文章编号:1000-5404(2007)17-1727-02

技术方法

寡核苷酸微阵列法检测冠心病患者心血管易感基因SNPs

唐 敏[1],戴 勇[2],蔡晓钟[1],唐晓君[3],吕天羽[2],涂植光[1] (重庆医科大学:[1]医学检验系实验诊断教研室,[3]预防医学系流行病学教研室,重庆 400016;[2]广东省深圳市人民医院临床研究中心,深圳 518020)

提 要:目的 研究13个心血管易感基因中17个SNPs与冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary atherosclerotic heart disease,CHD)的关系。**方法** 采用寡核苷酸微阵列技术检测并分析32例冠心病患者和30例健康对照者,涉及RAAS和内皮功能相关基因、载脂蛋白等13个基因17个SNPs的基因型频率。**结果** 病例组中ACE^{Alu}和$NOS3^{298}$偏离Hardy-Weinberg平衡(χ^2分别为11.2和28.0)。ANP^{2238} C、$ApoB^{Ecor1}$(-)和$KCNQ1^{140}$ G在中国人群中的分布频率小于5%。$NPRC^{-55}$在病例组和对照组中的基因频率分布的差异具有统计学意义($P<0.05$)。其他SNPs的频率分布差异未检验出。**结论** RAAS中的血管紧张素转换酶(ACE)的Alu插入与缺失变异和与内皮系统功能相关的内皮型一氧化氮合成酶(NOS3)的E298D以及C型尿钠肽受体(natriuretic peptide receptor C,NPRC)基因调控区域的-55位A的突变可能是导致中国人群冠心病发病的危险因素。

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary atherosclerotic heart disease,CHD)是由遗传易感性和环境因素共同作用的复杂疾病。发病机制涉及内皮细胞受损、高脂血症和血小板功能障碍等。目前对候选基因多态性研究大多局限于单个系统的单个基因,而忽略了基因-基因间相互作用,即同时分析多个基因的研究较少。本研究采用病例对照研究方法,用寡核苷酸微阵列法对内皮功能相关基因、载脂蛋白等13个心血管疾病候选基因同时进行检测分析,以了解与中国汉族人群CHD相关的基因及其SNPs。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取2005-04-2006-04在深圳市人民医院就诊的CHD患者32例,其中男性23例,女性9例,年龄(74±9.59)岁,入选标准:符合1979年WHO的CHD诊断标准。另设正常对照组30例,男性15例,女性15例,年龄(43.47±13.55)岁,入选标准:无冠心病、高血压、高脂血症、动脉粥样硬化等心血管疾病。2组均为无血缘关系的中国汉族人群,样本均经供者同意用于研究。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集和检测 取外周血3 ml,终浓度为0.2%的EDTA抗凝,上下颠倒数次混匀,存放于-20 ℃备用。DNA抽提、PCR扩增、杂交、显色及检测等步骤都严格按照上海百傲公司的Baio基因型检测芯片试剂盒使用说明书进行,芯片用BaiO基因芯片识读仪检测,检测图像经Array Doctor软件分析。

1.2.2 质量控制 在每次检测中都设置阴性、阳性对照品。样本检测过程中,若软件对"标志列"、"阴性对照"、"阳性对照"三者进行判断后,输出其中之一为"不合格",则实验无效,同时抽取1份DNA样品,对其中几个SNP位点进行DNA测序,结果与芯片检测结果进行比较。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件,直接计数法分别计算各个位点的等位基因频率;χ^2检验Hardy-Weinberg遗传平衡,评价样本是否具有群体代表性;采用χ^2检验、Fisher精确概率等方法进行组间基因型及等位基因频率比较。

2 结果

2.1 芯片检测结果和测序结果

芯片第1排为阳性对照列,所点寡核苷酸是人类没有的序列,试剂盒中阳性对照样本与之完全吻合;芯片最后1排为阴性对照列,所点亦是人类没有的序列,试剂盒中的阴性对照样本与之不吻合。阳性对照列出现强的荧光说明试剂盒本身质量没有问题;而阴性对照列没有信号则说明操作中没有出现污染。以AGT^{235}为例:检测AGT^{235}M的3个位点的平均荧光值与检测AGT^{235}T位点的平均荧光值比较,信号强度相同,则该AGT^{235}位点基因型为杂合子MT;如AGT^{235}M强于AGT^{235}T一定比例,则认为基因型为纯合子MM;反之则为TT型。

图1为某CHD患者芯片检测结果,基因型为:TT/ID/EE/AG/TT/AC/+-/--/++/CC/GG/GG/E2E4/CT/AG(AGT^{235}/ACE^{Alu}/$NOS3^{298}$/ET-2^{985}/ANP^{2238}/$NPRC^{-55}$/$ApoB^{Msp\ I}$/$ApoB^{XbaI}$/$ApoB^{Ecor\ I}$/$MTHFR^{677}$/ApoC Ⅲ^{3175}/ApoC Ⅲ^{3206}/$ApoE^{112,158}$/$CYP46A1^{rs754203}$/SerpinA3^{rs4934})。第2排框内为测序位点1(AGT^{235}),第3排为测序位点2。结果完全吻合,分别为AGT^{235}TT和ET-2^{985}AG。

基金项目:广东省科技计划项目(2003C30609)
Supported by the Sci&Tech Project of Guangdong Province(2003C30609)

作者简介:唐 敏(1975-),女,四川省达州市人,博士研究生,讲师,主要从事疾病的基因诊断方面的研究。电话:(023)68485223,E-mail:tangmin2004061@hotmail.com
通讯作者:戴 勇,E-mail:xiaoyong62@tom.com

收稿日期:2006-08-07;修回日期:2006-10-10

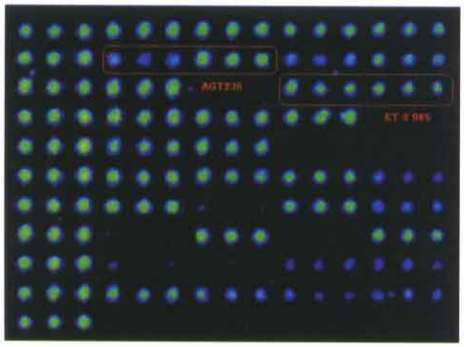


图1 某CHD患者芯片检测结果

2.2 基因型和等位基因频率分布情况

分析结果显示,17个等位基因的基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡分布的有93%以上($P>0.05$, $\chi^2<3.84$),证明所研究对象具有人群代表性。病例组中ACE^{Alu}和$NOS3^{298}$偏离Hardy-Weinberg平衡($P<0.05$,χ^2值分别为11.2和28.0)。ANP^{2238} C、$ApoB^{EcorI}$(-)和$KCNQ1^{140}$ G在中国人群中的分布频率小于5%。$NPRC^{-55}$在病例组和对照组中的基因频率分布的差异具有统计学意义(P值为0.006,OR值为3.95)。其他SNPs的频率分布差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

CHD是多个不同易感基因或/和同一易感基因上一个以上的SNPs不同组合,与后天环境因素共同作用的结果。CHD易感基因的基因多态性分析,对疾病的预测和预防,诊断和治疗都有重大意义。本研究用包含RAAS系统中的AGT、ACE和内皮细胞功能相关的基因NOS3、ET-2、ANP、NPRC以及载脂蛋白B、C3和E和MTHFR、KCNQ1、CYP46A1、SerpinA3等13个基因中17个国内外报道与心血管疾病相关的SNPs的寡核苷酸微阵列,对CHD病例组和健康对照组进行分析,试图找出对中国汉族人群CHD有影响的基因位点。

虽然文献[1,2]报道认为,ANP^{2238}、$ApoB^{EcorI}$和$KCNQ1^{140}$对心血管疾病有重要意义,但本研究结果显示ANP^{2238} C、$ApoB^{EcorI}$(-)和$KCNQ1^{140}$ G在中国人群中的分布频率小于5%,可能不是中国人群的心血管疾病发病原因。研究显示在对照组中基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡的ACE^{Alu}和$NOS3^{298}$2个基因,在病例组中严重偏离Hardy-Weinberg平衡(χ^2分别为11.2和28.0)。有研究表明,在病例中偏离Hardy-Weinberg平衡有可能意味着该位点具有易感性[3]。即ACE^{Alu}和$NOS3^{298}$与CHD有关,这与Sekuri等[4-6]的研究一致。通过对病例组和对照组中的基因频率的分布差异的分析,结果显示$NPRC^{-55}$的频率分布差异具有统计学意义($\chi^2=7.636$, $P=0.006$)。而Sarzani[7]和Pitzalis等[8]的研究认为$NPRC^{-55}$与高血压和肥胖有关,可能$NPRC^{-55}$通过引起血压升高和脂肪代谢紊乱间接导致CHD产生。

本研究虽然采用高通量的基因芯片对13个易感基因的基因位点进行同时检测,但许多易感基因只检测了1个SNP,而有研究认为1个基因上至少要有2个以上的变异才能对基因产物的表达产生较大的作用,因此最好能同时检测多个SNP;在实验设计方面,由于具体原因,未能对影响CHD的年龄因素进行很好的平衡,样品量对多个基因的研究仍然不够。

关键词:冠状动脉粥样硬化性心脏病;单核苷酸多态性;微阵列;C型尿钠肽受体

中图法分类号:R446.9 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Sakuma T, Hirata R D, Hirata M H. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals[J]. J Clin Lab Anal, 2004, 18(6): 309-316.

[2] Chen Y H, Xu S J, Bendahhou S, *et al*. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation[J]. Science, 2003, 299(5604): 251-254.

[3] Nielsen D M, Ehm M G, Weir B S. Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus[J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(5): 1531-1540.

[4] Sekuri C, Cam F S, Ercan E, *et al*. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and premature coronary heart disease[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2005, 6(1): 38-42.

[5] Mendonca I, Freitas I A, Sousa C A, *et al*. Polymorphism of the ACE gene is associated with extent and severity of coronary disease[J]. Rev Port Cardiol, 2004, 23(12): 1605-1611.

[6] Cattaruzza M, Guzik T J, Slodowski W, *et al*. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease[J]. Circ Res, 2004, 95(8): 841-847.

[7] Sarzani R, Strazzullo P, Salvi F, *et al*. Natriuretic peptide clearance receptor alleles and susceptibility to abdominal adiposity[J]. Obes Res, 2004, 12(2): 351-356.

[8] Pitzalis M V, Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, *et al*. Allelic variants of natriuretic peptide receptor genes are associated with family history of hypertension and cardiovascular phenotype[J]. J Hypertens, 2003, 21(8): 1491-1496.

(编辑 王小寒)