

• 论 著 •

ER α 基因 Pvu II、Xba I 和 ER β 基因 Rsa I、Alu I 酶切多态性与冠心病的相关性研究*

吴 芹, 马桂芳, 孙金霞, 宋祥和, 杨留才, 李仕红, 丁凤云 Δ

(江苏医药职业学院医学技术学院, 江苏盐城 224005)

摘要:目的 研究盐城地区雌激素受体 α (ER α) 基因 Pvu II、Xba I 和雌激素受体 β (ER β) Rsa I、Alu I 酶切多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)危险因素的相关性。方法 选取 124 例 CHD 患者和 163 例健康体检者分别作为 CHD 组和对照组, 采用酶法测定三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC), 采用直接法测定高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL), 采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性方法分析两组 ER α 基因 Pvu II、Xba I 和 ER β 基因 Rsa I、Alu I 酶切多态性。结果 CHD 组有吸烟史、有家族史、合并高血压及糖尿病的比率, 以及体质量指数、TC、TG、LDL-C 水平均明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 男女之间各指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组 ER α 基因 Pvu II、Xba I 和 ER β 基因 Rsa I、Alu I 基因频率分布与理论分布无差别, 均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 具有群体代表性。CHD 组中, pp、xx、RR、AA 基因型最多, PP、XX、rr、aa 基因型最少; 对照组中, Pp、xx、RR、AA 基因型最多, PP、XX、rr、aa 基因型最少。CHD 组 p、x 基因分布频率明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 雌激素基因多态性可能是一个有效的治疗 CHD 的靶点, p、x 基因分布频率可能与 CHD 危险因素相关。

关键词: 雌激素受体; 冠心病; 基因多态性; 等位基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)22-3116-04

Study on correlation between ER α gene Pvu II, Xba I and ER β gene Rsa I, Alu I digestion polymorphism with coronary heart disease*

WU Qin, MA Guifang, SUN Jinxia, SONG Xianghe, YANG Liucui, LI Shihong, DING Fengyun Δ

(Medical Technology College, Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng, Jiangsu 224005, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation of ER α gene Pvu II, Xba I and ER β gene Rsa I, Alu I digestion polymorphism with coronary atherosclerotic heart disease(CHD) risk factors in Yancheng area. Methods A total of 124 cases of CHD and 163 persons undergoing physical examination served as the CHD group and CON group. The enzyme method was adopted to detect TG and TC. The direction method was adopted to detect HDL and LDL. ER α gene Pvu II, Xba I and ER β gene Rsa I, Alu I digestion polymorphisms were detected by adopting RFLP-PCR. Results The ratios of smoking history, family history, complicating hypertension and diabetes, and the level of body mass index, TC, TG and LDL-C in the CHD group were significantly higher than those in the control group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The various indicators had no statistically difference between male and female($P > 0.05$). The frequency distribution and geographic distribution of ER α gene Pvu II, Xba I and ER β gene Rsa I, Alu I digestion polymorphisms had no difference between the two groups, all conformed to Hardy-Weinberg genetic equilibrium and had the group representativeness. pp, xx, RR and AA genotypes in the CHD group were maximal, while PP, XX, rr and aa genotypes were minimal; Pp, xx, RR and AA genotypes in the CON group were maximal, while PP, XX, rr and aa genotypes were minimal. The distribution frequency of p and x genes in the CHD group was significantly higher than that in the control group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). Conclusion The estrogen gene polymorphism might be a target spot for effectively treating CHD, and p and x gene distribution frequency may be related with CHD risk factors.

Key words: estrogen receptor; coronary heart disease; gene polymorphisms; allele

冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)简称冠心病, 与年龄、性别、家族史、血脂异常、高血压、糖尿病、体质量等多种因素有关。在多种诱因作用下, 冠状动脉内膜上的脂质沉着并形成白色斑块, 斑块的增多会使动脉管腔变狭窄、血流受阻, 从而导致心肌缺血和心绞痛。本课题组已研究表明, 雌激素通过雌激素受体(ER)发挥保护缺血性心脏病的作用^[1]。介导雌激素基因型效应的经典核受体有雌激素受体 α (ER α) 和雌激素受体 β (ER β), ER α 、ER β 基因可分别在限制性内切酶 Pvu II、Xba I 和 Rsa I、Alu I 的酶切位点上发生点突变, 形成基因多态性。

笔者曾综述过 ER α 、ER β 基因多态性与 CHD 的相关性研究进展^[2], 盐城地区 ER α 、ER β 基因与 CHD 危险因素相关性的研究尚未见报道。本研究通过调查盐城地区冠心病危险因素, 分析雌激素受体基因多态性与 CHD 相关性, 为长江中下游苏北沿海城市汉族人群 CHD 的早期预防和干预提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014—2017 年盐城市 3 级医院心内科确诊的 CHD 患者 124 例作为 CHD 组, 其中男 66 例, 女 58 例, 年龄 40~80 岁。同时选取健康体检者 163 例作为对照组, 其

* 基金项目: 盐城市医学科技发展计划项目(YK2013054)。

作者简介: 吴芹, 女, 副教授, 主要从事心血管功能调控研究。 Δ 通信作者, E-mail: dingfengyun01@aliyun.com。

中男 92 例,女 71 例,年龄 40~80 岁。研究对象均为盐城本地汉族成人,无血缘关系,排除严重肝、肾疾病患者。

1.2 方法

1.2.1 体格检查 测量研究对象清晨空腹身高、血压、体质量指数(BMI)。

1.2.2 血清生化指标检测 研究对象隔夜禁食 10 h,于清晨 7:30—8:30 安静状态下坐位采集肘静脉血,使用 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝剂 9:1 抗凝,3 000 r/min 低温离心机离心 10 min,吸取上清液,血清或血浆放入-70 ℃超低温冰箱内保存待测。标本分离过程在取血后 2 h 内完成。采用酶法测定三酰甘油(TG)和胆固醇(TC),采用直接法测定高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL),以上测定均在全自动生化分析仪上进行。

1.2.3 聚合酶链反应(PCR)扩增 采集外周静脉血,用标准方案提取基因组 DNA,应用聚合酶链反应-限制片断长度多态性方法分析两组 ER α 基因 Pvu II、Xba I 和 ER β 基因 Rsa I、Alu I 酶切多态性。ER α 的引物序列为:上游 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3',下游 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'。Xba I 多态性位点位于距 Pvu II 多态性位点 50 bp 处。特异性扩增 ER α 基因使用上述引物对包含第 1 内含子和第 2 外显子的一部分片断进行扩增,产物片段 1.3 kb。分别使用 Pvu II、Xba I 内切酶酶切、琼脂糖凝胶电泳可区分不同基因型。Rsa I 的引物序列为:上游 5'-TCT TGC TTT CCC CAG GCT TT-3',下游 5'-ACC TGT CCA GAA CAA GAT CT-3'。特异性扩增 ER β 基因第 5 外显子的配体结合区的一部分,产物片段 156 bp。Alu I 的引物序列为:上游 5'-GAC CTG CTG CTG GAG ATG CT-3',下游 5'-AAT GAG GGA CCA CAG CA-3'。特异性扩增 ER β 基因第 8 外显子的 3'非编码区的一部分,产物片段 307 bp。反应体系为 50 μ L(含 200 μ mol/L 10 $\times$ Buffer,200 μ mol/L 脱氧核苷三磷酸,0.4 μ mol/L 引物,0.1 μ g 模板 DNA),于热循环仪(PTC-220PCR 扩增仪)中 95 ℃预变性 5 min,再加入 Taq DNA 聚合酶 1.5 IU,按下列程序循环 35 次:94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 45 s。末次循环后,72 ℃再延伸 10 min。

1.2.4 扩增产物限制性酶切 取 PCR 扩增产物 10 μ L,分别用 12 IU Pvu II、20 IU Xba I、10 IU Rsa I、8 IU Alu I 于 37 ℃酶切 3 h。反应终止后产物经 2%琼脂糖凝胶电泳(制胶过程中已加入溴化乙锭),以 DNA 片段长度标准物为参考,紫外灯下观察结果。ER α 基因型判定参照文献[3],使用 Pvu II 酶切可区分出 PP 基因型(1.3 kb 大小的一条带)、Pp 基因型(850 bp、450 bp、1.3 kb 大小的三条带)、pp 基因型(850 bp、450 bp 大小的两条带),使用 Xba I 酶切可区分出 XX 基因型(1.3 kb 大小的一条带)、Xx 基因型(1.3 kb、910 bp、390 bp 大小的三条带)、xx 基因型(910 bp、390 bp 大小的两条带),以上大写字母均表示存在点突变而该酶切位点消失,小写字母表示

存在该酶切位点。ER β 基因型判定参照文献[4],使用 Rsa I 酶切可区分出 rr 基因型(156 bp 大小的一条带)、Rr 基因型(156 bp、125 bp、31 bp 大小的三条带)、RR 基因型(125 bp、31 bp 大小的两条带),使用 Alu I 酶切可区分出 aa 基因型(307 bp 大小的一条带)、Aa 基因型(307 bp、240 bp、67 bp 大小的三条带)、AA 基因型(240 bp、67 bp 大小的两条带),以上大写字母均表示存在点突变而出现该酶切位点,小写字母表示不存在该酶切位点。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism5.0 软件进行分析;计数资料以频数或百分率表示,研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,ER α 、ER β 基因型与 CHD 危险因素比较采用方差分析;CHD 与相关因素的综合分析采用 Logistic 逐步回归分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组临床资料比较 两组年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$),具有一定的可比性。CHD 组有吸烟史、有家族史、合并高血压及糖尿病的比率明显高于对照组,BMI、TC、TG、LDL-C 水平均明显高于对照组,而 HDL-C 水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。男女之间各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 两组临床资料比较($\bar{x}\pm s$)

项目	CHD 组		对照组	
	男($n=66$)	女($n=58$)	男($n=92$)	女($n=71$)
年龄(岁)	61.2 $\pm$ 2.1	60.8 $\pm$ 3.4	60.4 $\pm$ 3.2	62.1 $\pm$ 5.1
有吸烟史(%)	30.3*	19.0*	15.2	8.5
有家族史(%)	18.2*	17.2*	2.2	2.8
绝经后期(%)	—	48.3	—	45.1
BMI(kg/m ²)	26.8 $\pm$ 3.9*	25.6 $\pm$ 2.2*	21.8 $\pm$ 1.9	22.4 $\pm$ 3.5
合并高血压(%)	28.8*	27.6*	16.3	15.5
合并糖尿病(%)	15.2*	12.1*	4.3	5.6
TC(mmol/L)	6.0 $\pm$ 1.4*	5.8 $\pm$ 1.2*	4.3 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 0.6
TG(mmol/L)	3.2 $\pm$ 0.6*	2.9 $\pm$ 0.8*	1.5 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.4
HDL-C(mmol/L)	0.9 $\pm$ 0.5*	1.0 $\pm$ 0.3*	1.4 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.3
LDL-C(mmol/L)	3.4 $\pm$ 0.7*	3.6 $\pm$ 1.1*	2.1 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.6

注:与对照组组中同性别组比较,* $P<0.05$;—表示无数据。

2.2 ER α 基因 Pvu II、Xba I 和 ER β 基因 Rsa I、Alu I 酶切多态性比较 两组 ER α 基因 Pvu II、Xba I 和 ER β 基因 Rsa I、Alu I 基因频率分布与理论分布无差别,均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,具有群体代表性。CHD 组中 pp、xx、RR、AA 基因型最多,PP、XX、rr、aa 基因型最少;对照组中 Pp、xx、RR、AA 基因型最多,PP、XX、rr、aa 基因型最少。男女性之间 4 种酶切多态性差异无统计学意义($P>0.05$),CHD 组 p、x 基因分布频率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2~5。

表 2 两组 ER α 基因 Pvu II 位点基因型的分布[n (%)]

组别		n	基因型			等位基因	
			PP	Pp	pp	P	p
CHD 组	男	66	8(12.1)	21(31.8)	37(56.1)	37(28.0)	95(72.0)
	女	58	6(10.3)	17(29.3)	35(60.3)	29(25.0)	87(75.0)

续表 2 两组 ERα 基因 Pvu II 位点基因型的分布[n(%)]

组别			基因型			等位基因	
			PP	Pp	pp	P	p
对照组	合计	124	14(11.3)	38(30.6)	72(58.1)	66(26.6)	182(73.4) *
	男	92	15(16.3)	44(47.8)	33(35.9)	74(40.2)	110(59.8)
	女	71	13(18.3)	31(43.7)	27(38.0)	57(40.1)	85(59.9)
	合计	163	28(17.2)	75(46.0)	60(36.8)	131(40.2)	195(59.8)

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

表 3 两组 ERα 基因 Xba I 位点基因型的分布[n(%)]

组别			基因型			等位基因	
			XX	Xx	xx	X	x
CHD 组	男	66	3(4.5)	19(28.8)	44(66.7)	25(18.9)	107(81.1)
	女	58	2(3.4)	17(29.3)	39(67.2)	21(18.1)	95(81.9)
	合计	124	5(4.0)	36(29.0)	83(66.9)	46(18.5)	202(81.5) *
对照组	男	92	4(4.3)	36(39.1)	52(56.5)	44(23.9)	140(76.0)
	女	71	4(5.6)	30(42.3)	37(52.1)	38(26.8)	104(73.2)
	合计	163	8(4.9)	66(40.1)	89(54.6)	82(25.2)	244(74.8)

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

表 4 两组 ERβ 基因 Rsa I 位点基因型的分布[n(%)]

组别			基因型			等位基因	
			RR	Rr	rr	R	r
CHD 组	男	66	29(43.9)	31(47.0)	6(9.1)	89(67.4)	43(32.5)
	女	58	26(44.8)	27(46.6)	5(8.6)	79(68.1)	37(31.9)
	合计	124	55(44.4)	58(46.8)	11(8.9)	168(67.7)	80(32.3)
对照组	男	92	39(42.4)	43(46.7)	10(10.9)	121(65.8)	63(34.2)
	女	71	29(40.8)	35(49.3)	7(9.9)	93(65.5)	49(34.5)
	合计	163	68(41.7)	78(47.9)	17(10.4)	214(65.6)	112(34.4)

表 5 两组 ERβ 基因 Alu I 位点基因型的分布[n(%)]

组别			基因型			等位基因	
			AA	Aa	aa	A	a
CHD 组	男	66	47(71.2)	14(21.2)	5(7.6)	108(81.8)	24(18.2)
	女	58	40(69.0)	13(22.4)	5(8.6)	93(80.2)	23(19.8)
	合计	124	87(70.2)	27(21.8)	10(8.1)	201(81.0)	47(19.0)
对照组	男	92	69(75.0)	20(21.7)	3(3.3)	158(85.9)	26(14.1)
	女	71	52(73.2)	18(25.4)	1(0.1)	122(85.9)	20(14.1)
	合计	163	121(74.2)	38(23.3)	4(2.5)	280(85.9)	46(14.1)

3 讨 论

近年来随着人们生活方式的改变、人口老龄化进程的加快及相关的危险因素明显增多,CHD 的发病率大幅度增加。CHD 是一种复杂的疾病,是由多个微效基因与环境因素长期相互作用的结果。流行病学研究显示,血液中脂类 and/或脂蛋白水平异常增加是动脉粥样硬化、中风、冠心病和心肌梗死重要危险因素^[5]。雌激素在血脂和脂蛋白代谢的调节中发挥着重要作用,雌激素通过调节肝脏的脂蛋白代谢相关基因的表

达,能够增加血清 HDL-C 和 TG 浓度,并降低血清 LDL-C 浓度^[6-7]。Zhao 等^[8]对 443 名上海汉族绝经后妇女 ESR1 和 ESR2 基因的 SNPs 研究发现,ESR1 不依赖于年龄、雌激素水平、BMI 及生活方式,对高脂血症有潜在作用。本研究显示,CHD 组有吸烟史、有家族史、合并高血压及糖尿病的比率明显高于对照组($P<0.05$),并且 BMI、TC、TG、LDL-C 水平均明显高于对照组($P<0.05$),而 HDL-C 水平明显低于对照组($P<0.05$),男、女性间各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。

雌激素通过 ER 介导基因或非基因机制调控心血管系统功能^[1,9-10]。ER α 和 ER β 位于细胞核内,通过调节特异性靶基因的转录而发挥基因型调节效应,由独立基因 ESR1 和 ESR2 编码,广泛分布于巨噬细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞等^[11]。有研究表明,ESR1 和 ESR2 基因的单核苷酸多态性(SNPs)影响了雌激素相关的作用,如 ESR1 的 Pvu II (rs2234693) 和 Xba I (rs9340799),ESR2 的 Rsa I (rs1256049) 和 Alu I (rs4986938) 等。Pvu II 基因多态性能影响转录因子的结合,改变蛋白质表达^[12]。有研究表明,ER α 和 ER β 基因的遗传变异与脂质代谢、CHD 等疾病有关^[13-14]。本研究结果显示,两组 ER α 基因 Pvu II、Xba I 和 ER β 基因 Rsa I、Alu I 基因型频率分布具有群体代表性,其酶切多态性在男、女性间没有明显性差异;CHD 组中 pp、xx、RR、AA 基因型最多,PP、XX、rr、aa 基因型最少,对照组中 Pp、xx、RR、AA 基因型最多,PP、XX、rr、aa 基因型最少,CHD 组 p、x 基因分布频率明显高于对照组($P<0.05$),其原因可能与冠心病危险因素相关。

综上所述,雌激素基因多态性可能是一个有效的治疗 CHD 的靶点,p、x 基因分布频率可能与冠心病危险因素相关。尽管公共卫生的健康教育宣传在不断加强,但 CHD 的发病率仍不断攀升。因此,需要尽更大的力量去避免诱发冠心病的相关危险因素,降低冠心病的发生率。

参考文献

- [1] Wu Q,Zhao Z,Sun H,et al. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion [J]. Exp Physiol,2008,93(9):1034-1043.
- [2] 吴芹,常唐喜. 雌激素受体 α 、 β 基因多态性与冠心病[J]. 检验医学与临床,2011,8(1):76-77.
- [3] Weng H,Zhang C,Hu YY,et al. Association between estrogen receptor- α gene Xba I and Pvu II polymorphisms and periodontitis susceptibility: a meta-analysis [J]. Dis Markers,2015,2015(1):1-9.
- [4] Yang L,Zhang H,Jiang YF,et al. Association of estrogen receptor gene polymorphisms and primary biliary cirrhosis in a Chinese population: a case-control study [J]. Chin Med J (Engl),2015,128(22):3008-3014.
- [5] Grundy SM,Becker D,Clark LT,et al. Third report of the National cholesterol education program (NCEP) expert

- panel on detection,evaluation,and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report[J]. Circulation,2002,106(25):3143-3421.
- [6] Dellatorre S,Mitro N,Fontana R,et al. An essential role for liver ER α in coupling hepatic metabolism to the reproductive cycle[J]. Cell Rep,2016,15(2):360-371.
- [7] Wei J,Shi YP,Zhang XY,et al. Estrogen upregulates hepatic apolipoprotein M expression via the estrogen receptor[J]. Biochim Biophys Acta,2011,1811(12):1146-1151.
- [8] Zhao T,Zhang D,Liu Y,et al. Association between ESR1 and ESR2 gene polymorphisms and hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women [J]. J Hum Genet,2010,55(1):50-54.
- [9] Gomes-Rochette NF,Souza LS,Tommasi BO,et al. Association of Pvu II and Xba I polymorphisms on estrogen receptor alpha (ESR1) gene to changes into serum lipid profile of post-menopausal women: effects of aging, body mass index and breast cancer incidence [J]. PLoS One,2017,12(2):e0169266.
- [10] Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system[J]. Am J Cardiol,2002,89(12A):12-17.
- [11] Mendelsohn ME. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system[J]. J Steroid Biochem Mol Biol,2000,74(5):337-343.
- [12] Herrington DM,Howard TD,Brosnihan KB,et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein[J]. Circulation,2002,105(16):1879-1882.
- [13] Shearman AM,Cooper JA,Kotwinski PJ,et al. Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts[J]. Circ Res,2006,98(5):590-592.
- [14] Domingues-Montanari S,Subirana I,Tomás M,et al. Association between ESR2 genetic variants and risk of myocardial infarction[J]. Clin Chem,2008,54(7):1183-1189.

(收稿日期:2017-03-24 修回日期:2017-07-13)

(上接第 3115 页)

- [4] Soriano V,Mcmahon B. Strategic use of lamivudine in the management of chronic hepatitis B [J]. Antiviral Res,2013,100(2):435-438.
- [5] 宋玉华,王静,宋三泰,等. 原癌基因 Fra-1 在人乳腺肿瘤组织中表达的初步研究[J]. 上海医药,2011,32(1):44-47.
- [6] Williams EM,Copp JN,Ackerley DF. Site-saturation mutagenesis by overlap extension PCR[J]. Methods Mol Biol,2014,1179(6):83-101.
- [7] Zhang B,Zhang R,ji J,et al. Cloning of human adiponectin gene by PCR-driven overlap extension and expression in Pichia pastoris [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao,2008,24(8):1480-1484.

- [8] Ovchinnikov DA,Wan Y,Coman WB,et al. DNA methylation at the novel CpG sites in the promoter of Med15/PCQAP gene as a biomarker for head and neck cancers [J]. Biomark Insights,2014,9(9):53-60.
- [9] Zhang M,Xiao XQ,Jiang YF,et al. DNA demethylation in PD-1 gene promoter induced by 5-azacytidine activates PD-1 expression on Molt-4 cells [J]. Cell Immunol,2011,271(2):450-454.
- [10] Memelink J. Electrophoretic mobility shift assay for the analysis of interactions of jasmonic acid-responsive transcription factors with DNA [J]. Methods Mol Biol,2013,1011(4):209-225.

(收稿日期:2017-03-12 修回日期:2017-07-01)