

山东地区肾上腺素能 β_3 受体基因多态性与冠心病的相关性研究

崔金兴¹ 崔国方^{2△} 钟志欢³ 张积涛² 陈惠²

(1 青岛大学医学院 山东 青岛 266033 2 青岛大学医学院附属海慈医疗集团心内科 山东 青岛 266033 ;

3 青岛海慈医疗集团特需保健科 山东 青岛 266033)

摘要 目的:研究山东地区肾上腺素能 β_3 受体(β_3 -AR)基因多态性与冠心病及其危险因素之间的关系。方法:对相互间无一级亲属关系的120例冠心病患者及114例非冠心病正常对照组人群,进行体重指数、腰臀围比、空腹血糖、血脂、血压、心电图、心脏彩超等检测,同时应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)核苷酸分型技术检测肾上腺素能 β_3 受体基因及其基因多态性进行分析。结果:(1)冠心病组和正常对照组 Trp64Trp、Trp64Arg 和 Arg64Arg 的基因型频率分别为 68.3%、30.0%、1.6% 和 69.2%、29.8%、0.9%。冠状动脉粥样硬化性心脏病组 Arg 等位基因频率(16.6%)与对照组(15.8%)频率近似($P>0.05$),突变频率在冠心病与非冠心病之间相比无显著性差异。(2)多态性分布在冠状动脉粥样硬化性心脏病组不同冠脉病变支数亚组中也无显著性差异($\chi^2=0.471$ $P=0.790$)。结论:肾上腺素能 β_3 受体基因 Trp64Arg 突变与山东地区人群冠心病的发生、发展无明显相关性。

关键词 冠心病 肾上腺素能 β_3 受体 基因突变

中图分类号 R541.1 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)11-2141-04

Relationship between β_3 -Adrenoreceptor Genetic Polymorphism and Risk Factors of CHD Patients in ShanDong Region

CUI Jin-xing¹, CUI Guo-fang^{2△}, ZHONG Zhi-huan³, ZHANG Ji-tao², CHEN Hui²

(1 Medical College of Qingdao University Qingdao 266033, China;

2 Department of Cardiology, the Medical College of Qingdao University Affiliated HISER Medical Group, Qingdao 266033, China;

3 Special Health care department, HISER Medical Group, Qingdao, Shandong, 266033, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the Relationship between β_3 -adrenoreceptor genetic polymorphism and risk factors of patients with coronary heart disease (CHD) in Shandong region. **Methods:** The 120 patients with coronary heart disease and 114 healthy controls were involved in the study. These β_3 -adrenoreceptor genetic polymorphisms were analyzed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The indexes such as body weight, height, Body-mass index (BMI), waist circumference, hip circumference, blood pressure, lipids, fast plasma glucose and electrocardiogram were detected in all subjects. **Results:** (1) The frequencies of Trp/Trp, Trp/Arg and Arg/Arg were 68.3%, 30.0%, 1.6% in the CHD group while those were 69.2%, 29.8% and 0.9% in the control group. The frequency of Arg allele were 16.6% in the CHD group and 15.8% in the control group ($P>0.05$). (2) The frequencies of Trp/Arg and Arg/Arg genotypes of the Trp64Arg polymorphism were not statistically different among CHD patients with one, two and three or more significantly diseased vessels ($\chi^2=0.471$ $P=0.790$). **Conclusion:** The findings suggest no significant association was found between β_3 -AR Trp64Arg polymorphism and CHD in ShanDong region.

Key words: CHD; β_3 -adrenoreceptor; Genetic polymorphism

Chinese Library Classification(CLC): R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)11-2141-04

前言

近年来,国内外关于 β_3 肾上腺素能受体(β_3 -adrenoreceptor β_3 -AR) Trp64Arg 基因多态性与冠心病的关系已有报道,但是结果不一^[1,2],我们对全国冠心病的高发地区-山东省人群进行 β_3 -AR 基因 Trp64Arg 多态性的检查及病例-对照分析,探讨这一多态性位点在山东省人群冠心病发病中的意义。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 冠心病组 选择 2009/09-2011/09 在山东省青岛市海慈医院心内科就诊的冠心病患者 120 例,男性 73 例,女性 47 例,均

为汉族,平均年龄(69.95 ± 6.55)岁,所有患者均经冠状动脉造影证实。冠心病的诊断根据美国心脏病协会的标准,以正常冠状动脉官腔直径为 100%计算,1 支或以上冠状动脉直径狭窄 $\geq 50\%$ 作为冠状动脉的诊断标准^[3]。其中单支病变者 43 例,双支病变者 46 例,多支病变者 31 例。

1.1.2 对照组 从同期参加健康体检的健康人 114 例,男性 65 例,女性 49 例,均为汉族,平均年龄(66.29 ± 9.19)岁,体检心电图、心脏彩超均正常。

1.1.3 剔除标准 资料不全及合并心力衰竭、风湿性心脏病、先天性心脏病、严重肝肾功能不全、全身免疫系统性疾病、多脏器功能衰竭等疾病之一者不予入选。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 对所有受试者详细询问病史及生活习惯,包括吸烟史、饮酒史、糖尿病、冠心病家族史等既往其他病史,测定身高、体重、

△通讯作者 崔国方 E-mail: cuiguofang@medmail.com.cn

(收稿日期 2011-12-08 接受日期 2011-12-31)

血压,并计算体重指数,测定部分临床指标,测定空腹血糖、血清总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平,并作心电图、心脏彩超等。血标本的采集:研究对象均在抽血前严格禁食 12h,采集静脉血备用。

1.2.2 冠状动脉造影检查 标准 Judkins 法^[4]行选择性冠状动脉造影,德国公司 AXIOM Artis FC/BC 心血管专用计算机定量分析系统分析冠状动脉狭窄程度。多角度投照,并分别对左主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉狭窄程度进行评价,主要分支如对角支、钝缘支等病变归属于所属主支计算。

1.2.3 DNA 提取及 PCR 扩增 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法(PCR-RFLP)检测 β 3-AR 基因 Trp64Arg 的多态性。(1)引物由上海生物工程公司合成,设计参照相关报道^[5]的序列。上游:5'-CGC CCA ATA CCG CCA ACA C-3',下游:5'-CCA CCA GGA GTC CCA TCA CC-3'。(2)提取模板 DNA:EDTA 抗凝周围静脉血,采用全血基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京百泰克)按操作步骤提取外周血基因组 DNA。(3)PCR 扩增(PCR MIX 由北京百泰克提供):反应体系:以 1 μ L DNA 为

模板在总反应体积 20 μ L 内行 PCR 扩增,扩增产物为 210bp,用 2%琼脂糖凝胶 90V 电泳 30 min,紫外灯下观察扩增是否成功。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,68 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 进一步延伸 10 min。(4)扩增产物的限制性酶切:在 10 μ L 酶切体系中限制性内切酶 BstNI [酶切位点 CC↓ (A/T)GG] 0.5 μ L 酶解 PCR 产物 5 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜。用 2%琼脂糖凝胶电泳,120 V,50 min,将 PCR 产物及酶切产物与 DNA 片段长度标准物比较鉴定基因型。

1.3 统计学处理

数据处理利用 SPSS13.0 软件包完成,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采用 χ^2 检验,等位基因频率 = (2x 纯合子数 + 杂合子数) / (2x 受检人数),主要检测指标均进行正态性检验,对于偏态分布的资料经对数转换达到近似正态分布,定量资料比较用 t 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

表 1 两组临床资料比较

Table 1 Comparison of clinical data between the two groups

Index	Coronary heart disease (n=120)	Control (n=114)	P
Age ($\bar{x} \pm s$, yr)	69.95 $\pm$ 6.55	66.29 $\pm$ 9.19	0.11
BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	27.10 $\pm$ 2.62	23.65 $\pm$ 3.18	< 0.01
Total cholesterol ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	4.68 $\pm$ 1.03	4.31 $\pm$ 0.94	< 0.01
Triacylglycerol ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	1.95 $\pm$ 1.07	1.93 $\pm$ 0.47	0.89
C-HDL ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	0.97 $\pm$ 0.25	1.30 $\pm$ 0.67	< 0.01
C-LDL ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	2.46 $\pm$ 0.84	2.34 $\pm$ 0.75	0.17
Diabetes mellitus (n/%)	44/36.67	20/17.54	< 0.01
Smoking (n/%)	71/59.16	38/33.33	< 0.01
Alcohol drinking (n/%)	41/34.16	37/32.45	0.49
Hypertension (n/%)	67/56.83	33/28.94	< 0.01

Note: BMI; body mass index; C-HDL: high-density lipoprotein cholesterol; C-LDL: low-density lipoprotein cholesterol

2 结果

2.1 两组的一般临床资料比较 见表 1。

冠心病组 BMI 指数、总胆固醇、吸烟及合并高血压、糖尿病的比例较正常对照组明显升高,而高密度脂蛋白降低($P < 0.01$)。

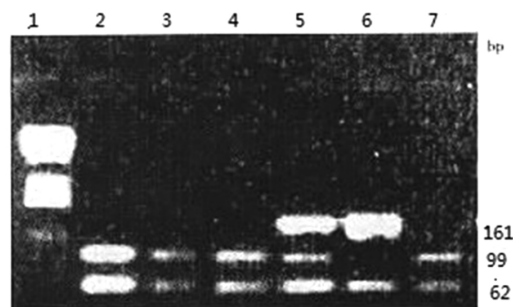
2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

β 3-AR 基因 Trp64Arg 基因型在冠心病组和对照组 χ^2 值分别为 0.76 和 1.68($P > 0.05$),符合 Hardy-Weinberg 平衡,具有群体代表性。

2.3 β 3-AR 基因 Trp64Arg 多态性分析

将提取的全血基因经 PCR 扩增后,获得的特异性产物片段长度为 210 bp,若扩增中存在碱基替换,经 BstNI 内切酶消化后产生 99bp,62bp,30bp,12bp,7bp 共 5 个片段,因此 Trp/Trp 基因型有 5 个片段(99bp,62bp,30bp,12bp 和 7bp),Trp/Arg 基因型有 6 个片段(161bp,99bp,62bp,30bp,12bp 和

7bp),Arg/Arg 基因型有 4 个片段(161bp,30bp,12bp,7bp),其中每型均出现的 30、12、7bp 片段因太小,在电泳上无法看清。见图 1。



1:marker 2、3、4、7: Trp/Trp, 5: Trp/Arg, 6: Arg/Arg
1:marker 2、3、4、7: Trp/Trp 5: Trp/Arg 6: Arg/Arg

图 1 PCR/RFLP 检测 β 3-AR 基因 Trp64Arg 多态性电泳图

Fig. 1 Enzymolysis electrophoretic of β 3-adrenergic receptor gene Trp64Arg polymorphism

2.4 两组 $\beta 3$ -AR 基因型分布及等位基因频率

冠心病组和正常对照组 Trp64Trp、Trp64Arg 和 Arg64Arg 的基因型频率为 68.3%、30.0%、1.6%，等位基因频率分别为 83.3%、16.6%，而正常对照组 Trp64Trp、Trp64Arg 和 Arg64Arg

的基因型频率为 69.2%、29.8%、0.9%，等位基因频率分别为 84.2%、15.8%。冠心病组与对照组的基因型分布、等位基因频率比较，差异均无显著性($P>0.05$)，见表 2。

表 2 冠心病组与对照组 Trp/Arg 各基因型的分布

Table 2 Genotype distribution and allele frequency of Trp64Arg polymorphism between groups

Group	n	Genotype allele frequency				
		Trp/Trp	Trp/Arg	Arg/Arg	Trp	Arg
CHD	120	82(68.3%)	36(30.0%)	2(1.6%)	83.3%	16.6%
Control	114	79(69.2%)	34(29.8%)	1(0.9%)	84.2%	15.8%
χ^2			0.293		0.066	
P			0.864		0.797	

2.5 冠心病组不同冠状动脉病变支数亚组的 Trp64Arg 基因型分布比较

在不同冠脉病变支数的亚组中，携带 Trp/Arg 或 Arg/Arg

基因组患者的冠状动脉狭窄程度和携带 Trp/Trp 基因型组患者差异无显著性意义($\chi^2=0.471$ ， $P=0.790$)，见表 3。

表 3 冠心病不同冠脉病变支数亚组的 Trp64Arg 基因型频率

Table 3 Genotype distribution of Trp64Arg in different subsets of coronary heart disease patients

Accumulative count of coronary artery stenosis	n	Genotype	
		Trp/Trp	Trp/Arg+Arg/Arg
1	43	29(35.4%)	14(36.8%)
2	46	33(40.2%)	13(34.2%)
≥ 3	31	20(24.4%)	11(28.9%)
Total	120	82	38 ^a

Note: $\chi^2=0.471$ ， $P=0.790$ ，vs. Trp/Trp group

3 讨论

冠心病是严重危害人类生命健康和生活质量的常见病、多发病，其特征性病理基础是内膜粥样斑块形成和动脉壁硬化，但具体机制尚未明确，影响冠心病的危险因素有近 300 种左右^[6]，目前已经肯定的风险因素如年龄、性别、吸烟、糖尿病、高血压病等可以增加冠心病的易感性。当前研究认为，冠心病是由环境因素和遗传因素共同作用所致的多基因遗传性疾病^[7,8]，且冠心病与肥胖、高脂血症、糖尿病、高血压病伴随出现。其中遗传因素对冠心病的发生发展起着十分重要的作用^[9,10]。

研究发现， $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因第 64 位密码子点突变可能导致体内脂肪分解下降，使热生成作用减弱，可能影响体质量^[11]及与肥胖有关的胰岛素抵抗^[12]及脂代谢异常，而成为肥胖、2 型糖尿病等的病因之一，同时也可能增加心血管疾病如冠状动脉性心脏病(冠心病)的危险^[13]。国内外关于 $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因 Trp64Arg 突变与冠心病关系的研究结果不一。Higashi^[14]等在日本进行的一个研究提示冠心病病人较非冠心病病人此突变频率有显著性升高。另外，Michael 等^[15]通过其研究得出 $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因和其基因多态性不但增加了美国妇女疑似冠心病患者的心血管病危险性，而且还提高了危险分

层。也有许多的研究结果并不能够发现 $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因多态性与冠心病存在直接相关性，如 Tamaki 等^[16]的一项研究中，该研究通过对冠心病的相关危险因素如性别、糖尿病、高脂血症、高血压、吸烟等调整后，其结果表明 $\beta 3$ -AR 基因突变频率和冠心病也未见明显的相关性。Stangl 等^[17]研究了 $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因 Trp64Arg 突变和冠心病及心肌梗死的关系，通过荟萃分析之后，也认为 Trp64Arg 突变或 Arg / Arg 突变在冠心病、心肌梗死中没有起到任何作用。国内也进行了一些相关研究，如 Sheu 等^[18]的研究得出 $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因型和等位基因频率在冠心病患者和对照组中无区别，在冠心病和正常对照组中无论是否有突变存在，血压、体质量指数等指标的差别也是不具有统计学意义的。 $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因多态性在冠心病的发展中不起主要作用。谭宁^[19]等的研究也认为 $\beta 3$ -AR 基因 Trp64Arg 突变不是冠心病的主要预测因子。

山东地区是全国冠心病高发地区之一^[20]，本研究结果显示山东地区汉族人群冠心病组和正常对照组 Trp64Trp、Trp64Arg 和 Arg64Arg 的基因型频率分别为 68.3%、30.0%、1.6% 和 69.2%、29.8%、0.9%。冠状动脉粥样硬化性心脏病组 Arg 等位基因频率(16.6%)与对照组(15.8%)频率近似($P>0.05$)，突变频率在冠心病与非冠心病之间相比无显著性差异。冠心病组不同冠

脉病变支数亚组之间, Arg 等位基因携带个体冠脉狭窄程度与 Trp/Trp 基因型数量接近($\chi^2=0.471$ $P=0.790$)。冠心病是一种复杂多基因遗传性疾病, 本研究通过对冠心病患者的血脂、血压、血糖等与正常对照组比较, 发现冠心病患者 BMI 指数、总胆固醇、吸烟及合并高血压、糖尿病的比例较正常对照组明显升高, 说明影响冠心病的发病因素是多方面的, 其他如生活方式、饮食习惯及膳食结构等可能也有相关影响。总之, 本研究未发现肾上腺素能 β_3 受体基因 Trp64Arg 突变与山东地区人群冠心病的发生、发展有明显相关性。

参考文献(References)

- [1] Higashi K, Ishikawa T, Ito T, et al. Association of a genetic variation in the beta3-adrenergic receptor gene with coronary heart disease among Japanese [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(3): 728-730
- [2] Sakane N, Yoshida T, Yoshioka K, et al. Beta 3-adrenoreceptor gene polymorphism: a newly identified risk factor for proliferative retinopathy in NIDDM patients [J]. *Diabetes*, 1997, 46(10): 1633-1636
- [3] Austen WG, Edwards JE, Frye RL, et al. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the AdHoc Committee for Grading of Coronary Artery Disease, Council on Cardiovascular Surgery [M]. American Heart Association, Circulation, 1975, 51(4 Suppl): 5-40
- [4] Kern MJ. A simplified method to measure coronary blood flow velocity in patients: validation and application of a Judkins-style Doppler-tipped angiographic catheter [J]. *Am Heart*, 1990, 120(5): 1202-1212
- [5] Silver K, Walston J, Wang Y, et al. Molecular scanning for mutations in the beta3-adrenergic receptor gene in Nauruans with obesity and monoinulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 4155-4158
- [6] Poulter N. Coronary heart disease is a multifactorial disease. *Am J Hypertens* [J]. 1999, 12(10): 92S-95S
- [7] Li JJ. Inflammation: an important mechanism for different clinical entities of coronary artery diseases [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(21): 1817-1826
- [8] Porter A, Assali AR, Zahalka A, et al. Impaired fasting glucose and outcomes of ST-elevation acute coronary syndrome treated with primary percutaneous intervention among patients without previously known diabetes mellitus [J]. *Am Heart*, 2008, 155(2): 284-289
- [9] Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, et al. Polymorphisms in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease [J]. *Am Heart*, 2007, 154(6): 1035-1042
- [10] Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, et al. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins [J]. *N Engl J Med*, 1994, 330(15): 1041-1046
- [11] Clement K, Vaisse C, Manning B S J, et al. Genetic variation in the β_3 -adrenergic-receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333: 352-354
- [12] Widen E, Lehto M, Kanninen T, et al. Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333(6): 348-351
- [13] Erhardt E, Czako M, Csernus K, et al. The frequency of Trp64 Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene in healthy and obese Hungarian children and its association with cardiovascular risk factors [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2005, 59(8): 955-959
- [14] Higashi K, Ishikawa T, Ito T, et al. Association of a genetic variation in the beta3-adrenergic receptor gene with coronary heart disease among Japanese [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(3): 728-730
- [15] Morrison AC, Brancati F L, Folsom AR, et al. Beta3-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphism does not predict incident CHD or carotid intima-media thickness in a community-based sample of whites: the ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities* [J]. *Hum Genet*, 1999, 105(4): 314-319
- [16] Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, et al. Variant of the beta3-adrenergic receptor gene and coronary atherosclerosis in Japanese subjects [J]. *Int J Cardio*, 1999, 69(3): 309-311
- [17] Stangl K, Cascorbi I, Laule M, et al. The beta3-adrenergic receptor Trp64Arg mutation is not associated with coronary artery disease [J]. *Metabolism*, 2001, 50(2): 184-188
- [18] Hoffstedt J, Poirier O, Thorne A, et al. Polymorphism of the human beta3-adrenoceptor gene forms a well-conserved haplotype that is associated with moderate obesity and altered receptor function [J]. *Diabetes*, 1999, 48(1): 203-205
- [19] 谭宁, 李浪, 陈纪言, 等. 中国人群 β_3 肾上腺素能受体基因 Trp64Arg 突变与冠心病关系的研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2003, 31(1): 38-41
Tan Ning, Li Lang, Chen Ji-yan, et al. Relationship between β_3 -adrenergic Trp64Arg mutation and coronary heart disease in Chinese [J]. *Chin J Cardiol*, 2003, 31(1): 38-41
- [20] 吴兆苏, 姚崇华, 赵冬, 等. 我国多省市心血管病趋势及决定因素的人群监测(中国 MONICA)方案 I: 发病率和死亡率监测结果 [J]. *中华心血管病杂志*, 1997, 25(1): 6-11
Wu Zhao-su, Yao Chong-hua, Zhao Dong, et al. The crowd Detection proposal of the cardiovascular disease trends and determinants in China (China MONICA) I: Incidence of a disease and mortality monitoring results [J]. *Chin J Cardiol*, 1997, 25(1): 6-11