166(40.1)	36(8.7)	0.777	590(71.3)	238(28.7)	0.911
	对照组	221(51.9)	163(38.3)	42(9.9)		605(71.0)	247(29.0)	
rs7027989	MI组	238(55.9)	151(35.4)	37(8.7)	0.347	627(73.6)	225(26.4)	0.129
	对照组	256(60.4)	139(32.8)	29(6.8)		651(76.8)	197(23.2)	
rs4399022	MI组	263(63.9)	133(32.2)	16(3.9)	0.901	661(80.0)	165(20.0)	0.673
	对照组	280(65.4)	132(30.8)	16(3.7)		692(82.2)	155(17.8)	
rs7850937	MI组	137(32.1)	207(48.5)	83(19.4)	0.894	481(56.3)	373(43.7)	0.649
	对照组	131(31.1)	203(48.2)	87(20.7)		465(55.2)	377(44.8)	
rs10118757	MI组	251(59.5)	152(36.0)	19(4.5)	0.923	654(77.5)	190(22.5)	0.920
	对照组	248(59.6)	147(35.3)	21(5.0)		643(77.3)	189(22.7)	
rs3802392	MI组	373(89.7)	43(10.3)	0(0.0)	0.212	789(94.8)	43(5.2)	0.339
	对照组	374(88.7)	47(11.3)	3(0.7)		795(93.8)	53(6.2)	
rs7047648	MI组	146(34.9)	202(48.3)	70(16.7)	0.355	494(59.1)	342(40.9)	0.356
	对照组	147(34.3)	194(45.2)	88(20.5)		488(56.9)	370(43.1)	
rs4129861	MI组	369(88.3)	48(11.5)	1(0.2)	0.838	786(94.0)	50(6.0)	0.997
	对照组	377(88.5)	47(11.0)	2(0.5)		801(94.0)	51(6.0)	
rs10117507	MI组	134(32.1)	218(52.3)	65(15.6)	0.186	486(58.3)	348(41.7)	0.224
	对照组	161(37.9)	198(46.6)	66(15.5)		520(61.2)	330(38.8)	

注: M代表野生型等位基因; m代表突变型等位基因

表3 研究SNP位点基因型和等位基因在男性中的分布频率比较

SNP		基因型 (%)			P值	等位基因 (%)		P值
		MM	Mm	mm		M	m	
rs7023474	MI组	150(49.7)	124(41.1)	28(9.3)	0.163	424(70.2)	180(29.8)	0.256
	对照组	168(56.4)	100(33.6)	30(10.1)		436(73.2)	160(26.8)	
rs7027989	MI组	167(53.4)	115(36.7)	31(9.9)	0.017	449(71.7)	177(28.3)	0.003
	对照组	191(64.5)	86(29.1)	19(6.4)		468(79.1)	124(20.9)	
rs4399022	MI组	195(64.8)	95(31.6)	11(3.7)	0.979	485(80.6)	117(19.4)	0.502
	对照组	193(64.8)	95(31.9)	10(3.4)		481(82.1)	105(17.9)	
rs7850937	MI组	103(32.9)	147(47.0)	63(20.1)	0.620	353(56.4)	273(43.6)	0.329
	对照组	86(29.5)	141(43.3)	65(22.3)		313(53.6)	271(46.4)	
rs10118757	MI组	187(60.5)	108(35.0)	14(4.5)	0.835	482(78.0)	136(22.0)	0.552
	对照组	169(58.3)	106(36.6)	15(5.2)		444(26.6)	136(23.4)	
rs3802392	MI组	270(88.8)	34(11.2)	0(0.0)	0.173	574(94.4)	34(5.6)	0.887
	对照组	263(89.5)	28(9.5)	3(1.0)		554(94.2)	34(5.8)	
rs7047648	MI组	101(33.1)	152(49.8)	52(17.0)	0.293	354(58.0)	256(42.0)	0.770
	对照组	111(37.1)	130(43.5)	58(19.4)		352(58.9)	246(41.1)	
rs4129861	MI组	267(87.5)	38(12.5)	0(0.0)	0.354	572(93.8)	38(6.2)	0.459
	对照组	266(89.9)	29(9.8)	1(0.3)		561(94.8)	31(5.2)	
rs10117507	MI组	89(29.3)	169(55.6)	46(15.1)	0.105	347(57.1)	261(42.9)	0.151
	对照组	110(37.2)	142(48.0)	44(14.9)		362(61.1)	230(38.9)	

注: 同表2

表4 研究SNP位点基因型和等位基因在女性中的分布频率比较

SNP		基因型 (%)			P值	等位基因 (%)		P值
		MM	Mm	mm		M	m	
rs7023474	MI组	62(55.4)	42(37.5)	8(7.1)	0.097	166(74.1)	58(25.9)	0.054
	对照组	53(41.4)	63(49.2)	12(9.4)		169(66.0)	87(34.0)	
rs7027989	MI组	71(62.8)	36(31.9)	6(5.3)	0.166	178(78.8)	48(21.2)	0.066
	对照组	65(50.8)	53(41.4)	10(7.8)		183(71.5)	73(28.5)	
rs4399022	MI组	69(61.6)	38(33.9)	5(4.5)	0.655	176(78.6)	48(21.4)	0.403
	对照组	82(66.9)	32(28.5)	6(4.6)		196(81.7)	44(18.3)	
rs7850937	MI组	34(29.8)	60(52.6)	20(17.5)	0.692	128(56.1)	100(43.9)	0.537
	对照组	45(34.9)	62(48.1)	22(17.1)		152(58.9)	106(41.1)	
rs10118757	MI组	64(56.6)	44(38.9)	5(4.4)	0.587	172(76.1)	54(23.9)	0.454
	对照组	79(62.7)	41(32.5)	6(4.8)		199(79.0)	53(21.0)	
rs3802392	MI组	103(92.0)	9(8.0)	0(0.0)	0.081	215(96.0)	9(4.0)	0.122
	对照组	111(85.4)	19(14.6)	0(0.0)		241(92.7)	19(7.3)	
rs7047648	MI组	45(39.8)	50(44.2)	18(15.9)	0.103	140(61.9)	86(38.1)	0.052
	对照组	36(27.7)	64(49.2)	30(23.1)		136(52.3)	124(47.7)	
rs4129861	MI组	102(90.3)	10(8.8)	1(0.9)	0.476	214(94.7)	12(5.3)	0.291
	对照组	111(85.4)	18(13.8)	1(0.8)		240(92.3)	20(7.7)	
rs10117507	MI组	45(39.8)	49(43.4)	19(16.8)	0.998	139(61.5)	87(38.5)	0.953
	对照组	51(39.5)	56(43.4)	22(17.1)		158(61.2)	100(38.8)	

注: 同表2

表 5 男性人群 MI 危险因素的 logistic 回归分析

危险因素	OR 值	95%CI	P 值
年龄	1.014	0.990 ~ 1.038	0.272
BMI	1.059	0.990 ~ 1.132	0.094
吸烟史	10.965	6.378 ~ 18.852	0.000
饮酒史	0.535	0.308 ~ 0.928	0.056
高血压病史	5.380	3.259 ~ 8.880	0.000
糖尿病史	5.065	3.128 ~ 8.202	0.000
高脂血症	1.147	1.032 ~ 1.874	0.012
rs7023474	1.548	0.737 ~ 3.251	0.248
rs7027989	1.282	1.041 ~ 1.594	0.022
rs4399022	1.098	0.757 ~ 2.302	0.206
rs7850937	1.249	0.736 ~ 2.119	0.411
rs10118757	1.144	0.592 ~ 2.210	0.688
rs3802392	0.986	0.412 ~ 2.359	0.974
rs7047648	0.853	0.555 ~ 1.310	0.467
rs4129861	0.417	0.164 ~ 1.061	0.067
rs10117507	0.618	0.392 ~ 0.975	0.039

不平衡程度,根据 SNP 位点间的 D' 值划分各基因内的单倍域分布。其中 rs7023474 和 rs7027989 间 $D' = 0.93$, $r^2 = 0.85$,提示存在连锁关系,但是未能发现有意义的单倍域。

讨 论

MTAP 基因是一个抑癌基因,MTAP 是甲硫氨酸和嘌呤合成补救途径中一个关键的酶^[4],它催化多胺代谢的副产物甲硫腺苷(methylthioadenosine, MTA),最终生成 ATP、dAMP 和甲硫氨酸,参与细胞的能量合成、DNA 合成和蛋白质合成,对维持正常细胞的功能有非常重要的作用。MTAP 基因定位在 9p21 区,该基因含有 8 个外显子和 7 个内含子^[5],其广泛表达于正常组织中。在人类基因组上,MTAP 与 p15、p16 基因簇连锁。国外的文献报道主要集中在 MTAP 与 p15、p16 在肿瘤发生中的共缺失研究。尚未见有关 MTAP 基因与动脉粥样硬化关联的研究报道。

tag SNP 是指能代表一个染色体区域其他众多位点信息的 SNP 位点。因此研究 tag SNP,可以提供该区域内大多数的遗传多态模式,极大提供关联分析的有效性。Hapmap 的定期更新发布也使我们能够从其网站中得到最新的数据信息。

rs7027989 位于 MTAP 基因的第 3 内含子。本研究发现 rs7027989 仅同男性人群发生 MI 有显著关联,而在女性人群未见差异有统计学意义。但出现这种性别差异的原因尚不清楚。CAD 患病率的性别差异已经在世界上不同地区的不同人群中进行的大量流行病学研究得到证实^[6]。同男性人群相比,

女性患 CAD 风险的减少部分原因是由于雌激素的作用。雌激素可能影响了动脉粥样硬化的过程,通过与其他染色质相关转录因子的相互作用,从而影响炎症基因或者其他多种类型的血管活性物质的作用而参与了动脉粥样硬化的形成和发展过程^[7]。而这种与性别相关的遗传易感性的生理机制还需要进一步的研究阐明。同时本研究中女性人群的检验效能仅为 0.62,检验效能的不足也使结果不能作为令人信服的依据来进行判断,提示本研究的样本量偏小,特别是女性研究对象的样本量偏小,可能造成结果的假阴性。因此,这种性别差异是否真正存在还需在今后的进一步研究中扩大样本例数来加以证实。

由于 rs7027989 并不处于 MTAP 基因的转录区,它也可能只是汉族人群 MI 发病的一个遗传标记,或者本身可能影响剪接方式的改变而影响基因表达,与其处于同一连锁不平衡区的这一 SNP 致病变异同样仍需进一步探索。

MI 是一个遗传与环境因素共同作用的多基因病,遗传的变异对疾病的发生具有微效性,本研究初步证实了 MTAP 基因与 MI 的患病的关联,然而,这种关联产生的机制尚需更深入研究。

参 考 文 献

- [1] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*, 2007, 316(5830): 1488-1491.
- [2] Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*, 2007, 316(5830): 1491-1493.
- [3] Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2007, 357(5): 443-453.
- [4] Backlund PS Jr, Smith RA. 5'-Methylthioadenosine metabolism and methionine synthesis in mammalian cells grown in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 108(2): 687-695.
- [5] Nobori T, Takabayashi K, Tran P, et al. Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6203-6208.
- [6] Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, et al. Myocardial infarction and coronary deaths in the world health organization MONICA project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation*, 1994, 90: 583-612.
- [7] Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 1997, 277: 1508-1510.

(收稿日期: 2009-06-10)

(本文编辑: 张林东)