

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.003

中国北方汉族人群核呼吸因子 -1 基因 +141G/T 单核苷酸多态与冠心病发病的关联研究*

张效林 梁振洋 孙莹 冯雪瑶 刘滕飞 蔡文芝 闫承慧 韩雅玲[△]

(中国人民解放军沈阳军区总医院心内科 辽宁 沈阳 110084)

摘要 目的:本研究旨在探讨 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点与中国北方汉族人群冠心病发病的相关关系。**方法:**本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性对经过冠脉造影证实的冠状动脉有一条主要分支狭窄大于 70% 的 675 例冠心病患者和经过冠状动脉造影证实冠状动脉狭窄小于 20% 或完全正常的 636 例对照患者进行检验,分析核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点的基因型和等位基因频率在两组间的分布情况。**结果:**核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点三种基因型(GG 型,GT 型和 TT 型)在中国北方汉族人群冠心病组的分布频率分别为 53.8%,36.2% 和 10.1%,在对照组的分布频率分别为 45.6%,46.2% 和 8.2%,核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点的基因型和等位基因频率分布在对照组和冠心病组之间存在统计学差异($P < 0.05$)。Logistic 回归分别校正冠心病的其他危险因素性别、年龄、体重指数、吸烟、高血压、高脂血症、糖尿病等后,核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点与中国北方汉族人群的冠心病的发病存在相关关系($P < 0.05$)。**结论:**核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态与中国北方汉族人群冠心病的发病存在相关关系,IRF-1 基因 +141 G/T 多态可能是中国北方汉族人群冠心病发病的独立危险因素。

关键词:冠心病;基因;单核苷酸多态性

中图分类号:R541.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)07-1212-04

Association of NRF-1 +141G/T Polymorphism with Coronary Artery Disease in Han Population of Northern China*

ZHANG Xiao-lin, LIANG Zhen-yang, SUN Ying, FENG Xue-yao, LIU Teng-fei, CAI Wen-zhi, YAN Cheng-hui, HAN Ya-ling[△]

(Department of Cardiology, Northern Hospital, People's Republic of China, Shenyang, Liaoning, 110084, China)

ABSTRACT Objective: The aim of the present study was to investigate the association between IRF-1 +141 G/T polymorphism and coronary artery disease in Han population of Northern China. **Methods:** A case-control study was conducted in 675 patients with coronary artery disease and 636 controls who had normal coronary angiograms. Polymorphic genotypes were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Results:** The genotype frequencies in IRF-1 +141 G/T polymorphism conformed well to the Hardy-Weinberg equilibrium in both controls and case, and were 53.8% (GG), 36.2% (GT), 10.1% (TT) in case group and 45.6% (GG), 46.2% (GT), 8.2% (TT) in the controls. There were significant differences in the genotype and allele distribution of +141 G/T polymorphism of the IRF-1 gene between cases and controls ($P < 0.05$). Logistic regression analysis with adjustments for other risk factors revealed that the IRF-1 +141 G/T allele carriers significantly increases the risk of coronary artery disease compared with the non-carriers ($P < 0.05$). **Conclusions:** This study shows that the IRF-1 +141 G/T polymorphism may be considered a genetic risk factor for coronary artery disease in Han population of Northern China.

Key words: Coronary artery disease; Gene; Single nucleotide polymorphism**Chinese Library Classification(CLC):** R541.4 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)07-1212-04

前言

冠状动脉粥样硬化性心脏病是一种严重危害全球人类健康的常见慢性疾病,作为一种复杂性状疾病,其发生发展受遗传和环境因素共同作用。流行病学资料显示,由冠状动脉粥样硬化所导致冠状动脉的疾病即冠心病目前已经成为我国及世

界发展中国家 40 岁以上男性人群的重要的致死性原因^[1-3]。随着人类基因组计划取得长足的进步,研究显示核呼吸因子 -1 (nuclear respiratory factor 1, NRF-1) 作为一种能转录激活许多线粒体相关基因启动子的核转录因子,在生物功能方面可能是参与动脉粥样硬化发生发展的重要候选基因^[4,7]。本文应用以人群为基础的病例对照研究方法,采用基于第三代遗传标志一单

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81100135);军队临床高新技术重大项目(2010GXJS001)

作者简介:张效林(1975-),女,硕士,副主任医师,主要研究方向:冠心病分子遗传学,

E-mail: xiaolindianyu75@sina.com

△ 通讯作者:韩雅玲, E-mail: hanyaling1953@gmail.com

(收稿日期:2013-11-09 接受日期:2013-11-28)

核苷酸多态性(SNP)的关联研究^[89],以 NRF-1 候选基因分析其基因多态性与中国汉族人群 CAD 遗传易感的关联性,进而从分子水平上寻找冠心病的易感基因,以期发现冠心病早期诊断的分子标记和早期预防的新靶点。

1 材料与方法

1.1 研究入选对象

从沈阳军区总医院心血管内科病房中随机选取 2005 年 5 月入院的病例,入选者均经冠状动脉造影证实为冠心病患者及非冠心病患者,连续入选 5 年(至 2010 年 10 月)共入选冠心病患者 675 例,非冠心病患者 636 例,所有入选的冠心病患者的冠脉造影的诊断标准为:冠状动脉(心外膜下的)一支或其主要分支(左前降支、左回旋支或右冠状动脉)存在 $\geq 70\%$ 的直径狭窄,且入选患者的所有临床症状均符合美国心脏病协(AHA)对冠心病的诊断标准者诊断为冠心病,入选患者的年龄在 29 岁至 75 岁,其全部为无血缘关系的中国北方汉族人群,并且自愿在沈阳军区总医院心血管内科接受冠状动脉造影检查。对照人群组:系为在沈阳军区总医院行冠脉造影显示冠状动脉完全正常或者冠状动脉造影显示 $< 20\%$ 冠状动脉管腔狭窄且临床上无相关生化检查依据证明为心肌缺血者。本研究获得沈阳军区总医院及当地医院医学伦理委员会批准,所有受试者均在参加本实验前签署知情同意书。

1.2 方法

患者在清晨、空腹状态,由护士利用含 1.5 mg/mL 乙二胺四乙酸二钠(EDTA - Na₂)的真空采血管,抽取入选研究对象外周静脉血液 5 毫升,反复颠倒摇匀后,静置于 -20 °C 冰箱,储存备用。提取研究对象的外周血 DNA 时,先反复摇匀血液,抽取抗凝管血液 0.5 毫升,采用常规酚-氯仿提取方法抽提人外周血基因组 DNA,采用紫外分光光度计检测外周血中提取的 DNA 浓度和纯度,确保提取 DNA 质量。采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 常规扩增人外周血基因组 DNA,按照 Oligo 6 软件设计方案,设计并从上海生工生物有限公司合成 IRF-1 基因的引物:IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点的 PCR 扩增引物分别为:上游引物:5'-TGGCTACCAT-AGAAGCACAT-3',下游引物:5'-ATCGTAAGAGGTGTCCTCCGG-3',含有核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T PCR 扩增产物的在 25 μ L 反应体系中进行 PCR 反应。本研究采用 PCR 扩增反应体系在美国 BIO-RAD 公司生产的 PCR 热循环仪进行。扩循环反应参数分别为:95 °C 3 min;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 7 min,然后通过凝胶电泳检测 PCR 扩增的样品是否扩增成功。

1.3 酶切检测 IRF-1 基因 +141G/T 基因型

含 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点的 PCR 扩增产物 256 个碱基。IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点的 PCR 扩增产物以限制性内切酶 Bsp EI(NEB 公司)消化过夜,Bsp EI 进行的酶切反应总体积为 10 微升,其中包括限制性内切酶 Bsp EI 0.5 微升,10 \times M 缓冲液 1.0 微升,去离子水 1.0 微升,待检的 PCR 目的片段产物为 7.5 微升。酶切反应后,在含 2 % 琼脂糖凝胶中进行电泳,鉴定酶切产物。同时随机将待检测的 PCR 产物送测序,验证酶切反应的效率。本实验研究发现,酶切

反应的效率为 100 %。

1.4 统计学方法

两组间的资料分析由 SPSS 13.0 软件包完成,核呼吸因子 +141G/T 单核苷酸多态位点单个基因型及等位基因频率比较采用四格表 χ^2 检验,OR 值和 95% 可信区间 (95% CI) 表示基因位点与疾病间的相关强度。群体遗传学分析采用 DNAMAN、SHEsis、Haplo.stats 等软件进行,Binary Logistic 回归用来校正其它 CAD 危险因素如性别、年龄、BMI、吸烟、高血压、糖尿病、TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 等混杂因素可能对结果造成的影响。

2 结果

本研究中共入选冠心病组病例 675 例,同时随机选取在沈阳军区总医院心内科住院的经冠状动脉造影证实的非冠心病患者 636 例(非冠心病组的病例与冠心病组的病例年龄和行相匹配)。入选的冠心病的病例中,具有吸烟史和糖尿病病史患者的比例明显高于非冠心病患者组($P < 0.05$)。病例组患者的血浆中血脂的各项生化检测指标:低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)的检测水平在冠心病患者组和非冠心病患者组间的差异存在统计学差异,表 1 为入选冠心病患者组和非冠心病患者组的临床检测资料。

核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态目的扩增片段 PCR 产物 256 碱基,目的片段的扩增产物经过 Bsp EI 限制性内切酶酶切消化后,核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态目的扩增片段酶切产物经过含有 2 % 琼脂糖的凝胶电泳后,分别在紫外光下显示出不同的电泳结果,携带 GG 纯合型基因型的片段为 128 碱基、携带 TT 纯合型的片段为 107 碱基及 21 碱基、携带 GT 杂合基因型的片段分别为 128 碱基、107 碱基、21 碱基。

核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态三种基因型 GG 型,GT 型和 TT 型在入选冠心病患者组中分布频率分别为 53.8 %,36.2 %和 10.1 %,在入选的非冠心病患者组中分布频率分别为 45.6 %,46.2 %和 8.2 %,核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点的基因型和等位基因频率在费冠心病组和入选的冠心病组之间存在显著性统计学差异 ($P < 0.05$)。采用 Logistic 回归的方法分别校正入选患者的年龄、性别、体重指数、糖尿病高血压、吸烟、高脂血症等常规的冠心病危险因素后,核呼吸因子 IRF-1 基因 +141 G/T 单核苷酸多态位点的基因型和等位基因频率与中国北方汉族人群冠心病的发病存在相关关系 ($P < 0.05$)。

3 讨论

动脉粥样硬化性疾病已成为危害人类健康的全球性疾病,生活方式的改变使得我国 40 岁以上人群的冠心病发病率显著上升,急性冠脉综合症作为冠心病最严重的类型导致患者死亡率增加^[1-3]。医学遗传学和基因蛋白质组学的迅猛发展给人类对冠心病的认识提升到了一个新的水平^[10-13]。国际上近年采用基于第三代遗传标志—单核苷酸多态性(SNP)的研究方法,从分子水平寻找基因与疾病的关系,取得了许多有意义的重大成果^[89]。在心血管领域,应用该方法寻找冠状动脉粥样硬化性疾病(冠

表 1 冠心病患者与对照组的临床特征比较
Table 1 Clinical characteristics between the coronary artery disease and control groups

	对照组 Control group	病例组 Case group	P
例数(n)	636	675	
年龄 (Year)	55.8± 10.4	56.4± 9.9	0.134
性别 (男 / 女) Gender (Male/Female)	354/282	372/303	0.84
体重指数 (千克 / 平方米) BMI (kg/m ²)	24.6± 3.2	25.7± 3.1	<0.001*
糖尿病 (%) Diabetes mellitus (%)	67 (10.5)	144(21.3)	<0.001*
高血压 (%) Hypertension (%)	287(45.1)	353 (52.3)	0.009*
吸烟 (%) Smoking (%)	200 (31.4)	299 (44.3)	<0.001*
胆固醇 (mmol/l) Cholesterol (mmol/l)	2.03± 1.01	2.29± 1.17	0.001*
甘油三酯 (mmol/l) Triglyceride ((mmol/l)	4.53± 1.11	4.53± 1.11	0.006*
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/l) Low density lipoprotein chilesterin (mmol/l)	2.33± 0.44	2.38± 0.57	0.083
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/l) High density lipoprotein chilesterin (mmol/l)	1.21± 0.20	1.28± 0.23	0.001*

表 2 IRF-1 基因 +141G/T 基因多态性在冠心病患者组和对照组的频率分布
Table 2 The genotype and allele frequency of IRF-1 +141 G/T polymorphism between the coronary artery disease and control groups

	对照组 Control group n=636	病例组 Case group n=675	P	OR(95% CI) 比值比(%可信区间)
IRF-1 +141G/T				
G/G (%)	352(55.3)	308(45.7)	< 0.001	
G/T (%)	220(34.6)	311(46.1)		
T/T (%)	64(10.1)	56 (8.3)		
G 等位基因 G allele	924(72.6)	927(68.7)	0.02	0.83(0.69-0.97)
T 等位基因 T allele	348(27.4)	423(31.3)		

心病)的易感基因及其易感的多态性位点以期发现冠心病早期诊断的分子标记和早期预防的新靶点也取得了许多实质性成果,使得冠心病的防治将进入基因治疗的时代^[11-14]。汉族人群急性冠脉综合症的发病的相关关系,如在病例 - 对照研究中获取阳性关联 SNP 位点,并在另一独立队列中进行验证^[15,16]。对已验证的阳性 SNP 位点,进一步进行生物学功能研究,以确认其为易感基因。上述研究的最终结果将为阐明特定的趋化因子及其受体是否为急性冠脉综合症的易感基因,为急性冠脉综合症发生的预测及个体化防治提供新的依据。冠心病是一种具有复

杂性状的多基因遗传性疾病,冠心病的发病是由多个微效基因协同作用、并受环境因素影响所导致的疾病。

核呼吸因子 NRF-1 为一种能转录激活许多线粒体相关基因启动子的核转录因子,NRF-1 为一种核转录因子,NRF-1 基因定位于 7 号染色体长臂 3 区 2 带,是由 503 个氨基酸组成,分子量为 68 kD,在细胞内以同源二聚体的形式存在,有两个功能性区域:(1) DNA 结合区 (2) 转录激活区:位于 C- 末端,富含疏水氨基酸,其转录激活功能依赖于特异性疏水结构。研究表明 NRF-1 对呼吸链的表达以及线粒体 DNA 的转录与复制

都发挥着重要作用,近年研究显示CAD的发生可能与线粒体功能缺失密切相关^[9-12],NRF-1可能控制着核和线粒体两个基因组的协同表达,它可以调节核基因组编码的呼吸链亚基的表达,NRF-1的功能改变,可能导致体内的氧化还原反应的异常,进而导致脂质代谢的异常,因而导致脂质沉积在动脉粥样硬化的血管管壁,从而影响动脉粥样硬化的发生发展的进程,由上我们认为NRF-1可能在CAD的动脉粥样硬化的发生发展进程中发挥重要的作用^[10-13]。

目前,关于核转录因子NRF-1基因单核苷酸多态性与冠心病及其并发症的关联研究报道不多,本研究对NRF-1受体基因多态位点进行病例-对照研究,研究结果发现NRF-1多态和中国北方汉族人群冠心病的发生存在相关关系。本研究采用同一中国北方的汉族人群,减少了人群分层的影响,上述研究从遗传学的角度证实NRF-1基因+141 G/T多态和冠心病发生存在相关关系,故IRF-1基因+141 G/T多态是冠心病发生的危险预测因子。目前关于冠心病的发病机制尚未明确,本研究显示IRF-1基因的+141 G/T多态性与冠心病的发病存在明显关联性,提示IRF-1基因+141 G/T多态性可能作为一种特殊的遗传学形式而参与冠心病的发生发展过程,IRF-1可能通过影响基因的剪切功能和转录后的翻译功能参与该基因的表达调控。本研究对象均接受了冠脉造影检查,保证了病例组和对照组之间的明确区分,但本研究仍存在一定的局限性,由于入选病例存在一定地域上的差别,会影响关联分析的结果,同时本研究结果尚需要在中国汉族及其他人群中进行相应的复制研究验证关联分析的结果^[16,17],同时对本研究的结果进行功能学的验证,进一步从离体和体水平验证IRF-1基因的+141 G/T单核多态位点的功能学意义,同时分析与本位点处于连锁不平衡的其他位点的基因型和等位基因频率,分析同一个BLOCK区域的其他位点与冠心病发病的相关关系,更能明确IRF-1基因在冠心病发病的意义^[18-20]。

IRF-1基因+141 G/T多态位点是冠心病发病危险因子,而IRF-1基因+141 G/T多态与冠心病发生存在相关关系。

参考文献(References)

- [1] He J, Gu D. Major causes of death among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(11): 1124-1134
- [2] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16): 1685-1695
- [3] Consortium. T. I. H. The International HapMap Project [J]. *Nature*, 2003, 426: 789-796
- [4] Consortium.,T. I.H. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs[J]. *Nature*, 2007, 449: 851-861
- [5] Teng YN, Chang YP, Tseng JT, et al. A single-nucleotide polymorphism of the DAZL gene promoter confers susceptibility to spermatogenic failure in the Taiwanese Han[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(9): 2857-2865
- [6] Carabelli J, Burgueño AL, Rosselli MS, et al. High fat diet-induced liver steatosis promotes an increase in liver mitochondrial biogenesis in response to hypoxia[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(6): 1329-1338
- [7] Gao CL, Zhu JG, Zhao YP, et al. Mitochondrial dysfunction is induced by the overexpression of UCP4 in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 25(1): 71-80
- [8] Choi YS, Kim S, Pak YK. Mitochondrial transcription factor A (mtTF-A) and diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2001, 54 Suppl 2: S3-9
- [9] Johar K, Priya A, Wong-Riley MT. Regulation of Na⁺/K⁺-ATPase by nuclear respiratory factor 1: implication in the tight coupling of neuronal activity, energy generation, and energy consumption [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40381-40390
- [10] Goo CK, Lim HY, Ho QS, et al. PTEN/Akt signaling controls mitochondrial respiratory capacity through 4E-BP1[J]. *PLOS One*, 2012, 7(9): e45806
- [11] Priya A, Johar K, Wong-Riley MT. Nuclear respiratory factor 2 regulates the expression of the same NMDA receptor subunit genes as NRF-1: both factors act by a concurrent and parallel mechanism to couple energy metabolism and synaptic transmission[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(1): 48-58
- [12] Ivanova MM, Radde BN, Son J, et al. Estradiol and tamoxifen regulate NRF-1 and mitochondrial function in mouse mammary gland and uterus[J]. *J Mol Endocrinol*, 2013, 51(2): 233-246
- [13] Ginsburg GS, Shah SH, M. JJ. Taking cardiovascular genetic association studies to the next level[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(10): 930-932
- [14] Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(12): 1237-1344
- [15] Granucci F, Zanoni I. The dendritic cell life cycle [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(23): 3816-3821
- [16] Yoshida R, Imai T, Hieshima K, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11. CCR7[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(21):13803-13809
- [17] Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 891-928
- [18] ZSchunkert H, Gotz A, Braund P, et al. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2008, 117: 1675-1684
- [19] Pei F, Han Y, Zhang X, et al. Association analysis of the IL-17F His-161Arg polymorphism in myocardial infarction[J]. *Coron Artery Dis*, 2009, 20(8): 513-517
- [20] Wenling Han, Yaxin Lou, Junmin Tang, et al. Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity[J]. *Biochem J*, 2001, 357: 127-135