基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1490-04

DDAH2 基因多态性与冠心病的相关性研究

李 虹[1],杨 军[2],苏 锐[1],肖传实[1],高 奋[1]

(1. 山西医科大学第二医院心内科,太原 030001;2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究中国人群二甲基精氨酸二甲基氨基酸水解酶(Dimethyl arginine dimethyl amion acid hydrolase,DDAH2)基因单核苷酸多态性与冠心病的关系。方法:从山西医科大学第二医院选取冠心病患者 165 例和匹配的对照组 192 例。并记录所有研究对象的病史、体格检查等临床资料及其它流行病学资料,采取连接酶检测反应(Ligase detection reaction,LDR)- 测序分型方法检测各组基因 rs2272592 位点 C/T 的基因型并统计各组的基因型频率。结果:冠心病组 rs2272592 基因型频率与对照组之间相比较无统计学意义($P>0.05$)。结论:DDAH2 基因 rs2272592 点 C/T 多态性可能与中国人冠心病发病不相关。

【关键词】DDAH2 基因;ADMA;基因多态性;冠心病

【中国图书分类法分类号】R541.4;Q754 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-15

The case-control study between DDAH2 polymorphism and coronary heart disease(CHD)

LI Hong, et al

(*Department of Cardiology, the Second Hospital, Shanxi Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship between the single nucleotide polymorphism (SNP) of DDAH2 gene and coronary heart disease(CHD)in Chinese population. *Methods*: The ligase detection reaction (LDR) was used to detect genotype of SNP rs2272592 in the 192 controls and 165 patients with coronary heart disease (CHD). *Results*: The frequency of rs2272592 CT+TT or T allele had not significant difference between CHD and control ($P>0.05$). These results were independent of age, gender, hypertension, diabetes and hyperlipidemia. The frequency of this polymorphism was consistent with the law of Hardy-Weinberg. *Conclusion*: The rs2272592 polymorphism of DDAH2 gene might not be related to the disease of coronary heart disease(CHD)in chinese.

【Key words】DDAH2 gene; ADMA; Polymorphism; Coronary heart disease

动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)是冠心病发病的主要原因,目前研究认为血管内皮受损在 AS 发生发展中起关键作用。大量研究表明一氧化氮(Nitric oxide,NO)除了促进血管舒张之外,还具有抗氧化、阻止血小板聚集和单核细胞粘附、抑制平滑肌细胞增殖多种作用,是一种公认的抗 AS 因子,AS 时 NO 系统功能紊乱已成为动脉硬化的发病机制之一。体内存在内源性一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase,NOS)抑制物非对称二甲基精氨酸(Asymmentric dimethylarginie,ADMA),能减少 NO 合成,进而损伤内皮功能。ADMA 主要有下面两条代谢去路:①通过肾脏排泄。②被二甲基精氨酸二甲基氨基酸水解酶(Dimethyl arginine dimethyl amino acid hydrolase,DDAH)分解为 L- 胍氨酸和二甲胺。体内约 90%的 ADMA 可通过 DDAH 的水解作用,生成 L2 瓜氨酸和二甲胺代谢,仅少部分经肾脏排泄,或经其二甲基精氨酸丙酮酸转移酶及肝脏乙酰化作用代谢。近年来一些研究发现,DDAH 是 ADMA 的代谢酶,其活性下降是体内 ADMA 累积的主要原因。已有研究证实 DDAH 能通过代谢 ADMA 影响 NOS 活性进而上调体内 NO 的生成,对血管内皮功能起着重要的调节作用。

DDAH 主要有 2 种类型:DDAH1 型和 DDAH2。DDAH1 型主要分布在表达神经元型的 NOS 组织中,DDAH2 型主要分布于表达内皮源性的 NOS 组织中。DDAH2 在内皮细胞表达或活性的改变是血浆 ADMA 浓度变化的一个重要机制[1]。因此,DDAH2 基因的遗传变异和冠心病发生发展的相关性值得深入研究,目前国内外尚未见相关报导。

1 对象与方法

1.1 研究对象

冠心病患者共 165 例,选自山西医科大学第二医院2008 年 10 月至 2009 年 3 月住院病例,其中男性 118 例,女性 47 例,平均年龄(61.84 ± 11.07)岁。对照组 192 例,入选标准为

作者介绍:李 虹(1975-),女,讲师,博士,研究方向:冠心病基础与研究。

通讯作者:肖传实,男,教授,E-mail: ganxibaozhongxin @163.com。

基金项目:山西省基础研究项目(青年基金)(编号:2010021039-1)。

年龄差别不超过 5 岁未患冠心病的健康人或医院内与冠心病无关的其它患者，其中男性 110 例，女性 82 例，平均年龄为（57.74 ± 8.01）岁。所有入选对象均签署知情同意书。全部冠心病病例均依据 1979 年 WHO 颁布的缺血性心脏病诊断标准，同时行冠状动脉造影术证实确诊（冠状动脉管腔狭窄程度＞50%定义为冠心病）。

1.2 调查内容：

个人的一般情况、既往疾病史、疾病家族史、吸烟饮酒史；身高体重等体格检查，并计算体重指数；测定血糖血脂等各项生化指标。血标本的采集：研究对象均在抽血前严格禁食 12 h，采集静脉血备用。

1.3 外周血白细胞 DNA 的制备

5 ml 外周血以 0.5 mol/L EDTA-Na_2 抗凝后，经过常规盐析提取外周血白细胞基因组 DNA。

1.4 DDAH2 基因 rs2272592 位点的基因型检测

用连接酶检测反应（Ligase detection reaction，LDR）对靶基因含有 SNP 位点的序列检测。

①rs2272592 引物和探针 引物：上游：GGGTGGGATGAGTAGGACAA；下游：ACTGACCCACCCCTCATTC。探针见表 1。

②PCR 系统，20 μl 体系，见表 2。

③3%的琼脂糖凝胶电泳检测，观察 PCR 产物的效果，确定其作为模板在 LDR 反应中加入的量（见图 1）。

④LDR 10 μl，见表 3。

⑤数据分析，见图 2。

表 1 rs 2272592 探针序列

探针名称	序列（5'-3'）	LDR 长度
rs2272592REVERSE_modify	P-TTTAAAGTGTGGGCGACATGGAATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM	
rs2272592REVERSE_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCAAGTGTTTTTACGCAATGGGGG	98
rs2272592REVERSE_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCAAGTGTTTTTACGCAATGGGGA	100

表 2 PCR 反应体系

	模板	Buffer	Mg^{2+}	dNTP	Taq 酶	H_2O	Q	Primer mix
浓度	50 ng	1 ×	3 mmol/L	2 mmol/L/each	1 U		1 ×	
体积	1 μl	2 μl	0.6 μl	2 μl	0.3 μl		4 μl	0.4 μl

程序：95℃ 15 min →94℃ 30 s→56℃ 1 min 30 s→72℃ 1 min→72℃ 7 min

35 个循环

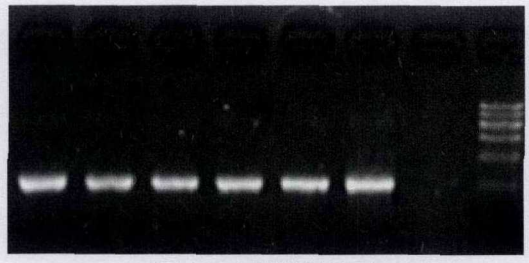


图 1 3%琼脂糖电泳图

表 3 LDR 反应体系

	Buffer	Probe mix	连接酶	H_2O	PCR 产物
浓度	1 ×	12.5 pmol/μl/each	2 U		100 ng/μl
体积	1 μl	1 μl	0.05 μl		≥1 μl

Program：95℃ 2 min→94℃ 30 s→50℃ 2 min

35 个循环

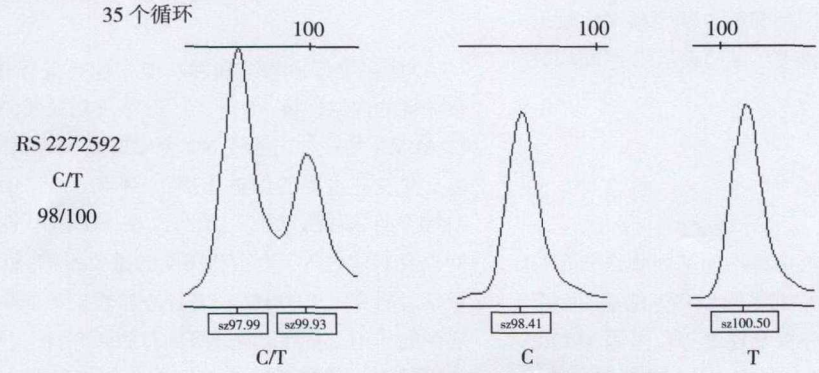


图 2 rs2272592 序列检测数据分析图

表 4 冠心病组和对照组的临床资料

指标	对照组(192 例)	病例组(165 例)	P 值
年龄(年)	53.05 ± 10.83	58.53 ± 10.54	0.000 1*
男/例(%)	110(57.3%)	118(71.5%)	0.000 1*
女/例(%)	82(42.7%)	47(28.5)	0.000 1*
体重指数(kg/m²)	24.03 ± 3.52	25.41 ± 4.04	0.002*
收缩压(mmHg)	127.02 ± 17.65	130.17 ± 18.05	0.112
舒张压(mmHg)	79.24 ± 12.73	79.98 ± 11.97	0.591
甘油三酯(mmol/L)	1.22(19.28)	1.40(8.29)	0.001*
胆固醇(mmol/L)	4.26 ± 0.98	4.18 ± 1.17	0.516
LDL-C(mmol/L)	2.61 ± 0.77	2.61 ± 0.91	0.933
HDL-C(mmol/L)	1.10 ± 0.65	1.02 ± 0.56	0.305
血糖(mmol/L)	5.32 ± 1.76	6.08 ± 2.65	0.002*
高血压史(无/有)	118/74	65/100	0.000*
糖尿病史(无/有)	160/10	124/40	0.000 1*
吸烟史(无/有)	154/38	80/85	0.000 1*
饮酒史(无/有)	164/28	118/47	0.001*

注：HDL-C:高密度脂蛋白胆固醇，LDL-C：低密度脂蛋白胆固醇；甘油三脂以中位数(全距)表示，* 与对照组比较有统计学差异，$P< 0.05$

表 5 DDAH2 基因 rs2272592 多态性位点等位基因和各基因型频率的分布

	对照组	冠心病组
基因型频率	-	-
CC,n(%)	142(74.0%)	110(66.7%)
CT,n(%)	45(23.4%)	53(32.1%)
TT,n(%)	5(2.60%)	2(1.20%)
CT+TT	50(26.0%)	55(33.3%)△
OR 95%CI(CT+TT)	1.000	
等位基因频率%	-	-
C	329(85.7%)	273(82.7%)
T	55(14.3%)	57(17.3%)

注：△与对照组比较无统计学意义，$P>0.05$

1.5 统计学处理

计算各组 DDAH2 基因的 SNP rs2272592 的基因型和等位基因的频率，并用 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 平衡。采用 SPSS13.0 软件进行统计分析，基因型和等位基因频率比较采用 χ^2 检验，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，2 组间均数比较采用 t 检验。

2 结 果

DDAH2 基因 rs2272592 位点多态性的基因频数分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。其基因型和等位基因频率的分布见表 2，以显型遗传模式分析发现 T 等位基因频率在冠心病组与对照组之间差异无统计学意义[26.0% vs 33.3%，$P>0.05$，OR 值=1.420(0.899~2.242)]。

3 讨 论

NO 在维持血管结构和功能中起重要作用，被认为是一个关键的内源性抗 AS 分子。近年研究发现，Nω，Nω2 不对称 ADMA 是一种内源性 NO 合成抑制剂，对心血管疾病的发生、发展有重要的促进作用[3]。本研究的 DDAH，它是降解 ADMA 的一种酶。由于 DDAH2 在 ADMA 代谢灭活中的重要性以及对体内 NO 生物利用度的重要影响，近年来国内外大量学者研究了 DDAH2 在多种心血管疾病如高血压、AS 等疾病中的作用。本研究通过病例对照研究，初步研究了 DDAH2 基因的 1 个单倍型标签 SNP 与汉族人群冠心病遗传易感性

的关系。目前国内外有关 DDAH2 遗传多态性的研究目前较少。DDAH 通过对血浆和组织中 ADMA 水平的调节,进而起到保护 NOS 活性的作用[4]。研究表明,DDAH 转基因老鼠表现为 DDAH 的活性增加,血浆 ADMA 的水平下降,血浆和尿液中 NO 的水平上升和血管抵抗力的下降[5]。DDAH 敲除老鼠表现为血浆 ADMA 水平的升高,血浆和尿液中 NO 的水平下降,血管阻力升高[5]。在慢性肾衰早期,NOS 和 DDAH2表达的 mRNA 明显下调,冠状动脉内皮功能异常,造成各种心血管疾病的发生[6]。Dayorb,Hayan MD 等在研究 DDAH 对 NO 的调节作用时,通过转基因的方法在体内体外过度表达 DDAH。在体外培养的内皮细胞中过度表达 DDAH 发现 NOS 的活性和 NO 的生成明显增加,在 hDDAH 转基因小鼠体内,发现组织内 NOS 的活性和 NO 合成增加而且血浆 ADMA 水平下降。NO 生成的增加使得全身的血管阻力和心脏的收缩力下降[4]。Jones 等通过对 DDAH2 -8717G/6G 和 A-1150C 构建单倍型进行研究时发现,-8717G/-1150C 单倍型的启动子活性显著高于 -8716G/-1150A 单倍型,而 -8717G/-1150A单倍型的启动子活性与 -8716G/-1150A 单倍型的启动子活性间无显著的差别,提示 A-1150C 位点可能具有一定的功能并与 -8717G/6G 多态位点协同增强 DDAH2 的转录活性[7]。Ryan 等在一项前瞻性观察研究中发现,DDAH2 基因G-449C 单核甘酸多态性与感染性休克患者早期血浆 ADMA 升高密切相关[8]。最近 Bai 等对中国人群进行的一项多中心病例对照研究发现,DDAH2-449G 位点 C 等位在显性模式下和隐性模式下都可明显降低颅内出血的风险,但与动脉粥样硬化栓子所导致的脑中风的易感性不相关[9]。

本实验在中国北方人群中检测了 DDAH2 基因的 rs2272592 位点基因型在冠心病的分布情况。DDAH2 基因 rs2272592 位点 C/T 多态性与冠心病的发病不相关,以显性遗传模式分析发现 T 等位基因频率在冠心病组与对照组之间差异无统计学意义,T 等位基因既不是中国人冠心病发病的保护因素,也不是其独立危险因素。主要原因考虑:①两位点多态性分布在不同种族存在遗传差异;②本研究样本量有待进一步扩大。

总之,本研究首次在中国人群中研究了 DDAH2 基因的遗传变异与冠心病的关系,对以后进一步研究冠心病的发生发展机制提供了有益的指导。

参 考 文 献

[1] Leiper J M,Santa Maria J,Chubb A,et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases[J].Biochem J,1999,1(343):209-214.

[2] Anthony S, Leiper J,Vallance P. Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors[J].Vasc Med,2005,10(s1):3-9.

[3] Maas R. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylargine (ADMA) [J]. Vasc Med, 2005,10 (s1): 49-57.

[4] Dayoub H,Achan V,Adimoolam S,et al.Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis[J].Circulation,2003,108:1043-1048.

[5] Leiper J,Nandi M,Torondel B,et al.Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis[J].Nat Med,2007,13(2):198-203.

[6] Tatematsu S,Wakino S,Kanda T,et al. Role of nitric oxide-producing and -degrading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2007,18(3):741-749.

[7] Jones L C,Tran C T L,Leiper J M,et al. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,310(3):836-843.

[8] O'Dwyer M J,Dempsey F,Crowley V,et al. Septic shock is correlated with asymmetrical dimethyl arginine levels, which may be influenced by a polymorphism in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase Ⅱ gene:aprospective observational study[J]. Crit Care,2006,10(5):139.

[9] Bai Y,Chen J,Hui R.Common genetic variation in DDAH2 is asso-coated with intraccerebrail hemorrhage in Chinese population: a multicente rcase-control study in China[J]. Clin Sci,2009,117(7):273-279.

(责任编辑:冉明会)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132