

脂蛋白磷脂酶 A2 基因 I198T 和 R92H 多态性与中国汉族人群冠心病的相关性

赵娜娜¹, 洪梅^{2*}, 鲁翔¹, 严腊梅², 周海波²

(¹南京医科大学第二附属医院老年医学科,²心内科,江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:探讨脂蛋白磷脂酶 A2 基因 I198T 和 R92H 多态性位点与中国汉族人群冠心病遗传易感性的关系。方法:纳入 173 例冠心病患者和 101 例对照者,应用 DNA 测序仪测脂蛋白磷脂酶 A2 基因 I198T 和 R92H 的基因型。结果:①冠心病组 I198T 的基因型和等位基因频率与对照组无明显差异,而 R92H 的基因型和等位基因频率明显高于对照组($P < 0.05$);②RH+HH 基因型者总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的水平高于 RR 基因型者($P < 0.01$);③IH 单倍型与 IR 单倍型在冠心病组和对照组中的分布均有显著性差异($P < 0.01$);④Logistic 回归分析表明 R92H 的等位基因 92H 是冠心病的独立危险因素。结论:脂蛋白磷脂酶 A2 基因 I198T 多态性与汉族人群冠心病无明显相关性,R92H 多态性与汉族人群冠心病独立相关。

[关键词] 脂蛋白磷脂酶 A2; 基因; 多态性; 冠心病

[中图分类号] R541.64

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)01-073-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130115

Association of I198T,R92H polymorphisms in lipoprotein-associated phospholipase A2 gene with coronary heart disease in the Chinese Han population

Zhao Nana¹, Hong Mei^{2*}, Lu Xiang¹, Yan Lamei², Zhou Haibo²

(¹Department of Geriatrics,²Department of Cardiology,the Second Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association of I198T and R92H point mutations in lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) with coronary heart disease (CHD) in the Chinese Han population. **Methods:** Totally 173 CHD patients and 101 normal controls were genotyped by DNA sequencing instrument. **Results:** There was no significant difference between the CHD group and the control group in the frequencies of I198T genotypes and allele, but the frequencies of the R92H genotypes and allele were significantly higher in CHD patients than those in normal controls ($P < 0.05$). The levels of total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were significantly higher in the RH+HH genotype group than in the RR genotype group ($P < 0.01$). The distributions of haplotype IH and IR had a significant difference ($P < 0.01$) between CHD patients and normal controls. Binary logistic regression analysis demonstrated that polymorphism of R92H was an independent risk factor for CHD. **Conclusion:** The I198T polymorphism of Lp-PLA2 gene has no significant correlation with coronary heart disease, while the polymorphism of R92H could be associated with risk of CHD in Chinese Han population.

[Key words] lipoprotein-associated phospholipase A2; gene; polymorphism; coronary heart disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 073-077]

冠心病(coronary heart disease, CHD)已成为当今严重危害人类健康、影响人们生活质量的最常见心血管疾病之一,越来越多的证据表明炎症在动脉

硬化及其并发症的发生和发展中起着重要作用,多种炎症因子被证实参与了动脉粥样硬化的形成和发展^[1]。脂蛋白磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)是近年来研究较热的新型炎症因子,其活性与 CHD 密切相关。国内外研究报道均显示 Lp-PLA2 的 V279F、A379V 和 R92H 基因的多态性与 CHD 的遗传易感性有一定的相关性

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2009450);江苏省社会发展基金(BE2011804)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: meihong@njmu.edu.cn

[2],但对于 I198T 的研究国外有报道,但国内研究较少见[3-5],本文采用病例对照研究方法对中国汉族人群 Lp2PLA2 基因 I198T 和 R29H 多态性分布与 CHD 遗传易感性的相关性进行初步探讨。

1 对象和方法

1.1 对象

2010 年 6 月~2012 年 2 月住院的 CHD 患者 173 例,其中男 98 例,女 75 例;对照组 101 例,其中男 51 例,女 50 例。入组人员均行冠状动脉造影检查,CHD 的诊断符合 WHO 的诊断标准。以左前降支、左回旋支和右冠状动脉及其主要分支中至少有 1 支冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 为有意义病变。所有患者均排除肿瘤、血液系统疾病、慢性肝肾功能不全等系统性疾病。

1.2 方法

1.2.1 观察指标

一般情况、既往疾病史、吸烟饮酒史。晨起测体重、身高、血压,计算体质指数 (body mass index, BMI)。空腹 12 h 取静脉血 2 ml,用德国 ROCHE 公司 P800 全自动生化分析仪检测甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 等生物化学指标。

1.2.2 外周血白细胞 DNA 的制备

取 EDTA 抗凝的静脉血 200 μ l,用美国 Invitrogen 公司提供的基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,保存于 -20°C 冰箱中。

1.2.3 Lp-PLA2 基因 I198T 和 R29H 位点的基因型检测

Platinum[®] Taq DNA 聚合酶、定制引物均由美国 Invitrogen 公司提供,I198T 的引物序列包括上游引物:5'-CCGGGATTTGATTCCTGAGA-3',下游引物 5'-GAGCATAACTTGCCAGGTGT-3';R29H 引物序列包括上游引物:5'-CAATCACCACAGCAGCCTAA-3',下游引物 5'-TCCCATCCAACCTCAGAATGG-3'。待测样品 PCR 完毕,1.5%的琼脂糖胶鉴定,使用 3730XL 型 DNA 测序仪进行测序。

1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计数资料以百分数表示,采用 *t* 检验、卡方检验等方法。检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。采用 SHEsis 软件

分析 2 组的 Hardy-Weinberg 平衡,组间基因型和等位基因频率用 Fisher's 精确概率检验。采用非条件 Logistic 逐步回归模型分析冠心病危险因素,以比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% 可信区间 (95% CI) 表示相对危险度。

2 结果

2.1 一般资料比较

CHD 组与对照组相比,2 组的 BMI 有明显统计学差异 ($P < 0.05$),而性别比例、吸烟比例、并发症比例以及除 HDL-C 之外的血生化指标等方面的比较,差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 研究对象基本资料

Table 1 Characteristics of the patients with CHD and controls

项目	CHD 组	对照组	P 值
年龄(岁)	63.15 \pm 7.64	63.44 \pm 6.41	0.741
男性[n(%)]	98(56.6)	51(50.5)	0.379
BMI	24.36 \pm 1.48	23.94 \pm 1.71	0.037
吸烟[n(%)]	27(15.6)	14(13.9)	0.729
高血压[n(%)]	108(62.4)	56(55.4)	0.307
糖尿病[n(%)]	49(28.3)	18(17.8)	0.059
TC(mmol/L)	4.53 \pm 1.18	4.49 \pm 1.02	0.704
TG(mmol/L)	1.57 \pm 1.15	1.42 \pm 0.80	0.285
HDL-C(mmol/L)	1.12 \pm 0.30	1.19 \pm 0.28	0.048
LDL-C(mmol/L)	2.66 \pm 0.96	2.48 \pm 0.83	0.114

2.2 I198T 和 R29H 基因型分布和等位基因的频率

Lp-PLA2 基因 I198T 多态性位点有 II 型、IT 型和 TT 型 3 种基因型,R29H 也有 RR 型、RH 型和 HH 型 3 种基因型。I198T 在 CHD 组和对照组之间的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 (F 值分别为 0.375 和 0.336, $P > 0.05$),R29H 在 CHD 组和对照组之间的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 (F 值分别为 0.226 和 0.922, $P > 0.05$)。I198T 基因型在两组之间分布差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.53$, $P > 0.05$),I198T 位点等位基因的频率在两组之间分布差异亦无统计学意义 ($\chi^2 = 0.51$, $P > 0.05$, 表 2); 而 CHD 组 R29H 的 RH、HH 基因型明显高于对照组 ($\chi^2 = 8.37$, $P < 0.05$),且 92H 等位基因的分布频率也明显高于对照组 ($\chi^2 = 7.61$, $P < 0.01$),92H 等位基因携带者患 CHD 风险是 92R 等位基因携带者的 2.07 倍 (95% CI: 1.22~3.50, 表 3)。

2.3 不同基因型患者一般资料与临床特征比较

将所有入组人员按照 I198T 和 R29H 基因型分别进行分组,由于 TT 基因型和 HH 基因型较少,将

表 2 I198T 基因型的分布及等位基因频率

Table 2 Genotype distribution and allele frequencies of I198T [n(%)]

组别	基因型			等位基因	
	II	IT	TT	I	T
CHD 组	147(85.0)	24(13.9)	2(1.2)	318(91.9)	28(8.1)
对照组	89(88.1)	11(10.9)	1(1.0)	189(93.6)	13(6.4)

表 3 R92H 基因型的分布及等位基因频率

Table 3 Genotype distribution and allele frequencies of R92H [n(%)]

组别	基因型			等位基因	
	RR	RH	HH	R	H
CHD 组	110(63.6)	59(34.1)*	4(2.3)*	279(80.6)	67(19.4)**
对照组	74(73.3)	26(25.7)	1(1.0)	174(86.1)	28(13.9)

与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

TT 和 IT 合并计算,HH 和 RH 合并计算。II 基因型者与 IT+TT 基因型者的一般资料比较无显著性差异,RH+HH 基因型者 TC 和 LDL-C 水平高于 RR 基因型者($P < 0.01$),年龄、性别、BMI、吸烟、高血压、糖尿病等 2 组间无明显差异(表 4)。

表 4 RR 基因型者与 RH+HH 基因型者一般资料

Table 4 Characteristics of RR and RH+HH genotype

项目	RR 基因型	RH+HH 基因型
年龄(岁)	63.33 ± 7.05	63.08 ± 7.59
男性[n(%)]	87(45.55)	46(55.42)
BMI	24.27 ± 1.52	24.04 ± 1.71
吸烟[n(%)]	28(14.66)	13(15.66)
高血压[n(%)]	115(60.21)	49(59.04)
糖尿病[n(%)]	45(23.56)	22(26.51)
TC(mmol/L)	4.37 ± 1.06	4.90 ± 1.16*
TG(mmol/L)	1.44 ± 0.79	1.66 ± 1.46
HDL-C(mmol/L)	1.15 ± 0.30	1.13 ± 0.28
LDL-C(mmol/L)	2.46 ± 0.85	2.92 ± 0.94*

与 RR 基因型组比较,* $P < 0.01$ 。

2.4 单倍型分析

单倍型分析显示 CHD 组和对照组 IH 单倍型分布有显著性差异($P < 0.01$),同时携带 I198T 位点 198I 等位基因和 R92H 位点 92H 等位基因者患冠心病的风险增加($OR=2.205, 95\%CI: 1.264\sim 3.849$)。单倍型 IR 在 CHD 组和对照组分布差异亦有统计学意义($P < 0.01$),即同时携带 I198T 位点 198I 等位基因和 R92H 位点 92R 等位基因者则有较低的患冠心病风险($OR=0.504, 95\%CI: 0.315\sim 0.805$)。其他的单倍型在 2 组分布差异无统计学意义(表 5)。

2.5 CHD 与基因及传统危险因素的 Logistic 回归分析

以是否为 CHD 作为因变量,年龄、性别、BMI、吸烟、高血压、糖尿病、TC、TG、HDL-C、LDL-C 为自变量,进行 Logistic 回归分析,表明在校正传统风险因素后 R92H 等位基因 92H 仍是 CHD 的独立危险因素,携带 92H 基因位点的患者患 CHD 的风险增加($P < 0.01, OR=0.418, 95\%CI: 0.228\sim 0.766$,表 6)。

表 5 I198T 和 R92H 的单倍型分析

Table 5 Haplotype analysis of I198T and R92H gene

单倍型	频率(%)		OR(95%CI)
	对照组	CHD 组	
IH	8.9	17.8*	2.205 (1.264~3.849)
IR	84.6	74.2*	0.504 (0.315~0.805)
TH	1.5	1.6	-
TR	57.8	6.5	1.323 (0.616~2.844)

与对照组比较,* $P < 0.01$ 。

表 6 多元 Logistic 回归分析

Table 6 Binary Logistic regression analysis

因素	B	S.E.	Wald	df	P 值	OR (95%CI)
性别	1.018	0.274	13.800	1	< 0.001	2.768(1.618~4.736)
92H	-0.871	0.309	7.961	1	0.005	0.418(0.228~0.766)
BMI	-0.253	0.087	8.485	1	0.004	0.777(0.655~0.921)

3 讨论

CHD 是包括环境和遗传因素共同作用的一种疾病,其病理基础是冠状动脉粥样硬化,近年来的研究发现,在动脉粥样斑块形成、进展以致破裂的过程中均有炎症反应介质的参与,炎症反应被认为是最主要的促动脉粥样硬化因素。Lp-PLA2 属于磷脂酶超家族中的一员,又称为血小板活化因子乙酰水解酶,具有明显促进动脉粥样硬化的作用,与 CHD 的发生发展密切相关,被认为是 CHD 的独立危险因素^[2,6-7]。Lp-PLA2 主要由成熟的巨噬细胞和淋巴细胞合成分泌,以多种亚型分布于细胞内和细胞外,人血循环中的 Lp-PLA2 主要与脂蛋白颗粒结合存在,80%~85%与低密度脂蛋白结合,15%~20%与高密度脂蛋白及极低密度脂蛋白结合,其活性与胆固醇的浓度密切相关^[8],遗传学研究表明 Lp-PLA2 活性 62%受基因影响^[9],在 CHD 研究方面常常涉及以下几个基因多态性位点,包括 4 号外显子上 R92H,7 号外显子 I198T,9 号外显子上 V279F 及 11 号外显子上的 A379V,而且 PLA2G7 的基因突变因种族而异。日本研究者首先报道 V279F 变异是 CHD 的危险因素,更多研究发现 V279F 只存在于亚洲人,并未在高加索人中发现突变,且研究结论尚有争议。同样在对欧洲人群研究中发现了 A379V 的基因突变对 CHD 具有保护意义^[10],但在中国汉族人群研究指出该基因突变降低了 Lp-PLA2 活性,加重冠脉病变风险,尤其对于有心肌梗死患者更有意义^[11]。Kruse 等^[3]研究表明了 198T 和 379V 等位基因可降低 Lp-PLA2 与底物亲和力,在高加索人过敏症和哮喘的发生中可能起着关键作用。Ninio 等^[10]研究发现了 92H 等位基因在 CHD 组的分布高于对照组,该等位基因与 CHD 相关,但不影响 Lp-PLA2 活性。杜克大学医学中心在对 Lp-PLA2 基因与 CHD 的研究中发现,I198T,A379V 和 R92H 基因属于非同义突变,均可导致 Lp-PLA2 与底物亲和力的降低,与 I198T 多态性相比,R92H 和 A379V 突变与 CHD 更具有相关性,但 92H 和 379V 在 CHD 组的分布是降低的^[5]。

本研究发现 I198T 的基因型分布及等位基因频率在 CHD 组与对照组并无明显差异,而 CHD 组 R92H 的 RH、HH 基因型和 H 等位基因的频率明显高于对照组,说明 R92H 基因突变增加了 CHD 的发病风险。在将所有入组人员按照 I198T 和 R92H 基因型分别进行分组分析时发现,II 基因型组与 IT+TT

基因型的各项指标无明显统计学差异,而 RH+HH 基因型组的 TC 和 LDL-C 水平明显高于 RR 基因型组,这也表明 R92H 多态性与脂质代谢紊乱具有相关性,而脂质代谢紊乱也正是 CHD 的危险因素之一。单倍型分析表明携带 198I 和 92H 等位基因者患 CHD 的风险增高($P < 0.01, OR=2.205$),但同时携带 I198T 位点 198I 等位基因和 R92H 位点 92R 等位基因者则有较低的患 CHD 的风险($P < 0.01, OR=0.504$),可能具有一定的 CHD 保护作用。Logistic 回归分析在校正传统危险因素后表明 R92H 的等位基因 92H 是 CHD 的独立危险因素,而并未发现 I198T 与 CHD 的相关性。Hou 等^[4]对我国汉族人群研究时发现 I198T 等位基因也可使 Lp-PLA2 活性下降,但并不增加 CHD 的风险。徐敏等^[12]研究也证实了 R92H 基因多态性与 CHD 的发生发展相关,携带 92H 等位基因者 CHD 发病风险及冠脉病变程度的严重性均会增加。在对日本人口研究中,Miwa 等^[13]证实了 198T 等位基因是日本高血压患者颈动脉硬化的独立危险因素,说明 198T 等位基因与亚洲人口的动脉粥样硬化是有一定关系的,但本研究却未能证实 198T 等位基因与冠状动脉粥样硬化疾病的相关性,考虑与样本量的大小、基因种族表达的差异性以及环境因素有一定的关系。本研究结果与中国汉族人群 Lp-PLA2 基因多态性的一些研究结果基本一致,由于未对 Lp-PLA2 活性进行定量测定,未能直观阐明 I198T 和 R92H 基因突变与 Lp-PLA2 活性的关系,但从研究结果推测,在汉族人群携带 92H 等位基因者的 Lp-PLA2 活性可能是增强的,致使该酶水解氧化卵磷脂能力增强,生成更多的活性促炎介质,细胞与炎症因子相互作用促进动脉粥样硬化不断进展,导致心血管疾病的发生发展。

总之,本研究结果表明了 Lp-PLA2 基因多态性与汉族人群 CHD 的发生具有相关性,从基因水平证实了炎症在 CHD 发生发展中的作用,但 Lp-PLA2 多基因型和等位基因导致动脉粥样硬化的确切机制尚进一步的阐明。Lp-PLA2 基因多态性的测定为 CHD 的诊断及治疗提供新的思路,可极早筛选高危人群,并针对 Lp-PLA2 进行相关治疗,延缓病程进展。随着 Lp-PLA2 基因多态性研究的不断深入,Lp-PLA2 有望作为新型的治疗靶点,在 CHD 预防和治疗方面发挥不可替代的作用。

[参考文献]

[1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2012,32(9):2045-2051

- [2] Rosenson RS, Stafforini DM. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2 [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53 (9): 1767-1782
- [3] Kruse S, Mao XQ, Heinzmann A, et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(5): 1522-1530
- [4] Hou L, Chen S, Yu H, et al. Associations of PLA2G7 gene polymorphisms with plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and coronary heart disease in a Chinese Han population: the Beijing atherosclerosis study [J]. *Hum Genet*, 2009, 125(1): 11-20
- [5] Sutton BS, Crosslin DR, Shah SH, et al. Comprehensive genetic analysis of the platelet activating factor acetylhydrolase (PLA2G7) gene and cardiovascular disease in case-control and family datasets [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(9): 1318-1328
- [6] Colley KJ, Wolfert RL, Cobble ME. Lipoprotein associated phospholipase A(2): role in atherosclerosis and utility as a biomarker for cardiovascular risk [J]. *EPMA J*, 2011, 2 (1): 27-38
- [7] Corson MA, Jones PH, Davidson MH. Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101(12A): 41F-50F
- [8] Silva IT, Mello AP, Damasceno NR. Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A (2) (Lp-PLA (2)): a review [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 170
- [9] Guerra R, Zhao B, Mooser V, et al. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins [J]. *J Lipid Res*, 1997, 38(11): 2281-2288
- [10] Ninio E, Tregouet D, Carrier JL, et al. Platelet-activating factor-acetylhydrolase and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13 (13): 1341-1351
- [11] Li L, Qi L, Lv N, et al. Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 gene polymorphism and coronary artery disease in the Chinese Han population [J]. *Ann Hum Genet*, 2011, 75(5): 605-611
- [12] 徐敏, 孙建辉, 罗光华, 等. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 基因 R92H 多态性与汉族人群冠心病易感性的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(12): 965-968
- [13] Miwa Y, Kamide K, Takiuchi S, et al. Association of PLA2G7 polymorphisms with carotid atherosclerosis in hypertensive Japanese [J]. *Hypertens Res*, 2009, 32 (12): 1112-1118

[收稿日期] 2012-05-13

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1 ^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 50×80×100 cm, 或 50×80×100 cm³。

(本刊编辑: 接雅俐)