

· 预防医学研究 ·

中国人群冠心病相关基因的精细定位研究

蒋 祝, 孙 洁, 蒋 涛, 朱 猛, 李志华, 程 越, 陈梦茜¹, 戴俊程, 沈 冲, 胡志斌*

南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWASs)已发现了多个冠心病(coronary heart disease, CHD)易感区域。然而,这些易感区域内的致病基因和真正致病位点尚不清楚。本研究旨在通过对报道的易感区域进行靶向测序来鉴定CHD相关基因和变异。**方法:**基于GWAS Catalog数据库筛选满足GWAS显著水平的CHD易感位点,经过多个数据库评估和基因功能检索,系统筛选了19个CHD易感区域内的关键基因。针对上述易感基因,在192例中国人群冠心病患者和192例健康对照中进行捕获测序。通过Logistic回归和计数法评估常见、罕见变异与CHD发生之间的关联。对于鉴定的CHD相关变异,采用功能注释和表达数量性状(eQTL)分析来评估其潜在的生物学功能。**结果:**5个常见变异关联 P 值 <0.05 ,功能注释表明其中rs12970与心血管组织中APOA1表达增加显著相关。鉴定了3个功能性罕见变异:WDR35 rs139543775、KLHDC10 rs60941031、CTSH rs3129。**结论:**通过在GWAS报道的区域中进行精细定位研究,为CHD遗传研究提供了新线索,但是仍需进一步大样本研究和功能实验来验证。

[关键词] 冠心病;易感位点;靶向测序;中国人群**[中图分类号]** R541.4**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)05-756-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190528

Fine mapping of coronary heart disease associated genes in Chinese population

Jiang Zhu, Sun Jie, Jiang Tao, Zhu Meng, Li Zhihua, Cheng Yue, Chen Mengxi, Dai Juncheng, Shen Chong, Hu Zhibin*

Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** Genome-wide association studies (GWASs) have identified several coronary heart disease (CHD) susceptibility loci. However, the pathogenic genes and real causal variants in these susceptible regions remain undetected. This study aims to identify CHD associated genes and variants through performing targeted sequencing in susceptible regions reported. **Methods:** We screened SNVs that were significantly associated with CHD risk base on GWAS Catalog, than selected 19 important genes in CHD susceptible regions by evaluating in databases and retrieving the gene function systematically. Targeted exon sequencing of 19 CHD susceptibility genes was performed within 192 Chinese CHD cases and 192 controls. Association between common/rare variants and CHD risk was evaluated by logistic regression and counting method. Further, for our identified novel CHD-related variants, functional annotation and expression Quantitative Trait Loci (eQTL) analysis were adopted to assess their potential biological functions. **Results:** There were 5 common variants with $P < 0.05$, and the eQTL analysis indicated that rs12970 was significantly associated with the increased expression of APOA1 in cardiovascular tissues. Moreover, we identified 3 rare functional variants: WDR35 rs139543775, KLHDC10 rs60941031, CTSH rs3129. **Conclusion:** This study provides deeper insight into the CHD genetic research by conducting fine mapping in GWAS reported regions. Further validation studies and functional experiments are needed to validate our findings.

[Key words] coronary heart disease; susceptibility loci; targeted sequencing; Chinese population

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05):756-761]

[基金项目] 国家自然科学基金重大项目(81390543);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A067);江苏高校优势学科建设工程资助项目

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

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病,简称为冠心病。《中国心血管病报告2017》指出,我国心血管疾病是导致死亡的主要原因之一,目前中国有超过1 000万名CHD患者,且CHD死亡率在世界范围内仍呈上升趋势^[1]。目前研究认为CHD是遗传因素和环境因素共同作用导致的复杂疾病^[2],其中有40%~50%的发病归因于遗传因素^[3]。

全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)已经鉴定出中国人群CHD的一些易感位点,然而GWAS发现的易感位点往往仅是标签性的遗传变异,而非真正的致病位点^[4]。此外, GWAS通常发现的是常见变异(minor allele frequency, MAF > 5%),且大部分位于基因非编码区或荒漠区,遗传效应相对较弱^[5]。近年来,Zanoni等^[6]通过对脂质调节基因编码区进行捕获测序,发现SCARB1中罕见变异(p.Pro376Leu)携带者的高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平显著增加,从而导致CHD发病风险增加。Timpson等^[7]通过全基因组测序发现APOC3中的罕见变异rs138326449与血浆甘油三酯(plasma triglyceride, TG)水平相关。这些研究提示CHD的遗传易感位点包括全基因组范围内的常见、罕见风险遗传变异,在疾病相关的目标风险区域内进行深度测序有助于鉴定CHD的罕见致病变异^[8-10]。因此, GWAS确定的CHD易感性区域需要进一步精确定位以确定新的罕见功能性变异位点。

本研究对中国汉族人群CHD易感位点相关区域进行靶向高通量测序,并进行了统计分析和功能注释,以寻找CHD的致病基因和致病位点。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究采用病例对照研究设计,所有研究对象的招募都经过南京医科大学的伦理委员会同意并签署了书面知情同意书。研究共包括192例CHD病例和192例正常对照。其中192例CHD病例来自于2009—2014年期间宜兴市人民医院收治的CHD新发病例。病例入选标准包括明确诊断的心肌梗死、至少1支冠状动脉主支狭窄>70%或左冠状动脉狭窄>50%,并且无脑卒中、慢性肾病、高血压性心脏病、风湿性心脏病以及急性或慢性心衰病史。同

期从本实验室已建立的常州队列^[11]中随机选取192例健康对照。本研究纳入对照与病例根据年龄(± 1 岁)、性别频数匹配(表1),对照无CHD、脑卒中、慢性肾病、高血压性心脏病、风湿性心脏病以及急性或慢性心衰病史。

1.2 方法

1.2.1 筛选目标基因/区域

首先,通过GWAS Catalog(<http://www.ebi.ac.uk/gwas/>)检索已报道的CHD发病相关易感位点(截止2016年11月),选择 P 值 $< 1 \times 10^{-8}$ 并且在多个人群研究中得到验证的单核苷酸位点变异(single nucleotide variant, SNV),总共36个SNV满足标准。应用GTEx数据库(<http://www.gtexportal.org/>)、Pritchard Lab eQTL Browser(<http://eqtl.uchicago.edu/cgi-bin/gbrowse/eqtl/>)和Genevar 3.3.0(<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar>)评估这些SNV基因型和基因表达水平之间的关联,确定这些SNV所在的基因以及存在表达数量性状(expression Quantitative Trait Loci, eQTL)关联的基因,最终得到65个CHD潜在相关基因。随后在GeneCards(<http://www.genecards.org>)和OMIM(<http://www.omim.org>)检索这65个基因的潜在功能,综合以上结果,选择其中已证实与CHD发病相关或潜在功能相关的基因,以及有强eQTL证据支持的基因作为CHD易感基因,得到19个基因:TCF21、MTAP、PDGFD、WDR35、ADAMTS7、APOA1、APOC3、APOA4、APOA5、UBE2Z、LIPA、MYL2、ERG、TAGLN、SKIV2L、KLHDC10、USMG5、CTSH、ATP5G1。针对19个基因的181个外显子区域(hg19)进行捕获测序。

1.2.2 Access Array 系统靶向捕获、高通量测序和质量控制

使用Primer 3软件设计486对靶向特异性引物,覆盖19个基因的所有181个编码外显子区域。采用Access ArrayTM System靶向捕获系统制备文库,每个样本得到1个由特定标签序列标记的DNA样本文库,随后在Illumina HiSeq1500测序平台完成测序。测序数据应用Burrows-Wheeler Aligner(BWA)将序列比对到人参考基因组(hg19)^[12]。然后使用Picard Tools程序(<http://picard.sourceforge.net/>)去除重复序列(duplication reads),并使用Genome Analysis Toolkit(GATK, V.1.0.5974)进行碱基质量值修正^[13],平均读取深度为126 \times 。最后用FreeBayes(V.0.9.21)进行变异识别,得到SNV和INDEL(插入、缺失变异)。

测序数据从研究对象和遗传变异两个方面进行质量控制。研究对象的质量控制:剔除超过1/3的区域测序深度 $< 20\times$ 的样本,共剔除12例CHD病例和2例对照。遗传变异的质量控制标准:①基因型分型成功率 $\geq 90\%$,排除153个变异;②对照中哈迪温伯格平衡(HWE)检验的 P 值 $\geq 1\times 10^{-3}$,排除41个变异。最终,纳入统计分析的为180例CHD病例和190例对照的407个变异。最后用 SnpEff(V.4.1)软件对遗传变异进行注释。并使用 Integrated Genome Viewer(IGV 2.3.80)和 Sanger 测序验证潜在功能变异的准确性。

1.2.3 生物信息学分析

使用 HaploReg v4.1 (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), UCSC (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)数据库资源来获得各变异位点的组蛋白修饰和 DNase 超敏感位点等信息从而评价它们的功能。使用 CADD(<http://cadd.gs.washington.edu/>)和 Regulome DB(<http://www.regulomedb.org/>)对遗传变异进行注释评分分别评估 SNV 的有害性以及影响转录因子结合的可能性^[14-15]。本研究选择功能注释 CADD 评分 > 20 以及 Regulome DB 评分为 1~3 的位点作为具有功能效应的变异。

1.3 统计学方法

使用 t 检验和卡方检验评估病例和对照的一般人口学特征。采用 PLINK 1.90 检验对照组的基因型分布是否符合 HWE 平衡。使用 Logistic 回归模型计算常见变异与 CHD 风险之间的关联 P 值、关联强度优势比(OR)及其 95% 置信区间(CI),并调整年龄、性别、吸烟和饮酒状态。此外,应用计数法来鉴定与 CHD 关联性强的罕见变异,对变异数量进行计数并选择以下突变作为有潜在功能的变异:①在病例/对照一方有纯合突变,另一方无纯合突变;②在病例/对照一方有 ≥ 3 个杂合突变,另一方无突变。采用序列核关联性检验(sequence kernel association test, SKAT)^[16]进行以基因为单位的关联分析,并调整年龄、性别、吸烟和饮酒状态。所有数据分析采用 R 软件(V.3.4.3)进行。

2 结果

2.1 研究对象的一般特征

本研究共纳入了 192 例 CHD 病例和 192 例对照。病例组和对照组的一般人口学特征、吸烟饮酒情况的分布特征如表 1 所示。病例和对照年龄构成均衡可比,性别、吸烟和饮酒状态无显著性差异

($P > 0.05$)。

表 1 研究对象特征

变量	病例组($n=192$)	对照组($n=192$)	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	61.72 \pm 10.98	61.81 \pm 11.39	0.943
<60岁 [$n(\%)$]	76(39.6)	96(50.0)	0.051
≥ 60 岁 [$n(\%)$]	116(60.4)	96(50.0)	
性别 [$n(\%)$]			1.000
男	144(75.0)	144(75.0)	
女	48(25.0)	48(25.0)	
吸烟 [$n(\%)$]			0.469
是	85(44.3)	77(40.1)	
否	107(55.7)	115(59.9)	
饮酒 [$n(\%)$]			0.577
是	33(17.2)	28(14.6)	
否	159(82.8)	164(85.4)	

年龄比较使用 Welch's t 检验;其余使用双侧卡方检验。

2.2 测序数据分析与筛选

高通量测序得到的原始文件包含 620 个变异,在针对研究对象和遗传变异的质量控制过程之后,总共在 180 个病例和 190 个对照中鉴定出 407 个高质量变异位点,包括 86 个常见变异(MAF $> 5\%$)和 321 个罕见变异(MAF $\leq 5\%$),用于随后的关联分析。

2.3 常见变异与 CHD 风险的关联

在 86 个常见变异中,通过 Logistic 回归分析发现 5 个位点与 CHD 风险关联 P 值 < 0.05 : TCF21 rs3734280、APOA4 rs5103、TAGLN rs12970、ADAMTS7 rs2277548、ATP5G1 rs66985080(表 2)。通过 Regulome DB 和 CADD 对这 5 个位点进行功能预测发现,rs12970 是人类基因组中前 1% 最有害的突变(C 评分 > 20)。进一步运用 GTE_x 数据库进行 eQTL 分析,结果表明 rs12970 的 A 等位基因与心脏-左心室组织中 APOA1 的表达增加有关($G > A$, $\beta = 0.66$, $P = 3.1\times 10^{-5}$,表 2)。

2.4 罕见变异与 CHD 风险的关联

计数法分析发现 15 个 CHD 风险关联位点:①在病例/对照一方有纯合子,而另一方无纯合子的突变位点 10 个;②在病例/对照一方至少有 3 个杂合子,而在另一方不存在的突变位点 5 个。其中 rs2075291 已有研究发现与中国人血浆 TG 水平升高显著相关^[17]。系统功能注释发现 WDR35 rs139543775 位点 CADD 评分 > 20 ,2 个位点 KLHDC10 rs60941031、CTSH rs3129 的 Regulome DB 预测评分为 1~3(表 3)。错义突变 rs139543775 导致

表2 关联分析鉴定的常见SNV

Table 2 Common SNVs identified by association analysis

基因	SNP	1KG ASN MAF ¹	MAF		OR(95%CI) ²	P值 ²	Regulome DB分值 ³	CADD C评分 ⁴	GTEx eQTL P值 ⁵
			病例	对照					
TCF21	rs3734280(A>G)	0.03	0.09(1/32/147)	0.05(0/19/171)	2.04(1.12~3.71)	0.020	—	2.786	—
APOA4	rs5103(A>G)	0.06	0.04(2/9/169)	0.08(2/28/160)	0.44(0.23~0.83)	0.012	5	0.262	—
TAGLN	rs12970(G>A)*	0.10	0.1(2/31/147)	0.15(5/47/138)	0.61(0.39~0.96)	0.033	—	21.8	3.1×10 ⁻⁵
ADAMTS7	rs2277548(C>T)	0.39	0.33(20/78/82)	0.41(29/98/63)	0.69(0.5~0.93)	0.017	5	8.005	—
ATP5G1	rs66985080(C>G)	0.14	0.11(0/39/141)	0.16(4/51/135)	0.63(0.4~0.99)	0.044	5	6.078	—

1:1KG数据库中亚洲人群最小等位基因频率;2:Logistic回归分析调整年龄,性别,吸烟和饮酒状态;3:Regulome DB分值范围1~6,分值越高表明影响转录因子结合的证据越少;4:C评分,分值范围1~99,基于人类可能发生的8.6亿个碱基替换变异进行评分和排序。分值越高表明变异预测有害的可能性越高;5:eQTL,GTEx数据库中rs12970与APOA1表达的关联,P值基于基因型数据和人的心脏-左心室中的基因表达的线性回归计算。*:代表预测可能有功能效应的变异。

WDR35基因第242位氨基酸谷氨酸突变为甘氨酸,CADD分析预测该错义突变很可能破坏蛋白质结构或功能,为人类基因组中前1%最有害的突变。此外,Regulome DB预测结果表明rs60941031很可能影响转录因子结合,从而影响蛋白质表达和功能,HaploReg注释结果显示,rs60941031是转录因子

结合位点,可以引起转录因子结合模块(Motif)的改变,并且也与DNase超敏感位点(DHS)和增强子(H3K4Me1)组蛋白修饰区域重叠。rs3129预测很可能影响转录因子结合并与靶基因的表达相关联,同时该位点位于增强子的组蛋白修饰区域和DHS。

表3 计数法鉴定的预测具有功能效应的罕见变异

Table 3 The rare functional mutations identified by counting method

基因	SNV	变异类型	1KG ASN MAF ¹	病例	对照	HaploReg						
						启动子修饰 ²	增强子修饰 ²	DNase超敏位点 ²	蛋白结合 ³	Motifs改变 ⁴	Regulome DB分值 ⁵	CADD C评分 ⁶
APOA5	rs2075291(C>A)	Gly185Cys	0.04	2/22/156	0/18/172	SKIN, LIV	IPSC, LIV	IPSC, BLD, KID	—	—	4	22.7
WDR35	rs139543775(T>C)	Glu242Gly	0.00	0/3/177	0/0/190	—	—	—	Ik-1, RBP-Jkappa	—	—	25.1
KLHDC10	rs60941031(C>T)	3'UTR	0.01	0/6/174	2/7/181	—	4 tissues	MUS, BLD	10 bound proteins	5 altered motifs	2b	3.945
CTSH	rs3129(C>T)	3'UTR	0.04	1/16/163	0/14/176	—	MUS	5 tissues	—	—	1b	6.338

1:1KG数据库中亚洲人群最小等位基因频率;2:代表不同种类的细胞系;3:代表结合蛋白的数目;4:代表预测改变的Motif;5:Regulome DB分值范围1~6,分值越高表明影响转录因子结合的证据越少,1b表示很可能影响结合并与靶基因的表达相关联,2b表示很有可能影响结合;6:CADD评分,分值范围1~99,基于人类可能发生的8.6亿个碱基替换变异进行评分和排序,分值越高表明变异预测有害的可能性越高。

2.5 基于基因的CHD风险分析

采用SKAT分析方法对测序结果进行了基于基因的关联分析,发现纳入分析的19个基因中,有3个关联P值达到了设定的显著性水平($P < 0.05$)。APOA4基因、APOA5基因和MTAP基因与CHD发病风险的关联性P值分别为0.021、0.032和0.025(表4)。

3 讨论

精细定位是一种确定特定区域致病位点或其

表4 基因与CHD易感性的关联

Table 4 Associations between significant genes and CHD risk

染色体定位	基因 ¹	检测SNV数 ²	P值 ³
11q23.3	APOA4	11	0.021
11q23.3	APOA5	16	0.032
9p21.3	MTAP	46	0.025

1:P值<0.05的基因;2:每个基因上的SNV数;3:SKAT分析调整了年龄、性别、吸烟和饮酒状态。

密切相关遗传标志的研究策略。由于精细定位研究能够帮助缩小致病位点候选范围,便于发现真正的致病位点,目前该策略已经成功应用于发现复杂性疾病的效应位点。例如,Rivas等^[4]利用二代测序技术已发现炎性肠病的50个易感区域(主要是GWAS发现的区域),在350例病例和350例对照中进行了重测序,并进一步进行了关联研究,最终在NOD2、IL23R、CARD9和IL18RAP等基因区域发现了多个独立效应的遗传变异。本研究通过对384例中国人群样本的19个CHD相关基因外显子区域进行精细定位研究,探索外显子区域遗传变异与CHD发病风险之间的关联。在质量控制和统计分析后,进行功能注释,确定了1个常见变异和3个罕见变异可能与CHD风险相关。

本研究鉴定的常见SNV rs12970位于染色体11q23.3,在eQTL分析中,发现rs12970的A等位基因可以增加基因APOA1的表达($G>A$, $\beta=0.66$, $P=3.1\times 10^{-5}$),而APOA1编码的载脂蛋白A1是血浆中HDL的主要蛋白质成分,载脂蛋白A1接受游离胆固醇,通过激活卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶(LCAT),降低低密度脂蛋白(LDL)中脂类的过氧化。Tani等^[18]研究发现apoB/apoA1比值是冠心病的独立危险因素,apoB/apoA1比值越低,冠状动脉粥样硬化的风险也越低。并且研究发现CHD患者的HDL-C和APOA1水平显著降低^[19]。表明rs12970可能通过上调APOA1的表达来降低CHD的风险。

本研究鉴定的低频CHD相关错义突变rs139543775(Glu242Gly),位于基因WDR35的第7个外显子上,WDR35是编码WD重复蛋白家族的成员,该家族成员参与细胞周期进程、信号转导、细胞凋亡和基因调控等多种细胞过程。2012年在Nature上发表的2个汉族人群CHD的GWAS发现WDR35基因与汉族人群的CHD易感性相关($P < 10^{-8}$)^[20]。Mill等^[21]已建立了WDR35化学诱导小鼠模型,突变胚胎在交配后12.5 d死亡,并且表现出一系列严重的心血管缺陷,揭示了WDR35基因在心血管系统中的重要作用。本研究中鉴定的rs139543775位于WDR35的重要功能域WD-40重复结构域(WD40-like repeat domain)中,该结构域存在于多种具有调控作用的蛋白,介导蛋白质之间的相互作用^[22],rs139543775可能会导致WDR35蛋白的结构功能异常,从而导致心血管疾病的发生。本研究发现的另一错义突变rs2075291(Gly185Cys)位于染色体区域chr11q23.3的APOA5基因,已报道与中国人群TG

水平和冠心病风险相关^[17]。APOA5在肝脏中特异性表达,功能研究表明,过表达APOA5的转基因小鼠血浆TG水平减少至对照的1/3,而APOA5敲除小鼠血浆TG水平升高4倍^[23-24]。小鼠模型证实rs2075291突变导致半胱氨酸取代甘氨酸,引入游离半胱氨酸巯基与血浆中遇到的各种蛋白质结合,形成同源或异源二硫键,影响载脂蛋白A5的脂蛋白结合特性,阻断脂蛋白交联从而影响甘油三酯水平^[25]。

SKAT基于基因的关联分析进一步检测候选基因与CHD风险的相关性,整合分析结果显示APOA4、APOA5和MTAP基因 $P < 0.05$ 。其中APOA4编码的载脂蛋白A4主要存在于乳糜微粒(CM)和HDL中^[26],已有研究表明APOA4在小鼠中过表达对饮食诱导的主动脉病变形具有保护作用^[27]。MTAP基因编码甲硫腺苷磷酸化酶,是甲硫氨酸、ATP和dAMP合成补救途径中关键的酶,与多胺代谢途径关系密切,研究显示MTAP基因与缺血性脑卒中、心肌梗死的发生相关^[28],小鼠敲除模型发现MTAP对动脉粥样硬化起到保护作用^[29]。

综上所述,本研究使用目标区域捕获结合高通量测序及生物信息分析技术的方法,经济高效。前期系统地筛选了GWAS中先前报道的CHD相关区域中的基因并整合了eQTL相关信息,因此测序的19个目标基因具有足够的选择依据。通过整合每个基因和变异的功能注释结果,认为4个位点可能在中国人群冠心病的发生发展进程中起重要作用。本研究功能注释都是基于公共数据库,并且样本量小,检验效能有限,需要进一步验证和功能研究以确认所鉴定变异影响CHD发生的潜在机制。

[参考文献]

- [1] 马丽媛,吴亚哲,王文,等.《中国心血管病报告2017》要点解读[J].中国心血管杂志.2018,23(1):3-6
- [2] Wang Q Molecular genetics of coronary artery disease[J]. Curr Opin Cardiol,2005,20(3):182-188
- [3] Barth AS, Tomaselli GF. Gene scanning and heart attack risk[J]. Trends Cardiovasc Med,2016,26(3):260-265
- [4] Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease[J]. Nat Genet, 2011,43(11):1066-1073
- [5] Maurano MT, Humbert R, Rynes E, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA[J]. Science,2012,337(6099):1190-1195
- [6] Zanoni P, Khetarpal SA, Larach DB, et al. Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increas-

- es risk of coronary heart disease [J]. *Science*, 2016, 351 (6278):1166-1171
- [7] Timpson NJ, Walter K, Min JL, et al. A rare variant in APOC3 is associated with plasma triglyceride and VLDL levels in Europeans[J]. *Nat Commun*, 2014, 5:4871
- [8] Beaudoin M, Goyette P, Boucher G, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies rare variants in CARD9, IL23R and RNF186 that are associated with ulcerative colitis[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(9):e1003723
- [9] Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene[J]. *Science*, 2006, 314(5804):1461-1463
- [10] Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5):596-604
- [11] 强德仁,周义红,许敏锐,等. 常州农村地区糖尿病危险因素巢式病例对照研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*. 2013,33(9):1323-1326
- [12] Li H, Durbin R Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14):1754-1760
- [13] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Res*, 2010, 20(9):1297-303
- [14] Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB[J]. *Genome Res*, 2012, 22(9):1790-1797
- [15] Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, et al. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018
- [16] Ionita-Laza I, Lee S, Makarov V, et al. Sequence kernel association tests for the combined effect of rare and common variants[J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(6):841-53
- [17] Hubacek J A, Adamkova V, Ceska R, et al. New variants in the apolipoprotein AV gene in individuals with extreme triglyceride levels[J]. *Physiol Res*, 2004, 53(2):225-228
- [18] Tani S, Nagao K, Anazawa T, et al. Relation of change in apolipoprotein B/apolipoprotein A - I ratio to coronary plaque regression after Pravastatin treatment in patients with coronary artery disease[J]. *Am J Cardiol*, 2010, 105 (2):144-148
- [19] Andrikoula M, McDowell IF The contribution of ApoB and ApoA1 measurements to cardiovascular risk assessment [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10(4):271-278
- [20] Lu X, Wang L, Chen S, et al. Genome-wide association study in Han Chinese identifies four new susceptibility loci for coronary artery disease [J]. *Nat Genet*, 2012, 44 (8):890-894
- [21] Mill P, Lockhart PJ, Fitzpatrick E, et al. Human and mouse mutations in WDR35 cause short-rib polydactyly syndromes due to abnormal ciliogenesis [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(4):508-515
- [22] Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, et al. The WD repeat: a common architecture for diverse functions[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(5):181-185
- [23] Pennacchio L A, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing[J]. *Science*, 2001, 294 (5540):169-173
- [24] van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A - V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295(5):1156-1159
- [25] Sharma V, Witkowski A, Witkowska H E, et al. Aberrant hetero-disulfide bond formation by the hypertriglyceridemia-associated p.Gly185Cys APOA5 variant(rs2075291) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(10):2254-2260
- [26] Beisiegel U, Utermann G An apolipoprotein homolog of rat apolipoprotein A-IV in human plasma. Isolation and partial characterisation [J]. *Eur J Biochem*, 1979, 93 (3) : 601-608
- [27] Cohen RD, Castellani LW, Qiao JH, et al. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A - IV[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(8):1906-1916
- [28] Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW, et al. Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke[J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(5):531-539
- [29] Kim JB, Deluna A, Mungrue IN, et al. Effect of 9p21.3 coronary artery disease locus neighboring genes on atherosclerosis in mice[J]. *Circulation*, 2012, 126(15):1896-1906

[收稿日期] 2019-01-13