

## 长链非编码 RNA H19 基因多态性与早发冠心病患者易感性研究

朱 萌,高 伟,赵 珊,王 昊,王 芳,王连生\*

(南京医科大学第一附属医院心内科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨编码一段长链非编码 RNA 的 H19 基因多态性与早发冠心病(pCAD)患者易感性的相关关系。方法:采用 TaqMan 技术分析 213 例早发冠心病患者和 776 例对照的 H19 基因 4 个多态位点(rs2067051、rs2251375、rs217727、rs4929984)的基因型,用 SPSS 软件进行统计学分析。结果:早发冠心病组 H19 基因 rs217727 位点的 CT 基因型、TT 基因型及 T 等位基因分布频率均高于对照组。多元 Logistic 回归分析显示:rs217727 多态性与早发冠心病发病独立相关( $P < 0.01$ )。T 等位基因携带者、TT 纯合基因患早发冠心病的风险分别是 CC 纯合基因型的 2.42 倍( $OR=2.42, 95\%CI=1.55\sim 3.71$ )和 3.01 倍( $OR=3.01, 95\%CI=1.87\sim 4.85$ )。结论:H19 rs217727 多态性与早发冠心病易感性有关,T 等位基因可能是早发冠心病的遗传易感因素。

**[关键词]** 早发冠心病;长链非编码基因;基因型;多态性;遗传学

**[中图分类号]** R541.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-670-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150514

## Association between polymorphisms of long non-coding RNA H19 and susceptibility to premature coronary artery disease

Zhu Meng, Gao Wei, Zhao Shan, Wang Hao, Wang Fang, Wang Liansheng\*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the association between polymorphisms in H19 gene, which transcribes a long non-coding RNA, and susceptibility to premature coronary artery disease (pCAD). **Methods:** Four polymorphisms (rs2067051, rs2251375, rs217727, rs4929984) of H19 gene were analyzed in 213 pCAD patients and 776 control subjects. Polymorphisms were genotyped by TaqMan technology. The statistical analysis was implemented in SPSS. **Results:** The frequencies of genotype CT, TT and allele T in pCAD group of rs217727 were higher than that in the control group. Multivariate logistic regression analysis showed that the rs217727 polymorphism of H19 gene was independently associated with the occurrence of pCAD ( $P < 0.01$ ). The risk of patients with T allele and TT homozygous genotype was 2.42 times ( $OR=2.42, 95\%CI=1.56\sim 3.71$ ) and 3.01 times ( $OR=3.01, 95\%CI=1.87\sim 4.85$ ) than that of patients with CC homozygous genotype. **Conclusion:** H19 gene rs217727 polymorphism is associated with the susceptibility of pCAD, and T allele may be a genetic susceptibility factor of pCAD.

**[Key words]** premature coronary artery disease; long noncoding RNA; genotype; polymorphism; genetics

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05):670-673]

冠心病是一种常见的心血管疾病,并且在中国发病率呈现上升趋势。冠心病的发病年龄男<55岁、女<65岁为早发冠心病,是冠心病的一种特殊形式<sup>[1]</sup>。研究示冠心病是由遗传因素和环境因素共

同作用的多基因遗传疾病,而早发冠心病的遗传背景要比普通冠心病强<sup>[2]</sup>。

基因印迹又称基因组印迹或配子印迹,表现为基因呈亲缘依赖性单等位基因表达,其另一等位基因不表达或表达极弱。第一个被鉴定的印迹基因是胰岛素样生长因子 2 受体 (insulin-like growth factor 2 receptor, IGF2R) 基因,随后是胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 及 H19 基因。H19 基因隶属于 H19/IGF2 基因印迹群,位于人染

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81270255);江苏省自然科学基金面上项目(BK2012880);江苏省高校“青蓝工程”创新团队课题(苏教师[2012]39)资助

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

染色体 11P15.5, 编码一段长 2.3 kb 的长链非编码 RNA, 在进化上具有高度保守性<sup>[3]</sup>。H19 基因高丰度表达于胚胎发育中期, 出生后 H19 的表达降低, 仅在心肌及骨骼肌中有一定的表达<sup>[4]</sup>。研究表明, H19 在成人的动脉粥样硬化斑块表达升高<sup>[5]</sup>, 并且 H19 的基因多态性被证明与多种冠心病危险因素相关, 如肥胖、出生体重、高血压<sup>[6-8]</sup>。迄今为止, 仍没有 H19 基因与冠心病特别是早发冠心病关系的相关报道。为此, 本研究旨在研究东南地区汉族人群 H19 基因 rs2067051、rs2251375、rs217727、rs4929984 位点多态性分布的特点及其与早发冠心病的相关性。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

研究对象共 213 例, 均来自南京医科大学第一附属医院心内科冠脉造影阳性患者(至少 1 支冠状动脉直径狭窄>50%), 其中男 149 例, 年龄均<55 岁, 女 64 例, 年龄均<65 岁。对照组共 776 例均为同时期门诊常规体检者, 性别匹配, 经相关检查除外冠心病。本研究获得了所有参与者的知情同意。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因分型

采血前禁食 12 h, 于清晨 8 时空腹坐位抽取左肘前静脉血 6 mL, 其中 3 mL 血液用 EDTA 抗凝管收集, 用于提取 DNA。DNA 提取采用 Wizard® 基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega 公司, 美国), 操作严格按照说明书步骤要求, 在本院心研所内完成。DNA 提取后-70℃保存备用。

选择 4 个最小等位基因频率 (minimum minor allele frequency, MAF) 在中国和日本人中高于 0.05 并且与冠心病危险因素相关的 SNP: rs2067051、rs2251375、rs217727、rs4929984<sup>[7-8]</sup>。针对每个 SNP 位点所设计的 2 条探针分别用 VIC 和 FAM 进行荧光标记(美国 ABI 公司合成)。PCR 反应体系为 5 μL, 使用 TaqMan SNP Genotyping 试剂盒, 反应条件: 经过 95℃预变性 10 min, 然后按 92℃ 15 s, 60℃ 1 min 进行 40 个循环。反应结束后, 在 ABI 7900 型 PCR 扩增仪上使用 SDS 软件对指定基因位点进行分型。

#### 1.2.2 生化检测

受试者均隔夜禁食 10~12 h, 次日清晨空腹抽取外周静脉血, 测定空腹血糖、血脂等。上述生化指标的测定结果均由本院检验科提供。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计处理。运用 Hardy-Weinberg (H-W) 平衡检验确认研究样本的群体代表性, 运用基因计数法计算各组基因频率及等位基因频率。2 组均数比较用 *t* 检验, 计数资料用  $\chi^2$  检验, 并应用 Pearson 相关分析和 Logistic 回归分析。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

早发冠心病组与对照组的年龄、性别差异没有统计学意义。冠心病组的体质指数(BMI)明显高于对照组( $P < 0.01$ ), 有吸烟史和高血压、糖尿病、高脂血症者明显多于对照组( $P < 0.01$ )。早发冠心病组的收缩压、空腹血糖、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)均明显高于对照组, 而高密度脂蛋白(HDL-C)明显低于对照组( $P < 0.01$ , 表 1)。

表 1 两组一般临床资料比较

Table 1 Clinical parameters of the two study population ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	早发冠心病组(n=213)	对照组(n=776)	P 值
年龄(岁)	52.6 ± 7.0	53.4 ± 7.2	0.053
性别(男, %)	149(70.0)	573(73.8)	0.259
吸烟 [n(%)]	111(52.1)	264(34.0)	< 0.001
高血压 [n(%)]	132(62.0)	315(40.6)	< 0.001
糖尿病 [n(%)]	42(19.7)	81(10.4)	0.001
高脂血症 [n(%)]	71(33.3)	142(18.3)	< 0.001
收缩压(mmHg)	132 ± 21	126 ± 18	< 0.001
舒张压(mmHg)	81 ± 11	79 ± 11	0.023
体重(kg)	71.5 ± 11.4	68.9 ± 11.3	0.003
BMI	26.0 ± 4.5	24.5 ± 3.3	< 0.001
TC(mmol/L)	4.40 ± 1.06	4.40 ± 1.27	0.948
TG(mmol/L)	2.10 ± 1.96	1.51 ± 0.90	< 0.001
HDL-C(mmol/L)	1.03 ± 0.27	1.24 ± 0.32	< 0.001
LDL-C(mmol/L)	2.72 ± 1.00	2.42 ± 0.78	< 0.001
空腹血糖(mmol/L)	5.58 ± 1.44	5.21 ± 1.12	< 0.001

### 2.2 两组 rs2067051、rs2251375、rs217727、rs4929984 多态性比较

经过 Pearson 检验, 早发冠心病组和对照组均达到 Hardy-Weinberg 平衡( $P > 0.05$ )。rs2067051 的 GG 型、GA 型、AA 型和 rs2251375 的 CC 型、AC 型、AA 型基因型频率在早发冠心病组与对照组均无显著差异。在 rs217727 位点, 早发冠心病组的 CT 基因型、TT 基因型和 T 等位基因频率高于对照组( $P < 0.01$ , 表 2), 差异具有统计学意义, 而 rs4929984 位点的 AA 型、AC 型和 CC 型频率暂未发现这种现象。

### 2.3 H19 基因型与早发冠心病的关系

rs217727 基因型频率的相对风险分析显示 TT 型纯合子患冠心病风险是 CC 型纯合子的 2.59 倍 (OR=2.59,95%CI: 1.65~5.06), 且经 Logistic 回归分析校正性别、年龄、BMI、吸烟史、高血压、糖尿病病史、血清总胆固醇(TC)、TG、HDL-C、LDL-C、空腹血糖水平等相关因素之后, 差异仍具有统计学意义(OR =3.01, 95%CI: 1.87~4.85)。T 等位基因携带者(CT + TT)患冠心病的风险较 CC 型纯合子也有明显升高 (OR = 2.17, 95%CI: 1.45~3.25)。经过 Logistic 回归分析校正性别、BMI、吸烟史、高血压、糖尿病病史、收缩压、舒张压、空腹血糖、血脂各项指标的影响后, 该差异仍具有统计学意义(OR = 2.42, 95% CI: 1.58~3.71)。而 H19 其余位点基因型和等位基因在冠心病组和对照组间的分布

趋势相同, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表 2)。

2.4 rs217727 基因型与收缩压的关系

rs217727 多态性不同基因亚组的收缩压水平有统计学意义( $P < 0.05$ , 表 3), TT 组及 TC 组的收缩压水平明显高于 CC 组, TT 组水平最高。其余冠心病危险因素未发现有明显统计学意义的指标。

3 讨论

长链非编码 RNA(lncRNA)是一类转录本长度超过 200 nt(核苷酸单位)的功能性 RNA 分子, 它们不参与或很少参与蛋白质编码。虽然大部分 lncRNAs 不单独表现已知的 RNA 特性, 但是它们的转录物不可能是转录“噪音”, 因为已经揭示出了

表 2 早发冠心病组与对照组 H19 基因多态性位点基因型、等位基因频率及与早发冠心病发病风险的关系

Table 2 Genotype and allele frequencies of the H19 polymorphisms among the cases and controls and their associations with risk of premature CAD [n(%)]

基因型	早发冠心病组(n=213)	对照组(n=776)	调整 OR 值(95%CI)	未调整 P 值	调整后 P 值
rs2067051					
GG	64(30.0)	230(29.6)	1.00	0.785	0.338
GA	112(52.6)	395(50.9)	1.09(0.71~1.67)	0.916	0.681
AA	37(17.4)	151(19.5)	0.74(0.56~1.39)	0.583	0.293
G 等位基因	240(56.3)	855(55.1)		0.640	
A 等位基因	186(43.7)	697(44.9)			
rs2251375					
CC	72(33.8)	267(34.4)	1.00	0.578	0.713
CA	98(46.0)	376(48.5)	0.95(0.62~1.45)	0.845	0.804
AA	43(20.2)	133(17.1)	1.17(0.69~2.00)	0.410	0.557
C 等位基因	242(56.8)	910(58.6)		0.502	
A 等位基因	184(43.2)	642(41.4)			
rs217727					
CC	68(31.9)	332(42.8)	1.00	<0.001	<0.001
CT	101(47.4)	361(46.5)	1.48(1.03~2.11)	0.074	0.032
TT	44(20.7)	83(10.7)	3.01(1.87~4.85)	<0.001	<0.001
C 等位基因	237(55.6)	1025(66.0)		<0.001	
T 等位基因	189(44.4)	527(34.0)			
rs4929984					
AA	64(30.0)	223(28.7)	1.00	0.092	0.412
AC	93(43.7)	396(51.0)	0.81(0.52~1.27)	0.272	0.366
CC	56(26.3)	157(20.2)	1.10(0.66~1.82)	0.302	0.721
A 等位基因	221(51.9)	842(54.2)		0.386	
C 等位基因	205(48.1)	710(45.8)			

表 3 rs217727 多态性不同基因型与血压的关系

Table 3 Association of rs217727 and blood pressure

基因型	高血压[n(%)]	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
CC	127(42)	123 ± 20	76 ± 11
CT	462(42)	127 ± 17	70 ± 10
TT	400(50)	130 ± 20	80 ± 11
P 值	0.031	0.002	0.003

相当一部分 lncRNAs 位于亚细胞内, 进行细胞特异性表达, 并且与人类疾病有关<sup>[9]</sup>。近年来还发现一些 lncRNAs, 如与心肌梗死相关的 lncRNA(MIAT)、INK4 基因座中反义非编码 RNA(ANRIL)与冠心病发病相关<sup>[10-11]</sup>。LncRNA H19 在胚胎期有丰富的表达, 在出生后表达下调<sup>[3]</sup>。在人类动脉粥样硬化斑

块和动脉损伤大鼠模型中,H19 重新表达<sup>[5,12]</sup>。同型半胱氨酸血症,作为冠心病的独立危险因素,可提高 H19 在主动脉血管平滑肌细胞(VSMC)的表达,这表明上调的 H19 可能参与冠心病的进展<sup>[12-13]</sup>。此外,基因研究还发现,H19 基因多态性与冠心病危险因素相关,包括肥胖、出生体重和血压<sup>[6-8]</sup>。到目前为止,已经有证据显示 lncRNAs 多态性可以影响动脉粥样硬化斑块的形成,并且成为冠心病的易感因素<sup>[10]</sup>。在本项病例对照研究中,首次发现 H19 基因多态性(rs217727)可能与冠心病易感性相关。

本研究结果显示对照组和早发冠心病组人群单核苷酸多态性皆遵循 Hardy-Weinberge 平衡,早发冠心病组 rs217727 的 CT 基因型、TT 基因型和 T 等位基因频率高于对照组( $P < 0.01$ ),差异具有统计学意义。经 Logistic 回归分析校正性别、年龄、BMI、吸烟史、高血压、糖尿病病史、血清 TC、HDL-C、LDL-C、空腹血糖水平等相关因素之后,TT 型纯合子患冠心病的风险是 CC 型纯合子的 3.01 倍,T 等位基因携带者(CT + TT)患早发冠心病的风险较 CC 型纯合子也有明显升高。进一步分析发现,rs217727 多态性与患者血压水平相关,CT 及 TT 基因型血压水平均高于 CC 型。这与 Tragante 等<sup>[8]</sup>的统计相符,这可能是该位点多态性与早发冠心病风险相关的机制。并且,Petry 等<sup>[14]</sup>报道了 rs217727 的 T 等位基因可能与脐带血的 IGF-2 的增高有关。鉴于 H19 基因在 IGF-2 基因附近,而 IGF-2 因子参与冠状动脉粥样硬化损伤<sup>[15]</sup>,本文推测 H19 基因编码的 lncRNA 可能通过正向或负向调控 IGF-2 水平,从而增加早发冠心病的易感性。

本研究第一次将长链非编码 RNA H19 与早发冠心病相关联,在中国人群中,早发冠心病的发病风险与 H19 基因多态性相关,rs217727 T 等位基因携带者患早发冠心病的风险升高。这可能会提供新的冠心病的早期干预遗传标记,相关机制也有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Tonstad S, Westheim A. Implementation of guidelines to screen relatives of patients with premature coronary heart disease in a hospital setting[J]. *Am J Cardiol*, 2002, 90(11): 1211-1214

[2] Nasir K, Budoff MJ, Wong ND, et al. Family history of premature coronary heart disease and coronary artery calcification: Multi ethnic study of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2007, 116(6): 619-626

[3] Gabory A, Ripoche MA, Yoshimizu T, et al. The H19 gene: regulation and function of a non-coding RNA [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2006, 113(1-4): 188-193

[4] Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development [J]. *Bioessays*, 2010, 32(6): 473-480

[5] Kim DK, Zhang L, Dzau VJ, et al. H19, a developmentally regulated gene, is reexpressed in rat vascular smooth muscle cells after injury [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(1): 355-360

[6] Hernandez-Valero M, Rother J, Gorlov I, et al. Interplay between polymorphisms and methylation in the H19/IGF2 gene region may contribute to obesity in Mexican-American children [J]. *J Develop Origin Health Dis*, 2013, 4(06): 499-506

[7] Adkins R, Somes G, Morrison J, et al. Association of birth weight with polymorphisms in the IGF2, H19, and IGF2R genes [J]. *Pediatr Res*, 2010, 68(5): 429-434

[8] Tragante V, Barnes M, Ganesh S, et al. Gene-centric meta-analysis in 87,736 individuals of European ancestry identifies multiple blood-pressure-related loci [J]. *Am J Human Genet*, 2014, 94(3): 349-360

[9] Jeremy EW, Hongjae S, David LS. Long noncoding rnas: Functional surprises from the rna world [J]. *Gene Development*, 2009, 23(13): 1494-1504

[10] Holdt LM, Beutner F, Scholz M, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(3): 620-627

[11] Nobuaki I, Kouichi O, Hiroshi S, et al. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction [J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(12): 1087-1099

[12] Li L, Xie J, Zhang M, et al. Homocysteine harasses the imprinting expression of IGF2 and H19 by demethylation of differentially methylated region between IGF2/H19 genes [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009, 41(6): 464-471

[13] Devlin A, Bottiglieri T, Domann F, et al. Tissue-specific changes in H19 methylation and expression in mice with hyperhomocysteinemia [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25506-25511

[14] Petry C, Ong K, Barratt B, et al. Common polymorphism in H19 associated with birthweight and cord blood IGF-II levels in humans [J]. *BMC Genetics*, 2005, 6(5): 22

[15] Bergman D, Halje M, Nordin M, et al. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review [J]. *Gerontology*, 2013, 59(3): 240-249