

汉族人 CST3 单核苷酸多态性与冠心病、胱抑素 C 水平相关性研究

徐志强 黄少华 王 骏

【摘要】 目的:研究胱抑素 C 基因(CST3)-157 位点单核苷酸多态性(SNP)与冠心病及胱抑素 C(Cys C)水平的相关性。 方法:采用病例对照研究,入选因疑似冠心病入院的 282 例患者为研究对象,依据冠脉造影结果分为冠心病组($n=130$)及对照组($n=152$)。提取外周血白细胞基因组 DNA,应用巢式 PCR-直接测序技术检测 CST3 -157 位点 SNP,分析该位点的基因型分布及等位基因频率与冠心病、Cys C 水平的关系。 结果:汉族人群中 CST3 基因-157 位存在 G/C 突变,存在 GG、GC 和 CC 3 种基因型,GG 型为野生基因型,无论等位基因频率或者基因型分布在冠心病及对照组无明显差异,但野生基因型 Cys C 水平明显高于突变基因型。 结论:汉族人群中 CST3 基因-157 位基因多态性与冠心病发病无直接相关性,携带野生型者血 Cys C 水平较高。

【关键词】 胱抑素 C;单核苷酸多态性;冠心病

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.06.017

Relevance of serum cystatin C level and coronary heart disease with single nucleotide polymorphism of CST3 in Hans XU Zhiqiang, HUANG Shaohua, WANG Jun. Department of Cardiology, the Center Hospital of Jing'an District, Shanghai 200040, China

【Abstract】 Objective: To investigate the single nucleotide polymorphisms(SNP)at -157 site of the CST3 gene in Hans and to analyze its correlation with the cystatin C (Cys C) level and coronary atherosclerotic disease(CAD). **Methods:** A case-control study was conducted in 282 suspected CAD people who were divided into CAD group (130 cases) and controls (152 cases) according to the coronary angiography. The genomic DNA of leukocytes was extracted from venous blood and the nested PCR-Direct Sequencing technique was used to detect SNP at -157 site of CST3. Relationship between the genotype or allele distribution frequency and CAD or Cys C levels was analyzed. **Results:** There was G/C variation at -157 locus of CST3 in Hans (GG, GC and CC genotypes), however the allele frequency and genotype distribution were not significantly different from CAD patients and controls. Serum Cys C level in wild-type homozygous carriers was significantly higher than that in mutant carriers.

Conclusion: The study shows that among Han population, the SNP of CST3 gene at -157 has no direct correlation to CAD but is related to serum Cys C level.

【Key words】 Cystatin C; Single nucleotide polymorphisms; Coronary atherosclerotic disease

胱抑素 C(Cys C)是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族 2 中的成员之一,Cys C 基因(CST3)位于人类第 20 号染色体短臂 13 区 2 带,大约为 4.3 kb,包含 3 个外显子,2 个内含子。人类基因组有 99%是相

似的,而 1%的差异是造成个体多样性的原因,这 1%的差异主要来自于单核苷酸多态性(SNP)。欧洲人群的相关研究提示,冠心病的发生及预后与 CST3SNP 相关^[3]。然而基因多态性研究存在民族和种族的差异,本研究针对汉族人群,采用病例对照研究,应用巢式聚合酶链式反应(nested PCR)-直接测序的方法分析 CST3 基因启动子区域的 -157 位 SNP,探讨其与冠心病发病的相关性。

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目引导类(114119a9800);
上海市卫生和计划生育委员会科研课题资助项目(20114Y089)
作者单位:200040 上海市静安区中心医院心内科
通信作者:王 骏,Email:wangjun@medmail.com.cn

1 资料和方法

1.1 研究对象

选择本院 2012 年 4 月至 2013 年 4 月因疑似冠心病入院的 282 例患者作研究对象。入选患者按照冠脉造影结果分为冠心病组 ($n = 130$) 和对照组 ($n = 152$)。冠心病诊断依据冠状动脉造影结果,即至少 1 支主要冠状动脉狭窄 $\geq 70\%$ 。排除标准:无行为能力不能签署知情同意书、恶性肿瘤、自身免疫性疾病、造血系统疾病、严重慢性肝肾功能不全以及长期使用激素等。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血标本及临床资料采集 抽取肘静脉血 5 ml 置于 3.2% EDTA 抗凝管中待用。抗凝静脉血标本 30 min 内 3 kg 离心 10 min,收集上层血浆以每管 100 μ l 分装,置于 -80°C 冰箱备用。常规空腹检测血脂、肾功能等生化各项指标。记录年龄、性别、吸烟史、高血压、糖尿病、冠心病家族史、体质量指数、血脂异常病史等。血 Cys C 应用均相法-乳胶

比浊法检测。

1.2.2 基因组 DNA 提取及基因型测定 用小量血液基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒,按照使用说明书提取基因组 DNA -20°C 保存 2 周后 -80°C 保存备检。针对 CST3 启动子区设计 2 对引物:

CST3-FO: 5'GATGGATGGGGAAGGACAG 3'

CST3-Ri: 5'CGACGGCAAAGTCCAGTG3'

CST3-Fn: 5'GAGGTGGGAGGGACGAGGC3'

CST3-Rn: 5'ACACCCTCCTCCTCCACGCT 3'

PCR 反应体系的配制:模板 DNA 1 μ l,引物各 1 μ l, dNTP 各 1 μ l, Taq Buffer 5 μ l, 25 mmol/L MgCl_2 5 μ l, Taq 酶 5 U/ μ l 0.5 μ l 加水至 50 μ l。

反应条件: 95°C 预变性 3 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 35 s, 72°C 延伸 30 s, 72°C 修复延伸 5 min, 循环 25 次;再以 PCR 产物 0.2 μ l 为模板,更换第 2 轮引物在相同条件下循环 35 次。PCR 产物长度 346 bp, PCR 纯化产物交上海生工公司直接测序。如果检测位点为纯合则只出现 1 个单峰,如果是杂合则会出现双峰,据此鉴别基因型(见图 1)。

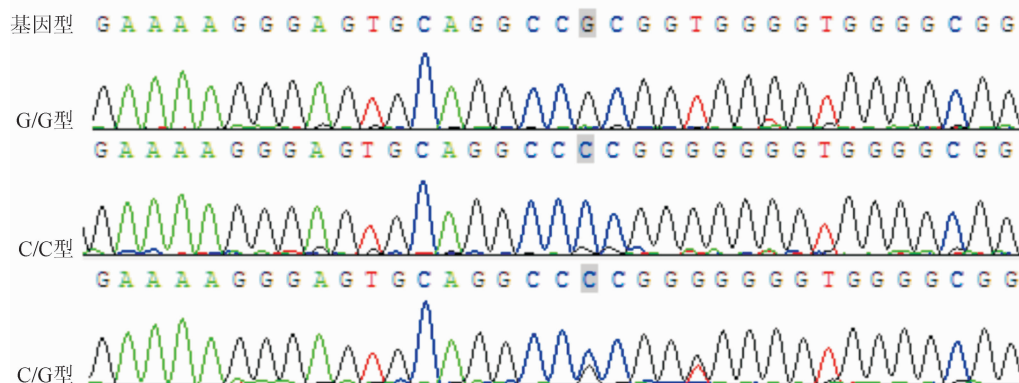


图 1 基因型鉴定

1.3 统计学方法

用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验, Cys C 水平与基因型关系应用单因素方差分析 (ANVOA)。计数资料用百分率表示,组间比较用卡方检验;用 Haploview 4.2 软件分析 Hardy-Weinberg 平衡,等位基因及基因型分布用率表示,采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学显著性差异。

2 研究结果

2.1 一般临床资料

冠心病组男性、糖尿病所占比例高于对照组,两组体质量指数、年龄、肾小球滤过率估算值

(eGFR)、高血压病史、冠心病家族史、吸烟、血脂等情况均无明显差异。

2.2 CST3 基因多态性和冠心病的关系

在所有人人群中检测到 CST3 基因启动子区 -157 位点存在 2 种等位基因 G 和 C,等位基因频率为 0.836 和 0.164,存在 3 种基因型:GG 为野生型,GC 和 CC 为突变型(见图 1),基因频率分别为 0.704、0.264 和 0.032。CST3 -157 位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P = 0.68, \chi^2 = 0.17$),说明群体基因遗传平衡,数据来自同一孟德尔群体。各组中基因分布与整体人群相当, CST3 基因启动子区 -157 位突变型携带者和 C 等位基因在冠心病组小于对照组,但这种差异无统计学意义(见表 1)。

表 1 CST3 -157 位基因型和等位基因频率(%)

分组	基因型			等位基因	
	GG	GC	CC	G	C
冠心病组	73.9	22.3	3.8	89.0	11.0
对照组	63.8	34.2	2.0	81.7	18.3
χ^2 值	2.145			0.481	
P 值	0.342			0.301	

2.3 基因型对血 Cys C 水平的影响

对照组中 CST3 - 157 位点 GG 基因型携带者血 Cys C 水平明显高于 GC 型和 CC 型, 差异有显著性 ($P<0.05$), 但在冠心病组未发现这种差异(见表 2)。

表 2 CST3-157 位点不同基因型携带者的 Cys C 水平(mg/L)

组别	GG	GC	CC	P 值
冠心病组	0.78 ± 0.11	0.81 ± 0.16	0.76 ± 0.09	0.21
对照组	1.03 ± 0.32	0.90 ± 0.25	0.81 ± 0.10	0.03

3 讨论

冠心病是由复杂的、多种易患基因与一系列环境因素相互作用所致^[1-2]。炎症参与了冠状动脉粥样硬化的发生与发展, 发病机制涉及细胞外基质 (ECM) 降解与血管壁重构。Cys C 是由 122 个氨基酸组成的低分子量非糖基化蛋白质, 恒定表达于所有的有核细胞, 调节半胱氨酸蛋白酶活性, 参与 ECM 的产生和降解的动态平衡, Cys C 及其片段还可能影响了粒细胞的吞噬与趋化功能, 参与炎症过程。

本研究针对汉族人群采用 PCR-直接测序的方法对 CST3 基因启动子区域 - 157 位点 SNP 多态性与冠心病发生的相关性进行了初步探索。本研究中 CST3 - 157 位点存在 SNP, 其中突变型基因 (G/C + C/C) 携带者 Cys C 水平明显低于野生型基因 (G/G), 这与既往国外的研究结果^[3]类似。基因发生突变可能引起 Cys C 的合成和分泌量降低, 对组织蛋白酶等活性的抑制功能也可能减弱, 大量的淀粉样物质积聚于体内, 导致冠状动脉粥样硬化及冠心病的发生。国内外诸多的研究者认为 Cys C 与冠心病的发生及预后密切相关^[4-6]。因此, 我们认为 CST3 基因启动子区域 - 157 位点 SNP 通过影响血 Cys C 浓度的表达进一步参与冠心病的发生, 并可能影响其预后。然而基因型对 Cys C 水平的影响在冠心病组并未得到体现。有研究发现急性冠脉综合征包括 ST 段抬高型心肌梗死患者 Cys C 水平在发病急性期明显低于其基线水平^[7-8]。因此, 冠心病分组及测定不同阶段 Cys C 水平对研究结果有决定性的影响, 本研究仅检测了患者入院即刻的 Cys C

水平, 可能对结果有影响。另外, 入选对象为疑似冠心病患者, 缺少健康人群该位点的基因资料, 代表性欠佳, 亟需在后续的研究中补充相关内容。冠心病多位点突变的基因连锁不平衡分析, 可能是我们以后该领域研究的研究重点, 同时实验设计之初应充分注意到测定不同阶段的 Cys C 水平及冠心病亚组分组对研究结果的影响。

本研究发现 CST3 - 157 位点等位基因频率和基因型分布均与冠心病的发生无直接相关性。这与既往欧洲人群的研究不一致^[3]。然而, 冠心病是多基因疾病^[9], 基因与环境, 基因与基因之间的相互作用势必会对研究结果造成影响, 同时还应综合考虑人种、民族、地域差异的影响及样本量、样本构成、研究方法等方面因素, 故此结论尚有待证实。

参 考 文 献

[1] 高磊, 高大胜. CFHY402H 基因与冠心病的相关性研究[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(1):19-21.

[2] 胡雪婷, 彭瑜, 张钰. 血栓调节蛋白基因多态性和血浆水平与冠心病的相关性[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(5):282-284.

[3] Eriksson P, Deguchi H, Samnegård A, et al. Human evidence that the cystatin C gene is implicated in focal progression of coronary artery disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(3):551-557.

[4] Ferraro S, Marano G, Biganzoli EM, et al. Prognostic value of cystatin C in acute coronary syndromes: enhancer of atherosclerosis and promising therapeutic target[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(9):1397-1404.

[5] Manzano-Fernández S, López-Cuenca A, Januzzi JL, et al. Usefulness of β -trace protein and cystatin C for the prediction of mortality in non ST segment elevation acute coronary syndromes[J]. Am J Cardiol, 2012, 110(9):1240-1248.

[6] 张瑾, 李勇, 李剑, 等. Cystain C/组织蛋白酶在动脉粥样硬化中的作用机制及冠心病流行病学研究[J]. 国际心血管病杂志, 2009, 36(5):264-266.

[7] De Servi S, Mariani G, Piatti L, et al. Time course changes of cystatin C and inflammatory and biochemical markers in non-ST-elevation acute coronary syndromes[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2014, 15(1):42-47.

[8] Noto D, Cefalu' AB, Barbagallo CM, et al. Cystatin C levels are decreased in acute myocardial infarction: effect of cystatin C G73A gene polymorphism on plasma levels[J]. Int J Cardiol, 2005, 101(2):213-217.

[9] 姜衡, 刘兵, 李涛, 等. 冠心病基因多态性研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2011, 38(2):75-78.

(收稿:2014-07-08 修回:2014-08-05)
(本文编辑:丁媛媛)