

· 论 著 ·

东莞汉族人 PCSK9 基因 SNP 与冠心病及其预后关系探讨*

莫玉前, 李伟其, 钟盈如, 张晓明

(东莞市人民医院检验科, 广东东莞 523000)

摘要:目的 探讨东莞汉族人 PCSK9 基因 E670G 位点 SNP 与冠心病(CAD)及其预后的关系。方法 选择在该院 CAD 患者 100 例及非 CAD 患者 100 例为研究对象, 取患者血液, 提取 DNA 并采用 PCR 法分析 PCSK9 基因 E670G 位点 SNP, 并采用基因测序法验证。采用酶法检测患者血脂水平, 并随访 CAD 患者采用他汀类治疗后血清脂质水平的变化、心血管事件发生率。

结果 冠心病(CAD)组血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平显著高于健康对照组, HDL-C 显著低于健康对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。基因型主要为 AA 即 298 bp 和 152 bp 的纯合子, 其次为 AG 即 450 bp 和 298 bp、152 bp 的杂合子, 尚未检测到 450 bp GG 纯合子基因型, 等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。CAD 组患者 AA 基因型的患者 LDL-C 水平显著低于 AG 基因型, HDL-C 水平显著高于 AG 基因型的患者($P < 0.05$)。随访半年发生心血管的例数总共为 27 例, AA 基因型占 66.7%, AG 基因型占 33.3%, G 等位基因携带者心血管事件例数和平均病变支数差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 PCSK9 基因 E670G 多态性与 LDL-C、HDL-C 水平及 CAD 病变程度相关, CAD 患者中 G 等位基因的携带可能增加发病概率和再发病风险。

关键词:PCSK9 基因; 单核苷酸多态性; 冠心病; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)12-1725-03

Dongguan Han patients with coronary artery PCSK9 gene SNP and its prognosis*

Mo Yuqian, Li Weiqi, Zhong Yuru, Zhang Xiaoming

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Dongguan City, Dongguan, Guangdong 523000, China)

Abstract: Objective To investigate the gene E670G SNP loci with coronary heart disease and its relationship Dongguan Han PCSK9 prognosis. **Methods** In our hospital 100 patients with coronary heart disease and 100 cases of non-coronary heart disease patients for the study, patients taking blood, DNA was extracted and analyzed gene PCSK9 E670G SNP locus by PCR, using gene sequencing validation. Lipid levels in patients using enzymatic detection and follow-up of patients with coronary heart disease changes in serum lipid levels after statin therapy, the incidence of cardiovascular events. **Results** CAD group TC, LDL-C levels were significantly higher than the healthy control group, HDL-C was significantly lower than the healthy control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). AA genotype that was mainly 298 bp and 152 bp of homozygotes, followed by AG that was 450 bp and 298 bp, 152 bp heterozygotes, had not been detected 450 bp GG homozygous genotype, allele frequency distributions in Hardy-Weinberg equilibrium. LDL-C levels in patients with CAD patients was significantly lower than AA genotype AG genotype, HDL-C levels were significantly higher in patients with AG genotype($P < 0.05$). Number of cardiovascular patients were followed up six months totaled 27 cases, AA genotype accounted for 66.7%, AG genotype accounted for 33.3%, G allele and the average number of cases of cardiovascular disease events count a statistically significant difference($P < 0.05$). **Conclusion** PCSK9 E670G polymorphism and LDL-C, HDL-C levels and CAD severity gene-related, CAD patients carrying G allele may increase the risk of disease and the risk of again.

Key words:PCSK9 gene; single nucleotide polymorphism; coronary heart disease; prognosis

冠心病(CAD)是临床常见的血管疾病, 其发生发展与患者遗传背景、生活方式及环境有着密切关系, 近年来我国的 CAD 患者呈上升趋势^[1]。血脂水平是影响 CAD 发病率和病死率的重要因素, PCSK9 基因的突变引起患者发生高胆固醇血症或低胆固醇血症。E670G 位点是 PCSK9 基因外显子 12, 它的突变可导致血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平的升高, 而以降脂为目的使用他汀类药时, PCSK9 呈浓度依赖性表达上调^[2]。因此追踪随访 CAD 患者在他汀类药物治疗后的血清脂质水平、心血管事件发生率, 有助于揭示 PCSK9 基因 SNP 位点与 CAD 及其预后的关系。本研究通过病例-对照, 分析、比较 PCSK9 基因 E670G 多态性位点在 CAD 患者和健康对照人群中的分布特点, 及其与 PCSK9 血清学水平、血脂水平、CAD 发生、病变程度的关系, 追踪随访 CAD 患者采用他汀

类治疗后血清脂质水平的变化、心血管事件发生率, 探讨 E670G 多态性位点与 CAD 预后的关系和对他汀类药物疗效的影响; 以期揭示 PCSK9 基因 E670G 多态性位点与 CAD 及其预后的关系, 为阐明 CAD 的遗传发病机理提供资料, 为患者危险性分层评估、个性化药物治疗方案制定等提供实验依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院心血管内科住院部就诊的 CAD 患者 100 例为研究对象作为 CAD 组, 男 58 例, 女 42 例, 年龄(56.4 ± 11.7)岁。另选取本院体检中心体检人群非 CAD 患者 100 例作为健康对照组, 男 56 例, 女 44 例, 年龄(54.7 ± 10.2)岁。纳入标准: 广东东莞汉族人, 无血缘关系。CAD 组有胸痛症状, 心电图 ST-T 改变, 冠脉造影显示左主干、左前降支、左

* 基金项目: 东莞市科技局课题(201410515000088)。作者简介: 莫玉前, 女, 主管技师, 主要从事医学检验研究。

回旋支及右冠状动脉中,至少有一支血管狭窄大于或等于50%。健康对照组经询问病史、体检及心电图、胸部X射线片等检查排除心血管疾病历史;无糖尿病、肝肾疾病以及其他内分泌异常疾病。剔除标准为在实验过程中未能扩增出相应基因片段的个体。

1.2 仪器与试剂 DNA提取试剂盒、TaqDNA聚合酶,dNTP、琼脂糖等购于北京博凌科为生物科技有限公司。凝胶电泳仪、凝胶成像分析仪、PCR分析仪(Bio-Rad公司);AU400全自动生化分析仪(奥林巴斯公司);离心机、恒温水浴锅、移液器等。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集CHD患者和健康对照组空腹外周静脉血,离心分离,吸取血细胞500 μL、血清1 000 μL于EP管,于-80℃保存。CAD患者血样本于冠状动脉造影当天收集,健康人群血液标本于体检当天收集。

1.3.2 生化指标测定 采集样本当天完成肝功、血脂等项目测定。血清总胆固醇(TC)、血清三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、LDL-C采用酶法检测实际。

1.3.3 外周血DNA提取 取血液标本,用相关试剂盒进行外周血单核细胞基因组DNA提取,琼脂糖凝胶电泳测定DNA浓度,并标准化DNA浓度至0.05 μg/μL,-4℃冰箱保存备用。

1.3.4 引物设计 针对多态性位点E670G所在12外显子序列设计引物,引物的Tm值设定在57~65℃,扩增片度为300~800 bp。引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。引物序列:正向(5'→3')GAG ATA CAC GGT TGT GTC CCA A,反向(3'→5')TGA GAG AGG GAC AAG TCG GAA。

1.3.5 PCR扩增及电泳 PCR反应总体积为30 μL,其中模板3 μL,Ex Taq15 μL,上游引物3 μL,下游引物3 μL,双蒸水6 μL。PCR扩增条件为:热启动,94℃预变性5 min,以下列温度和时间循环35次:94℃变性30 s,57~65℃退火30 s,72℃延伸45 s。末次循环后均于72℃延伸5 min,4℃保存。取5 μL扩增产物和1 μL 10×Loading Buffer于0.5 mg/L溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中100 V电泳,GD-1000凝胶成像仪中观察DNA条带、拍照、记录。

1.3.6 RFLP分析及序列测定 酶切反应体系含PCR产物10 μL,0.2 U限制性核酸内切酶Ear 1,2.5 μL 10×缓冲液,灭菌去离子水7.3 μL,37℃水浴过夜。取酶切产物10 μL于1.5%琼脂糖凝胶点样,90 V电泳20 min,胶成像分析仪观察、拍照。基因分型:经酶切后得到298 bp和152 bpDNA片段(A等位基因),450 bpDNA片段(G等位基因)。PCR产物经酶纯化后,送至上海英潍捷基贸易有限公司进行双向测序反应,找出变异位点并验证酶切结果。

1.3.7 出院后随访半年 追踪随访CAD患者在他汀类药物治疗后心血管事件发生状况,记录出院半年后心血管事件发生率。

1.4 统计学处理 所有数据采用SPSS17.0软件进行处理分析,计量资料采用t检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验,CAD组各基因型血脂水平、年龄、病变支数、出院后心血管事件差异的显著性用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组血脂水平 CAD组TC、LDL-C水平显著高于健康对照组,HDL-C显著低于健康对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 两组血脂水平比较(mmol/L)

组别	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
CAD组	100	5.03±0.91	1.05±0.73	2.96±0.81	1.35±0.46
健康对照组	100	4.62±1.03*	1.14±0.87	1.65±0.79*	2.11±0.71*

*: $P < 0.05$,与CAD组比较。

2.2 PCSK9基因和E670G等位基因频率和基因型频率 酶切后基因分型存在两种多态:298 bp和152 bpDNA片段(A等位基因),450 bpDNA片段(G等位基因),基因型主要为AA即298 bp和152 bp的纯合子,其次为AG即450 bp和298 bp、152 bp的杂合子,尚未检测到450 bpGG纯合子基因型。HWE软件进行吻合度检验,等位基因频率分布符合Hardy-Weinberg平衡。见表2。

表2 PCSK9基因和E670G等位基因频率和基因型频率

组别	n	等位基因频率(%)		基因型频率(%)	
		A	G	AA	AG
CAD组	100	92.81	7.19	87.12	12.88
健康对照组	100	95.12	4.88	91.53	8.47

2.3 PCSK9基因E670G位点测序验证 PCR扩增产物经酶纯化后测序,结果与GeeneBank中dbSNP数据库对比,如图1所示(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),箭头即为A→G多态位点的转换。

2.4 CAD组PCSK9基因E670G基因型血脂水平 CAD组患者AA与AG基因型TC、TG水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),AA基因型的患者LDL-C水平显著低于AG基因型,HDL-C水平显著高于AG基因型的患者($P < 0.05$)。见表3。

表3 CAD组PCSK9基因E670G基因型血脂水平比较(mmol/L)

基因型	TC	TG	LDL-C	HDL-C
AA	4.48±0.81	0.97±0.58	2.12±0.72	1.49±0.47
AG	4.56±0.97	1.05±0.89	3.01±0.83*	0.97±0.73*

*: $P < 0.05$,与AA基因型比较。

2.5 PCSK9基因E670G基因型与CAD预后关系 随访CAD患者在他汀类药物治疗后心血管事件发生状况,半年内发生心血管的例数总共为27例,AA基因型占66.7%,AG基因型占33.3%,未发生心血管事件G基因携带频率为17.8%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。用Logistic回归分析对CAD组各基因型血脂水平、年龄、病变支数、出院后心血管事件发生等因素校正,G等位基因携带者心血管事件例数和平均病变支数差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表4 PCSK9基因E670G基因型与CAD预后关系

基因型	心血管事件 [n(%)]	无心血管事件 [n(%)]	平均年龄 (岁)	平均病变支数 (n)
AA	18(66.7)	60(82.2)	65.3±8.9	1.8
AG	9(33.3)*	13(17.8)*	64.7±7.4	2.3*

*: $P < 0.05$,与AA基因型比较。

3 讨 论

CAD是临床常见的心血管疾病,其发生发展与患者遗传

背景、生活方式及环境有着密切关系,是一种较复杂的遗传性疾病,血脂水平是影响 CAD 发病率和病死率的重要因素,有研究报道 PCSK9 基因即前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 基因可影响血清胆固醇水平,PCSK9 基因的突变引起患者发生高胆固醇血症或低胆固醇血症^[3-4]。PCSK9 不同部位碱基突变形式多样,具单核苷酸多态性(SNP)^[5],E670G 位点是 PCSK9 基因外显子 12,它的突变可导致血清 LDL-C 水平的升高,并于冠状动脉粥样硬化的严重程度密切相关,是 LDL-C 水平和冠状动脉粥样硬化严重程度的基因标志物。而以降脂为目的使用他汀类药时,PCSK9 呈浓度依赖性表达上调^[6-7]。PCSK9 已成为 CAD 研究的候选基因,对阐述 CAD 的发生发展机制提供新的途径。有研究报道,人血清中 PCSK9 浓度在 33~2 988 ng/mL,平均水平在 487 ng/mL^[8]。他汀类药物是目前临床应用较为广泛的一类调脂药^[9],其作用机制为抑制肝脏胆固醇合成中的 HMG-CoA 还原酶活性,显著降低 LDL-C 发挥降脂作用,他汀类药物的不良反应主要是肌病和肝酶升高。目前,国内学者开始研究 PCSK9 基因,有关 PCSK9 基因 SNP 位点筛选、PCSK9 基因 SNP 与 CAD 及其预后关系的研究虽然有相关报道,但未有明确结论。

本实验对东莞汉族人 PCSK9 基因 E670G 多态性与 CAD 及其预后的关系进行研究,分析、比较 PCSK9 基因 E670G 多态性位点在 CAD 患者和健康对照人群中的分布特点,及其与 PCSK9 血清水平、血脂水平、CAD 发生、病变程度的关系。结果发现酶切后基因分型存在两种多态:298 bp 和 152 bp-DNA 片段(A 等位基因),450 bpDNA 片段(G 等位基因),基因型主要为 AA 即 298 bp 和 152 bp 的纯合子,其次为 AG 即 450 bp 和 298 bp/152 bp 的杂合子,尚未检测到 450 bpGG 纯合子基因型。东莞地区汉族人 CAD 患者基因型频率和等位基因频率差异不显著,CAD 组整体 TC、LDL-C 水平显著高于健康对照组,HDL-C 显著低于健康对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但 AA 基因型的 CAD 患者 LDL-C 水平显著低于 AG 基因型,HDL-C 水平显著高于 AG 基因型的患者($P < 0.05$),TC、TG 水平相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。可见 PCSK9 基因 E670G 多态性与 HDL-C 和 LDL-C 水平关系密切,与 CAD 病变程度具有一定相关性。但也有研究报道 G 等位基因携带者有降低 LDL-C 水平趋势^[10],其机制可能与 E670G 与 PCSK9 基因或邻近区域未知功能改变的不平衡连锁造成,也可能与不同种族环境下,其他因素影响作用。随访 CAD 患者在他汀类药物治疗后心血管事件发生状况,半年内发生心血管的例数总共为 27 例,AA 基因型占 66.7%,AG 基

因型占 33.3%,心血管事件例数和平均病变支数差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,东莞地区汉族人群 PCSK9 基因 E670G 多态性是 CAD 发病率的危险因素之一,CAD 患者中 G 等位基因的携带可能增加发病概率和再发病风险,这可为患者危险性分层评估、个性化药物治疗方案制定等提供临床参考。

参考文献

- [1] 莫玉前,钟孟如,郭志勤. 东莞汉族人 PCSK9 基因 SNP 与冠心病及其预后关系研究[J]. 现代诊断与治疗, 2014, 25(8): 1883-1884.
- [2] 孟艳辉,刘忠民. 广东汉族人 PCSK9 基因 E670G 位点多态性与冠心病相关性研究[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(2): 137-138.
- [3] 曾剑,刘英,曾智,等. PCSK9 基因单核苷酸多态性与冠心病的关联研究[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(21): 3202-3203.
- [4] 唐志晗,任重,武春艳,等. PCSK9-siRNA 在抗 oxLDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡中对 Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(1): 29-33.
- [5] 杜伟南,孙红霞,方福德. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(4): 392-394.
- [6] 沈莉,赵水平. 降脂新药 PCSK9 抑制剂研究现状[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(7): 607-608.
- [7] Dubuc G, Chamberland A, Wasef H, et al. Statins upregulate PCK9, the gene encoding the Proprotein convertase neural apoptosisregulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(8): 1454-1459.
- [8] Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, et al. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(7): 2537-2543.
- [9] 吴娜琼. 2011 美国国家脂质协会成人家族性高胆固醇血症患者管理建议解读[J]. 中国医学前沿杂志:电子版, 2012, 4(2): 48-54.
- [10] Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closet family members VLDLR and ApoER2[J]. J Biol Chem, 2008, 283(1): 2363-2372.

(收稿日期:2015-03-08)



(上接第 1724 页)

- [6] 朱启波,童南伟. 2011 年美国内分泌医师协会糖尿病临床实践指南解读[J]. 中国医学前沿杂志:电子版, 2011, 3(4): 3-8.
- [7] Bhavsar NA, Appel LJ, Kusek JW, et al. Comparison of measured GFR, serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein to predict ESRD in African Americans with hypertensive CKD[J]. Am J Kidney Dis, 2011, 58(1): 886-893.
- [8] 杨术生,周丹秋. 血清胱抑素 c 在急性肾盂肾炎中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2403-2404.
- [9] Peralta CA, Katz R, Sarnak MJ, et al. Cystatin C identifies chronic kidney disease patients at higher risk for complications[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1): 147-155.
- [10] Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, et al. Estimating glomerular

filtration rate from serum creatinine and cystatin C[J]. N Engl J Med, 2012, 367(1): 20-29.

- [11] Stevens PE, Levin A. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline[J]. Ann Intern Med, 2013, 158(1): 825-830.
- [12] 王伟,马黎丽,王卫国. 胱抑素 C 与尿微量清蛋白在Ⅱ型糖尿病早期肾损害中的临床应用[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(10): 1666-1668.

(收稿日期:2015-03-18)