

· 论著 ·

福建地区汉族人群骨保护素基因位点多态性与急性冠脉综合征的相关性研究

罗助荣 谢钦著

【摘要】目的 探讨福建地区汉族人群骨保护素(OPG)基因 209G/A、245T/G、1181G/C 位点基因多态性与急性冠脉综合征(ACS)及其病变程度的相关性。**方法** 采用前瞻性研究方法,选取 2010 年 7 月至 2011 年 9 月 252 例福建地区无血缘关系的汉族人为研究对象,纳入的 184 例 ACS 患者再根据冠状动脉(冠脉)造影结果分为单支病变组(60 例)、双支病变组(68 例)、多支病变组(54 例),其中 2 例造影冠脉无狭窄;以 68 例健康体检者为对照。取静脉血提取 DNA,采用 Sanger 测序法检测各组 OPG 基因 209G/A、245T/G、1181G/C 位点多态性。分析 ACS 组与对照组之间以及 ACS 不同病变程度组之间 209G/A、245T/G、1181G/C 各基因型和等位基因的分布频率以及基因多态性与 ACS 病变程度的关系。**结果** ACS 组与对照组 OPG 209G/A、245T/G 位点基因型及等位基因分布均无明显差异;而 1181G/C 位点基因型分布[GG 型:92(50.0%)比 43(63.2%),CC 型:26(14.1%)比 0,GC 型:66(35.9%)比 25(36.8%), $\chi^2=11.240, P=0.004$]、等位基因分布[等位基因 G:250(67.9%)比 111(81.6%),等位基因 C:118(32.1%)比 25(18.4%), $\chi^2=9.148, P=0.002$]差异均有统计学意义。进一步分析发现,ACS 单支病变组、双支病变组及多支病变组 209G/A、245T/G 及 1181G/C 位点分布比较均无明显差异。**结论** 福建地区汉族人群 OPG 209G/A、245T/G 位点多态性与 ACS 无明显相关性;1181G/C 位点基因多态性与 ACS 发病之间存在相关性,但与其病变程度无关。

【关键词】 骨保护素; 急性冠脉综合征; 基因多态性

Correlation between osteoprotegerin gene 209G/A, 245T/G and 1181G/C polymorphism and acute coronary syndromes in Han people of Fujian area LUO Zhu-rong, XIE Qin-jing. Department of Cardiology, PLA Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, Fujian, China

Corresponding author: LUO Zhu-rong, Email: mdlzrong@126.com

【Abstract】Objective To explore the association of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphisms 209G/A, 245T/G and 1181G/C in the Han population of Fujian province with acute coronary syndrome (ACS) and its severity. **Methods** A prospective study was conducted. Two hundred and fifty-two cases without sibship of Fujian Han people was enrolled from July 2010 to September 2011, in which 68 healthy subjects as controls. One hundred and eighty-four patients with ACS were divided into three groups, 60 had one-vessel, 68 had two-vessel, and 54 had three-vessel lesion, 2 had not been found stenosis. DNA was extracted from venous blood, different groups of OPG gene polymorphism was identified by Sanger Method. OPG 209G/A, 245T/G and 1181G/C genotype frequencies and allelic frequencies were analyzed between ACS subjects and normal subjects and among the three groups of ACS, and the relationship between gene polymorphisms and ACS severity. **Results** No significant differences were observed in the genotype and allelic frequencies of OPG gene 209G/A, 245T/G between the ACS and control groups. Significant differences were observed in the genotype and allelic frequencies of OPG gene 1181G/C between the ACS and control groups [1181G/C GG: 92 (50.0%) vs. 43 (63.2%), CC: 26 (14.1%) vs. 0, GC: 66 (35.9%) vs. 25 (36.8%), $\chi^2=11.240, P=0.004$; allelic gene G: 250 (67.9%) vs. 111 (81.6%), allelic gene C: 118 (32.1%) vs. 25 (18.4%), $\chi^2=9.148, P=0.002$]. No significant differences were observed in the genotype and allelic frequencies of OPG gene 209G/A, 245T/G and 1181G/C between those groups. **Conclusions** There were no significant difference in frequencies OPG genotype and allele in polymorphisms 209G/A, 245T/C between patients with ACS and control group in Han population of Fujian province. There were difference in frequencies OPG genotype and allele in polymorphisms 1181G/C between patients with ACS and control group, but it was not differently distributed among patients with single-, double-, or triple-vessel lesion.

【Key words】 Osteoprotegerin; Acute coronary syndrome; Gene polymorphism

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.12.009

基金项目:全军医学科技创新项目(09MA094)

作者单位:350025 福建,南京军区福州总医院心内科,安徽医科大学福州总医院临床学院心内科

通信作者:罗助荣,Email:mdlzrong@126.com

新近研究证实骨保护素(osteoprotegerin, OPG)作为肿瘤坏死受体(TNFR)超家族的一员,具有调节骨密度、保护血管内皮、抑制血管钙化和抗动脉粥样硬化的作用,在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用,因此,OPG 与心血管疾病的关系正在

成为急性冠脉综合征(ACS)的研究热点之一。本研究中通过对福建地区汉族人群 OPG 基因 209G/A、245T/G 和 1181G/C 位点基因进行分析,初步探讨福建地区汉族人群 OPG 多态性基因型分布及与 ACS 的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象:采用前瞻性研究方法,选择 2010 年 7 月至 2011 年 9 月在南京军区福州总医院心内科行冠状动脉(冠脉)造影的无血缘关系的福建地区汉族人。ACS 诊断符合美国心脏病学会/美国心脏协会(ACC/AHA)的诊断标准及 2007 中华医学会心血管病学分会制定的诊断标准^[2]。

排除标准:合并有急慢性感染、恶性肿瘤、风湿性心脏病、瓣膜钙化、严重肝肾功异常、重度心功能衰竭(心衰)、甲状腺或肾上腺功能紊乱、钙代谢异常、免疫系统疾病者。

本研究符合医学伦理学标准,并经医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。最终纳入 184 例患者作为 ACS 组,再根据冠脉病变支数分为单支病变组(60 例)、双支病变组(68 例)、多支病变组(54 例),其中 2 例造影冠脉无狭窄。选择同期在本院进行体检的 68 例健康者作为对照组。

1.2 研究方法

1.2.1 临床资料收集:取受试者空腹静脉血,用全自动生化分析仪检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、糖化血红蛋白(HbA1c)。

1.2.2 DNA 提取:取受试者清晨空腹 12 h 外周静脉血 2 ml 至乙二胺四乙酸二钾(EDTA_{K2})的抗凝管中,-20℃冰箱保存待测,标本保存时间最长不超过 3 个月。DNA 提取采用改良碘化钾提取法(KI 法)。

1.2.3 引物设计、聚合酶链反应(PCR)扩增及测序:位点 1(209、245 处碱基)上游引物序列为 ACTCGT GGTGGAAGGATGTC,下游引物序列为 TGTCTGAT TGGCCCTAAAGC;位点 2(1181 处碱基)上游引物序列为 TGAAAGCGTTAACCCTGGAG,下游引物序列为 CTAGGGGAAGCATGGCATAA。分别取 PCR 产

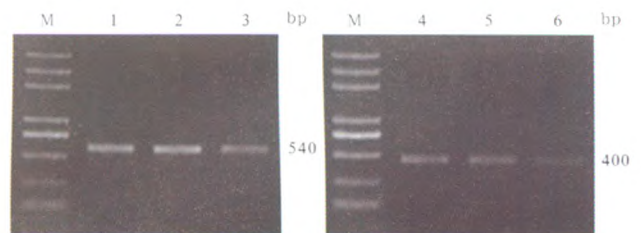
物 3 μl,用 2%琼脂糖凝胶电泳分离。产物测序采用 Sanger 测序法直接测序。

1.3 统计学处理:数据处理均在 SPSS 15.0 软件中进行。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析;方差齐时两样本均数比较采用 *t* 检验,方差不齐时两样本均数比较采用秩和检验,多组间均数比较采用 *H* 检验。计数资料间比较采用 χ^2 检验。对基因型分布进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析,以确定研究样本的群体代表性。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACS 组与对照组一般临床资料比较(表 1):两组年龄、体质指数(BMI)、伴糖尿病和高血压的比例、TG、TC、HDL-C、LDL-C、HbA1c 水平比较差异均无统计学意义(均 *P*>0.05);两组间性别、吸烟史比较差异有统计学意义(均 *P*<0.01)。

2.2 基因分型:OPG 基因 209G/A 和 245T/G 位点 PCR 扩增产物大小为 540 bp,OPG 基因 1181G/C 位点 PCR 扩增产物大小为 400 bp(图 1)。PCR 产物用 Sanger 测序法直接测序,得到各个位点的 3 种基因型(图 2~4)。



OPG:骨保护素;M:Trans2K Plus DNA Marker, 1~3:依次代表 209G/A 位点 GG、GA、AA 型,同时也代表 245T/G 位点 TT、TG、GG 型;4~6:依次代表 1181G/C 位点 GG、GC、CC 型

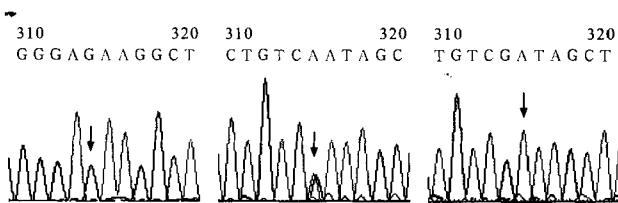
图 1 聚合酶链反应检测福建地区汉族人群 OPG 基因 209G/A、245T/G、1181G/C 位点产物电泳图

2.3 209G/A、245T/G、1181G/C 位点基因型频率和等位基因(表 2):ACS 组与对照组间 209G/A 及 245T/G 位点基因型分布及等位基因频率比较差异均无统计学意义,1181G/C 位点基因型分布及等位基因频率比较差异均有统计学意义(均 *P*<0.01)。

表 1 福建地区汉族人群 ACS 患者与健康对照者一般资料比较

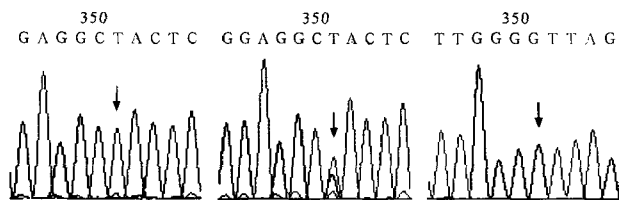
组别	例数	男性 [例(%)]	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	BMI($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	既往史(例)			TC($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	TG($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	HDL-C($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	LDL-C($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	HbA1c ($\bar{x} \pm s$, %)
					吸烟	糖尿病	高血压					
对照组	68	39(57.4)	60.79 ± 11.56	24.78 ± 3.46	24	12	45	4.77 ± 1.34	1.72 ± 1.18	1.10 ± 0.55	2.57 ± 1.02	6.11 ± 1.11
ACS 组	184	146(79.3) ^a	62.61 ± 11.34	23.80 ± 3.48	112 ^a	51	101	4.74 ± 1.37	1.77 ± 1.67	1.00 ± 0.26	2.62 ± 0.99	6.46 ± 1.44

注:ACS:急性冠脉综合征;BMI:体质指数;TC:总胆固醇;TG:甘油三酯;HDL-C:高密度脂蛋白胆固醇;LDL-C:低密度脂蛋白胆固醇;HbA1c:糖化血红蛋白;与对照组比较,^a*P*<0.01



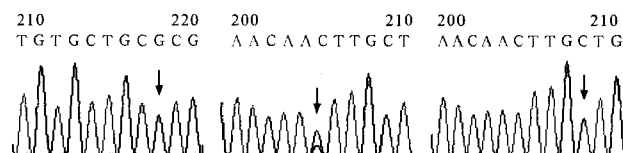
OPG:骨保护素,箭头所示 GG、GA、AA 型

图 2 福建地区汉族人群 OPG 基因 209G/A 位点 3 种基因型测序图



OPG:骨保护素,箭头所示 TT、TG、GG 型

图 3 福建地区汉族人群 OPG 基因 245T/G 位点 3 种基因型测序图



OPG:骨保护素,箭头所示 GG、GC、CC 型

图 4 福建地区汉族人群 OPG 基因 1181G/C 位点 3 种基因型测序图

表 2 福建地区汉族人群 ACS 患者与健康对照者 OPG 209G/A、245T/G、1181G/C 位点基因型及等位基因的分布

组别	例数	209G/A[个(%)]				
		GG 型	AA 型	GA 型	等位基因 G	等位基因 A
对照组	68	50(73.5)	0(0)	18(26.5)	118(86.8)	18(13.2)
ACS 组	184	141(76.6)	6(3.3)	37(20.1)	319(86.7)	49(13.3)
总体	252	191(75.8)	6(2.4)	55(21.8)	437(86.7)	67(13.3)
χ^2 值			3.201		0.001	
P 值			0.072		0.981	

组别	例数	245T/G[个(%)]				
		TT 型	GG 型	TG 型	等位基因 T	等位基因 G
对照组	68	52(76.5)	0(0)	16(23.5)	120(88.2)	16(11.8)
ACS 组	184	140(76.1)	6(3.3)	38(20.6)	318(86.4)	50(13.6)
总体	252	192(76.2)	6(2.4)	54(21.4)	438(86.9)	66(13.1)
χ^2 值			2.410		0.290	
P 值			0.300		0.590	

组别	例数	1181G/C[个(%)]				
		GG 型	CC 型	GC 型	等位基因 G	等位基因 C
对照组	68	43(63.2)	0(0)	25(36.8)	111(81.6)	25(18.4)
ACS 组	184	92(50.0)	26(14.1)	66(35.9)	250(67.9)	118(32.1)
总体	252	135(53.6)	26(10.3)	91(36.1)	361(71.6)	143(28.4)
χ^2 值			11.240		9.148	
P 值			0.004		0.002	

注:ACS:急性冠脉综合征,OPG:骨保护素

按 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,3 个位点基因型分布符合遗传平衡,具有群体代表性,209G/A 位点 $\chi^2=0.711, P>0.25$;245T/G 位点 $\chi^2=0.866, P>0.25$;1181G/C 位点 $\chi^2=3.12, P>0.05$ 。

2.4 209G/A、245T/G、1181G/C 位点多态性与 ACS 病变程度的关系(表 3):ACS 单支病变、双支病变、多支病变患者间 209G/A、245T/G、1181G/C 3 个位点比较差异均无统计学意义。

表 3 福建地区汉族人群 ACS 患者 OPG 209G/A、245T/G、1181G/C 位点多态性与 ACS 病变程度的关系

病变	例数	209G/A(例)			245T/G(例)			1181G/C(例)		
		GG 型	GA 型	AA 型	TT 型	TG 型	GG 型	GC 型	CC 型	
单支	60	43	15	2	42	16	2	29	21	10
双支	68	54	11	3	51	14	3	35	23	10
多支	54	42	11	1	45	8	1	27	21	6
χ^2 值		2.090			3.191			0.919		
P 值		0.719			0.526			0.922		

注:ACS:急性冠脉综合征,OPG:骨保护素

3 讨论

OPG 属于 TNFR 超家族的一员,是破骨细胞形成抑制因子,在 1997 年由美国和日本的科学家同时发现^[3-4]。在人体内,OPG 与细胞核转录因子 $-\kappa B$ 受体活化因子配体(RANKL)、核转录因子 $-\kappa B$ 受体活化因子(RANK)组成 OPG/RANKL/RANK 系统,调节细胞分化、成熟及功能。在 OPG/RANKL/RANK 系统中,OPG 通过与 RANK 竞争结合 RANKL,阻止 RANK 与 RANKL 结合从而发挥作用,所以 OPG 和 RANKL 的水平,特别是两者之间的比值在一定程度上反映了这个系统的调节方向和程度。

OPG 基因为单拷贝序列,位于染色体 8q23~24,由 7 个不同的结构域、3 个功能区及 401 个氨基酸组成。在前人的研究中发现,OPG 基因存在多个突变位点,包括 149T/C、163A/G、209G/A、245T/G、950T/C(以上位点都在启动子区域)、1181G/C(位于第 1 外显子)、6890A/C(位于第 4 内含子)。虽然国内外学者对 OPG 基因多态性进行了许多研究,但结果各不相同。Soufi 等^[5]对男性冠心病患者的 OPG 基因 149T/C、163A/G、209G/A、245T/G、950T/C、1181G/C、6890A/C 位点进行分析,结果显示 OPG 基因 950T/C 和 1181G/C 位点与男性主动钙化及冠脉疾病的风险呈显著相关性,提示携带 950T/C/1181G/C 或 950CC/1181CC 基因型者较其他基因型人群冠心病的发病率更高。Ueland 等^[6]对澳大利亚老年女性进行了研究,发现其 OPG 基因的 950T/C 基因多态性与血管内膜中层厚度相关,并且 950T/C 及 1181G/C

位点的基因多态性也与冠心病的发病率相关。Celczyńska Bajew 等^[7]进行了绝经后女性 OPG 基因 209G/A、245T/G、1181G/C 位点基因多态性与骨质疏松及冠脉病变的研究,结果提示 209G/A 位点基因多态性与骨质疏松及冠脉病变的关系均无统计学意义;245T/G 位点基因多态性与骨质疏松相关,但与冠脉病变无关;1181G/C 位点则与 245T/G 位点相反,其基因多态性与冠脉病变关系存在统计学意义,而与骨质疏松无关。

随着研究的开展,OPG 在心血管系统的作用越来越被重视,被认为是预测心血管疾病发病和死亡的新标志物^[8]。在动物研究中,OPG^{-/-}小鼠有严重的外周大动脉钙化,而 OPG 载脂蛋白 E 基因敲除的小鼠会形成动脉硬化^[9-10],证实 OPG 具有血管保护作用。同样在临床研究中也发现,OPG 与动脉硬化的严重程度有一定的相关性。有研究发现,在易损斑块处 OPG 表达升高,T 淋巴细胞表达 RANKL 增多,单核细胞分泌 RANK 水平增多,证实不稳定型心绞痛患者与稳定型心绞痛患者较健康对照组具有更高的血清 OPG 水平^[11]。与传统诸多公认的危险因素皆不同,血清 OPG 水平增加可作为动脉粥样硬化的炎症反应指标。因此,探讨 OPG 基因多态性与 ACS 之间的相关性也显得更加必要和重要。

本研究选择福建地区无血缘关系的汉族人群,对其 OPG 基因 209G/A、245T/G、1181G/C 3 个位点进行分析,结果提示,209G/A、245T/G 位点基因多态性与 ACS 无关,这与 Celczyńska Bajew 等^[7]的研究结果一致;而 1181G/C 位点基因多态性与 ACS 发病相关,这与 Ueland 等^[6]及 Celczyńska Bajew 等^[7]的研究结果一致。对 ACS 患者进一步研究发现,单支、双支及多支病变 3 组之间基因型比较差异均无统计学意义。由此说明 1181G/C 位点基因多态性与 ACS 危险度存在相关性,但与其病变程度无关。

王志禄等^[12]研究发现,在中国汉族人群中,内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因 Glu298→Asp 多态性与 ACS 患者不相关,而与 ACS 患者血清尿酸存在显著的关联。由此可见,开展地区易感人群 OPG 基因多态性与 ACS 相关性的研究十分必要。由于人类基因型在不同地域及不同民族之间存在明显差异,而本研究仅针对福建地区汉族人群,且病例数较少,因此研究结果存在局限性。开展多民族、多地域、大范围的 OPG 基因多态性与 ACS 相关性研究,

对评估 OPG 基因多态性是否可以成为 ACS 发生及危险度预测的一个新型分子标志物具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Antman EM, Hand M, Armstrong PW, et al. 2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51: 210-247.
- [2] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南. *中华心血管病杂志*, 2007, 35: 295-304.
- [3] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- [4] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234: 137-142.
- [5] Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, et al. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 3764-3768.
- [6] Ueland T, Wilson SG, Amirul Islam FM, et al. A cohort study of the effects of serum osteoprotegerin and osteoprotegerin gene polymorphisms on cardiovascular mortality in elderly women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, 71: 828-833.
- [7] Celczyńska Bajew L, Horst Sikorska W, Bychowicz B, et al. The effects of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in patients with ischaemic heart disease on the morphology of coronary arteries and bone mineral density. *Kardiol Pol*, 2011, 69: 573-578.
- [8] 谢钦菁, 罗助荣. 骨保护素作为预测心血管疾病发病率和死亡率的新标志物的研究进展. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5: 2963-2966.
- [9] Price PA, June HH, Buckley JR, et al. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 1610-1616.
- [10] Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 2117-2124.
- [11] Sandberg WJ, Yndestad A, Øie E, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 857-863.
- [12] 王志禄, 赵永青, Joshua D. Liao, 等. 内皮型一氧化氮合酶基因多态性与急性冠脉综合征患者尿酸的关系. *中国危重病急救医学*, 2007, 19: 652-656.

(收稿日期: 2012-04-18)

(本文编辑: 李银平)