

PECAM-1 基因 rs7503550 位点多态性和表达水平 与冠心病及 2 型糖尿病的相关性研究*

张阳东¹, 周建荣², 楚瑞雪³, 周国勇¹, 朱磊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. 火箭军总医院礼士路门诊部, 北京 100820)

摘要:目的 观察血小板内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)基因 rs7503550 位点多态性及表达水平与冠心病(CAD)和 2 型糖尿病(T2DM)的相关性。方法 提取 2014 年 11 月~2016 年 5 月就诊于火箭军总医院的 122 例 CAD 患者、99 例 T2DM 患者及 126 例健康对照者外周血白细胞的 DNA 和 RNA, 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 PECAM-1 基因 rs7503550 位点的基因型, 应用荧光标记及毛细管电泳技术检测 PECAM-1 的基因表达水平。结果 CAD 组和 T2DM 组的 SNP 基因型频率和等位基因频率与健康对照组差异无统计学意义($\chi^2=0.004\sim 0.170$, 均 $P>0.05$)。CAD 组(0.726 ± 0.514 vs 0.548 ± 0.379 , $t=3.109$, $P=0.002$)和 T2DM 组(0.731 ± 0.559 vs 0.548 ± 0.379 , $t=2.918$, $P=0.004$)的 PECAM-1 基因表达水平明显高于健康对照组, 差异均有统计学意义。通过对不同基因型间表达水平的比较, 结果显示 CAD 组的 AG 型和 GG 型均显著高于正常对照组的 AG 型(0.690 ± 0.481 vs 0.518 ± 0.365 , $t=2.118$, $P=0.037$)和 GG 型(0.768 ± 0.600 vs 0.520 ± 0.286 , $t=2.015$, $P=0.049$); T2DM 组的 AG 型显著高于正常对照组的 AG 型(0.802 ± 0.674 vs 0.518 ± 0.365 , $t=2.716$, $P=0.008$), 差异有统计学意义。结论 rs7503550 位点多态性与 CAD 和 T2DM 的易感性无关, PECAM-1 基因表达水平的升高是 CAD 和 T2DM 的危险因素, rs7503550 的基因型与 PECAM-1 的基因表达有关。

关键词:血小板内皮细胞黏附分子-1; 多态性; 冠心病; 2 型糖尿病

中图分类号: R541.4; R587.1; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)03-021-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.03.005

Relativity Study on rs7503550 Polymorphism and Genes Expression Levels of PECAM-1 in Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus

ZHANG Yang-dong¹, ZHOU Jian-rong², CHU Rui-xue³, ZHOU Guo-yong¹, ZHU Lei¹

(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, the General Hospital of the PLA Rocket Force, Beijing 100820, China)

Abstract: Objective To investigate the rs7503550 polymorphism and expression levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene in coronary artery disease (CAD) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients. **Methods** Extracted DNA and RNA samples of peripheral blood white cells from 122 CAD patients, 99 T2DM patients and 126 healthy individuals in Nov 2014 to May 2016 from the General Hospital of the PLA Rocket Force. The rs7503550 polymorphism of PECAM-1 gene was analyzed with allele-specific fluorogenic oligonucleotide probes in an assay combining extension and hybridization. The gene expression levels were analyzed with fluorescence labeled and capillary electrophoresis technology. **Results** The genotype and allele frequencies of the polymorphism of the CAD and T2DM group showed no significant difference compared to the control group ($\chi^2=0.004\sim 0.170$, all $P>0.05$). The gene expression levels of CAD group (0.726 ± 0.514 vs 0.548 ± 0.379 , $t=3.109$, $P=0.002$) and T2DM group (0.731 ± 0.559 vs 0.548 ± 0.379 , $t=2.918$, $P=0.004$) were obviously higher than that of control group, the difference was statistically significant. The gene expression levels of AG and GG genotype were obviously higher in CAD group than that of AG (0.690 ± 0.481 vs 0.518 ± 0.365 , $t=2.118$, $P=0.037$) and GG (0.768 ± 0.600 vs 0.520 ± 0.286 , $t=2.015$, $P=0.049$) genotype in control group. Compared with control group, the levels of AG were obviously higher in T2DM group (0.802 ± 0.674 vs 0.518 ± 0.365 , $t=2.716$, $P=0.008$). All the difference was statistically significant. **Conclusion** The polymorphism of rs7503550 had no relevance with CAD and T2DM susceptibility. The elevated PECAM-1 gene expression level was a risk factor for CAD and T2DM. The mutations of rs7503550 were associated with expression levels of PECAM-1.

* 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, E-mail: zhangyd262@sohu.com.

通讯作者: 楚瑞雪(1970—), 女, 副主任医师, 研究方向: 老年病学与健康健康管理, E-mail: churuixue7652@163.com.

Keywords: platelet endothelial cell adhesion molecule-1; polymorphism; coronary artery disease; type 2 diabetes mellitus

血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 表达于血管内皮并参与动脉粥样硬化斑块的形成, 是糖尿病患者微血管病变发生的促发因素之一。为了研究 PECAM-1 基因与冠心病 (coronary artery disease, CAD) 及 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的相关性, 我们对 PECAM-1 基因的 rs7503550 位点多态性和表达水平进行了检测分析。

1 材料和方法

1.1 研究对象 2014 年 11 月~2016 年 5 月就诊于火箭军总医院的 CAD 患者组 122 例, 年龄 35~75 岁, 平均年龄 63.0 ± 8.4 岁, 其中男性 77 例, 女性 45 例; T2DM 组 99 例, 年龄 25~77 岁, 平均年龄 57.9 ± 12.2 岁, 其中男性 60 例, 女性 39 例; 对照组 126 例, 年龄 48~78 岁, 平均年龄 62.0 ± 5.8 岁, 其中男性 74 例, 女性 52 例。三组研究对象的纳入标准参照文献[1-2]。

1.2 仪器和试剂 本研究所应用仪器和试剂来源参见文献[1]。引物设计: PECAM-1 (基因序列号

为: Nm_000442) 的 RT 引物: 5'-GTACGACT-CACTATAGGGACGCAATGATCAAGAGAGCAA-3', 浓度为 500 nmol/L; PCR 引物: 5'-AGGTGACACTATAGAATATCAAATGACCTCAAA TGCCA-3'。rs7503550 的 PCR 引物: 5'-AAG-GCTGAGGACCTGGCC-3' 和 5'-ATTATGTGATCTGTAGTTTGGGAAGC-3'。延伸引物: 5'-CTAACTAAGCTACGCCGACATTCCTCCCGATCCCCTCCAAACCCA-3'。

1.3 方法和统计学 白细胞 DNA 和 RNA 的提取、核苷酸的多态性分型、基因表达水平的检测及统计学分析等参见笔者先前发表的文献[1-3]。

2 结果

2.1 基因型频率分析 见表 1。rs7503550 位点的基因型和等位基因在本研究三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 CAD 组和 T2DM 组 rs7503550 的基因型和等位基因频率与对照组相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 rs7503550 基因型和等位基因频率分布 [$n(\%)$]

基因型和等位基因	对照组 ($n=126$)	CAD 组 ($n=122$)	T2DM 组 ($n=99$)	χ^2^*	P^*	$\chi^2^\#$	$P^\#$
AA	39(31.0)	40(32.8)	34(34.3)	0.030	0.862	0.157	0.692
AG	58(46.0)	52(42.6)	43(43.4)	0.170	0.680	0.064	0.800
GG	29(23.0)	30(24.6)	22(22.3)	0.020	0.887	0.001	0.985
A	136(54.0)	132(54.1)	136(54.0)	0.004	0.951	0.121	0.728
G	116(46.0)	112(45.9)	87(43.9)				

注: * 为 CAD 组和对照组比较; # 为 T2DM 组和对照组比较。

2.2 基因表达水平分析 以参考基因 SRP14 和 β -actin 的几何均值为标准化因子, 对照组的基因表达水平为 0.548 ± 0.379 , CAD 组为 0.726 ± 0.514 , T2DM 组为 0.731 ± 0.559 。CAD 组和 T2DM 组的基因表达水平高于正常对照组 ($t=3.109, P=0.002$; $t=2.918, P=0.004$), 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。正常对照组、CAD

组和 T2DM 组不同基因型间基因表达结果见表 2。通过对三组不同基因型间基因表达水平进行比较, 结果显示 CAD 组的 AG 型和 GG 型显著高于正常对照组的 AG 型 ($t=2.118, P=0.037$) 和 GG 型 ($t=2.015, P=0.049$); T2DM 组的 AG 型显著高于正常对照组的 AG 型 ($t=2.716, P=0.008$), 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

表 2 不同基因型间基因表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	对照组	CAD 组	T2DM 组	t_1	P_1	t_2	P_2
AA	0.613 ± 0.455	0.742 ± 0.498	0.636 ± 0.386	1.202	0.233	0.229	0.819
AG	0.518 ± 0.365	0.690 ± 0.481	0.802 ± 0.674	2.118	0.037	2.716	0.008
GG	0.520 ± 0.286	0.768 ± 0.600	0.739 ± 0.540	2.015	0.049	1.872	0.670

注: t_1, P_1 为 CAD 组和对照组比较; t_2, P_2 为 T2DM 组和对照组比较。

3 讨论 PECAM-1 又名 CD31, 是一种高表达于血小板、中性粒细胞和内皮细胞表面连接部的糖蛋白, 具有众多包括调控血小板功能、介导内皮细胞之间、内皮细胞与其他细胞之间的黏附等血管生物学调控作用^[4-5]。在炎症起始期, PECAM-1 可引起白细胞外渗、促进白细胞迁移。可溶性存在于血浆内的 PECAM-1 通过介导白细胞与内皮细胞之间的黏附反应, 损伤冠状动脉血管内皮, 使内皮细胞发生回缩, 暴露出内皮下组织, 参与动脉粥样硬化斑块和血栓形成, 与心肌梗死的发生密切相关^[6]。以往的研究结果表明 PECAM-1 基因 rs668 位点多态性与 CAD 密切相关^[7-8], 而 rs1867624 位点多态性与 CAD 的易感性无关^[9]。血清 PECAM-1 能较好地反映 CAD 的严重程度, 对临床有重要的应用价值^[10]。

糖尿病患者由于长期处于高血糖状态, 可致患者体内 PECAM-1 水平呈高表达, 从而加重患者微血管病变的发生。同时由于大部分糖尿病患者血浆中存在的高胰岛素可激活丝裂原蛋白激酶分泌, 上调内皮细胞 PECAM-1 的表达, 从而使中性粒细胞加快对血管内皮细胞的浸润, 加速血管病变进程^[11]。国内以往的研究结果显示 T2DM 患者血清 PECAM-1 的高表达是患者微血管病变发生的促发因素之一, PECAM-1 水平监测可预测患者微血管的病变发生和病情发展^[12]。国外学者通过对高加索人 PECAM-1 基因 rs688 位点多态性进行分析, 发现 rs688 位点多态性与 T2DM 患者肾病的发病无关, 而其 GG 型是 T2DM 患者发生颈动脉斑块的易感因素^[13-14]。

本研究通过对 PECAM-1 基因 rs7503550 位点多态性进行分型, 结果显示中国汉族人群 CAD 组和 T2DM 组 rs7503550 位点多态性的基因型和等位基因频率与对照组无统计学差异, 提示 rs7503550 位点多态性与 CAD 和 T2DM 的遗传易感性无关。PECAM-1 基因表达水平的检测结果显示 CAD 组和 T2DM 组显著高于健康对照组, 提示 PECAM-1 基因表达水平可作为 CAD 和 T2DM 的诊断指标。通过对 rs7503550 位点多态性不同基因型间表达水平进行分析, 发现 CAD 组以 AG 和 GG 型增高为主, T2DM 组以 AG 型增高为主, 提示 rs7503550 位点多态性可能部分参与调控 PECAM-1 基因的表达。基因经翻译可合成蛋白, PECAM-1 基因 rs7503550 位点多态性和表达水平是否与 CAD 和 T2DM 患者的蛋白合成相关还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 张阳东, 陈洁, 楚瑞雪, 等. 冠心病患者 α -内收蛋白基

因多态性与表达水平研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(3): 59-61.

ZHANG Yangdong, CHEN Jie, CHU Ruixue, et al. Study on polymorphisms and genes expression levels of α -adducin in patients with coronary artery disease [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(3): 59-61.

[2] 张阳东, 楚瑞雪, 时磊, 等. 2 型糖尿病患者外周血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 Yangdong, CHU Ruixue, SHI Lei, 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.

[3] 张阳东, 陈洁, 楚瑞雪, 等. 2 型糖尿病患者低密度脂蛋白水平及其受体基因表达水平研究[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(5): 97-99.

ZHANG Yangdong, CHEN Jie, CHU Ruixue, et al. Study of low-density lipoprotein levels and its receptor genes expression levels in type 2 diabetes mellitus patients [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(5): 97-99.

[4] DELA PAZ N G, MELCHIOR B, SHAYO F Y, et al. Heparan sulfates mediate the interaction between PECAM-1 and the G α q/11 subunits of heterotrimeric G proteins [J]. J Biol Chem, 2014, 289(11): 7413-7424.

[5] LU W H, HUANG S J, YUH Y S, et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphisms are associated with coronary artery lesions in the chronic stage of kawasaki disease [J]. Acta Cardiol Sin, 2017, 33(3): 273-284.

[6] SHALIA KK, MASHRU MR, SONEJI SL, et al. Leucine 125 valine (Leu125Val) gene polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and myocardial infarction in Indian population [J]. Indian J Clin Biochem, 2010, 25(3): 273-279.

[7] KISELEVA R, GREINER C F, VILLA C H, et al. Mechanism of collaborative enhancement of binding of paired antibodies to distinct epitopes of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169537.

[8] TOURDOT B E, BRENNER M K, KEOUGH K C, et al. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)-mediated inhibitory signaling is regulated by sequential phosphorylation mediated by distinct non-receptor tyrosine kinases: a case study involving PECAM-1 [J]. Biochemistry, 2013, 52(15): 2597-2608.

[9] LI Yilan, WANG Shipeng, ZHANG Dandan, et al. The association of functional polymorphisms in genes expressed in endothelial cells and smooth muscle cells with the myocardial infarction [J]. Hum Genomics,

- 2019,13(1):5.
- [10] 齐蕊,李忠艳,史坚,等. 冠心病患者血小板 CD31 及血浆纤维蛋白原表达水平的测定及其意义[J]. 中国心血管杂志,2012,17(5):354-356.
QI Rui,LI Zhongyan,SHI Jian,et al. Expression level and clinical significance of platelet CD31 and plasma fibrinogen in patients with coronary heart disease [J]. Chin J Card Med,2012,17(5):354-356.
- [11] TROUGHTON R, MICHAEL FELKER G, JANUZZI J L. Natriuretic peptide-guided heart failure management[J]. Eur Heart J,2014,35(1):16-24.
- [12] 何玉芳,程琦,何鑫,等. 心钠素、脑利钠肽、C型利钠肽及血小板内皮细胞黏附分子 1 在老年 2 型糖尿病血管病变患者血浆中的水平及临床意义[J]. 临床误诊误治,2018,31(8):86-89.
HE Yufang,CHENG Qi,HE Xin,et al. The levels of atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide,C type natriuretic peptide and platelet endothelial cell adhesion molecule 1 in the plasma of elderly patients with type 2 diabetes complicated by angiopathy and their clinical significance[J]. Clinical Misdiagnosis Mistherapy,2018,31(8):86-89.
- [13] ZAVRSNIK M, KARIZ S, MAKUC J, et al. PECAM-1 leu125Val (rs688) polymorphism and diabetic nephropathy in caucasians with type 2 diabetes mellitus[J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2016, 2016(2):3152967.
- [14] POPOVIC D, NIKOLAJEVIC STARCEVIC J, SANTL LETONJA M, et al. PECAM-1 gene polymorphism(rs668) and subclinical markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Balkan J Med Genet,2016,19(1):63-70.

收稿日期:2019-02-30

修回日期:2019-04-10