

脂联素及其基因多态性与广西瑶族冠心病的关系*

刘运端, 林世恒 (广西玉林市红十字会医院检验科, 广西玉林 537000)

摘要:目的 探讨广西地区瑶族冠心病患者血清中脂联素(APN)水平及其基因位点+276 G/T和-11377 C/G的多态性。方法 瑶族、汉族冠心病患者、瑶族和汉族正常人各100例纳入研究。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测研究对象血清中APN水平,聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测APN基因位点+276G/T和-11377C/G的多态性。结果 ①两组冠心病组血清中APN水平明显低于两组正常组,差异有统计学意义($t=10.311, 8.642$;均 $P=0.000$)。瑶族冠心病组和汉族冠心病组血清中APN的差异无统计学意义($t=1.792, P=0.076$);②在H-W平衡检验中,四组中APN基因位点+276G/T和-11377C/G均具有群体代表性(均 $P>0.05$);③四组APN+276G/T位点的主要型别是野生型。4组间APN+276G/T位点的等位基因频率均无显著差异(均 $P>0.05$);④冠心病组APN-11377C/G基因型和等位基因频率与同民族正常组的差异有统计学意义($\chi^2=8.908, P=0.012$; $\chi^2=17.275, P=0.000$);瑶族冠心病组APN-11377C/G基因杂合程度略低于汉族冠心病组,但差异无统计学意义($\chi^2=0.363, P=0.834$)。结论 同汉族冠心病一样,血清低APN水平和APN-11377C/G位点是瑶族冠心病患者的危险因素。

关键词:脂联素;基因多态性;瑶族;冠心病

中图分类号:R541.4;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)04-056-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.015

Study on Relations between Adiponectin and Its Gene Polymorphism and Yao Coronary Heart Disease of Guangxi District

LIU Yun-duan, LIN Shi-heng (Department of Clinical Laboratory, Yulin Red Cross Hospital in Guangxi District, Guangxi Yulin 537000, China)

Abstract: Objective To investigate the difference of serum levels of adiponectin (APN) and its gene polymorphism +276 G/T and -11377 C/G in Yao patients with CHD and Han CHD patients and Yao normal people in Guangxi district. **Methods** Yao CHD patients, Han CHD patients, Yao normal people and Han normal people, each of 100 cases were included in the study. The levels of serum adiponectin of all research object were detected by ELISA and APN+276 G/T and APN-11377 C/G genotyping were conducted by using PCR-RFLP. **Results** The levels of adiponectin in two groups of CHD patients were significantly lower than same race normal groups, the difference were statically significant ($t=10.311, 8.642$, all $P=0.000$). The adiponectin levels of two CHD groups was not statically significant difference ($t=1.792, P=0.076$); ② The APN+276 G/T and APN-11377 C/G of four groups conform the Hardy-Weinberg population genetic equilibrium law (all $P>0.05$); ③ The main type of all groups APN+276 G/T was the wild type. The genotype frequencies of APN+276 G/T were no significant differences in between 4 groups (all $P>0.05$); ④ The CG and GG genotype frequency of APN-11377 C/G in two CHD groups were higher than same race normal group, the difference of Yao CHD group and Yao normal group was statically significant ($\chi^2=8.908, P=0.012$; $\chi^2=17.275, P=0.000$), and the difference of Yao CHD group and Han CHD group were not statically significant ($\chi^2=0.363, P=0.834$). **Conclusion** As with Han CHD patients, serum low APN level and APN-11377 C/G loci may be risk factors of Yao CHD patients.

Keywords: adiponectin; polymorphism; yao nationality; coronary heart disease

脂联素(APN)是由脂肪细胞特异性分泌的活性因子,具有抗炎症、抗动脉粥样硬化、抗血小板聚集等生物作用。近年来研究发现APN所在基因区域与心血管疾病相关,且基因多态性具有地区、种族特异性。冠心病(CHD)是由冠状动脉发生动脉粥样硬化病变而引起血管狭窄,导致供血不足,心肌缺血、缺氧而导致的心脏病,是致死致残率最高的疾病之一。是一种由遗传因素、环境因素和不良生活习惯相互作用导致的复杂疾病,其中易感基

因可能对冠心病的发生起非常重要的作用。本研究旨在通过检测广西瑶族CHD患者APN水平及其基因位点+276G/T和-11377C/G基因多态型及等位基因的分布频率,探讨APN水平及2个基因位点与广西瑶族CHD的关系,从而为CHD防治提供全新视角。

1 材料与方法

1.1 研究对象 瑶族、汉族冠心病患者、瑶族和汉族健康个体各100例。其中,瑶族冠心病患者:男

* 作者简介:刘运端(1981—),男,大学本科,主管检验技师,医学检验工作,研究方向:医学免疫学与生化检验, Tel:13977544498, E-mail:490835268@qq.com.

性53例,女性47例,年龄49~75岁,平均年龄58.3岁;瑶族健康个体:男性52例,女性48例,年龄46~71岁,平均年龄56.9岁;汉族冠心病患者:男性55例,女性45例,年龄46~78岁,平均年龄57.5岁;汉族健康个体:男性54例,女性46例,年龄47~69岁,平均年龄58.1岁。瑶族入选标准:①居住在广西瑶族主要分布区的瑶族个体;②三代中未有与外族通婚的瑶族家族,选择第三代个体为研究对象,且尽可能确保研究对象在其可追踪的历史上没有与外族通婚;③无遗传性疾病家族史及其他急、慢性疾病史。冠心病诊断标准^[1]:选择冠状动脉造影显示左主干狭窄 $\geq 30\%$ 或其他3支至少有1支冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 者。瑶族冠心病患者须符合上述两个入选标准,且动态心电图ST段下移。四组研究对象在年龄和性别上无差异。采样过程遵循知情同意原则,通过询问确保样本间无血缘关系。

1.2 标本采集 抽取所有研究对象静脉血4 ml,分别注入干燥管和EDTA抗凝管中,并充分混匀。30 min后,干燥管3 000 r/min离心10 min,分离血清-20℃冰箱保存,用于血清APN的检测,EDTA管用于APN基因位点多态性检测。

1.3 主要仪器和试剂 9700扩增仪(美国ABI公司),RT-6000酶标仪(深圳雷杜生命科学有限公司),电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像仪(珠海黑马生物公司),APN试剂(美国GBD公司提供),DNA抽提试剂(深圳益生堂生物有限公司)。

1.4 检测方法

1.4.1 血清APN的检测:采用ELISA法,一切操作严格按照试剂说明书。

1.4.2 DNA制备:采用离心柱法,一切操作严格按照试剂说明书,最后将DNA溶于TE缓冲液,-20℃保存备用。

1.4.3 APN基因检测

1.4.3.1 反应体系:在50 μ l总体积中进行,每孔反应体系内含8 μ l PCR混合反应液(含d NTP,buffer),Taq酶0.5 μ l,无菌水37.5 μ l,上下游引物各1 μ l和DNA模版2 μ l,充分混匀。APN+276G/T和-11377C/G基因位点引物序列见表1。

表1 APN+276G/T和-11377C/G基因位点引物序列

位点	引物序列	长度(bp)
APN+276G/T位点	上游引物:5'-CTTGCTGAGGAAAGGAGAC-3'	745
	下游引物:5'-GAGGAATCAGAATATGAATG-3'	
APN-11377C/G位点	上游引物:5'-TGCTCTGTGAAGTTGGTGCTG-3'	450
	下游引物:5'-GCTTGTGGCTCGAATCGTA-3'	

1.4.3.2 APN基因位点+276G/T扩增条件和限制性片段长度多态性分析:94℃ 5 min预变性;94℃ 1 min,55℃ 45 s,72℃ 1 min,35个循环;最后72℃延伸7 min。取PCR后产物20 μ l,BsmI内切酶1 μ l,buffer 3 μ l,无菌水6 μ l,37℃酶切1 h。APN+276 G/T的PCR产物为745 bp,酶切后为225 bp和520 bp的两个片段。在2 g/dl琼脂糖凝胶上点样,电压100V,电泳60 min后自动凝胶图象分析仪下观察电泳结果并摄像保存。

1.4.3.3 APN基因位点-11377C/G扩增条件和限制性片段长度多态性分析:94℃ 5 min预变性;94℃ 1 min,62℃ 45 s,72℃ 1 min,35个循环;最后72℃延伸5 min。取PCR产物20 μ l,AlwNI内切酶1 μ l,buffer 3 μ l,无菌水6 μ l,37℃酶切1 h。SNP-11377C/G的PCR产物长度为450 bp(C等位基因),酶切后为95 bp和355 bp(G等位基因)两个片段。在2 g/dl琼脂糖凝胶上点样,电压100 V,电泳30 min后自动凝胶图象分析仪下观察电泳结果并摄像保存。

1.5 统计学分析 采用统计学软件SPSS 16.0进行数据处理,同民族冠心病组和正常对照组的APN水平比较采用 t 检验, $P < 0.05$,为差异具有统计学意义。APN等位基因进行Hardy-Weinberg(H-W)平衡检验, $P > 0.05$ 即表明样本具有群体代表性。4组间APN基因频率分布的差异,采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

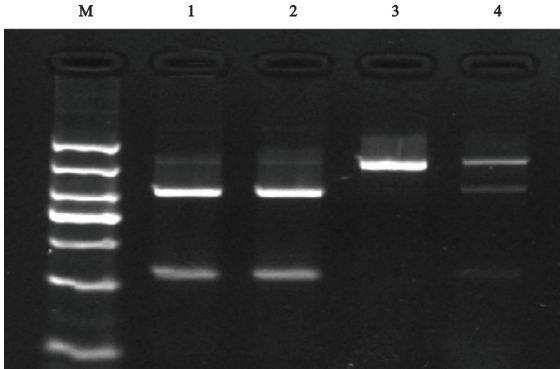
2.1 广西地区瑶族冠心病组、瑶族正常组、汉族冠心病组和汉族正常组血清中APN水平的比较 瑶族冠心病组血清中APN水平7.30(3.65~10.35),明显低于瑶族组正常组10.56(5.99~15.67),差异有统计学意义($t = 10.311$, $P = 0.000$)。汉族冠心病组APN水平6.74(3.02~10.62),也显著低于汉族组正常组10.29(5.67~16.04),差异有统计学意义($t = 8.642$, $P = 0.000$)。瑶族冠心病组血清中APN浓度略高于汉族冠心病患者组,但两组间的差异无统计学意义($t = 1.792$, $P = 0.076$)。

2.2 瑶族冠心病组、瑶族正常组、汉族冠心病组和汉族正常组APN基因分型结果 见表2。四组APN+276G/T位点的主要型别是野生型,两个民族冠心病组的APN-11377C/T位点的主型别是突变型。经H-W平衡检验,比较观察值和期望值,4组的APN两个位点 P 值均 > 0.05 ,符合H-W群体遗传平衡法则,具有群体代表性。

表 2 广西瑶族、壮族健康人群 HPA1-17 的基因检测结果 (n=100)

组别	ANP+276					H-W 值		ANP-11377					H-W 值	
	GG	TG	TT	G	T	P 值	MP	CC	CG	GG	C	G	P 值	MP
瑶族冠心病组	62	29	9	76.5	23.5	0.053	0.295	41	42	17	62.0	38.0	0.277	0.360
瑶族正常组	71	24	5	80.3	17.0	0.135	0.242	62	26	12	75.0	25.0	0.219	0.305
汉族冠心病组	64	28	8	78.0	22.0	0.069	0.291	37	44	19	59.0	41.0	0.365	0.367
汉族正常组	74	22	4	85.0	15.0	0.170	0.222	66	26	8	79.0	21.0	0.096	0.277

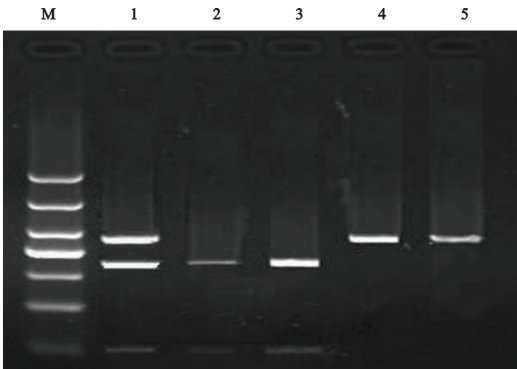
2.3 广西瑶族冠心病组、瑶族正常组、汉族冠心病组和汉族正常组 APN+276G/T 基因多态性的比较 四组 APN+276G/T 位点的主要型别是野生型。同民族冠心病组和正常对照组比较,差异均无统计学意义 ($\chi^2=2.224, P=0.322; \chi^2=2.778, P=0.265$);瑶族冠心病组 APN+276G/T 基因杂合程度也略高于汉族冠心病组,差异无统计学意义 ($\chi^2=0.108, P=0.947$),见图 1。



M:marker;3:GG 型;1,2,4:GT 型。

图 1 APN 基因+276 位点 C/G 扩增产物酶切电泳图

2.4 广西瑶族冠心病组、瑶族正常组、汉族冠心病组和汉族正常组 APN-11377C/G 基因多态性的比较 4 组中 APN-11377C/G 基因多态性分布发现瑶族和汉族冠心病组的等位基因频率明显高于同族正常组,差异有统计学意义 ($\chi^2=8.908, P=0.012; \chi^2=17.275, P=0.000$);瑶族冠心病组 APN-11377C/G 基因杂合程度也略低于汉族冠心病组,但差异无统计学意义 ($\chi^2=0.363, P=0.834$),见图 2。



M:marker;1:CG 型;2,3:CC 型;4,5:GG 型。

图 2 APN 基因-11377 位点 C/G 扩增产物酶切电泳图

3 讨论 脂联素(adiponectin, APN)是一种具有抗炎症、抗动脉粥样硬化、抗血小板聚集的由脂肪组织特异性分泌的活性因子。APN 对动脉粥样硬化的保护作用机制可能为:①抑制巨噬细胞转化为泡沫细胞^[2];②通过环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 途径发挥抑制内皮细胞的炎症反应^[3];③抑制血管平滑肌细胞增殖^[4];④促进肝脏合成 HDL 而发挥胆固醇逆转运功能、抗氧化功能和抗炎症等作用^[5];⑤通过对血管舒张因子一氧化氮(NO)增强血管舒张、抑制血小板聚集、单核细胞黏附以及血管平滑肌细胞增殖等作用而对血管系统起着保护作用^[6]。APN 基因位于人染色体 3q27 区域,该区域包括 3 个外显子和 2 个内含子,具有丰富的多态性。此区域也是 2 型糖尿病、代谢综合征、冠心病的易感基因区域^[7~10],但 APN 基因 SNP 在不同种族、地区分布差异较大,国内外研究结果不一致,甚至对同一种族不同地区人群的研究也会有相互矛盾的结果产生^[11]。

本研究结果显示,与正常人相比,CHD 组血清中 APN 水平显著降低,这与 Kizer^[12~13]的研究结果相似,证实了血清中低 APN 水平可能是 CHD 的危险因素。瑶族冠心病组 APN 水平略高于汉族冠心病组,这可能跟瑶族冠心病组体重指数略低于汉族冠心病组相关。APN+276G/T 基因位于内含子,并不影响 APN 蛋白的氨基酸序列及结构和功能,但有研究证实 APN+276 GG 纯合冠心病患者血浆 APN 水平明显下降^[14],推测可能和外显子区 SNP 连锁,或与启动子区的 SNP 连锁,影响 mRNA 的转录,也有可能其本身就能影响 mRNA,从而影响 mRNA 的表达和脂联素蛋白的翻译。在瑶族、汉族冠心病组和瑶族、汉族正常对照组中 APN+276G/T 的基因多态性和基因型的比较中发现 4 组间无明显差异。这与张献玲等^[15]在华东地区冠心病患者中的研究结果一致。而与马晓伟^[16]的研究不一致,分析原因可能是由于我国是一个多民族多地区国家,人群之间存在相对较大的遗传背景差异。同时部分文献中病例对照组之间主要特征未完全匹配等因素而造成各独立研究结果之间的差别。在 APN-11377C/G 的基因比较中瑶族冠心病组和同地区汉族冠心病组 APN-

11377C/G 的基因杂合程度明显区别于瑶族正常组,提示 SNP-11377C/G 基因多态性与 CHD 相关,是 CHD 的一个危险因素。两个民族冠心病组比较发现差异无统计学意义,提示 SNP-11377C/G 是该地区瑶族和汉族冠心病的易感基因。

总之,血清中低 APN 水平和 APN-11377C/G 基因位点是广西地区汉族、瑶族冠心病患者的易感因素。APN+45 基因位点是否是瑶族冠心病的易感基因,还需增加样本进一步研究。

参考文献:

- [1] 宋来凤. 冠心病[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:47.
Song LF. Coronary heart disease[M]. Beijing: People's Medical Publishing House,2002;47.
- [2] Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, et al. Adiponectin, modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies[J]. J Clin Invest, 2007, 117(2):375-386.
- [3] Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in athero-sclerosis and thrombosis [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2006, 12(2):163-168.
- [4] Wang Y, Lam KS, Xu JY, et al. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner[J]. J Biol Chem, 2005, 280(18):18341-18347.
- [5] Matsuura F, Oku H, Koseki M, et al. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprote in assembly in the liver[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(4):1091-1095.
- [6] Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction[J]. Curr Hypertens Rep, 2003, 5(6):473-480.
- [7] 孙琳, 廖羽, 叶琳, 等. FADS1/FADS2 基因多态性与冠心病发病的关联性分析[J]. 吉林大学学报(医学版), 2012, 38(1):115-118.
Sun L, Liao Y, Ye L, et al. Association analysis between polymorphisms of FADS1/FADS2 gene and coronary heart disease[J]. Journal of Jilin University (Medical Edition), 2012, 38(1):115-118.
- [8] 何慧婧, 卫大英, 王淳秀, 等. 四川凉山汉族 2 型糖尿病与脂联素基因多态性[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(3):302-304.
He HJ, Wei DY, Wang CX, et al. Association between single nucleotide polymorphism of adiponectin gene and type 2 diabetes in Han people in Liangshan, Sichuan province [J]. Chin J Public Health, 2012, 28(3):302-304.
- [9] 王遂军, 贾伟平, 包玉倩, 等. 脂联素基因多态性与代谢综合征相关性研究[J]. 中华实用诊断和治疗杂志, 2012, 26(7):659-661.
Wang SJ, Jia WP, Bao YQ, et al. Association of adiponectin gene polymorphism with metabolic syndrome [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Treatment, 2012, 26(7):659-661.
- [10] 陈芳, 武海亮, 王洁, 等. 脂联素水平及基因多态性与冠心病的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2011, 27(4):284-286.
Chen F, Wu HL, Wang J, et al. Relationships between adiponectin levels and its gene polymorphism with coronary heart disease [J]. Journal of Clinical Cardiovascular, 2011, 27(4):284-286.
- [11] 徐丽, 凌文华. 脂联素基因多态性研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2005, 25(21):1-3.
Xu L, Ling WH. Adiponectin gene polymorphism is reviewed [J]. Section Endocrinol Foreign Med Sci, 2005, 25(21):1-3.
- [12] Kizer JR, Barzilay JI, Kuller LH, et al. Adiponectin and risk of coronary heart disease in older men and women [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(9):3357-3364.
- [13] 徐丽, 凌文华. 脂联素基因 SNP+45T/G 单核苷酸多态性与冠心病的相关性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6):1064-1068.
Xu L, Ling WH. Correlation of adiponectin gene SNP+45 T/G polymorphism with coronary heart disease [J]. Chinese Journal of Pathology, 2010, 26(6):1064-1068.
- [14] Bacci S, Menzaghi C, Ercolino T, et al. The +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with coronary artery disease in type 2 diabetic patients [J]. Diabetes Care, 2004, 27(8):2015-2020.
- [15] 张献玲, 彭文辉, 陆林, 等. 脂联素基因多态性与冠心病及斑块进展的相关性研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(4):435-439.
Zhang XL, Peng WH, Lu L, et al. Correlation of adiponectin gene polymorphisms with coronary artery disease and plaque progression [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2009, 29(4):435-439.
- [16] 马晓伟, 林益华, 李建平, 等. 我国 2 型糖尿病人群脂联素基因多态性与冠心病的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(4):197-200.
Ma XW, Lin YH, Li JP, et al. Adiponectin gene polymorphisms are associated with the risk of coronary artery disease in Chinese type 2 diabetic patients [J]. Chinese Journal of Diabetes, 2008, 16(4):197-200.

收稿日期:2014-12-31

修回日期:2015-03-07