

血管紧张素Ⅱ1型受体3个 单核苷酸多态性与冠心病的相关性分析*

张阳东¹,周建荣²,楚瑞雪³,王利营¹,方 靛¹ (1. 火箭军总医院特勤医学科,北京 100088;
2. 解放军第532医院,安徽黄山 245000;3. 火箭军礼士路门诊部,北京 100820)

摘要:目的 观察中国汉族人群血管紧张素Ⅱ1型受体(AT1R)基因3个单核苷酸多态性(SNP)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192例CAD患者和189例健康对照者外周血白细胞DNA和RNA,设计引物,应用荧光标记单碱基延伸及寡核苷酸微阵列芯片杂交技术检测AT1R基因rs6801836,rs2675511和rs5182的基因型。结果 对照组和CAD组间3个SNP的基因型频率和等位基因频率差异无统计学意义($\chi^2=0.047\sim2.226$, P 值均 >0.05);由相互连锁的rs6801836和rs5182构成的单倍型以TT型为主,各单倍型频率在两组间差异无统计学意义($\chi^2=0.025\sim1.020$, P 值均 >0.05)。结论 研究中AT1R基因的3个SNP与CAD的易感性无关。

关键词:血管紧张素Ⅱ1型受体;单核苷酸多态性;冠心病;单倍型

中图分类号:R541.4;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)02-057-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.015

Correlation between the Three Single Nucleotide Polymorphisms in Angiotensin Ⅱ Type one Receptor Gene and Coronary Artery Disease

ZHANG Yang-dong¹, ZHOU Jian-rong², CHU Rui-xue³, WANG Li-ying¹, FANG Liang¹

(1. Department of Special Service Medicine, the General Hospital of the PLA Rocket Force,
Beijing 100088, China; 2. No. 532 Hospital of the PLA, Anhui Huangshan 245000, China;

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

Abstract: **Objective** To investigate the association between the three single nucleotide polymorphisms (SNP) in angiotensin II type one receptor (AT1R) gene with coronary artery disease (CAD) in Chinese Han nationality. **Methods** Extracted DNA and RNA samples of peripheral blood white cells from 192 CAD patients and 189 healthy individuals in Jan 2011 to Oct 2013 from the general hospital of the PLA Rocket Force. Designed primes and the three SNPs as rs6801836, rs2675511 and rs5182 of AT1R gene were analyzed with allele-specific fluorogenic oligonucleotide probes in an assay combining extension and hybridization. **Results** The genotype and allele frequencies of the three SNPs were not significantly different between the control group and CAD group ($\chi^2=0.047\sim2.226$, all $P>0.05$). The major haplotype constructed with linked rs6801836 and rs5182 was TT. The frequency of every haplotypes showed no significantly difference between the two groups ($\chi^2=0.025\sim1.020$, all $P>0.05$). **Conclusion** The three polymorphisms of AT1R gene studied in this work showed no association with CAD susceptibility.

Keywords: angiotensin II type one receptor; single nucleotide polymorphism; coronary artery disease; haplotype

冠心病(coronary artery disease, CAD)是我国患病率和死亡率都较高的疾病之一。CAD的发生发展是遗传因素和环境因素共同作用的结果。高血压是CAD的重要致病因子,而血管紧张素Ⅱ与血管紧张素Ⅱ1型受体(angiotensin II type one receptor, AT1R)结合引起AT1R的激活是血压升高的关键环节。为了研究AT1R与CAD易感的相关性,本研究对AT1R基因的3个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) rs6801836, rs2675511和rs5182的分布特点进行了分析。

1 材料和方法

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组192例,年龄35~75岁,平均年龄 62.7 ± 8.0 岁,其中男性121例,女性71例。对照组189例,年龄45~78岁,平均年龄 61.7 ± 5.9 岁,其中男性112例,女性77例。CAD组和对照组的纳入标准参见笔者先前发表的文献^[1]。

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)。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

* 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: zhangyd262@sohu.com。

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:rs6801836 的 PCR 引物:5'-AAATTCTTCTCCCTTTTCTC-3' 和 5'-CCAATTAGAAGAACATTTTACATAAATG-3'。延伸引物:5'-CCACTCAACCTCCACGAATACATGACCAGAACTCCCTGC CCAATAA-3'。rs2675511 的 PCR 引物:5'-AAGATATAATGCATGAAATAAAAGCC-3' 和 5'-AATAGAGTTGCTACTGAAAAACCCT-3'。延伸引物:5'-AGCAAGACCACCTAGACCAGACCTTTGATAATTTATATCTCTCAC-3'。rs5182 的 PCR 引物:5'-ATTTTTCATTGAGAACACCAATATTAC-3' 和 5'-ACAGGAAACCCAGTATATTTTGG-3'。延伸引物:5'-ACAAC TCACGCAAGTACCATATTATGAGTCCCAA AATTCAACCCT-3'。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 方法 采集受检者空腹外周血 2 ml, EDTA-K₂ 抗凝,外周血白细胞 DNA 的提取、SNP 的基因分型、单倍型的构建及统计学分析方法等参见笔者先前发表的文献^[2]。

2 结果

2.1 SNP 的检出率 通过对 2 组共 381 份 DNA 标本进行检测,3 个 SNP 的基因分型成功率分别为:rs6801836 为 99.0%(377/381),rs2675511 为 97.6%(372/381),rs5182 为 97.9%(373/381)。平均样本检出率为 98.2%。

2.2 基因型频率分析 见表 1。3 个 SNP 的基因型和等位基因在本研究两组人群中的分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡,说明纳入本研究的样本具有群体代表性。统计结果显示 3 个 SNP 的基因型和等位基因频率在对照组和 CAD 组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 AT1R 基因 3 个 SNP 位点基因型和等位基因频率分布($n, \%$)及统计结果(χ^2, P)

基因型	对照组 ($n=189$)	CAD 组 ($n=192$)	χ^2	P	等位基因	对照组 ($n=189$)	CAD 组 ($n=192$)	χ^2	P
rs6801836	TT 140(74.1)	131(68.2)	1.354	0.245	T	327(86.5)	317(82.6)	2.124	0.145
	TC 47(24.97)	55(28.7)	0.170	0.680	C	47(12.4)	63(16.4)		
	CC 0(0)	4(2.1)	2.226	0.154					
rs2675511	AA 120(63.5)	134(69.8)	1.309	0.253	A	303(80.2)	321(83.6)	1.052	0.305
	AC 63(33.3)	53(27.6)	1.316	0.251	G	65(17.2)	55(14.3)		
	GG 1(0.5)	1(0.5)	0.481	0.488					
rs5182	TT 95(50.3)	103(53.7)	0.451	0.502	T	272(72.0)	279(72.7)	0.142	0.706
	TC 82(43.4)	73(38.0)	1.817	0.178	C	100(26.5)	95(24.7)		
	CC 9(4.8)	11(5.7)	0.047	0.828					

2.3 单倍型分析 国际单倍型图工程数据库(<http://www.hapmap.org>, HapMap)上公布的中国汉族人群 AT1R 基因 3 个 SNP 位点间的连锁不平衡指标 D' 和 r^2 见表 2。其中空白对角线下方为 D' ,上方为 r^2 。

表 2 AT1R 基因 3 个 SNP 位点间连锁不平衡水平

D'	r^2		
	rs6801836	rs2675511	rs5182
rs6801836		0.166	0.276
rs2675511	0.423		0.164
rs5182	0.877	0.652	

根据国内外文献报道^[3,4],本研究以 $D'>0.7$ 和 $r^2<0.6$ 作为连锁不平衡的判断标准。表 2 的检索结果显示,3 个 SNP 间只有 rs6801836 和 rs5182 间存在连锁不平衡。根据 rs6801836 和

rs5182 的基因型,用 PHASE2.1 软件对每个个体的单倍型进行构建。构建的 4 种单倍型的分布频率见表 3。结果显示中国汉族人群由 rs6801836 和 rs5182 构建的单倍型以 TT 型为主,CAD 组和对照组的 4 种单倍型频率差异无统计学意义(χ^2 和 P 见表 3)。

表 3 AT1R 基因 2 个 SNP 构建单倍型频率分布比较

单倍型	SNP 等位基因		单倍型频率(%)		χ^2	P
	rs6801836	rs5182	对照组	CAD 组		
H1(T-T)	T	T	71.9	71.4	0.025	0.876
H2(T-C)	T	C	15.6	12.0	0.665	0.415
H3(C-T)	C	T	1.1	3.0	1.020	0.312
H4(C-C)	C	C	11.4	13.6	0.411	0.521

3 讨论 肾素-血管紧张素系统在维持机体水盐平衡和调节心血管活动中起着十分重要的作用。

在肾素-血管紧张素系统中,血管紧张素Ⅱ的生物活性最强,具有血管收缩、刺激血管平滑肌细胞生长、心肌细胞和内膜增生、提高交感神经活性、增加冠状动脉阻力等作用,甚至可能诱发心律失常。血管紧张素Ⅱ主要通过AT1R结合而发挥作用。AT1R被激活后可引起水钠潴留及血压升高,是肾素-血管紧张素系统作用于效应器的关键环节。

单个核苷酸碱基的突变可导致氨基酸的替换,从而导致基因表达水平和生物活性的改变。国内牛秋丽等^[5]通过对AT1R的rs388915多态性进行分析,发现其基因型和等位基因频率与原发性高血压的发病相关。目前国内外对AT1R基因与CAD的病因及病变程度的相关性研究较多的是A1166C多态性,可能因研究对象的族群不同,国内国外报道的结果也不尽相同^[6~10]。我们的研究结果显示中国汉族人群rs6801836,rs2675511和rs5182多态性的基因型以纯合的TT和AA型为主,而另一纯合的CC和GG型的频率很低。通过对3个SNP基因型和等位基因频率进行比较,结果显示3个SNP的基因型和等位基因频率在CAD组和对照组间无统计学差异,提示3个SNP与CAD的遗传易感性无关。同时我们根据AT1R基因3个SNP的连锁不平衡水平,通过对相互间连锁的rs6801836和rs5182进行单倍型构建,结果显示其单倍型以TT型为主,CAD组和对照组间各单倍型频率无统计学差异,提示rs6801836和rs5182作为单倍型存在时,与CAD的发生也无遗传易感性的关联。

CAD是多因素作用于不同环节所致的疾病。HapMap上公布的中国汉族人群AT1R基因的SNP就有将近20个。其余SNP是否与CAD的发病易感性有关尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张阳东,温新宇,董 矜,等.浆细胞膜糖蛋白-1基因单核苷酸多态性与冠心病的相关性研究[J].武警医学,2011,22(6):468-471.
Zhang YD, Wen XY, Dong J, et al. The association between single nucleotide polymorphisms of plasma cell membrane glycoprotein-1 gene and coronary artery disease[J]. Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Forces, 2011, 22(6): 468-471.
- [2] 张阳东,时 磊,于 敏,等.中国汉族人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与2型糖尿病的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2009,25(1):14-16.
Zhang YD, Shi L, Yu M, et al. Correlation between single nucleotide polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene and type 2 diabetes mellitus in Chinese Han nationality[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2009, 25(1): 14-16.
- [3] 倪培华,应雅韵,傅 毅,等.肝脂酶基因启动子多态性与连锁不平衡分析[J].诊断学理论与实践,2007,6(4):339-342.
Ni PH, Ying YY, Fu Y, et al. Analysis of hepatic lipase gene polymorphism and linkage disequilibrium [J]. Journal of Diagnostics Concepts & Practice, 2007, 6(4): 339-342.
- [4] Morita A, Nakayama T, Doba N, et al. Polymorphism of the C-reactive protein (CRP) gene is related to serum CRP level and arterial pulse wave velocity in healthy elderly Japanese[J]. Hypertens Res, 2006, 29(5):323-331.
- [5] 牛秋丽,刘洁琳,王佐广,等.血管紧张素Ⅱ1型受体基因rs388915多态性与原发性高血压的相关性[J].心肺血管病杂志,2012,31(3):232-235.
Niu QL, Liu JL, Wang ZG, et al. Association of rs-388915 polymorphism of AT1R gene with essential hypertension[J]. Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases, 2012, 31(3): 232-235.
- [6] 徐 欣,徐 雯,杨承健,等.血管紧张素Ⅱ-1型受体基因A1166/C多态性与中国人冠心病的关系[J].山东医药,2007,47(27):135-136.
Xu X, Xu W, Yang CJ, et al. Association of A1166/C polymorphism of AT1R gene with Chinese coronary artery disease patients[J]. Shandong Medical Journal, 2007, 47(27): 135-136.
- [7] 杨 涛,石 毅,陈敬州,等.血管紧张素Ⅱ1型受体基因多态性与冠心病发病相关[J].中国分子心脏病学杂志,2008,8(2):91-94.
Yang T, Shi Y, Chen JZ, et al. Ang II type 1 receptor polymorphism is association with coronary artery disease[J]. Molecular Cardiology of China, 2008, 8(2): 91-94.
- [8] 王选琦,燕醒狮,吴晓明,等.血管紧张素Ⅱ1型受体基因多态性与冠心病的相关性研究[J].海南医学,2013,24(14):2040-2042.
Wang XQ, Yan XS, Wu XM, et al. Correlation of angiotensin II receptor gene polymorphism with coronary heart disease[J]. Hainan Medical Journal, 2013, 24(14): 2040-2042.
- [9] Abd El-Aziz TA, Hussein YM, Mohamed RH, et al. Renin-angiotensin system genes polymorphism in Egyptians with premature coronary artery disease[J]. Gene, 2012, 498(2): 270-275.
- [10] Abboud N, Ghazouani L, Kaabi B, et al. Evaluation of the contribution of renin angiotensin system polymorphisms to the risk of coronary artery disease among Tunisians[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2010, 14(5): 661-666.

收稿日期:2016-11-22

修回日期:2017-01-23