基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0020-04

# 汉族人内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性与冠心病关系的研究

彭瑾瑜[1],彭怀燕[2],聂新民[2]

(1. 湖南省疾病预防控制中心性艾科,长沙 410005;2. 中南大学湘雅三医院检验科,长沙 410013)

【摘 要】目的:研究汉族人内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)基因 G894T 多态性与冠心病(Coronary heart disease,CAD)的关系。方法:采用聚合酶链反应限制性片断长度多态性(Polymerase chain reaction-restricted fragments length polymorphism,PCR-RFLP)技术检测了 103 例 CAD 患者、104 例对照组 eNOS 基因 G894T 多态性的基因型,分析了其对 CAD 的影响。结果:CAD 组和对照组 eNOS 基因 G894T 多态性的等位基因频率有显著性差异($P$=0.029),但是基因型分布在两组间的差异无统计学意义。Logistic 回归分析确定高血压病、糖尿病及吸烟史为 CAD 发生的独立危险因素,T 等位基因不是其发生的独立危险因素。结论:CAD 组的 eNOS 基因 G894T 突变频率高于对照组,T 等位基因可能与 CAD 的发生有一定的关联。

【关键词】内皮型一氧化氮合酶;冠心病;基因多态性;基因型;等位基因

【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-25

# Relationship between coronary heart disease and polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene G894T in Han Nationality

*PENG Jin-yu, et al*

(*Department for AIDS and STD Prevention and Control, Hunan Province Center for Disease Prevention and Control*)

【Abstract】 ***Objective***: To explore the relationship between polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene G894T and coronary heart disease (CAD) in Han Nationlity . ***Methods***: Polymerase chain reaction-restricted fragments length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine the genotype of the eNOS gene G894T in 103 patients with CAD and 104 controls. ***Results***: There was significant difference in frequencies of allele in G894T polymorphism of eNOS gene between CAD and control groups ($P$=0.029), but there was no significant difference in genotype distribution between two groups . Logistic regression analysis revealed that hypertension, diabete mellitus and smoking history were independent risk factors for the incidence of CAD, but T allele was not . ***Conclusion***: The frequency of eNOS gene G894T mutation in the CAD group is higher than that in the control group and T allele may be related to with the development of CAD.

【Key words】 Endothelial nitric oxide synthase; Coronary heart disease; Gene polymorphism; Genotype; Allele

冠心病(Coronary heart disease,CAD)是一种严重危害人们健康的疾病,它的病理基础是冠状动脉粥样硬化病变引起的冠状动脉狭窄,斑块的破裂和出血导致血栓形成,出现心肌缺血、心绞痛或者心肌梗塞。在一些个体中,常表现出明显的家族史,可能与遗传因素诱发冠状动脉粥样硬化及栓塞并发症的发生有关。人们已经认识到基因多态性如血管紧张素转换酶基因 DD 型及载脂蛋白 E 基因的 E4 等位基因是冠状动脉粥样硬化的遗传危险因素。根据相关文献的报道[1~3],一氧化氮(Nitric oxide,NO)是一种内皮源性血管舒张因子,它的主要功能是舒张血管平滑肌、阻止血小板的粘附和聚集、抑制血管平滑肌细胞增生、调节血管压力等[4,5]。eNOS 是位于血管内皮的生成 NO 的关键酶。到目前为止,已经发现了 10 多种 eNOS 的基因多态性位点,主要有5种单核苷酸多态性(启动子区域转录起始点上游-786 的 T/C 突变、内含子 18 的 A/C 突变、内含子 23 的 G/T 突变、外显子 6 的 C/T 突变和外显子7 的G/T

作者介绍:彭瑾瑜(1977- ),女,主管检验师,硕士,研究方向:心血管疾病的基因诊断。

通讯作者:聂新民,男,副主任检验师,E-mail:niexinmin7440@hotmail.com。

课题基金:中国博士后科学基金(2004035206)。

突变)、内含子 4 的 27 bp 可变数目串连重复顺序和内含子 13 的 CA 重复多态性。其中,只有位于外显子的多态性才能引起氨基酸顺序的改变,而外显子 6 的 C/T 突变是同义突变,外显子 7 的 G894T 的突变使氨基酸残基的 298 位谷氨酸被天冬氨酸取代(Glu298Asp)[6]。本研究采用聚合酶链反应-限制性片断长度多态性(Polymerase chain reaction-restricted fragments length polymorphism,PCR-RFLP)方法,研究湖南省汉族人群 eNOS 基因 G894T 多态性与 CAD 的关系。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

1.1.1 CAD 组 共 103 例,均为 2004 年 10 月~2005 年 9 月在中南大学湘雅三医院经过冠状动脉造影确诊为CAD患者。其中男性 79 例,女性 24 例,年龄 41~80 岁,平均年龄(65.7±9.4)岁。冠心病的诊断标准是冠状动脉造影时显示任一支血管存在≥50%狭窄,并根据累及支数定义为单支、双支和多支病变,累及左主干者记做 2 支病变。

1.1.2 对照组 共 104 例,均为 2005 年 7 月~9 月在湘雅三医院体检中心的体检者。其中男性 78 例,女性 26 例,年龄 45~83 岁,平均年龄(64.3±8.1)岁。该组是通过详细询问病史、体格检查、X 线胸片、心电图、心脏彩超、肝胆 B 超等检测确定为未患有 CAD 的体检者。

1.1.3 各种危险因素的确定 高血压,血压≥140/90 mmHg 或正接受降压治疗;糖尿病,随机血糖≥11.1mmol/L,或空腹血糖≥7.0 mmol/L,或口服葡萄糖耐量试验中 2 h 后血糖≥11.1 mmol/L 或正接受降糖治疗;高血脂症,胆固醇≥220 mg/dl(5.72 mmol/L)或甘油三脂≥150 mg/dl(1.70 mmol/L)或正接受降脂治疗;吸烟习惯,分为不吸烟、曾吸烟(戒烟至少 6 个月)和现吸烟(≥400 支×年);CAD 家族史,有一级直属亲属曾患有 CAD。CAD 组与对照组之间的年龄、性别无显著性差异($P$>0.05)。

全部研究对象均来自湖南地区汉族人群,且个体之间无血缘关系。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 自行设计 2 对引物,由上海生工有限公司合成。上游引物为:5'-GCCGAGGAGACTTCCGAATC-3';下游引物为:5'-GCAGCATGTTGGACACTGCC-3'。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 取研究对象的空腹静脉血 2ml 用 EDTA-$Na_2$ 抗凝,用上海生工有限公司的基因组抽提试剂盒 SK1262 提取全血基因组 DNA,紫外分光光度仪测 DNA 含量,然后放入 -4℃冰箱保存。

1.2.3 PCR 扩增条件 eNOS 基因的扩增反应体系为 50 μl,其中含 10×PCR Buffer 5.0 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 3.0 μl,10 mmol/L dNTPs 1.0 μl,上、下游引物各 10 pmol,模板 DNA 2.0 μl,TaqDNA 聚合酶 2 单位,用灭菌双蒸水补足至 50 μl。反应条件为 94℃预变性 5 min,再 94℃变性 1 min,56℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,反复 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min,4℃冷却 5 min。用含 2%的溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察 PCR 扩增产物。

1.2.4 PCR 扩增产物的限制性酶切 取 PCR 扩增产物 10 μl,加入 10×酶切缓冲液 2.0 μl,10 U/μl *Ban* Ⅱ 酶(MBI 公司)2.0 μl,用灭菌双蒸水补足至 20 μl,置于 37℃水浴箱酶切 12 h。用酶切产物在含 2%溴化乙锭的琼脂糖凝胶上电泳,在紫外凝胶成像系统中判断结果。

### 1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件包进行分析,以 $P$<0.05 认为差异有统计学意义。基因型和等位基因频率采用基因计数法计算,eNOS 基因 G894T 突变的基因型的 Hardy-Weinberg 平衡检验、组间基因型及等位基因频率比较用 $\chi^2$ 检验。组间临床资料的比较根据资料的性质,计量资料用非配对 $t$ 检验,以均数±标准差表示,计数资料用 $\chi^2$ 检验。用 Logistic 回归分析 CAD 的各种独立危险因素。

## 2 结 果

### 2.1 CAD 组和对照组临床资料的比较

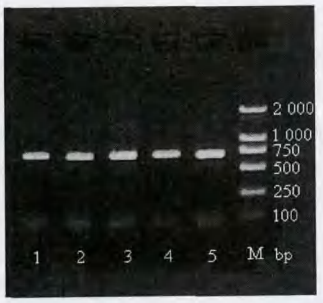
2 组在性别、年龄上进行了匹配。在 CAD 组高血压、糖尿病和吸烟史的比例明显高于对照组($P$<0.05)。高血脂症、CAD 家族史在 2 组之间无显著性差别($P$>0.05)。见表 1。

**表 1 CAD 组与对照组的临床资料**

| | CAD 组 ($n$=103) | 对照组 ($n$=104) | $P$ 值 |
|---|---|---|---|
| 年龄(岁) | 65.72±9.44 | 64.28±8.09 | 0.240 |
| 性别(男/女) | 79/24 | 78/26 | 0.775 |
| 高血压(有/无) | 71/32 | 46/58 | <0.001 |
| 糖尿病(有/无) | 27/76 | 14/90 | 0.024 |
| 高血脂症(有/无) | 35/68 | 32/72 | 0.658 |
| 冠心病家族史(有/无) | 14/89 | 13/91 | 0.839 |
| 吸烟史(有/无) | 57/46 | 36/68 | 0.003 |

### 2.2 PCR 扩增产物及酶切产物的电泳分析

用设计的引物与条件经 PCR 反应后电泳可得 681 bp PCR 扩增产物(见图 1)。扩增产物用 *Ban* Ⅱ 酶切后产生 3 种基因型:GG 型,被完全切开,酶切产物有 2 条带,228 bp 和 453 bp;GT 型,酶切产物包括 228 bp、453 bp 和 681 bp3 条带;TT 型,不被酶切,只有 681 bp 一条带(见图 2)。




M 泳道是 DNA Marker DL-2 000，从下至上分别代表 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp 和 2 000 bp，1、2、3、4、5 号泳道为 5 个样本的 PCR 产物，可见到有 681 bp 的条带

**图 1　eNOS 基因 G894T 突变的 PCR 产物的电泳图**

### 2.3　基因适合度的检测

对 eNOS 基因 G894T 突变的基因型频率经 $\chi^2$ 检验进行适合度检测，符合 Hardy-Weinberg 平衡（$P>0.05$），说明样本具有良好的代表性，不存在选择偏倚。

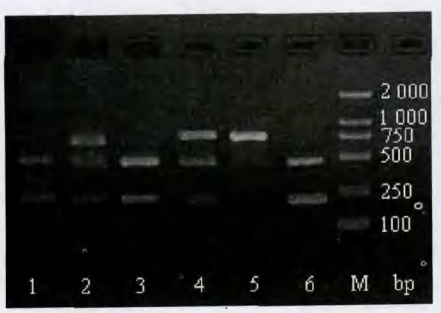
### 2.3　CAD 组与对照组 eNOS 基因 G894T 变异基因型和等位基因频率分布

CAD 组中有 26 例突变，其中纯合子 4 例，杂合子 22 例。对照组中有 15 例突变，除 1 例为纯合子外，其他都为杂合子。CAD 组的变异基因型的频率高于对照组，但无显著性差别（$P=0.109$），T 等位基因的频率明显高于对照组，差别有显著性（$P=0.029$）。

**表 2　冠心病组与对照组 eNOS 基因 G894T 的基因型及等位基因频率分布**

| 组别 | 例数 | 基因型 | | | 等位基因 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | GG | GT | TT | G | T |
| 冠心病组 | 103 | 77 | 22 | 4 | 176 | 30 |
| 对照组 | 104 | 89 | 14 | 1 | 192 | 16 |
| 合计 | 207 | 166 | 36 | 5 | 368 | 46 |

注：2 组基因型频率比较，$\chi^2=4.441$，$P=0.109$；等位基因频率比较，$\chi^2=4.947$，$P=0.029$




M 泳道是 DNA Marker DL-2 000，从下至上分别代表 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp 和 2 000 bp，1、2、3、4、5、6 号泳道为 6 个样本的酶切产物，1、3、6 号泳道有 2 条条带，为 228 bp 和 453 bp，是 GG 基因型；2、4 号泳道有 3 条条带，分别为 228 bp、453 bp 和 681 bp，是 GT 基因型；5 号泳道有 1 条条带，为 681 bp，是 TT 基因型

**图 2　eNOS 基因 G894T 突变的酶切产物的电泳图**

见表 2。

### 2.4　CAD 各种危险因素的 Logistic 回归分析

将所有研究对象作为整体进行分析，以性别、年龄、T 等位基因、有无高血压病、糖尿病、高血脂症、CAD 家族史及吸烟史作为自变量（X），将有无 CAD（有=1，无=0）作为应变量（Y），进行 Logistic 回归分析。结果显示，高血压病、糖尿病和吸烟史为本组研究对象 CAD 发生的独立危险因素（OR 分别为：2.987，1.883，2.705），T 等位基因不是 CAD 发生的独立危险因素。见表 3。

**表 3　CAD 各危险因素的 Logistic 回归分析结果**

| 选入变量 | β | SE | OR(95%CI) | $P$ 值 |
|---|---|---|---|---|
| 高血压 | 1.094 | 0.309 | 2.987(1.631~5.473) | <0.001 |
| 糖尿病 | 0.633 | 0.385 | 1.883(0.885~4.006) | 0.100 |
| 吸烟史 | 0.995 | 0.306 | 2.705(1.486~4.923) | 0.001 |

## 3　讨　论

NO 的化学性质非常活泼，半衰期只有 5~10 s，而且 NO 有很强的亲脂性，极易透过生物膜，与血红蛋白、肌球蛋白和可溶性鸟苷酸环化酶的铁离子有高度亲和性，所以不易准确定量测定，故对 NO 的认识多来自于它的限速酶 eNOS 的研究。eNOS 位于7号染色体短臂 35~36 区。它是由 26 个外显子和 25 个内含子组成，全长 21 kb[7]。冠心病是一种由遗传因素和环境因素共同所致的复杂疾病，导致动脉粥样硬化的高危因素有高血压、高脂血症、吸烟、糖尿病等。经研究，这些危险因素都能引起血管内皮结构不完整和功能不完全，NO 合成和释放减少，NO 抑制血小板和白细胞粘附功能减弱，血小板等有形成分大量粘附聚集形成血栓，引起血管腔狭窄，甚至急性闭塞；NO 抑制血管平滑肌细胞增生作用减弱，平滑肌细胞大量增生和迁移，加速了动脉粥样硬化。因此，冠心病的发生、发展被认为可能和 eNOS 基因变异有关。

eNOS 基因的 G894T 突变导致 298 位的谷氨酸被天冬氨酸取代，虽然该位点不位于酶的功能性序列，但计算机分析 298 位谷氨酸正处于 α-螺旋的中心，错义突变导致 eNOS 在此处的构象由 α-螺旋变为紧密折叠，提示此突变影响 eNOS 蛋白功能，使NO 生成减少，但也可能仅仅是涉及发病机制的遗传因素的一个标记[8]。另外有分子水平研究表明完整的

eNOS 的 Asp298 具有和 Glu298 相同的酶活性，但在细胞和组织或体外均可发生选择性的裂解N-末端 35 kPa 和 C-末端 100 kPa 的 2 个片段，在带有该等位基因时，eNOS 的完整活性下降，从而影响 eNOS 的功能。证实了带 eNOSAsp298 的突变可导致 eNOS 功能受损，NO 产生减少，血管紧张性增高而引起高血压的设想，尤其是在有环境因素影响的情况下，内皮功能更受影响，动脉硬化和脑血管疾病的危险性都可能增加[9]。

本研究结果显示，我国湖南地区汉族人群冠心病患者和对照人群中，G 等位基因和 T 等位基因频率分别为 0.854、0.923 和 0.146、0.077。Suin Yoon 等[1]人研究了韩国人群中 656 例 CAD 患者和 276 例对照者的 eNOS 基因 G894T 突变，发现 G 等位基因和 T 等位基因频率分别为 0.901、0.931 和 0.099、0.069，与本研究结果基本一致。Hibi 等[2]人研究了日本人群的急性心肌梗死(Acute myocardial infarction，AMI)患者 eNOS 基因的 G894T 突变，突变频率和韩国人群相当接近。Hingorani 等[3]在英国白人中研究 249 例 AMI 患者和 183 例对照者的 G894T 变异与冠心病、心肌梗死的关系，结果表明 T 等位基因频率分别为 0.396 和 0.309，明显高于上述结果。Cai 等[10]研究了 763 例澳大利亚白种人，也证实了白人的 T 等位基因频率远高于亚洲人。

本研究采用了病例-对照的方法，纳入了 103名冠心病患者，104 名对照，参加研究者均为汉族人，结果发现 eNOS 基因 G894T 突变的等位基因频率在两组间有显著性差异($P$=0.029)，而该突变的基因型在 2 组间的差异尚未达到统计学意义。本研究还采用 Logistic 回归分析了 CAD 各种危险因素，明确了高血压病、糖尿病和吸烟史是 CAD 发生的独立危险因素，T 等位基因不是 CAD 发生的独立危险因素，这一点与国外的研究有所不同。而 Shimasaki 等[11]在另一日本人群中进行病例-对照研究，发现 AMI 组中 T 突变频率显著高于对照组，Logistic 回归分析表明，T 突变是心肌梗死的独立危险因素。Hibi 和 Suin Yoon 等[1,2]人的研究也显示 eNOS 基因G894T 突变不仅等位基因频率而且基因型在组间有显著性差异。也有不同的报道，Cai 等[10]研究的澳大利亚白种人 eNOS 基因 G894T 的突变发生率在冠心病组和正常对照组没有显著差异。

综上所述，T 等位基因可能与冠心病发生有一定的关联，由于本研究对象数量有限、病例或对照组的选择标准不很严格以及基因之间的连锁不平衡现象，基因突变存在着种族、环境及地理因素的差异，而疾病本身的复杂性等多种原因，造成了研究结论的不一致。今后的工作要通过大样本和家系进行统计学分析单个等位基因出现频率和基因型频率，并检测突变的基因频率与血浆中的 NOS 水平、活性以及 NO 水平的相关关系，从转录和翻译水平了解其间的内在联系，并探讨基因之间连锁不平衡现象，为临床工作提供指导。

## 参 考 文 献


[1] Suin Y, Chol S, Hyun-Young P, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with vessel stenosis in Korean population [J]. Clinica Chimica Acta, 2005, 353(1-2): 177-185.

[2] Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction[J]. Hypertension, 1998, 32(3): 521-526.

[3] Hingorani A D, Liang C F, Fatibene J, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK[J]. Circulation, 1999, 100(14): 1515-1520.

[4] Furchgott R F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide [J]. Biosci Rep, 1999, 19(4): 235-251.

[5] Palmer R M, Ferrige A G, Moncada S, et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor [J]. Nature, 1987, 327(6122): 524-526.

[6] Wang X L, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease[J]. Molecular genetics and metabolism, 2000, 70(4): 241-251.

[7] Marsden P A, Heng H H, Scherer S W, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene[J]. J Biol Chem, 1993, 268(23): 17478-17488.

[8] Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese[J]. Hum Genet, 1998, 103(1): 65-69.

[9] Uwabo J, Soma M, Nakayama T, et al. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese[J]. Am J Hypertens, 1998, 11(1pt1): 125-128.

[10] Cai H, Wilcken D E, Wang X L. The Glu298Asp (894G/T)mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease[J]. J Mol Med, 1999, 77(6): 511-514.

[11] Shimasaki Y, Yause H, Yoshimura M, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction[J]. J Am Coll Caridiol, 1998, 31(7): 1506-1510.


(责任编辑：冉明会)