论著

文章编号:1000-5404(2011)21-2282-04

CFH基因rs1061170多态性与重庆汉族人群冠心病的关系研究

周 娟,杨成明,曾春雨,陈 鹏,陈彩宇,张小群 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科)

[摘要] **目的** 探讨CFH基因rs1061170单核苷酸多态性与冠心病的相关性。**方法** 筛选2008年10月到2009年6月在我院心内科就诊的重庆汉族地区人群中243例,其中冠心病组175例和对照组68例,用荧光定量PCR分析法检测2组CFH基因rs1061170多态位点基因型,分析CFH基因的频率分布及比较不同基因型各亚组间临床代谢参数。**结果** 冠心病组与对照组CFH基因rs1061107中TT、TC、CC基因型频率分别为87.4%、12.6%、0和94.1%、5.9%、0。两组基因型频率分布差异不显著($\chi^2=2.293$, $OR=2.301$, 95% CI 为0.762－6.943, $P>0.05$),冠心病组T等位基因频率为85.3%,对照组为97.05%,两组等位基因频率分布无统计学意义($\chi^2=2.164$, $OR=2.213$, 95% $CI=0.748-6.546$, $P>0.05$)。冠心病组中TC基因人群的SBP、DBP、BUN、Cr明显高于TT基因人群($P<0.05$)。**结论** CFH基因rs1061170多态性与重庆地区部分汉族人群冠心病的发生可能无相关性。

[关键词] 冠心病;补体因子H;基因多态性;*Taq*Man探针

[中图法分类号] R394-33; R394.3; R541.4 [文献标志码] A

Association of polymorphism of human complement factor H gene rs1061170 with coronary heart disease in the Han population of Chongqing

Zhou Juan, Yang Chengming, Zeng Chunyu, Chen Peng, Chen Caiyu, Zhang Xiaoqun (Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between single nucleotide polymorphism of human complement factor H gene (CFH) rs1061170 and coronary heart disease. **Methods** A total of 243 patients including 175 patients with coronary heart disease and 68 patients as controls who were admitted to the cardiology of Daping Hospital from Oct 2008 to Jun 2009 were enrolled. Fluorescence quantitative PCR was applied to detect the polymorphic genotype of CFH gene rs1061170 in the 243 patients. Frequency distribution of CFH gene was analyzed in CHD patients and control individuals. The clinical metabolic parameters of subgroups with different genotypes were compared. **Results** The frequency distributions TT, TC and CC genotypes of CFH gene rs1061107 in the CHD group and the control group were 87.4%, 12.6% and 0 and 94.1%, 5.9% and 0, respectively. The difference between the two groups was not significant (Chi square = 2.293, $OR=2.301$, 95% $CI=0.762-6.943$, $P>0.05$). The frequency of T allele in the CHD group and the control group was 85.3% and 97.05%, respectively, and the difference was not significant (Chi square = 2.164, $OR=2.213$, 95% $CI=0.748-6.546$, $P>0.05$). The SBP, DBP, BUN and Cr of CHD patients with TC genotype were significantly higher than those of the CHD patients with TT genotype ($P<0.05$). **Conclusion** Polymorphism of CFH gene rs1061170 may not correlated with the incidence of coronary heart disease in the Han population of Chongqing.

[**Key words**] coronary heart disease; complement factor H; gene polymorphism; *Taq*Man probe

Corresponding author: Yang Chengming, Tel: 86-23-68757028, E-mail: yangchenmi@163.com

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)简称冠心病,是一种复杂的多基因疾病,具有高度的遗传易感性,与环境等因素共同作用而发病。在人类动脉粥样病变中能观察到补体因子H(CFH, complement factor H)的存在[1]。补体因子H通过调节补体激活从而阻止动脉粥样硬化的进程,同时也可介导免疫的病理损伤[2]。近年来Qian等[3]研究CFH基因C等位基因携带者早发冠心病的风险高

[通信作者] 杨成明,电话:(023)68757028, E-mail:yangchmi@163.com

于TT基因型,然而CFH基因多态性与动脉粥样硬化及冠心病的相关性尚有争议[4-5]。本研究通过对重庆汉族人群CFH基因rs1061170的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)进行分析,旨在探讨CFH基因多态性在重庆地区汉族人群中与冠心病之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

筛选2008年10月到2009年6月在我院住院患者243例,均为重庆汉族人群,均行冠脉造影(CAG)。冠心病诊断依据1979 WHO颁布的缺血性心脏病诊断标准,并经冠状动脉造影术证实确诊(以左冠脉主干、左前降支、左回旋支和右冠状动脉及其主要分支中至少有1支冠状动脉狭窄≥50 %为有意义病变),冠心病组175例,其中男性107例,女性68例,年龄(64.65±10.89)岁。非冠心病组(对照组)68例,男性32例,女性36例,年龄(57.59±11.63)岁。经询问病史、体格检查、实验室检查和冠状动脉造影检查等排除冠心病。所有研究对象均收集临床资料,并测量血压、身高、体质量(BMI)。研究对象均为重庆汉族人群,除外炎症、风湿性疾病、肿瘤及近期感染性疾病等,所有个体均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 实验样本采集 所有研究对象留取空腹血标本,用于提取基因组DNA和生化指标的测定。取空腹静脉血3 ml,在全自动分析仪上检测空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FIN)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、载脂蛋白(APO-B)、C反应蛋白(CRP)、总胆固醇(TC)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)。胰岛素抵抗指数(IRI)根据HOMA Model计算。每人另采集外周静脉血2 ml,EDTA抗凝处理,保存于-20 ℃冰箱中。

1.2.2 基因组DNA提取 空腹采取的外周静脉血2 ml按常规酚-氯仿法抽提基因组DNA。紫外分光光度仪测定DNA含量,琼脂糖凝胶电泳法检测DNA的完整性。

1.2.3 直接测序的分析 设计上下游引物扩增目的片段用于直接测序分析。CFH基因1277T/ C位点上游引物为:上游引物为5′-TCA TTG TTA TGG TCC TTA GGA AA-3′;下游引物为5′-TTA GAA AGA CAT GAA CAT GCT AGG-3′。PCR循环条件(ABI 7900HT型荧光定量PCR仪):95 ℃预变性2 min,然后按95 ℃变性20 s、58 ℃退火及延伸40 s条件进行40个循环。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,PCR扩增产物长度为240 bp。使用PCR产物纯化试剂盒(天根生化公司)对上述PCR产物进行纯化(具体操作见试剂说明书)。纯化的PCR产物直接测序则由上海洛成生物技术有限公司完成。

1.2.4 *Taq*Man探针荧光定量PCR

1.2.4.1 引物及*Taq*Man探针 另设计上下游引物用于*Taq*Man探针荧光PCR。上游引物为5′-GGATGGCAG-GCAACGTCTAT-3′;下游引物为5′-TCATTGTTATGGTCCTTAG-GAAAATG-3′;探针1为FAM-CTTTCTTCCATAATTTTGATT-MGB;探针2为HEX-TTTCTTCCATGATTTTGATT-MGB。引物及*Taq*Man探针由本实验室设计,由上海洛成生物工程有限公司合成。

1.2.4.2 荧光定量PCR 荧光定量PCR反应体系如下:10×PCR反应缓冲液2.5 μl,2.5 pmol/μl d NTP混合液2 μl,上下游引物20 pmol/μl各0.5 μl,*Taq*Man探针1及2各0.25 μl,反应总体积为30μl。然后按95 ℃变性5 s、60 ℃退火及延伸30 s条件进行40个循环,PCR扩增产物长度为131 bp。PCR每次PCR扩增均设立阴性对照(以无菌去离子纯水代替模板DNA3例)。反应结束由ABI 7900HT型荧光定量PCR仪实时荧光PCR等位基因辨别系统对样本进行分型。

1.3 统计学分析

统计分析用SPSS 15. 0 for Windows软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,计算对照组和冠心病组的Hardy-Weinberg平衡,单因素采取方差分析和χ^2检验,多因素采取多重线性回归分析。比较冠心病组和对照组之间基本临床资料(年龄、性别、生化指标等)和CFH基因分布的频率的差异及不同CFH基因型之间各生化指标的分布差异。所有统计检验均为双侧概率检验。

2 结果

2.1 两组基本临床资料分析

冠心病组年龄、高血压史、吸烟史、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、LDL-C均显著高于对照组,而HDL-C浓度低于对照组($P<0.05$,表1),而两组性别无显著差异($P>0.05$)。

2.2 直接测序结果

随机选取40例样本(包括冠心病组及对照组)PCR产物CFH基因rs11061170位点直接测序结果为纯合子(TT基因型)37例,杂合子(TC)3例两种不同的CFH基因型测序结果。

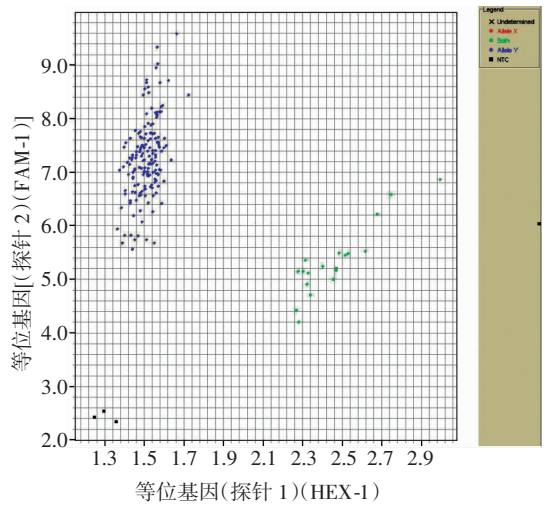
2.3 *Taq*Man探针荧光定量PCR结果

不同的等位基因对应不同的荧光,根据不同的Ct值便可区分不同的基因型,每个样本的扩增效率不完全相同,所以结果显示同一基因型的个体聚集成簇,而不是一个点(图1)。其分型结果与直接测序结果一致。

表1 重庆汉族人群冠心病组和正常人群基本资料的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	年龄(岁)	腹围(cm)	BMI(kg/m^2)	FIN(μU/ml)	FBG(mmol/L)	IRI	TG(mmol/L)
冠心病组	175	64.65±10.89a	87.72±10.26	24.46±3.56	8.01±15.55	5.50±1.30	1.77±2.35	1.69±0.83[a]
对照组	68	57.59±11.63	87.29±9.57	24.22±2.68	7.63±12.73	5.34±1.54	1.84±3.09	1.23±0.77
组别	n	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)	Apo-B(g/L)	TC(mmol/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)	UA(μmol/L)
冠心病组	175	1.12±0.21[a]	2.69±0.64[a]	0.83±0.24	4.68±0.87[a]	5.43±2.06	77.77±23.72	334.1±100.64
对照组	68	1.36±0.23	2.45±0.65	0.85±0.24	4.49±0.91	5.17±1.91	73.47±19.58	321.1±121.95

a:$P<0.05$,与对照组比较



黑点示NTC;蓝点示FAM纯合子,对应等位基因T,即TT基因型;绿点示杂合子,即TC基因型

图1 *Taq*Man探针荧光定量PCR分析243例基因分型图谱

2.4 CFH基因rs1061170多态位点频率分布

2.4.1 CFH基因rs1061170多态位点的基因型及等位基因频率分析 两组之间基因型频率分布差异无统计学意义($\chi^2=2.293$,$OR=2.301$,95% CI 为0.762－6.943,$P>0.05$)冠心病组T等位基因频率为85.3%,对照组为97.05%,两组等位基因频率分布无统计学意义($\chi^2=2.164$,$OR=2.213$,95% $CI=0.748-6.546$,$P>0.05$)(表2)。

2.4.2 2组CFH基因rs1061170多态位点不同基因型的代谢指标比较 冠心病组TT基因型与TC基因型人群相比,携带TC基因型群组SBP、DBP、BUN、Sr均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组不同基因型间年龄、BMI及代谢指标的比较:TT基因型与TC基因型人群均差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

表2 两组CFH基因编码区rs1061170位点基因型分布和等位基因频率[例(%)]

组别	n	基因型			等位基因频率	
		TT	TC	CC	T	C
冠心病组	175	153(87.4)	22(12.6)	0	128(85.3)	22(6.3)
对照组	68	64(94.1)	4(5.9)	0	132(97.05)	4(2.95)

3 讨论

动脉粥样硬化是慢性炎症性疾病,大量研究表明,补体和补体调节因子与动脉粥样硬化相关[6]。正常动脉内没有补体成分的激活,但在易损的斑块和破裂的斑块处,补体大量激活。在AS病变处,补体主要是通过经典途径和旁路途径激活。CFH集中在动脉内膜的表层,通过结合C3b加速了旁路途径中C3转化酶的灭活,在动脉内膜的表层抑制补体的激活[7]。CFH基因包含23个外显子,位于染色体1q31,CFH基因多态性位于第9外显子,为1 277位置上C代替T的突变,即外显子9中具有酪氨酸(Tyr)402-组氨酸(His)402(rs1061170)的蛋白多态性是疏水酪氨酸由正电荷的组氨酸取代所致的氨基酸序列的改变。氨基酸的改变将影响CFH与肝素、CRP结合,降低CFH对C3b的亲和力,减弱其补体系统的灭活作用和抗炎作用[3]。从而影响其动脉粥样硬化作用[8]。

在本研究中以重庆汉族人群为研究对象,在相对于PCR-RFLP法酶切不完全还有可能会出现较复杂的带型或者由于浓度较低等原因呈假阴性的情况下,采用*Taq*Man探针技术,该技术相对于普通PCR,对SNP位点侧翼序列要求很高,而且需要量身定做合适目的SNP位点的探针[9]。它能更好地减少样本的交叉污染及提高分型的准确率。通过*Taq*Man探针荧光定量PCR技术对243例DNA样本进行分型。在每次PCR反应过程中均是由直接测序得到证实,也更进一步提高了分型的准确率。研究结果提示CFH基因rs1061170中TT、TC、CC基因型频率分布差异无统计学意义($\chi^2=2.293$,$P>0.05$)。与Meng等[10]在580例英国人群的研究结果一致,而Pulido等[11]研究493例经冠脉造影确诊的患者,结果证明CFH基因多态性与CHD有相关性。Pai[12]等随访6～8年,通过研究266例男性和249例女性,结果发现CFH基因多态性与早发冠心病关系密切,Goverdhan等[13]的对照研究和Stark等[14]研究2161例德国人发现CFH基因多态

表3 2组CFH基因rs1061170多态位点不同基因型的代谢指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	基因型	n	年龄(岁)	BMI(kg/m^2)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	IRI	Bun(mmol/L)	FIN(μU/ml)
冠心病组	TT	153	64.58±11.01	24.58±3.66	125.82±13.23	72.05±8.06	1.77±2.39	5.28±1.91	6.95±8.28
	TC	22	65.14±10.23	23.64±2.79	135.03±19.60[a]	77.54±12.49[a]	1.73±2.09	6.50±2.70a	15.37±37.97
对照组	TT	64	58.08±11.10	24.11±2.64	128.80±13.95	76.53±11.04	1.88±3.18	5.23±1.95	7.61±13.06
	TC	4	49.75±18.66	25.98±3.14	141.50±19.21	84.00±20.59	1.17±0.58	4.15±0.73	7.89±6.25

组别	基因型	n	FBG(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)	TC(mmol/L)	Cr(μmol/L)	UA(μmol/L)	Apo-B(g/L)
冠心病组	TT	153	5.53±1.32	1.37±1.04	1.14±0.28	2.45±0.72	4.51±1.21	76.30±23.60	330.37±101.37	0.83±0.24
	TC	22	5.31±1.18	1.56±1.01	1.11±0.34	2.55±0.83	4.46±1.28	87.98±22.48[a]	360.10±94.32	0.86±0.24
对照组	TT	64	5.21±1.15	1.26±0.71	1.22±0.33	2.48±0.66	4.49±0.96	73.28±19.97	322.98±114.99	0.84±0.24
	TC	4	5.31±1.54	1.28±1.08	0.98±0.06	2.02±1.30	5.29±0.98	76.58±13.20	292.30±230.86	1.00±0.22

a: $P<0.05$,与TT基因型组比较

性与冠心病之间无明确的相关性。Zee 等[15]通过研究685 例高加索人群发现该基因多态性与心肌梗死没有相关性。本次研究的结果在相同的入选标准下并且较国内孙彩琴等[16]和崔芬等[17]入选样本量多且研究方法精确的情况下与其结论一致，表明 CFH 基因 rs1061170 可能和重庆地区汉族人群的冠心病无相关性。支持 meng 等[10, 14-15]的研究结论。本研究进一步将 TT 基因型人群与 TC 基因型人群相比，在冠心病组体 SBP、DBP、BUN、Cr 2 组间差异具有统计学意义，TC 基因人群较 TT 基因型人群明显增高，而在正常对照组两组基因型无明显差异。有研究报道 CFH 基因 TC 基因型携带者比 TT 基因型携带者发生年龄相关性黄斑变性（aged-related macular de-generation，AMD）高 2.5 倍[18]，AMD 与动脉粥样硬化有密切的关系，组织学的研究发现 AMD 具有脂质沉积、炎性细胞浸润等动脉粥样硬化性的改变[19]。高血压可加速动脉粥样硬化的发展，增加冠脉病变的严重性，本研究冠心病组中 TC 基因组的 SBP、DBP、BUN Cr 均较 TT 基因组高（$P<0.05$），血压的增高可加重肾脏中小动脉的硬化使排毒能力下降，BUN 和 Cr 在体内蓄积从而可能加重动脉粥样硬化的过程。然而国内外所有的研究均未见以 BUN、Cr 作为一个独立的代谢症状，观察其与 CFH 基因的相关性的报道，近年来的研究也逐渐地认识到 BUN Cr 可能也是冠心病的传统危险因子高血压、糖尿病、吸烟等因素之外不可忽视的危险因素。故 CFH 基因变异是否可能作为影响动脉硬化的危险指标，尚待进一步研究。

总之，本次研究结果显示 CFH 基因 rs1061170 多态性分布与重庆汉族人群冠心病无显著相关性。冠心病本身就是多因素的复杂疾病，存在种族、国家、地区的差异，受环境各因素的影响，目前有关 CFH 基因参与心血管病等疾病发生、发展的确切机制仍不清楚，CFH 基因变异在动脉粥样硬化过程中确切的作用机制有待更深入的研究。这将有助于进一步阐明 CFH 基因在心血管疾病的发生、发展，对冠心病高危人群的筛查和早期重点预防具有积极的临床意义。

参考文献：

[1] 袁海军，袁梅，曾高峰. 补体因子 H 1277T>C 多态性与不稳定型心绞痛的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志，2009，17(12)：1024-1026.

[2] Alexander J J, Quigg R J. The simple design of complement factor H: Looks can be deceiving[J]. Mol Immunol, 2007, 44(1/3): 123-132.

[3] Qian Q, Chen Z, Ma G, *et al*. Complement factor H Y402H polymorphism, plasma concentration and risk of coronary artery disease[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(6): 1257-1261.

[4] Sofat R, Casas J P, Kumari M, *et al*. Genetic variation in complement factor H and risk of coronary heart disease: eight new studies and a meta-analysis of around 48, 000 individuals[J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1): 184-190.

[5] Zhang H F, Wang J F, Wang Y, *et al*. Complement factor H Y402H gene polymorphism and coronary heart disease susceptibility: a meta-analysis[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(5): 2933-2938

[6] Oksjoki R, Kovanen P T, Pentikainen M O. Role of complement activation in atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 2003, 14(5): 477-482.

[7] Oksjoki R, Jarva H, Kovanen P T, *et al*. Association between complement factor H and proteoglycans in early human coronary atherosclerotic lesions: implications for local regulation of complement activation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(4): 630-636.

[8] Laine M, Jarva H, Seitsonen S, *et al*. Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein[J]. J Immunol, 2007, 178(6): 3831-3836.

[9] Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2007, 9: 289-320.

[10] Meng W, Hughes A, Patterson C C, *et al*. Genetic variants of complement factor H gene are not associated with premature coronary heart disease: a family-based study in the Irish population[J]. BMC Med Genet, 2007, 8: 62.

[11] Pulido J S, McConnell J P, Lennon R J, *et al*. Relationship between age-related macular degeneration-associated variants of complement factor H and LOC387715 with coronary artery disease[J]. Mayo Clin Proc, 2007, 82(3): 301-307.

[12] Pai J K, Manson J E, Rexrode K M, *et al*. Complement factor H (Y402H) polymorphism and risk of coronary heart disease in US men and women[J]. Eur Heart J, 2007, 28(11): 1297-1303.

[13] Goverdhan S V, Lotery A J, Cree A J, *et al*. Complement factor H Y402H gene polymorphism in coronary artery disease and atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2006, 188(1): 213-214.

[14] Stark K, Neureuther K, Sedlacek K, *et al*. The common Y402H variant in complement factor H gene is not associated with susceptibility to myocardial infarction and its related risk factors[J]. Clin Sci (Lond), 2007, 113(4): 213-218.

[15] Zee R Y, Diehl K A, Ridker P M. Complement factor H Y402H gene polymorphism, C-reactive protein, and risk of incident myocardial infarction, ischaemic stroke, and venous thromboembolism: a nested case-control study[J]. Atherosclerosis, 2006, 187(2): 332-335.

[16] 孙彩琴，陈忠，马根山. 补体因子 H 基因 1277T/C 多态性与早发冠心病的相关性研究[J]. 交通医学，2008，22(6)：606-608.

[17] 崔芬，杨志寅. CFH Y402H 基因多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关性研究--附 101 例报告[J]. 新医学，2010，41(4)：237-240.

[18] Thakkinstian A, Han P, McEvoy M, *et al*. Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(18): 2784-2790.

[19] Van-Leeuwen R, Ikram M K, Vingerling J R, *et al*. Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of age-related maculopathy: the Rotterdam Study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(9): 3771-3777.

（收稿：2011-06-25；修回：2011-08-25）

（编辑 栾 嘉）