

骨保护素启动子区域 T149C 和 T950C 基因多态性及血清骨保护素水平与冠心病的关系

赵福梅¹ 赵辉² 张蕊³ 任珉¹ 刘超¹ 刘珊¹ 马静¹ 宋衍秋¹ 刘婷¹ 张旭¹ 丛洪良^{1,3}

¹天津市心血管病研究所 300222; ²天津市天津医院心内科 300210; ³天津市胸科医院心内科 300222
通信作者: 丛洪良, Email: hongliangcong@126.com

【摘要】目的 探讨骨保护素(OPG)启动子区域 T149C、T950C 基因多态性及血清 OPG、可溶性核转录因子- κ B 受体活化因子配体(sRANKL)含量与冠心病(CHD)发病风险的关系。**方法** 选择 2017 年 4 月至 2018 年 12 月天津市胸科医院心内科收治的天津地区疑似 CHD 入院并接受冠状动脉造影(CAG)的 528 例患者,根据 CAG 检查结果将患者分为 CHD 组(302 例)和非 CHD 组(226 例)。记录所有受试对象的性别、年龄、高血压史、CHD 家族史、糖尿病、血脂指标等临床资料;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 OPG、sRANKL 水平;应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 T149C、T950C 基因多态性,等位基因进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验;采用二分类多因素非条件 Logistic 回归法分析 T149C、T950C 基因多态性及血清 OPG、sRANKL 水平与 CHD 的关系。**结果** 所有患者均纳入最终分析。CHD 组血清 OPG 水平明显高于非 CHD 组($\mu\text{g/L}$: 1.76 ± 0.49 比 1.47 ± 0.29 , $P < 0.01$),血清 sRANKL 水平明显低于非 CHD 组(ng/L : 342.14 ± 121.38 比 376.63 ± 108.66 , $P < 0.05$)。Logistic 回归分析显示,在调整了年龄、性别、血脂指标、糖尿病等因素后,血清 OPG 升高为发生 CHD 的独立危险因素[优势比(OR) = 1.995, 95% 可信区间(95% CI) = 1.935 ~ 2.066, $P = 0.012$]。PCR-RFLP 检测结果显示,OPG 基因启动子区域 T149C、T950C 均有 TT、TC、CC 3 种基因型。经 Hardy-Weinberg 平衡检验,OPG T149C 及 OPG T950C 基因多态性符合 Hardy-Weinberg 定律,达到遗传平衡,具有群体代表性。非 CHD 组 T149C 基因型 TT、TC、CC 及等位基因 T、C 的频率分别为 53.5%、42.9%、3.6%、75.0% 和 25.0%, CHD 组分别为 43.1%、50.3%、6.6%、68.2% 和 31.8%,两组间基因型和等位基因频率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Logistic 回归分析显示, T149C 位点的 TC+CC 基因型发生 CHD 的风险是 TT 基因型的 1.86 倍($OR = 1.86$, 95% $CI = 1.24 \sim 2.78$, $P = 0.003$),提示 C 等位基因可能为发生 CHD 的易感基因。非 CHD 组 T950C 基因型 TT、TC、CC 及等位基因 T、C 的频率分别为 39.8%、46.5%、13.7%、63.1% 和 36.9%, CHD 组分别为 39.4%、43.4%、17.2%、61.1% 和 38.9%,两组间基因型和等位基因频率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。Logistic 回归分析显示, T950C 位点的 TC+CC 基因型与 CHD 的发生无关。**结论** 血清 OPG 水平升高与 CHD 发生有关,可作为 CHD 发生的危险因素。OPG T149C 的 TC+CC 基因型与 CHD 发生密切相关, C 等位基因可能为发生 CHD 的易感基因。

【关键词】 骨保护素; 基因多态性; 启动子; 可溶性核转录因子- κ B 受体活化因子配体; 冠心病
基金项目: 天津市科技计划项目(16ZXMJSY00140)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.012

Polymorphisms of T149C and T950C genes in osteoprotegerin promoter sites and the relationship between serum osteoprotegerin levels and coronary heart disease

Zhao Fumei¹, Zhao Hui², Zhang Rui³, Ren Min¹, Liu Chao¹, Liu Shan¹, Ma Jing¹, Song Yanqiu¹, Liu Ting¹, Zhang Xu¹, Cong Hongliang^{1,3}

¹Tianjin Cardiovascular Institute, Tianjin 300222, China; ²Department of Cardiology, Tianjin Hospital, Tianjin 300210, China; ³Department of Cardiology, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300222, China

Corresponding author: Cong Hongliang, Email: hongliangcong@126.com

【Abstract】Objective To explore the polymorphisms of T149C and T950C gene in osteoprotegerin (OPG) promoter sites and the levels of serum OPG and soluble nuclear factor- κ B receptor activator ligand (sRANKL) and the incidence of coronary heart disease (CHD). **Methods** 528 patients in Tianjin suspected of CHD and underwent coronary angiography (CAG) who admitted to the department of cardiology of Tianjin Chest Hospital from April 2017 to December 2018 were enrolled. According to the CAG results, they were divided into two groups: CHD group ($n = 302$) and non-CHD group ($n = 226$). The gender, age, history of hypertension, family history of CHD, diabetes, levels of blood lipid parameters in serum and other clinical data of patients were recorded. The levels of serum OPG and sRANKL were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). T149C and T950C gene polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction-restriction endonuclease fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods. Hardy-Weinberg genetic balance test was performed for alleles. Binomial classification multivariate non-conditional Logistic regression method was used to analyze the relationship between T149C and T950C gene polymorphisms, serum levels of OPG and sRANKL and CHD. **Results** All patients were enrolled in the final analysis. The serum level of

OPG in CHD group was significantly higher than that in non-CHD group ($\mu\text{g/L}$: 1.76 ± 0.49 vs. 1.47 ± 0.29 , $P < 0.01$), the serum level of sRANKL was significantly lower than that in non-CHD group (ng/L : 342.14 ± 121.38 vs. 376.63 ± 108.66 , $P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that after adjusting for age, gender, blood lipid parameters, diabetes and other factors, the increase in serum OPG level was an independent risk factor for CHD [odds ratio (OR) = 1.995, 95% confidence interval (95%CI) = 1.935–2.066, $P = 0.012$]. PCR-RFLP results showed that TT, TC and CC genotypes were found in T149C and T950C of OPG promoter. According to Hardy-Weinberg equilibrium test, the polymorphisms of OPG T149C and T950C accorded with Hardy-Weinberg law, achieving genetic balance with representative of the population. The frequencies of TT, TC, CC and alleles T and C in T149C genotypes of non-CHD group were 53.5%, 42.9%, 3.6%, 75.0% and 25.0%, respectively, and they were 43.1%, 50.3%, 6.6%, 68.2% and 31.8%, respectively in CHD group. There were statistically significant differences in genotype and allele frequencies between the two groups (all $P < 0.05$). It was shown by Logistic regression analysis that the risk of CHD in TC+CC genotype of T149C was 1.86 of TT genotype (OR = 1.86, 95%CI = 1.24–2.78, $P = 0.003$). It was suggested that C allele might be a susceptible gene for CHD. In non-CHD group, the frequencies of TT, TC, CC, and alleles T and C in T950C genotypes were 39.8%, 46.5%, 13.7%, 63.1% and 36.9%, respectively. They were 39.4%, 43.4%, 17.2%, 61.1% and 38.9%, respectively in CHD group. There were no significant differences in genotype and allele frequencies between the two groups (all $P > 0.05$). Logistic regression analysis showed that TC+CC genotype of T950C was not related with CHD. **Conclusions** The increased level of serum OPG was closely related with CHD and could be used as a risk factor for CHD. The cases carried OPG T149C TC+CC genotype might have the risk suffering CHD. C allele is might be a susceptible gene.

【Key words】 Osteoprotegerin; Gene polymorphism; Promoter; Soluble nuclear factor- κ B receptor activator ligand; Coronary heart disease

Fund program: Tianjin Municipal Science and Technology Planning Project (16ZXMJSY00140)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.012

冠心病(CHD)已成为危害人类健康的主要原因^[1-2],呈现出发病率逐年攀升、发病年龄年轻化的特点。CHD是由各种原因导致的冠状动脉(冠脉)血管发生粥样硬化,从而引起冠脉血管不同程度的狭窄,造成相应部位心肌细胞缺血、缺氧,甚至心肌组织坏死的一类心脏疾病^[3-4]。遗传变异体、生活方式和环境等多种因素被认为参与了CHD的发生发展^[5-7]。血清骨保护素(OPG)水平升高被认为是动脉粥样硬化的独立危险因子,不仅参与骨代谢,而且参与影响血管钙化和动脉粥样硬化的过程,与CHD发病显著相关^[8]。OPG通过抑制破骨细胞改变成骨与破骨平衡,可能影响到骨的重构及异位钙化^[9]。已有研究表明,OPG基因启动因子区域存在多个位点基因多态性,且其多态性及水平与CHD、高血压、肿瘤等疾病相关^[10],在不同种族中其基因频率也不相同^[11]。OPG基因存在T149C、T950C、G209A、T245G、G1181C等多态性,其多态性与CHD易感性相关^[12],但仍存在争议^[13]。OPG T149C位点基因多态性与CHD发病的相关性国内外均鲜见报道。本研究以OPG启动子区域T149C、T950C为候选基因,探讨OPG血清含量及其基因多态性与CHD发病的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象:选择2017年4月至2018年12月天津市胸科医院心内科收治的528例天津地区患者。本研究符合医学伦理学标准,并通过天津市胸科医

院伦理委员会的批准(审批号:2019KY-001-01),入院患者均已签署知情同意书。

1.1.1 纳入标准:疑似CHD患者;接受冠脉造影(CAG);患者间无血缘关系。

1.1.2 排除标准:存在肝、肾、内分泌等代谢疾病。

1.2 研究分组:根据CAG结果将患者分为CHD组(302例)和非CHD组(226例)。CHD的诊断标准:CAG显示左主干狭窄 $\geq 30\%$ 或至少有1支冠脉狭窄 $\geq 50\%$ 。

1.3 研究方法

1.3.1 资料收集:收集所有受试对象的性别、年龄、高血压史、CHD家族史、糖尿病等临床资料。

1.3.2 生化指标测定:研究对象空腹12h后取静脉血并分离血清,应用全自动生化分析仪,采用酶法测定总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、脂蛋白(a)[LP(a)]、载脂蛋白AI(apoAI)、载脂蛋白B(apoB)、空腹血糖(FBG)、纤维蛋白原(FIB)、同型半胱氨酸(HCY)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、尿酸(UA)水平;应用全自动酶标仪,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定OPG和可溶性核转录因子- κ B受体活化因子配体(sRANKL)水平。

1.3.3 基因组DNA的提取:采用离心柱型基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司)提取外周血中DNA。

1.3.4 引物合成及聚合酶链反应(PCR):引物序列

由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体积 25 μ L: DNA 3 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 预制混合液 permix 12.5 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测是否为特异性扩增产物。

1.3.5 限制性片段长度多态性(RFLP)分析: 上述扩增产物分别以 Xba I 酶、Hinc II 酶(美国 Thermo 公司)37 $^{\circ}$ C 酶切 10 h, 然后用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测基因型。

1.4 统计学分析: 使用 SPSS 11.5 软件对结果进行统计分析。符合正态分布的定量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用独立样本 *t* 检验; 非正态分布的定量数据以中位数(四分位数)[$M(Q_L, Q_U)$]表示, 采用秩和检验(Mann-Whitney *U* 检验)。定性数据以百分比表示, 采用 χ^2 检验; 等位基因进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。对单因素分析中差异有统计学意义的变量进行二分类多因素非条件 Logistic 回归分析。检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料(表 1): 所有患者均纳入最终分析。CHD 组 302 例患者中男性 186 例, 女性 116 例; 年龄(59.39 ± 9.99)岁。非 CHD 组 226 例患者中男性 102 例, 女性 124 例; 年龄(55.35 ± 8.64)岁。与非 CHD 组比较, CHD 组患者年龄更大, 男性、高血压史、糖尿病比例及血清 TG、LP(a)、FBG、HCY、CK-MB 和 UA 水平更高, 且血清 HDL-C、apoAI 和 apoAI/apoB 比值更低(均 $P < 0.05$); 而两组 CHD 家族史比例及血清 TC、LDL-C、apoB、FIB 水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.2 血清 OPG 和 sRANKL 水平(表 2): CHD 组患者血清 OPG 水平显著高于非 CHD 组, 而血清 sRANKL 水平显著低于非 CHD 组, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

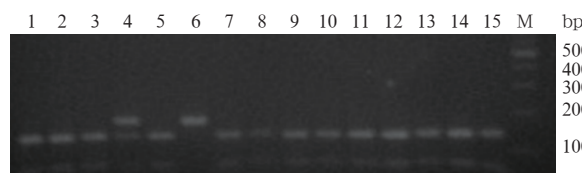
组别	例数(例)	OPG(μ g/L)	sRANKL(ng/L)
非 CHD 组	226	1.47 \pm 0.29	376.63 \pm 108.66
CHD 组	302	1.76 \pm 0.49	342.14 \pm 121.38
<i>t</i> 值		-6.885	2.463
<i>P</i> 值		0.000	0.014

注: CHD 为冠心病, OPG 为骨保护素, sRANKL 为可溶性核转录因子- κ B 受体活化因子配体

指标	非 CHD 组 (<i>n</i> =226)	CHD 组 (<i>n</i> =302)	$\chi^2/t/Z$ 值	<i>P</i> 值
男性[例(%)]	102(45.1)	186(61.6)	30.570	0.000
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	55.35 \pm 8.64	59.39 \pm 9.99	-5.121	0.000
高血压史[例(%)]	108(47.8)	196(64.9)	33.569	0.000
CHD 家族史[例(%)]	40(17.7)	61(20.2)	2.576	0.470
糖尿病[例(%)]	28(12.4)	75(24.8)	19.504	0.000
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.64 \pm 1.03	4.52 \pm 1.12	1.323	0.203
TG[mmol/L, <i>M</i> (Q_L, Q_U)]	1.33(1.00, 1.88)	1.70(1.22, 2.46)	-3.920	0.000
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.23 \pm 0.46	1.04 \pm 0.34	5.639	0.000
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.95 \pm 0.93	2.91 \pm 0.98	0.497	0.665
LP(a)[g/L, <i>M</i> (Q_L, Q_U)]	22.35(9.78, 57.53)	28.95(11.93, 74.08)	-7.151	0.021
apoAI(g/L, $\bar{x} \pm s$)	1.27 \pm 0.23	1.16 \pm 0.21	5.957	0.000
apoB(g/L, $\bar{x} \pm s$)	0.98 \pm 0.24	0.99 \pm 0.29	-0.444	0.561
apoAI/apoB 比值($\bar{x} \pm s$)	1.37 \pm 0.40	1.26 \pm 0.45	3.061	0.003
FBG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	5.43 \pm 1.53	6.05 \pm 2.16	-3.900	0.000
FIB(g/L, $\bar{x} \pm s$)	2.98 \pm 1.07	3.09 \pm 1.14	-1.181	0.249
HCY [μ mol/L, <i>M</i> (Q_L, Q_U)]	11.7(9.4, 14.6)	13.2(10.8, 17.9)	-1.754	0.000
CK-MB [U/L, <i>M</i> (Q_L, Q_U)]	14.0(11.0, 17.0)	15.0(12.0, 19.0)	-1.030	0.000
UA(μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	301.78 \pm 83.80	334.44 \pm 95.49	-4.306	0.000

注: CHD 为冠心病, TC 为总胆固醇, TG 为三酰甘油, HDL-C 为高密度脂蛋白胆固醇, LDL-C 为低密度脂蛋白胆固醇, LP(a) 为脂蛋白(a), apoAI 为载脂蛋白 AI, apoB 为载脂蛋白 B, FBG 为空腹血糖, FIB 为纤维蛋白原, HCY 为同型半胱氨酸, CK-MB 为肌酸激酶同工酶, UA 为尿酸

2.3 OPG 启动子区域 T149C、T950C 的基因多态性(图 1~2): OPG T149C 基因多态性 PCR 产物长度为 177 bp, 经内切酶 Xba I 酶切 130 bp 和 47 bp 两个片段, 电泳后出现 3 种基因型, 其中纯合子 TT 型显示 2 个条带(130 bp、47 bp), 杂合子 TC 型显示 3 个条带(177、130、47 bp), 变异纯合子 CC 型显示 1 个条带(177 bp)。OPG T950C 基因多态性 PCR 产物长度为 147 bp, 经内切酶 Hinc II 酶切 113 bp 和 34 bp 两个片段, 电泳后出现 3 种基因型, 其中变异纯合子 CC 型显示 2 个条带(113 bp、34 bp), 杂合子 TC 型显示 3 个条带(147、113、34 bp), 纯合子 TT 型显示 1 个条带(147 bp)。



OPG 为骨保护素, PCR 为聚合酶链反应, 泳道 1、2、3、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15 为 TT 基因型(130 bp、47 bp), 泳道 4 为 TC 基因型(177、130、47 bp), 泳道 6 为 CC 基因型(177 bp), M 为 DNA 标记型号 DL 100 Marker

图 1 OPG 基因 T149C PCR 扩增产物内切酶 Xba I 酶切鉴定电泳图

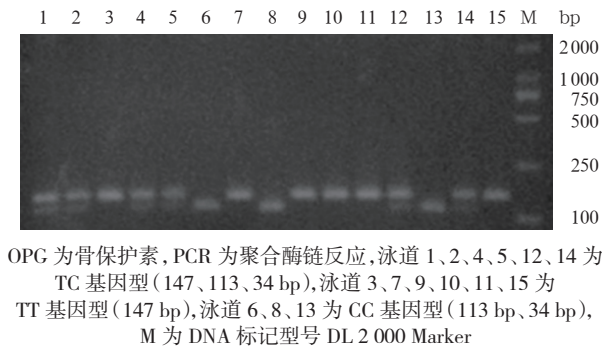


图2 OPG 基因 T950C PCR 扩增产物内切酶 HincII 酶切鉴定电泳图

2.4 群体代表性检验: OPG T149C 基因多态性及 OPG T950C 基因多态性经 Hardy-Weinberg 平衡检验符合 Hardy-Weinberg 定律, 达到遗传平衡, 具有群体代表性。

2.5 OPG T149C、T950C 基因多态性与 CHD 的关系
2.5.1 OPG T149C、T950C 基因型和等位基因频率分布(表 3~4): 非 CHD 组与 CHD 组患者 T149C 基因型 TT、TC、CC 和等位基因 T、C 的频率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 而两组 T950C 基因型 TT、TC、CC 和等位基因 T、C 的频率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.5.2 CHD 危险因素的多因素非条件 Logistic 回归分析: 由于 CC 基因型较少, 故将 CC 基因型与 TC 基因型合并为一组, TT 基因型单独为一组, 分别代入回归方程。结果显示, T149C 位点的 TC+CC 基因型发生 CHD 的风险是 TT 基因型的 1.86 倍, 优势比(OR)为 1.86 [95% 可信区间(95%CI)=1.24~2.78, $P=0.003$], 提示 C 等位基因可能是发生 CHD 的易感基因。T950C 位点的 TC+CC 基因型与 TT 基

因型比较差异无统计学意义, 与 CHD 的发生无关。将全体研究对象进行整体分析, 选择 CHD 组与非 CHD 组比较中差异有统计学意义的变量, 即 OPG、年龄、TG、HDL-C、apoAI、LP(a)、HCY、CK-MB、UA、T149C 基因型 TC+CC 等 10 个因素为自变量(X), 以有无 CHD(有=1, 无=0)作为应变量(Y), 采用逐步法进行多因素非条件 Logistic 回归分析。结果显示, OPG、年龄、T149C 基因型 TC+CC、CK-MB、UA 是发生 CHD 的危险因素, 而血清 apoAI 为保护因素(均 $P < 0.05$; 表 5)。

表 5 CHD 危险因素的多因素非条件 Logistic 回归分析

变量	β 值	s_e	χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
OPG	2.995	1.192	6.320	0.012	1.995	1.935~2.066
年龄	0.059	0.012	25.707	0.000	1.061	1.037~1.086
TG	0.063	0.091	0.482	0.488	1.065	0.891~1.272
HDL-C	-0.649	0.384	2.850	0.091	0.523	0.246~1.110
apoAI	-1.518	0.657	5.341	0.021	0.219	0.060~0.794
LP(a)	0.003	0.002	3.697	0.055	1.003	1.000~1.007
HCY	0.017	0.010	3.002	0.083	1.017	0.998~1.036
CK-MB	0.034	0.012	8.211	0.004	1.035	1.011~1.059
UA	0.003	0.001	6.484	0.011	1.003	1.001~1.005
T149C 基因型 TC+CC	0.617	0.207	8.906	0.003	1.854	1.236~2.780

注: CHD 为冠心病, OPG 为骨保护素, TG 为三酰甘油, HDL-C 为高密度脂蛋白胆固醇, apoAI 为载脂蛋白 AI, LP(a) 为脂蛋白(a), HCY 为同型半胱氨酸, CK-MB 为肌酸激酶同工酶, UA 为尿酸, OR 为优势比, 95%CI 为 95% 可信区间

3 讨论

OPG 是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的新成员, 是一种由成骨细胞分泌的可溶性无跨膜糖蛋白^[14], 因其可以阻断核转录因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)从而抑制骨重吸收而得名^[15]。

OPG 为 RANKL 的诱导型受体, 与核转录因子- κ B 受体活化因子(RANK)竞争性结合 RANKL, 亲和力强。RANK 与 RANKL 相互作用诱导核转录因子- κ B(NF- κ B)向细胞核内转移并激活信号转导通路, 启动编码破骨细胞形成、分化、活化的特定基因的转录, 最终导致骨吸收^[16]。OPG、RANK、RANKL 共同构成 OPG 系统, 通过抑制成骨细胞的分化和成熟以及诱导成骨细胞凋亡, 在骨的形成和再吸收中起关键作用^[17]。OPG 也是一种重要的血

表 3 非 CHD 与 CHD 两组患者 OPG T149C 基因型和等位基因频率比较

组别	基因型频率[%(例/例)]			等位基因频率[%(例次/例次)]	
	TT	TC	CC	T	C
非 CHD 组	53.5(121/226)	42.9(97/226)	3.6(8/226)	75.0(339/452)	25.0(113/452)
CHD 组	43.1(130/302)	50.3(152/302)	6.6(20/302)	68.2(412/604)	31.8(192/604)
χ^2 值	6.816			5.800	
P 值	0.033			0.016	

注: CHD 为冠心病, OPG 为骨保护素

表 4 非 CHD 与 CHD 两组患者 OPG T950C 基因型和等位基因频率比较

组别	基因型频率[%(例/例)]			等位基因频率[%(例次/例次)]	
	TT	TC	CC	T	C
非 CHD 组	39.8(90/226)	46.5(105/226)	13.7(31/226)	63.1(285/452)	36.9(167/452)
CHD 组	39.4(119/302)	43.4(131/302)	17.2(52/302)	61.1(369/604)	38.9(235/604)
χ^2 值	1.662			0.421	
P 值	0.436			0.516	

注: CHD 为冠心病, OPG 为骨保护素

管调节因子,由多种组织产生并分泌,在血管系统中主要由血管内皮细胞和血管平滑肌细胞表达与释放,以活性二聚体形式存在,与动脉粥样硬化和动脉钙化的发生发展关系密切^[18]。现已证实,高血清 OPG 水平与 CHD 的严重程度显著相关^[19],被认为是预测 CHD 发生和严重程度的新型生物标志物^[20],是 CHD 发生的独立危险因素。Bjerre 等^[21]通过对稳定型心绞痛患者研究发现,血清 OPG 水平升高是患者远期死亡的独立预测因子。Hosbond 等^[22]对不稳定型心绞痛患者的研究表明,高血清 OPG 水平与冠脉病变的严重程度、受累血管数量明显相关。近年有学者对 414 例怀疑有心血管疾病的患者进行研究,与低血清 OPG 组患者相比,高血清 OPG 组患者有 2 种以上心血管危险因素的比例更高^[23]。Lindberg 等^[24]前瞻性纳入了 42 例接受经皮冠脉介入治疗(PCI)的原发性 ST 段抬高型心肌梗死(STEMI)患者,结果显示,在 PCI 治疗原发性 STEMI 过程中,OPG 的循环水平发生改变,证实高 OPG 水平与左室射血分数(LVEF)受损独立相关,高水平的循环 OPG 可预测 STEMI 患者的远期预后。在急性心肌梗死(AMI)患者中,OPG 水平升高不仅可增加心肌梗死面积^[25],还能增加梗死、缺血、中风、心力衰竭和死亡的风险^[17-18, 26-27],且可以预测患者近期主要心血管事件(MACE)及远期预后^[28]。本研究显示,CHD 组血清 OPG 水平显著高于非 CHD 组,与文献报道一致,证实高血清 OPG 水平与 CHD 的发生有关。

RANKL 基因定位于染色体 13q14 上,由 316 个氨基酸组成。在骨骼系统中,RANKL 能够刺激破骨细胞分化、成熟,从而加快骨吸收。在血管壁中,RANKL 主要由相关内皮细胞和血管平滑肌细胞表达,其靶细胞膜结合受体 RANK 在巨噬细胞和树突细胞的表面表达^[29]。在心血管系统中,RANKL 能够介导炎症反应,刺激补体、TNF 等物质的生成,从而促进内皮细胞增殖,加重血管钙化^[30]。RANKL 在正常血管中表达水平较低,但在斑块及破裂部位水平较高,表明其在动脉粥样硬化的发生发展中有潜在作用^[31]。RANKL 有两种分子形式存在,一种为跨膜结合蛋白,是发挥其生物学功能的主要形式;另一种为游离型多肽 sRANKL。有研究证实,RANKL 水平与急性心血管事件发生率显著相关^[32-33]。王丽蕊等^[34]研究显示,中国郑州地区人群中 OPG 与功能型 RANKL 结合增高时,其血清

sRANKL 水平则降低。本研究结果显示,CHD 组血清 OPG 水平显著高于非 CHD 组,血清 sRANKL 水平显著低于非 CHD 组,与研究报道结果相符。

OPG 基因位于染色体 8q23-24 上,由 401 个氨基酸组成。T950C 基因多态性位于 OPG 的启动子区翻译起始位点上游 233 bp 处^[35],可通过改变启动子活性来获得其功能意义^[36]。在分泌蛋白的信号肽外显子编码中,OPG 基因启动子序列的变化及其多态性可能在细胞内协同发挥着调节转录或分泌 OPG 蛋白的作用。有荟萃分析表明,T950C 基因多态性与 CHD 发生风险显著相关^[37]。但韩国学者认为,OPG 启动子区域 T950C 基因多态性与韩国人 CHD 的发生无明显相关性^[38],与本研究结果一致。由于 T149C 位点基因多态性与 CHD 发生相关性的研究在国内外均鲜见报道,因此本研究检测了 OPG T149C 位点的基因多态性,并探讨其与 CHD 的关系,结果显示其基因型 TC+CC 与 CHD 发生相关,提示 T149C 位点的 C 等位基因可能是发生 CHD 的易感基因,而这一结果可能与地域、种族差异有关。

本研究通过对 OPG 启动子区域 T149C、T950C 基因多态性及血清 OPG、sRANKL 水平与 CHD 关系的研究表明:① CHD 组血清 OPG 水平明显高于非 CHD 组,血清 sRANKL 水平明显低于非 CHD 组;Logistic 回归分析显示,在调整了年龄、性别、血脂、糖尿病等因素后,血清 OPG 水平为 CHD 发生的危险因素。② T950C 基因型和等位基因频率在非 CHD 组与 CHD 组间分布差异无统计学意义。③ CHD 组与非 CHD 组之间 OPG T149C 基因型和等位基因频率差异均有统计学意义;TC+CC 基因型与 CHD 发生密切相关,C 等位基因可能是发生 CHD 的易感基因。

综上所述,高血清 OPG 水平是 CHD 进展及死亡的独立危险因素,作为一种新的生物标志物具有巨大的潜力,对 CHD 的预测、治疗及预后判断具有重大意义。本研究使我们了解到 OPG T149C、T950C 基因多态性的分布,且 T149C 基因型 TC+CC 可能是 CHD 发生的危险因素,为进一步群体遗传学研究和防治心血管疾病提供了重要的基础资料,对今后开展多种疾病的基因诊断及治疗有着深远意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Townsend N, Nichols M, Scarborough P, et al. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2015 [J]. Eur Heart J, 2015, 36 (40): 2696-2705. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv428.

- [2] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics: 2016 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 133 (4): e38–360. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000350.
- [3] Bjork Petersen C, Bauman A, Gronbæk M, et al. Total sitting time and risk of myocardial infarction, coronary heart disease and all-cause mortality in a prospective cohort of Danish adults [J]. *Int J Behav Nutr Phys Act*, 2014, 11: 13. DOI: 10.1186/1479-5868-11-13.
- [4] Blais C, Rochette L. Trends in prevalence, incidence and mortality of diagnosed and silent coronary heart disease in Quebec [J]. *Health Promot Chronic Dis Prev Can*, 2015, 35 (10): 184–193. DOI: 10.24095/hpcdp.35.10.02.
- [5] Akesson A, Larsson SC, Discacciati A, et al. Low-risk diet and lifestyle habits in the primary prevention of myocardial infarction in men: a population-based prospective cohort study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64 (13): 1299–1306. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.06.1190.
- [6] Strik JJ, Honig A, Maes M. Depression and myocardial infarction: relationship between heart and mind [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001, 25 (4): 879–892. DOI: 10.1016/S0278-5846(01)00150-6.
- [7] Kessler T, Erdmann J, Schunkert H. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction: 2013 [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2013, 15 (6): 368. DOI: 10.1007/s11886-013-0368-0.
- [8] Raaz-Schrauder D, Schrauder MG, Stumpf C, et al. Plasma levels of sRANKL and OPG are associated with atherogenic cytokines in patients with intermediate cardiovascular risk [J]. *Heart Vessels*, 2017, 32 (11): 1304–1313. DOI: 10.1007/s00380-017-0998-z.
- [9] 陈晓依, 刘峰, 刘蕴玲. 血清骨保护素与血管钙化的关系 [J]. *中华老年医学杂志*, 2013, 32 (5): 574–576. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2013.05.036.
Chen XY, Liu F, Liu YL. The relationship between osteoprotegerin and vascular calcification [J]. *Chin J Geriatr*, 2013, 32 (5): 574–576. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2013.05.036.
- [10] 杜玉英, 周晓辉. 骨保护素基因多态性及其血清浓度与人类相关疾病的研究进展 [J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2015, 9 (2): 295–299. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2015.02.026.
Du YY, Zhou XH. Research progress on gene polymorphism and the serum level of osteoprotegerin with the human diseases [J/CD]. *Chin J Clin (Electronic Edition)*, 2015, 9 (2): 295–299. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2015.02.026.
- [11] Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, et al. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 254 (3): 685–691. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2540685.x.
- [12] Nikpay M, Goel A, Won HH, et al. A comprehensive 1000 genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease [J]. *Nat Genet*, 2015, 47 (10): 1121–1130. DOI: 10.1038/ng.3396.
- [13] 洪慰麟, 郭新贵, 焦青萍, 等. 上海地区汉族人群护骨素基因 G1181C 多态性与冠状动脉性心脏病及其严重程度的相关性 [J]. *上海医学*, 2012, 35 (5): 420–424.
Hong WL, Guo XG, Jiao QP, et al. Correlation of osteoprotegerin gene G1181C polymorphisms with presence and severity of coronary artery disease in Chinese Han people in Shanghai [J]. *Shanghai Med J*, 2012, 35 (5): 420–424.
- [14] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. *Cell*, 1997, 89 (2): 309–319. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80209-3.
- [15] Lello S, Capozzi A, Scambia G. Osteoporosis and cardiovascular disease: an update [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31 (8): 590–594. DOI: 10.3109/09513590.2015.1041908.
- [16] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016, 8 (3): 227–241. DOI: 10.1002/wsbm.1331.
- [17] Montagnana M, Lippi G, Danese E, et al. The role of osteoprotegerin in cardiovascular disease [J]. *Ann Med*, 2013, 45 (3): 254–264. DOI: 10.3109/07853890.2012.727019.
- [18] Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204 (2): 321–329. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.033.
- [19] Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2002, 106 (10): 1192–1194. DOI: 10.1161/01.CIR.0000031524.49139.29.
- [20] Venuraju SM, Yerramasu A, Corder R, et al. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55 (19): 2049–2061. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.03.013.
- [21] Bjerre M, Hilden J, Kastrup J, et al. Osteoprotegerin independently predicts mortality in patients with stable coronary artery disease: the CLARICOR trial [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2014, 74 (8): 657–664. DOI: 10.3109/00365513.2014.930510.
- [22] Hosbond SE, Diederichsen AC, Saaby L, et al. Can osteoprotegerin be used to identify the presence and severity of coronary artery disease in different clinical settings? [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 236 (2): 230–236. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.07.013.
- [23] Raaz-Schrauder D, Schrauder MG, Stumpf C, et al. Plasma levels of sRANKL and OPG are associated with atherogenic cytokines in patients with intermediate cardiovascular risk [J]. *Heart Vessels*, 2017, 32 (11): 1304–1313. DOI: 10.1007/s00380-017-0998-z.
- [24] Lindberg S, Jensen JS, Hoffmann S, et al. Osteoprotegerin levels change during STEMI and reflect cardiac function [J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30 (12): 1523–1528. DOI: 10.1016/j.cjca.2014.08.015.
- [25] Fuernau G, Zaehring S, Eitel I, et al. Osteoprotegerin in ST-elevation myocardial infarction: prognostic impact and association with markers of myocardial damage by magnetic resonance imaging [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167 (5): 2134–2139. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.05.101.
- [26] Vik A, Mathiesen EB, Brox J, et al. Serum osteoprotegerin is a predictor for incident cardiovascular disease and mortality in a general population: the Tromsø study [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9 (4): 638–644. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04222.x.
- [27] Abedin M, Omland T, Ueland T, et al. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study) [J]. *Am J Cardiol*, 2007, 99 (4): 513–518. DOI: 10.1016/j.amjcard.2006.08.064.
- [28] Lindberg S, Jensen JS, Hoffmann S, et al. Osteoprotegerin levels change during STEMI and reflect cardiac function [J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30 (12): 1523–1528. DOI: 10.1016/j.cjca.2014.08.015.
- [29] Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, et al. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2010, 107 (4): 466–475. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.216846.
- [30] Nahidi L, Leach ST, Lemberg DA, et al. Osteoprotegerin exerts its pro-inflammatory effects through nuclear factor-κB activation [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58 (11): 3144–3155. DOI: 10.1007/s10620-013-2851-2.
- [31] Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK story [J]. *Gerontology*, 2015, 61 (6): 534–542. DOI: 10.1159/000371845.
- [32] Poornima IG, Mackey RH, Buhari AM, et al. Relationship between circulating serum osteoprotegerin and total receptor activator of nuclear κ-B ligand levels, triglycerides, and coronary calcification in postmenopausal women [J]. *Menopause*, 2014, 21 (7): 702–710. DOI: 10.1097/GME.0000000000000127.
- [33] Quercioli A, Montecucco F, Bertolotto M, et al. Coronary artery calcification and cardiovascular risk: the role of RANKL/OPG signalling [J]. *Eur J Clin Invest*, 2010, 40 (7): 645–654. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02308.x.
- [34] 王丽蕊, 李凌, 赵晓燕, 等. 血清骨保护素和可溶性核因子 κB 受体活化因子配体水平与急性冠状动脉综合征的相关性研究 [J]. *临床心血管病杂志*, 2010, 26 (9): 705–707. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1439.2010.09.020.
- [35] Wang LR, Li L, Zhao XY, et al. Relationship between serum OPG, sRANKL levels and severity of coronary artery lesion in patients with acute coronary syndrome [J]. *J Clin Cardiol*, 2010, 26 (9): 705–707. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1439.2010.09.020.
- [36] Kruzliak P, Berezin A, Kremzer A, et al. Global longitudinal strain and strain rate in type two diabetes patients with chronic heart failure: relevance to osteoprotegerin [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2016, 58 (3): 164–173. DOI: 10.1515/folmed-2016-0021.
- [37] Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and coronary artery disease in Japanese men [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187 (1): 215–217. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.03.026.
- [38] Jia P, Wu N, Jia D, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Balkan J Med Genet*, 2017, 20 (2): 27–34. DOI: 10.1515/bjmg-2017-0021.
- [39] Rhee EJ, Oh KW, Jung CH, et al. The relationship between four single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the osteoprotegerin gene and aortic calcification or coronary artery disease in Koreans [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2006, 64 (6): 689–697. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2006.02530.x.