

· 论 著 ·

染色体 9p21 上 rs2383206 单核苷酸多态性与冠脉病变 Gensini 积分的关系

孙帅^{1,2}, 翁建新², 陈竹君³, 罗建方³

1. 云南省第一人民医院, 云南 昆明 650032; 2. 深圳市孙逸仙心血管医院心内科, 广东 深圳 518100;
3. 广东省人民医院心血管研究所心内科, 广东 广州 510080

摘要: **目的** 探讨染色体 9p21 上 rs2383206 位点的单核苷酸多态性与冠状动脉(冠脉)病变严重程度的关系。**方法** 连续收集 2010 年 12 月至 2012 年 12 月行冠脉造影术诊断为冠心病的患者(冠心病组)200 例,同期冠脉造影正常者 150 例(对照组)。抽取静脉血,硅珠法提取基因组 DNA;采用 PCR-SNP Stream 技术对 rs2383206 位点进行多态性分型,对冠心病患者冠脉造影结果进行 Gensini 积分评定,分析两者的关系。**结果** 冠心病组 rs2383206 位点 G 等位基因频率(53.0% vs 42.0%)以及 AG(42.0% vs 38.7%)、GG 基因型分布频率(32.0% vs 24.7%)均高于对照组(P 均 < 0.05)。与 AA 基因型相比,AG、GG 基因型 Gensini 积分明显升高(P 均 < 0.01)。与 AA 基因型相比,AG、GG 基因型显著增加冠心病风险($OR = 1.428, 95\% CI: 1.048 \sim 1.947, P = 0.024$)。**结论** rs2383206 位点 G 等位基因为冠心病患病的危险等位基因,GG 基因型可能为冠心病易感相关的危险基因型。AG、GG 基因型与冠脉病变严重程度呈正相关。

关键词: 染色体; 位点; 单核苷酸多态性; 冠心病; Gensini 积分

中图分类号: R 541.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)06-0753-03

Relationship between rs2383206 SNP on chromosome 9p21 and Gensini score of coronary artery disease

SUN Shuai*, WENG Jian-xin, CHEN Zhu-jun, LUO Jian-fang

* First People's Hospital of Yunnan Province (currently working in Department of Cardiology, Shenzhen Sun Yat-sen Cardiovascular Hospital), Kunming, Yunnan 650032, China

Corresponding author: WENG Jian-xin, E-mail: WJX968@126.com

Abstract: Objective To investigate the relationship between rs2383206 single nucleotide polymorphism (SNP) on chromosome 9p21 and the severity degree of coronary artery disease (CHD). **Methods** A total of 200 patients with CHD diagnosed by coronary angiography were consecutively collected from December 2010 to December 2012 (CHD group), and the subjects with normal coronary angiography at the same period were served as control group ($n = 150$). Genomic DNA was extracted from venous blood sampling by silica bead method. The polymorphic typing of rs2383206 locus was analyzed by PCR-SNP stream technique. Gensini score was made to evaluate the results of coronary angiography of CHD patients, and the relationship between them was analyzed. **Results** Compared with control group, the G allele frequency (53.0% vs 42.0%), AG genotype distribution frequency (42.0% vs 38.7%) and GG genotype distribution frequency (32.0% vs 24.7%) at rs2383206 locus in CHD group significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with AA genotype, the Gensini scores of AG and GG genotypes in CHD group significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with AA genotype, the CHD risk in AG and GG genotypes significantly increased ($OR: 1.428, 95\% CI: 1.048 - 1.947, P = 0.024$). **Conclusions** G allele at rs2383206 locus is the risk allele for CHD patients. GG genotype may be the risk genotype associated with susceptibility to CHD. AG genotype and GG genotype are positively correlated with the severity of CHD.

Key words: Chromosome; Locus; Single nucleotide polymorphism; Coronary heart disease; Gensini score

冠心病是多基因疾病,是若干作用微小但有累加效应的致病基因结合环境因素共同导致的。近年来

随着人类基因组计划(GWAS)和分子生物学技术的进展,目前已确定了一系列的冠心病易感基因及相关单核苷酸多态性(SNP)位点。GWAS 研究发现染色体 9p21.3 的 SNP 是冠心病发病的首要危险因素之一^[1]。研究表明其 rs2383206 位点与冠心病发病的易感性相关^[1-2]。本研究通过分析昆明汉族人群 rs2383206 的 SNP,进一步探讨该位点与冠状动脉(冠脉)病变严重程度的关系。

1 对象与方法

1.1 病例选择 连续收集 2010 年 12 月至 2012 年 12 月行冠脉造影术诊断为冠心病的患者 200 例(冠心病组)。冠心病组入选标准:(1)冠脉造影证实至少 1 支主要冠脉血管主要截断管腔狭窄 $\geq 50\%$;(2)进行过冠脉旁路术或经皮冠脉介入者。同期冠脉造影正常者 150 例作为对照组。两组均排除先天性心脏病、心肌病、瓣膜病及严重肝、肾疾病者。

1.2 临床资料 本研究为单中心病例对照研究,获得医院伦理委员会的批准,研究对象在入选时签署知情同意书。记录临床资料:年龄、体质指数(BMI)、吸烟史、饮酒史、高血压病史、糖尿病史、高脂血症病史、冠心病病史、家族史、药物使用情况及家庭环境。

1.3 标本收集与保存 抽取患者空腹 12 h 静脉血 5 ml,用 2% EDTA-Na2 200 μ l 抗凝处理后,充分混匀置于 4℃ 冰箱保存,采用硅珠法提取基因组 DNA,保存于 -20℃ 冰箱。

1.4 方法 染色体 9p21.3 上冠心病风险相关基因成簇存在于 53kb 的区域中^[3],该区域包括两组细胞周期蛋白激酶抑制因子编码基因 CDKN2A 和 CDKN2B。2007 年心血管疾病全基因组研究显示,这两个基因转录起始位点上游的 rs2383206 SNP 突变与冠心病发病相关^[4]。

1.4.1 SNP 位点检测 SNP 位点的引物由 www.autoprimer.com 在线设计,由上海英骏公司合成。上游引物:ATCCTGGTTGCCCTTCT;下游引物:CTCATTGAAGATGGGGG;延伸引物:GTGATTCTGTACGTGTCGCCCTT, TCCTTAGAAATGTTATTGTAGT。采用双蒸水将 DNA 稀释到 10 ng/ μ l。PCR 引物及延伸引物稀释终浓度为 10 μ M。依次加入引物、脱氧核苷三磷酸(dNTP)、缓冲液、氯化镁、Taq 酶及稀释后的 DNA。进行扩增、纯化、引物延伸、杂交。应用 SNP Stream 基因分型系统进行扫描分析。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 公司。

1.4.2 Gensini 积分 以冠脉病变血管的不同节段

及狭窄程度制定不同的权重系数:(1)血管狭窄程度评分,狭窄 1%~25% 记 1 分;26%~50% 记 2 分;51%~75% 记 4 分;76%~90% 记 8 分;91%~99% 记 16 分;100% 闭塞记 32 分。(2)病变血管部位权重系数,左主干为 5;左前降支近段为 2.5,中段为 1.5,远段为 1;左回旋支近段为 2.5,中、远段为 1;右冠状动脉为 1;小分支为 0.5。根据患者冠脉造影结果,计算各分支血管积分=病变血管部位权重系数 \times 血管狭窄程度权重系数,再将各分支血管积分求和,结果记为该患者冠脉病变的 Gensini 积分。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,均为双侧检验。计量资料进行正态性检验,三组独立样本比较采用 *F* 检验,两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料组间比较采用 χ^2 检验;多因素分析采用逐步 Logistic 回归处理;变量间相关性采用 Spearman 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型和等位基因频率分析 所有样本中 rs2383206 位点的分型成功率为 100%,对照组样本符合 Hardy-Weinberg 平衡。在冠心病组,rs2383206 位点的 G 等位基因频率及 AG、GG 基因型分布频率均高于对照组(P 均 < 0.05)。见表 1。由此推断,在 rs2383206 位点中,G 等位基因可能为冠心病患病的危险等位基因,GG 基因型可能为冠心病易感相关的危险基因型。

2.2 SNP 位点的患病风险评估 应用 Logistic 回归分析推断 rs2383206 位点与冠心病患病的关联性,并评价患病增加的风险。结果显示,校正了传统危险因素后,与 AA 纯合子相比,rs2383206 的 GG、AG 基因型具有显著增加冠心病风险的效应($OR = 1.428$, 95% *CI*:1.048~1.947, $P = 0.024$)。

2.3 Gensini 积分分析 冠心病组 rs2383206 位点存在 AG、GG 基因型的 Gensini 积分高于 AA 基因型(P 均 < 0.01)。见表 2。应用 Spearman 相关性分析校正冠心病传统危险因素对结果的影响,rs2383206 位点的 G 等位基因数与 Gensini 积分仍呈正相关($r = 0.264$, $P < 0.05$)。

表 1 rs2383206 位点基因型和等位基因的分布频率比较 例(%)

| 组别 | 例数 | 基因型 | | | 等位基因 | |
|------|-----|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | | AA | AG | GG | A | G |
| 冠心病组 | 200 | 52(26.0) | 84(42.0)* | 64(32.0)* | 188(47.0) | 212(53.0)* |
| 对照组 | 150 | 58(38.7) | 58(38.7) | 34(24.7) | 174(58.0) | 126(42.0) |

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

表 2 rs2383206 基因型与传统危险因素、

Gensini 积分的关系

| 变量 | 基因型分组 | | | P 值 |
|---------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------|
| | AA (n=52) | AG (n=84) | GG (n=64) | |
| 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$) | 60.23 ± 10.746 | 60.62 ± 11.209 | 61.75 ± 9.891 | 0.449 |
| BMI($\bar{x} \pm s$) | 24.94 ± 2.738 | 25.41 ± 3.127 | 24.92 ± 3.539 | 0.586 |
| Gensini 积分(分, $\bar{x} \pm s$) | 35.62 ± 21.863 | 50.30 ± 36.202* | 49.82 ± 25.248* | 0.011 |
| 吸烟史[例(%)] | 32(61.5) | 56(66.7) | 40(62.5) | 0.759 |
| 高血压病史[例(%)] | 28(53.8) | 28(33.3) | 40(62.5) | 0.001 |
| 糖尿病病史[例(%)] | 24(46.2) | 28(33.3) | 16(25.0) | 0.056 |
| 高脂血症[例(%)] | 40(76.9) | 60(71.4) | 4(6.2) | 0.000 |

注:与 AA 型比较, *P < 0.01。

3 讨论

通过人类基因组计划, 现已明确了一系列与冠心病发病相关的 SNP 位点。McPherson 等^[2]对白种人行全基因组扫描及关联分析发现, 染色体 9p21 上的 rs2383206 位点的 SNP 与冠心病易感性相关。Scheffold 等^[5]的研究进一步证实 rs2383206 位点与心肌梗死(MI)的发生有相关性。张琦等^[6]对初发 MI 的汉族人群 rs2383206 位点进行 SNP 分型研究, 结果表明 G 等位基因可使 MI 患病风险提高 54%, 提示 rs2383206 也是中国汉族人群 MI 发生的易感位点。不同种族冠心病危险等位基因亦存在差异^[7], 本研究探索昆明高原地区汉族人群 rs2383206 与冠心病的相关性, 结果与张琦等^[6]研究结果相近, AG/GG 基因型冠心病的患病风险比 AA 基因型增加 42.8%。

对于 9p21 染色体上的 SNP 位点影响冠心病发病的机制不断被认知^[8], 但尚未最终阐明, 大多数人认为其可能通过相邻基因(CDKN2A 及 CDKN2B)发挥作用^[9-10]。其相邻基因编码的 p16NK4a、p15NK4b 在动脉粥样硬化进程中起重要作用^[11-12]。Visel 等^[13]通过该区域基因敲除小鼠观察到 CDKN2A 和 CDKN2B 表达显著下调, 明显提升主动脉平滑肌的增殖能力。Gioli-Pereira 等^[14]发现 rs2383206 位点为 GG 基因型的冠心病患者有更高的病死率, 提示 rs2383206 位点为 GG 基因型与冠心病患者的不良预后有关, 但对于该位点与冠脉病变严重程度的关系国内外尚未见报道。本研究从该位点基因型与冠脉病变 Gensini 积分的关系出发, 校正了性别、年龄、BMI、高血压等传统危险因素, 发现冠心病患者 rs2383206 位点的 G 等位基因数与 Gensini 积分呈正相关, 表明冠心病患者 AG、GG 基因型比 AA 基因型冠脉病变更加严重。

对冠脉病变严重程度的量化, 目前仍缺乏统一标准。Gensini 积分并不十分完善, 其评分体系中未包含患者基础疾病状态, 评分主要依据仅是冠脉狭窄的

程度及支配区域的血供情况, 对于扭曲钙化、小血管病变等复杂病变评估尚存在缺陷。本研究为单中心病例对照研究, 样本量有限, SNP 位点 rs2383206 的具体基因效应还有待在临床实践中进一步证实。

参考文献

- [1] Roberts R, Stewart AF. Genes and coronary artery disease; where are we? [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(18): 1715 - 1721.
- [2] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease [J]. Science, 2007, 316(5830): 1488 - 1491.
- [3] Harismendy O, Notani D, Song X, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response [J]. Nature, 2011, 470(7333): 264 - 268.
- [4] Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction [J]. Science, 2007, 316(5830): 1491 - 1493.
- [5] Scheffold T, Kullmann S, Hugel A, et al. Six sequence variants on chromosome 9p21.3 are associated with a positive family history of myocardial infarction; a multicenter registry [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2011, 11: 9.
- [6] 张琦, 钟光珍, 王志军, 等. 染色体 9p21 上两个 SNP 位点与中国汉族人群心肌梗死的关系 [J]. 山东医药, 2010, 50(5): 4 - 6.
- [7] Xie F, Chu X, Wu H, et al. Replication of putative susceptibility loci from genome-wide association studies associated with coronary atherosclerosis in Chinese Han population [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20833.
- [8] Muhlestein JB, Anderson JL. The 9p21.3 genetic region and coronary heart disease where do we go from here? [J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(4): 435 - 437.
- [9] Almontashiri NA, Fan M, Cheng BL, et al. Interferon-gamma activates expression of p15 and p16 regardless of 9p21.3 coronary artery disease risk genotype [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(2): 143.
- [10] Pilbrow AP, Folkersen L, Pearson JF, et al. The chromosome 9p21.3 coronary heart disease risk allele is associated with altered gene expression in normal heart and vascular tissues [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39574.
- [11] Zhuang J, Peng W, Li H, et al. Methylation of p15INK4b and expression of ANRIL on chromosome 9p21 are associated with coronary artery disease [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47193.
- [12] Segev A, Nili N, Qiang B, et al. Inhibition of intimal hyperplasia after stenting by over-expression of p15; a member of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(3): 417 - 422.
- [13] Visel A, Zhu Y, May D, et al. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice [J]. Nature, 2010, 464(7287): 409 - 412.
- [14] Gioli-Pereira L, Santos PC, Ferreira NE, et al. Higher incidence of death in multi-vessel coronary artery disease patients associated with polymorphisms in chromosome 9p21 [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2012, 12: 61.