

冠心病患者 α -内收蛋白基因多态性与表达水平研究*

张阳东^{1a}, 陈洁^{1b}, 楚瑞雪², 王利营^{1a}, 云洁^{1a}, 安娟¹, 方靓^{1a}

(1. 火箭军总医院 a. 特勤医学科; b. 护理部, 北京 100088; 2. 火箭军礼士路门诊部, 北京 100820)

摘要:目的 探讨 α -内收蛋白基因(ADD1)的单核苷酸多态性(SNP)及表达水平与冠心病(CAD)的相关性。方法 提取 2011 年 1 月~2013 年 10 月就诊于火箭军总医院的 114 例 CAD 患者和 116 例健康对照者外周血白细胞 DNA 和 RNA, 应用荧光标记单碱基延伸及杂交技术检测 ADD1 基因的 rs3775067 和 rs1263359 多态性, 应用荧光标记及毛细管电泳技术检测 ADD1 的基因表达水平。结果 ADD1 基因 2 个 SNPs 的基因型频率和等位基因频率在两组间差异无统计学意义($\chi^2=0.018\sim1.317$, P 值均 >0.05)。CAD 组的 ADD1 基因表达水平为 0.226 ± 0.284 , 明显高于健康对照组(0.153 ± 0.144), 差异有统计学意义($P<0.05$)。通过对不同基因型间表达水平的比较, 结果显示 CAD 组 rs3775067 的 TC 型患者的基因表达水平(0.250 ± 0.319)明显高于健康对照组(0.154 ± 0.156 , $P<0.05$), 余各基因型两组间表达水平差异无统计学意义($t=0.557\sim1.867$, P 值均 >0.05)。结论 ADD1 基因表达水平的升高是 CAD 的危险因素, 而 rs3775067 和 rs1263359 多态性与 CAD 的易感性无关。

关键词: α -内收蛋白; 冠心病; 单核苷酸多态性; 基因表达

中图分类号: R541.4; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)03-059-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.016

Study on Polymorphisms and Genes Expression Levels of α -Adducin in Patients with Coronary Artery Disease

ZHANG Yang-dong^{1a}, CHEN Jie^{1b}, CHU Rui-xue², WANG Li-ying^{1a}, YUN Jie^{1a},

AN Juan^{1a}, FANG Liang^{1a} (1a. *Special Service Medicine Department;*

1b. *Nursing Department, the General Hospital of the PLA Rocket Force, Beijing 100088, China;*

2. *Lishilu Clinic of the PLA Rocket Force, Beijing 100820, China*)

Abstract: **Objective** To investigate the association between single nucleotide polymorphisms (SNP) and expression levels of α -adducin(ADD1) gene in coronary artery disease (CAD) patients. **Methods** Extracted DNA and RNA samples of peripheral blood white cells from 114 CAD patients and 116 healthy individuals in Jan 2011 to Oct 2013 from the General Hospital of the PLA Rocket Force, SNPs of rs3775067 and rs1263359 mutations in the ADD1 gene were analyzed with allele-specific fluorogenic oligonucleotide probes combining hybridization. The gene expression levels were analyzed with fluorescence labeled and capillary electrophoresis technology. **Results** The frequencies of the genotypes and alleles of the two SNPs in the ADD1 gene were not significantly different between the two groups ($\chi^2=0.018\sim1.317$, all $P>0.05$). The ADD1 gene expression levels of CAD group (0.226 ± 0.284) were obviously higher than that of control group (0.153 ± 0.144 , $P<0.05$). The gene expression levels of TC genotype of rs3775067 were obviously higher in CAD group (0.250 ± 0.319) than that of control group (0.154 ± 0.156 , $P<0.05$), but the levels of the other genotypes had no significant difference between the two groups ($t=0.557\sim1.867$, all $P>0.05$). **Conclusion** The elevated ADD1 gene expression level would be risk factor for CAD. The polymorphisms of rs3775067 and rs1263359 had no relevance with CAD susceptibility.

Keywords: α -adducin; coronary artery disease; single nucleotide polymorphism; gene expression

α -内收蛋白(α -adducin, ADD1)是一种细胞膜骨架蛋白, ADD1 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与高血压密切相关^[1], 而高血压和动脉弹性减退是心血管疾病的重要危险标记。为了研究冠心病(coronary artery disease, CAD)患者 ADD1 基因表达水平与 SNP 的相关性, 本研究对 ADD1 基因的 rs3775067 和

rs1263359 多态性的基因型和基因表达水平进行检测, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2011 年 1 月~2013 年 10 月就诊于火箭军总医院的 CAD 患者 114 例为研究对象, 年龄 35~75 岁, 平均年龄 63.17 ± 8.32 岁, 其中男性 69 例, 女性 45 例, 均为经冠状动脉造影确诊的

* 作者简介: 张阳东(1970—), 男, 医学博士, 主任技师, 研究方向: 临床生物化学与分子生物学诊断, Tel: 13671041699, E-mail: zhangyud262@sohu.com。

CAD患者。对照组 116 例,年龄 48~78 岁,平均年龄 61.78 ± 5.82 岁,其中男性 67 例,女性 49 例,均为在笔者医院住院经查体、询问病史、全面体检,无心、肝、肾等疾病的健康者。两组均为汉族,无血缘关系。两组间性别和年龄等基本资料比较差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。

1.2 试剂和仪器 SNP Stream 基因分型系统(美国 Beckman Coulter 公司),PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),GenomeLab GeXP 基因表达分析系统(美国 Beckman Coulter 公司)。Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),Taq 酶(美国 Thermo 公司),dNTP(日本 TaKaRa 公司),PCR 缓冲液、氯化镁、Taq 酶(瑞士 Roche 公司),外切酶 I(新英格兰 BioLabs 公司),虾碱性磷酸酶及其缓冲液、灭菌双蒸水(美国 Promega 公司),余试剂购自美国 Beckman Coulter 公司。引物设计:ADD1 基因的 rs3775067 的 PCR 引物为 5'-TAACCAAT-TCAAACCTTATTTAATCAGC-3' 和 5'-TGTG-GTGGAGATTAGTGCTAAGT-3';延伸引物为 5'-CACCGCTATCAACAGACTTGCCA ATCA-CAGCTGTAACATTTTCAC-3'。rs1263359 的 PCR 引物为 5'-AAATTCCAGACTGCAAA TGG-3' 和 5'-TCATCTAGAGGCAGACATA CTAGCT-3';延伸引物为 5'-CAACAATAC-GAGCCAGCAAGTAAGAAGGTCTTATGTTT CCAAAAT-3'。ADD1(基因序列号为:Nm001119)基因扩增的 RT 引物为 5'-GTACGACTCAC-TATAGGGAGTGAGTGTGGTGAA GGGGTT-

3',PCR 引物为 5'-AGGTGACACTATAGAA TAGGTCCAGGAGATGAGGAACA-3',引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 方法 空腹采集受检者外周血 2 ml,EDTA-K₂ 抗凝,提取外周血的 DNA 和 RNA。DNA 的提取、SNP 的基因分型方法参见文献[2]。RNA 的提取、基因表达水平的检测方法参见文献[3]。本研究前期结果显示,基因的定量分析以 β -actin 和 SRP14 作为内参基因[3]。

1.4 统计学分析 应用北京元义堂科技开发公司的中华高智 CHISS 2005 统计软件进行分析。基因型和等位基因频率的组间比较采用四格表资料的 χ^2 检验。基因表达水平的统计分析先进行定量资料的正态性检验,正态分布定量资料的两组间比较采用成组设计资料的 t 检验,非正态分布定量资料两组间的比较采用成组设计资料的 t' 检验;多组间正态分布定量资料的比较采用单因素方差分析,多组间非正态分布定量资料的比较采用单因素 Kruskal-Wallis 检验,检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 基因型频率分析 见表 1。ADD1 基因 rs3775067 和 rs1263359 基因型和等位基因在 CAD 组和健康对照组间的分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡,表明研究对象具有群体代表性。CAD 组和健康对照组的 rs3775067 和 rs1263359 的基因型分布频率差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。

表 1 rs3775067 和 rs1263359 基因多态性基因型频率分布[n(%)]

基因型	rs3775067				rs1263359			
	CAD 组(n=114)	健康对照组(n=116)	χ^2	P	CAD 组(n=114)	健康对照组(n=116)	χ^2	P
TT	12(10.5)	14(12.1)	0.137	0.712	43(37.7)	37(31.9)	0.859	0.354
TC	55(48.2)	57(49.1)	0.018	0.892	47(41.2)	49(42.2)	0.024	0.876
CC	47(41.2)	45(38.8)	0.160	0.689	24(21.1)	30(25.9)	0.740	0.390

2.2 等位基因频率分析 见表 2。CAD 组和健康对照组的 rs3775067($\chi^2=0.198$, $P=0.656$)和 rs1263359($\chi^2=1.317$, $P=0.251$)的等位基因分布频率差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。

表 2 rs3775067 和 rs1263359 等位基因频率分布[n(%)]

等位基因	rs3775067		rs1263359	
	CAD 组	健康对照组	CAD 组	健康对照组
T	79(34.6)	85(36.6)	133(58.3)	123(53.0)
C	149(65.4)	147(63.4)	95(41.7)	109(47.0)

2.3 ADD1 不同基因型间基因表达水平分析 见表 3。CAD 组的 ADD1 基因表达水平为 0.226 ± 0.284 ,健康对照组的 ADD1 基因表达水平为 0.153 ± 0.144 ,两组间差异具有统计学意义($P=0.016$)。两组不同的基因型间的表达水平差异无统计学意义(P 值均 >0.05),两组间 rs3775067 的 TC 型基因表达水平差异具有统计学意义($P=0.046$),余各基因型两组间表达水平差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。

表3 不同基因型间 ADD1 基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因型		CAD 组	健康对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
rs3775067	TT	0.184±0.139	0.154±0.139	0.557	0.583
	TC	0.250±0.319	0.154±0.156	2.028	0.046
	CC	0.208±0.269	0.153±0.132	1.263	0.211
rs1263359	TT	0.187±0.282	0.143±0.118	0.935	0.354
	TC	0.217±0.253	0.151±0.123	1.612	0.112
	CC	0.314±0.333	0.170±0.198	1.867	0.070

3 讨论 ADD1 是一种细胞膜骨架蛋白,参与细胞连接、信号转导及离子转运,尤其与钠离子转运及细胞的增生程度密切相关^[4]。ADD1 基因第 10 外显子存在 G614T 点突变,使氨基酸序列第 460 位的甘氨酸被色氨酸取代。携带 460 色氨酸等位基因者在钠摄入增加、利尿治疗时血压变化较大,因此认为该基因与高血压有关,尤其是盐敏感性。同时该基因多态性还与降压药物对原发性高血压的降压效果密切相关^[5]。另有研究发现该多态性不仅与心血管病的发病密切相关,而且还与心血管病患者的高血压^[6,7]及大动脉弹性^[8]密切相关,是高血压后心血管病发病率和死亡率的理想预警因子^[9]。Wang 等^[10]在高血压的发生风险评估研究中,通过对 ADD1 基因的多个 SNP 进行分型,发现 rs3775067 的基因型频率以及该 SNP 与其它 3 个 SNP 构建的单倍型频率和冷加压试验中血压的变化密切相关。

本研究通过对 ADD1 基因 SNP 中的 rs3775067 和 rs1263359 进行分型,结果显示 2 个 SNP 的基因型和等位基因频率在两组间无统计学差异,提示其多态性与 CAD 的易感性无关。同时我们利用荧光标记和毛细管电泳技术检测 ADD1 的基因表达水平,结果表明 CAD 组 ADD1 基因表达水平明显高于健康对照组,通过对不同基因型间表达水平的比较,结果显示以 rs3775067 的 TC 型的改变最为显著。结果提示 CAD 组 ADD1 基因表达水平虽然高于健康对照组,但其只能作为 rs3775067 的基因型为 TC 型患者的辅助诊断指标。

CAD 患者常并发有高血压,而治疗高血压的噻嗪类、潴钾利尿剂类及袢利尿剂类等药物均可影响钠离子的转运,因此 CAD 患者 ADD1 基因表达水平的变化是否和血压的变化及降压药物的使用有关尚待研究。

参考文献:

- [1] 翟丽华,梁旭,王沙燕.内收蛋白 α 亚单位遗传多态性与原发性高血压[J].中华老年医学杂志,2011,31(5):901-903.

Zhai LH, Liang X, Wang SY. Genetic polymorphisms of alpha-adducin and essential hypertension[J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2011, 31(5): 901-903.

- [2] 张阳东,温新宇,董矜,等.冠心病相关基因多重单核苷酸多态性分型检测法的构建[J].中国实验诊断学,2011,15(9):1428-1432.
- Zhang YD, Wen XY, Dong J, et al. Establishment of a multiplex genotyping method for single nucleotide polymorphisms of genes associated with coronary artery disease[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011, 15(9): 1428-1432.
- [3] 张阳东,楚瑞雪,时磊,等.2型糖尿病患者外周血管管家基因表达水平比较[J].现代检验医学杂志,2011,26(1):9-10.
- Zhang YD, Chu RX, Shi L, et al. Comparison of housekeeping genes expression levels in peripheral blood of type 2 diabetes mellitus patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(1): 9-10.
- [4] Chen CL, Lin YP, Lai YC, et al. α -adducin translocates to the nucleus upon loss of cell-cell adhesions[J]. Traffic, 2011, 12(10): 1327-1340.
- [5] 李刚强,朱瑞,樊济海.原发性高血压患者 α -内收蛋白基因单核苷酸多态性与复方缬沙坦降压治疗疗效的相关性研究[J].临床内科杂志,2012,29(4):276-278.
- Li GQ, Zhu R, Fan JH. Relationship between the angiotensin II type 2 receptor polymorphism and anti-hypertensive effect of valsartan/Hydrochlorothiazide[J]. Journal of Clinical Internal Medicine, 2012, 29(4): 276-278.
- [6] Li YY. α -Adducin Gly460Trp gene mutation and essential hypertension in a Chinese population: a meta-analysis including 10 960 subjects[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30214.
- [7] Wang LF, Zheng B, Zhao HG, et al. α -Adducin gene G614T polymorphisms in essential hypertension patients with high low density lipoprotein (LDL) levels[J]. Indian J Med Res, 2014, 139(2): 273-278.
- [8] 王丛,孙刚,丁燕程,等. α -内收蛋白基因多态性与大动脉弹性相关性研究[J].中国分子心脏病学杂志,2007,7(4):214-217.
- Wang C, Sun G, Ding YC, et al. The association between α -adducin gene polymorphism and big artery elasticity[J]. Molecular Cardiology of China, 2007, 7(4): 214-217.
- [9] Yan L, Lutgarde T, Tatiana K, et al. Cardiovascular risk in relation to α -adducin Gly460Trp polymorphism and systolic pressure[J]. Hypertension, 2005, 46(3): 527-532.
- [10] Wang L, Chen S, Zhao Q, et al. Association between genetic variants of the ADD1 and GNB3 genes and blood pressure response to the cold pressor test in a Chinese Han population: the GenSalt Study[J]. Hypertens Res, 2012, 35(8): 805-810.

收稿日期:2015-09-28

修回日期:2016-01-05