

## Periostin 基因多态性与汉族人群心力衰竭发病的初步研究

纪元,王芳芳,蒋建光,刘志平,周学军,丁志坚\*

(南京医科大学附属常州市第二人民医院心内科,江苏 常州 213000)

**[摘要]** **目的:**研究 Periostin 基因多态性与汉族人群心力衰竭发病的关系。**方法:**采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态法(PCR-RFLP)检测 Periostin 基因启动子区功能性位点(SNP C-33G)基因型。病例组选自心内科住院的心衰患者 464 例,对照组选自同期在医院健康体检或住院的正常人群 640 例。基因型及其他危险因素与心衰关系采用 Logistic 回归分析。**结果:**经过年龄、性别、血压、血糖、吸烟、高脂血症等多因素 Logistic 回归校正,Periostin 基因 rs3829365 位点的 CG 或 GG 基因型是心力衰竭的一个独立危险因素;在吸烟的心衰患者中,Periostin C-33G 的 CG 或 GG 基因型可能起到保护作用。**结论:**Periostin 基因 rs3829365 位点可能有助于心衰易感性和严重性的判断。

**[关键词]** 心力衰竭;Periostin;rs3829365;单核苷酸多态性;吸烟

**[中图分类号]** R541.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)09-1213-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140912

## Associations between Periostin gene polymorphisms and heart failure in Chinese Han population

Ji Yuan, Wang Fangfang, Jiang Jianguang, Liu Zhiping, Zhou Xuejun, Ding Zhijian\*

(Department of Cardiovascular Disease, Changzhou NO.2 People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213000, China)

**[Abstract]** **Objective:**To determine the associations between Periostin gene polymorphisms and heart failure in a Chinese population. **Methods:**In total,464 patients with heart failure and 640 control individuals were included in this study. rs3829365 was genotyped through PCR and restriction fragment length polymorphism. Multivariate logistic regression was employed to analyze the independent strength of association among clinical parameters,genotypes and heart failure. **Results:**After adjusting for age,sex, hypertension,diabetes mellitus,smoking and hypertriglyceridemia in multivariate logistic regression,we found that CG or GG of rs3829365 was an independent risk factor for heart failure and that CG or GG of rs3829365 was significantly protective factors for heart failure in patients who smoked. **Conclusion:**These findings suggest that rs3829365 of Periostin gene may be helpful to determine the susceptibility and severity of heart failure.

**[Key words]** heart failure;Periostin;rs3829365;single nucleotide polymorphism;smoking

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(09):1213-1217]

心力衰竭是严重威胁人类健康的心脏疾病,随着对该疾病分子生物学研究的深入,人们认识到心力衰竭的发生与基因的表达和调控密切相关。近年来,越来越多的研究表明,Periostin 基因是心力衰竭疾病的重要候选基因。

Periostin 蛋白最初由 1993 年日本学者 Takeshita 等从小鼠成骨细胞株中克隆成功,分子量为 90 000,由 838 个氨基酸组成,是成束蛋白 fasciclin 基因家族的成员之一,是由心脏成纤维细胞分泌表达的一种细胞外基质蛋白。研究表明 Periostin 蛋白与心肌纤维化、心肌重构、心力衰竭密切相关<sup>[1-2]</sup>。各种原因的心肌损伤激活 ANG II、TGF- $\beta$ 1、ET-1 途径使成纤维细胞大量分泌内源性 Periostin 蛋白,Periostin 蛋白通过 FAK 系统再次活化成纤维细胞,与整合蛋白

**[基金项目]** 常州市社会发展科技计划项目(CS20092018)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhjdjngcn@gmail.com

以及纤维连接蛋白、黏蛋白、胶原蛋白等联合作用引起细胞外基质异常沉积,从而出现心肌纤维化、心室重塑、心力衰竭<sup>[3-4]</sup>。

本研究选取 33C/G(rs3829365)这个功能性位点对 Periostin 基因多态性与中国汉族人群心力衰竭疾病进行关联分析。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

心衰组:选自 2009~2011 年常州市第二人民医院心内科住院的慢性心力衰竭患者,男 282 例,女 182 例,平均年龄(66.01 ± 12.73)岁。入选标准:①心功能(NYHA) II~IV 级;②有器质性心脏疾病基础;③年龄 ≥ 18 岁。排除标准:①有严重肝、肾功能不全(Cr > 2.5 mg/dl);②肿瘤及恶性病患者;③有严重的急性感染或代谢紊乱;④慢性心衰急性发作;⑤近 3 个月内有急性心肌梗死、不稳定心绞痛或冠状动脉旁路移植术、介入治疗手术史;⑥继发于明显的瓣膜性心脏病、肥厚性梗阻性心肌病者。

对照组:选自同期在医院健康体检或住院的正常人群,男 344 例,女 296 例,平均年龄(62.91 ± 13.50)岁。

两组人群均为苏皖地区汉族人,无血缘关系。详细询问每人的疾病史、家族史、个人史、吸烟饮酒史、身高、体重和血压等人群基线资料,并做好记录。本研究不限制受检者的任何治疗。所有受检者的信息资料严格保密,尊重受检者的隐私权。

AU2700 全自动生化分析仪(Olympus 公司,日本),PCR 扩增仪(Biometra@TGRADIENT 公司,美国),UVI 自动凝胶成像分析系统(Bio-Rad,Quantity one),Taq DNA 聚合酶、dNTPs、上下游引物(TaKaRa 公司,日本),限制性内切酶(New England Biolabs 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血标本采集

所有研究对象均在禁食 12 h 后,于清晨采肘静脉血 2 ml,32 g/L 柠檬酸钠抗凝,分离血浆和白细胞,-70℃保存,备用。

#### 1.2.2 基因组 DNA 的提取

采用酚-氯仿法提取白细胞基因组 DNA,加入 40 μl TE 保存(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0),-70℃保存。

#### 1.2.3 Periostin 基因 SNP 位点的选取

基因的多态性位点可以影响基因的调节和蛋白

质水平的表达,从而出现疾病易感性和严重程度的个体差异。在本研究中,位于启动子区域内的 Periostin 基因单核苷酸多态性位点(SNP C-33)因为对基因转录调控的潜在影响被选中进一步分析。欧洲学者 Forst 等<sup>[5]</sup>已证实,该功能性位点可能通过调控血管生长影响乳腺癌发生发展;根据 dbSNP 数据库提供的数据显示,证实该单核苷酸多态性在人群中存在;HapMap 项目显示,这个单核苷酸多态性为连锁不平衡;从进行的 20 个标本小样本预实验结果显示,该单核苷酸多态性在本研究的汉族人群中存在。

#### 1.2.4 Periostin 基因 SNP C-33G 目的 DNA 片段扩增

引物由大连宝生物工程有限公司合成,上游引物为 5'-CCCTCTAAGATACAAAGGAA-3',下游引物为 5'-CCTGATACGACTATGAGCC-3'。PCR 反应体系为 50 μl,包括:10×缓冲液 5 μl,Mg<sup>2+</sup> 终浓度为 2.0 mmol/L,4 种 dNTPs 终浓度为 0.2 mmol/L,上下游引物各 20 pmol,Taq DNA 酶 1.25 U(大连宝生物公司)和 DNA 模板 100 ng。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min,然后按 94℃ 60 s,58℃ 50 s,72℃ 60 s 进行 30 个循环,终末延伸 72℃ 5 min。反应结束后,取 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统观察 PCR 扩增结果。

#### 1.2.5 Periostin 基因 SNP C-33G 位点 PCR 产物通过酶切、电泳和测序鉴定基因型

取 5 μl PCR 产物用 5 U 限制性内切酶 Mbo II 37℃温育 12 h,产物经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统判断基因型。基因型分为 GG 纯合型(411 bp);GC 杂合型(411、142 和 269 bp)和 CC 纯合型(142 和 269 bp)。部分 PCR 扩增产物进一步测序鉴定。

#### 1.2.6 临床指标的测定

血脂和血糖等用日本 Olympus 全自动生化分析仪检测。

#### 1.2.7 质量控制

制定详细、规范化的操作手册和调查表,对所有参加研究的人员进行统一培训,生化指标在质控合格的实验室完成检验。选取 10%的 PCR-RFLP 试验结果,进行随机重复试验,检查证实 99%的基因分型结果前后一致。

### 1.3 统计学方法

所有资料采用 SPSS16.0 软件进行分析。计量资料比较采用 student's *t* 检验;计数资料比较、基因型频率、单倍体频率与 Hardy-Weinberg 平衡采用  $\chi^2$  检验;连锁不平衡分析采用 PHASE 2.1 程序<sup>[6]</sup>;基因型

及其他危险因素与心衰关系采用 Logistic 回归分析和 Bonferroni 多重比较校正, 结果以比值比(OR)和 95%可信区间(95%CI)来表示。

## 2 结果

### 2.1 心力衰竭组和对照组的一般临床资料比较

2009~2011 年住院诊治的慢性心力衰竭患者共 464 例。病因以冠心病、高血压、扩张性心肌病最为多见, 其中冠心病 169 例, 占 36.4%; 高血压 148

例, 占 31.9%; 扩张性心肌病 96 例, 占 20.7%。其中男 282 例, 女 182 例, 以男性为主, 占 60.7%; 平均年龄 (66.01 ± 12.73) 岁; 高甘油三酯 259 例, 占 55.8%; 吸烟 213 例, 占 45.9%; 高血压 319 例, 占 68.8%; 糖尿病 101 例, 占 21.8%; 饮酒患者 50 例, 占 32.3%。与对照组比较, 心力衰竭组有更多的老年、男性、高甘油三酯, 更多的吸烟者、高血压和糖尿病患者, 饮酒者的分布差异在两组间无统计学意义(表 1)。

表 1 两组临床指标比较

Table 1 Clinical parameters of the two study population

临床指标(n=1 104)	心力衰竭组(n=464)	对照组(n=640)	P 值	OR 值(95%CI)
年龄(岁)	66.01±12.73	62.93±13.50	<0.001	3.096(1.53~4.66)
男性[n(%)]	282(60.7)	344(53.8)	0.020	1.333(1.05~1.70)
甘油三酯(mmol/L)	2.42±1.57	1.61±1.31	<0.001	0.809(0.64~0.98)
高甘油三酯[n(%)]	259(55.8)	174(27.2)	<0.001	3.384(2.63~4.36)
吸烟[n(%)]	213(45.9)	252(39.4)	0.030	1.307(1.03~1.66)
高血压[n(%)]	319(68.8)	285(44.5)	<0.001	2.740(2.13~3.51)
糖尿病[n(%)]	101(21.8)	55(8.6)	<0.001	2.959(2.08~4.22)
饮酒[n(%)]	150(32.3)	211(33.0)	0.823	0.971(0.75~1.25)

### 2.2 遗传平衡检验

对照组基因型频率遵循 Hardy-Weinberg 平衡 (P = 0.533), 具有群体代表性。

### 2.3 Periostin C-33G 基因型分布

GG、GC、CC 心衰患者和正常人群中存在显著性差异 (P = 0.043)。心衰组 CG+GG 基因型明显高于对照组 [P = 0.015, OR = 1.43, 95%CI (1.07~1.91)]。心衰组 G 等位基因频率明显高于对照组 [P = 0.025, OR = 1.21, 95%CI(1.03~1.44), 表 2]。

### 2.4 多因素条件 Logistic 回归分析

采用多因素条件 Logistic 回归模型筛选危险因素, 将研究对象中有无心力衰竭作为应变量, 年龄、性别、高甘油三酯、吸烟状况、糖尿病、高血压的患病

状况、CG+GG 基因型、CG+GG 基因型和吸烟作为自变量进行分析, 其中含有突变基因的基因型赋值为 1 (CG+GG), 否则赋值为 0(CC); 含有 CG+GG 基因型的吸烟心衰患者赋值为 1, 否则赋值为 0。结果显示, 在调整上述影响因素后, Periostin CG+GG 基因型是心力衰竭发病的独立危险因素, OR 值为 1.88; CG+GG 基因型和吸烟是心力衰竭发病的保护因素, OR 值为 0.50(表 3)。

### 2.5 Periostin C-33G 基因型与心衰患者心衰严重程度关系

心衰患者组心功能分级: II 级 175 例, 占 37.7%; III 级 196 例, 占 42.2%; IV 级 93 例, 占 20.0% (表 4), 各组药物使用背景无差异 (P > 0.05, 表 5),

表 2 Periostin 基因型分布

Table 2 Genotype and allele analysis of Peristin in both the experiment and the control group [n(%)]

基因型(rs3829365)(n=1 104)	心力衰竭组(n=464)	对照组(n=640)	P 值	OR 值(95%CI)
基因型			0.043	
CC	92(19.8)	167(28.1)		1
CG	259(55.8)	339(53.0)		1.20(0.85~1.70)
GG	113(24.4)	134(20.9)		1.42(0.98~2.14)
CC 或 CG+GG			0.015	
CC	92(19.8)	167(28.1)		1
CG+GG	372(80.2)	473(73.9)		1.43(1.07~1.91)
C 或 G 等位基因			0.025	
C	443(47.7)	673(52.6)		1
G	485(52.3)	607(47.4)		1.21(1.03~1.44)

表3 多因素 Logistic 回归分析结果

Table 3 Multivariate Logistic analysis of multiple factors for heart failure

影响因子	Coefficient	P 值	OR	95%CI
男性	0.29	0.039	1.34	1.02~1.76
年龄(> 65 岁)	0.54	<0.001	1.72	1.31~2.26
高血压	0.87	<0.001	2.37	1.81~3.11
糖尿病	1.01	<0.001	2.77	1.88~4.08
吸烟	0.88	0.003	2.41	1.34~4.33
高甘油三酯血症	1.70	<0.001	5.46	2.89~10.33
CG 或 GG	0.63	0.015	1.88	1.13~3.13
CG 或 GG 与吸烟	-0.69	0.039	0.50	0.26~0.97

CG+GG 基因型明显存在于更严重的心衰分组中( $P < 0.001$ , 表 4)。

### 3 讨论

心力衰竭是由于各种原因的心肌损伤引起心肌结构和功能的变化,最后导致心室泵血和(或)充盈功能低下。常见病因包括冠心病、高血压、心肌病、瓣膜病等。所有形式的心力衰竭都有一个共同的致病机制:心室重塑、心腔扩大。大量研究表明 Periostin 蛋白与心肌纤维化、心肌重构、心力衰竭密切相关。各种原因的心肌损伤激活 ANG II、TGF- $\beta$ 1、ET-1 途

表4 Periostin 基因型与纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级

Table 4 Periostin polymorphisms and the NYHA classifications

基因型(rs3829365)	NYHA II (n=175)	NYHA III (n=196)	NYHA IV (n=93)	(n)
CC(n=92)	53	34	5	
CG 或 GG(n=372)	122	162	88	

表5 心力衰竭组药物使用情况

Table 5 Medication background in heart failure patients

药物	NYHA II (n=175)	NYHA III (n=196)	NYHA IV (n=93)	P 值	[n(%)]
血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)	160(91.4)	184(93.9)	84(90.3)	0.503	
$\beta$ 受体阻滞剂	146(83.4)	164(83.7)	76(81.7)	0.912	
螺内酯拮抗剂	85(48.6)	90(45.9)	41(44.1)	0.761	

径使成纤维细胞分泌大量内源性 Periostin 蛋白, Periostin 又通过 FAK 系统活化成纤维细胞,与整合蛋白  $\alpha$  V  $\beta$  1、 $\alpha$  V  $\beta$  3、 $\alpha$  V  $\beta$  5 以及纤维连接蛋白、黏蛋白 C、I 型胶原、V 型胶原等联合作用引起细胞外基质异常沉积,从而出现心肌纤维化、心室重塑<sup>[1-2]</sup>。小鼠基因转染模型证实 Periostin 是心脏扩张、心肌重构的一个新的影响因子<sup>[3]</sup>。小鼠基因敲除模型也证实 Periostin 在心肌纤维化、心肌重构中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。

在本研究中,位于启动子区域内的 Periostin 基因单核苷酸多态性位点(SNP C-33G)因为对基因转录调控的潜在影响被选中,进一步行 Periostin 基因多态性与心力衰竭疾病的关联分析。

本研究结果显示,对照组和病例组人群单核苷酸多态性皆遵循 Hardy-Weinberg 平衡。Hardy-Weinberg 不平衡提示可能存在取样错误、基因分型错误或者不真实的基因型与人群分布特点关系<sup>[7]</sup>。本研究中,对照组病例皆遵循 Hardy-Weinberg 平衡,排除了这些错误可能。

本研究结果显示,Periostin C-33G 基因型 CG+GG 心衰组明显高于对照组,G 等位基因频率心衰组明显高于对照组,提示 Periostin C-33G 基因型 G 等

位基因与心衰易感性密切相关。进一步分析发现,Periostin C-33G 基因 CG+GG 基因型在 NYHA 心功能分级高的患者中分布明显多,提示 CG+GG 基因型与心衰严重性密切相关。分析可能原因,C-33G SNP 位点的上游 38 bp 处存在一个假定的 TATA 转录因子调节盒结合位点,G 等位基因的个体差异可能导致 Periostin 蛋白表达的个体差异<sup>[8]</sup>,从而导致 Periostin 蛋白结构和功能的个体差异<sup>[9-10]</sup>。

本研究结果显示,Periostin C-33G 基因型 CG+GG 与吸烟的交互因素可能是心衰的一个保护因子。就是说,尽管 Periostin C-33G 基因型 CG+GG 和吸烟单独都是心衰的危险因素,但是在吸烟人群中,Periostin C-33G 基因型 CG+GG 可能是心衰的一个保护因素。同样,Fonarow 等<sup>[11]</sup>的最近研究显示,吸烟可能是心衰疾病发病的一个保护因素。Yilmaz 等<sup>[12]</sup>的研究证实,吸烟可以降低血浆中非对称性二甲基精氨酸(ADMA)水平,ADMA 是一种强有效的血管内皮一氧化氮合酶抑制因子,可以导致血管收缩和内皮重构;而且研究提示,吸烟人群似乎有着更低的心肌缺血事件<sup>[12-13]</sup>。另一些研究也发现,在冠状动脉血管再成形术中,吸烟者较非吸烟者有更好的心肌再

灌注表现<sup>[4]</sup>。本研究结果显示,在吸烟人群中,Periostin C-33G 基因型 CG+GG 可能是心衰的一个保护因素,原因可能是,Periostin 基因与血浆 ADMA 水平的调节相关。当然,具体机制仍需进一步研究证实。

目前,Meta 分析研究结果显示,Periostin 基因可能是血压的一个上调因子<sup>[15]</sup>。然而,在本研究中,Periostin 基因(SNP C-33)位点,无论在心衰组的高血压人群还是在对照组的高血压人群中,基因型分布无显著性差异。Periostin 基因(SNP C-33)位点未见与高血压相关。可能原因是目前的 Meta 分析研究结果主要建立在小鼠模型研究上<sup>[15]</sup>,而且本研究仅涉及(SNP C-33G)一个位点,Periostin 基因其他多态性位点是否与高血压相关,不得而知。

本研究显示,Periostin 基因 SNP C-33G(rs3829365)位点有助于心衰易感性和严重性的判断。POSTN C-33G 基因型 CG+GG 与吸烟的交互因素,可能具有同样的作用,但需要进一步研究证实和更深入的分子机制研究。

#### [参考文献]

- [1] Oka T, Xu J, Kaiser RA, et al. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling [J]. *Circ Res*, 2007, 101(3): 313-321
- [2] Butcher JT, Norris RA, Hoffman S, et al. Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase [J]. *Dev Biol*, 2007, 302(1): 256-266
- [3] Katsuragi N, Morishita R, Nakamura N, et al. Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation [J]. *Circulation* 2004, 110(13): 1806-1813
- [4] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Novel mechanisms of valsartan on the treatment of acute myocardial infarction through inhibition of the antiadhesion molecule periostin [J]. *Hypertension*, 2007, 49(6): 1409-1414
- [5] Forsti A, Jin Q, Altieri A, et al. Polymorphisms in the KDR and POSTN genes: association with breast cancer susceptibility and prognosis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 101(1): 83-93
- [6] Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 73(8): 1162-1169
- [7] Levecque C, Elbaz A, Clavel J, et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study [J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(1): 79-86
- [8] Nejentsev S, Laaksonen M, Tienari PJ, et al. Intercellular adhesion molecule-1 K469E polymorphism: study of association with multiple sclerosis [J]. *Hum Immunol*, 2003, 64(3): 345-349
- [9] Rizzello V, Liuzzo G, Trabetti E, et al. Role of the CD14 C (-260)T promoter polymorphism in determining the first clinical manifestation of coronary artery disease [J]. *J Cardiovasc Med*, 2010, 11(2): 20-25
- [10] Lombardi F, Belletti S, Battezzati PM, et al. MMP-1 and MMP-3 polymorphism and arrhythmia recurrence after electrical cardioversion in patients with persistent atrial fibrillation [J]. *J Cardiovasc Med*, 2011, 12(1): 37-42
- [11] Fonarow GC, Abraham WT, Albert NM, et al. A smoker's paradox in patients hospitalized for heart failure: findings from OPTIMIZE-HF [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(16): 1983-1991
- [12] Yilmaz MB, Yontar OC. Smoker's paradox in heart failure: might asymmetric dimethylarginine be the possible explanation? [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(23): 2948-2949
- [13] Onat A, Hergenc G. Reduced asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels mediate in the protection from metabolic syndrome by smoking [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196(1): 479-480
- [14] Albertal M, Cura F, Escudero AG, et al. Mechanism involved in the paradoxical effects of active smoking following primary angioplasty: a subanalysis of the protection of distal embolization in high-risk patients with acute myocardial infarction trial [J]. *J Cardiovasc Med*, 2008, 9(8): 810-812
- [15] Conway SJ, Molkentin JD. Periostin as a heterofunctional regulator of cardiac development and disease [J]. *Curr Genomics*, 2008, 9(8): 548-555

[收稿日期] 2013-07-27