

磷酸二酯酶 4D 基因 rs918592 位点多态性与急性冠脉综合征的关系

韩鹏黎, 程晓丹, 刘建华, 刘新叶, 池豪, 曹巍, 杨东伟

郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450007

摘要: **目的** 探讨磷酸二酯酶(phosphodiesterase 4D, PDE4D)基因 rs918592 位点多态性与急性冠脉综合征的关系。 **方法** 运用聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态性方法(PCR-RFLP)检测 50 例急性冠脉综合征患者(ACS 组)及 100 例同期经冠脉造影排除冠心病诊断的患者作为对照组(NC 组)血液中 PDE4D 基因 rs918592 位点多态性, 比较两组间的 PDE4D 基因 rs918592 位点多态性差异。 **结果** 150 个样本中 AA、AG、GG 基因型频率分别为 22.67%、56.66%、20.67%, 符合 Hardy · Weinberg 定律($\chi^2=2.686, P=0.101$)。ACS 与 NC 两组的 GG 基因型(18% vs. 25%)、AA+AG 基因型(82% vs. 75%)分布以及 G(57% vs. 55%)、A(43% vs. 45%)等位基因频率差异无统计学意义($P<0.05$)。 **结论** PDE4D 基因 rs918592 位点多态性与急性冠脉综合征无关。

关键词: 磷酸二酯酶 4D 基因; rs918592 位点多态性; 急性冠脉综合征

中图分类号: R543.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2019)01-0030-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.01.008

Relationship between polymorphism of rs918592 locus in phosphodiesterase 4D gene and acute coronary syndrome

HAN Peng-li, CHENG Xiao-dan, LIU Jian-hua, LIU Xin-ye, CHI Hao, CAO Wei, YANG Dong-wei

Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450007, China

Corresponding author: YANG Dong-wei, E-mail: yangdongwei@126.com

Abstract: **Objective** To explore the association of polymorphism of rs918592 locus in phosphodiesterase 4D (PDE4D) gene with acute coronary syndrome (ACS). **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to determine the polymorphism of rs918592 locus in PDE4D gene in 50 patients with ACS (the ACS group) and 100 patients who underwent coronary artery angiography and were diagnosed without coronary artery disease at the same time (the normal control group). The difference in the polymorphism of rs918592 locus in PDE4D gene was compared between the two groups. **Results** Genotype frequencies of AA, AG and GG in the 150 patients were 22.67%, 56.66% and 20.67% respectively, which conformed to Hardy · Weinberg law ($\chi^2=2.686, P=0.101$). No statistically significant differences were found in the frequencies of GG genotype (18% vs. 25%) and AA+AG genotype (82% vs. 75%) as well as G (57% vs. 55%) and A (43% vs. 45%) allele between the two groups. **Conclusions** The polymorphism of rs918592 loci in PDE4D gene is not associated with ACS.

Key words: phosphodiesterase 4D gene; rs918592 locus polymorphism; acute coronary syndrome

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)是严重危害人类健康最常见的心脏病之一,是因冠状动脉粥样硬化致使血管腔狭窄、阻塞或功能性改变如冠脉痉挛导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病变。急性冠脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)是冠心病中较严重的类型,易发生心力衰竭以及猝死等严重并发症^[1]。

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(No.142102310460)

作者简介: 韩鹏黎(1987-),女,硕士,药师,研究方向:药理学。

通信作者: 杨东伟, E-mail: yangdongwei@126.com。

磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)是一个多基因大家族,在体内广泛分布, PDE 4D 是 PDE 超家族的成员之一, PDE 4D 基因位于 5q12, 其长度大约 1.5 Mb, 至少有 22 个外显子, 编码至少 9 个不同的异构体^[2]。研究表明, PDE4D 基因 rs918592 位点多态性与缺血性脑卒中有较强的相关性^[3-5]。ACS 的发病机制与缺血性脑卒中有相似之处, PDE4D 基因 rs918592 位点多态性与 ACS 是否相关目前国内研究较少。本实验通过聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length

polymorphism, PCR-RFLP) 方法检测 50 例急性冠脉综合征患者 (ACS 组) 及 100 例正常对照组 (NC 组) 血液中 PDE4D 基因 rs918592 位点多态性, 比较两组间的 PDE4D 基因 rs918592 位点多态性差异, 探索其与急性冠脉综合征的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 入选标准: 选取郑州大学附属郑州中心医院 2015–2016 年住院病例, 入院诊断考虑急性冠脉综合征并通过冠状动脉造影确诊病例 50 例, 并选取同期经冠脉造影排除了冠心病诊断的患者 100 例作为对照组 (NC 组)。按 2007 年美国心脏病学会 (American College of Cardiology, ACC)/美国心脏协会 (American Heart Association, AHA) 急性冠脉综合征诊疗指南的诊断标准。

排除标准: 患有严重肝肾脑肺疾病、严重瓣膜性心脏病、心肌病、风心病、肺源性心脏病患者、重症感染、甲亢、活动性结核、近 1 个月内应用激素或其他免疫抑制剂、肿瘤、自身免疫疾病、感染性疾病或感染急性期、银屑病、妊娠、近期皮肤及组织损伤等病患。

1.2 试剂 血液 DNA 提取试剂盒 (购自天根生物)、cDNA 第一链合成试剂盒 (购自 Thermo)、2×Taq MasterMix 逆转录试剂盒 (购自北京康为世纪生物公司)、100 bp Ladder Marker 试剂盒 (购自北京康为世纪生物公司); PDE 4D-rs918592 特异性引物 (上海英俊公司); 内切酶 Apal I (Ferments 公司)。

1.3 方法

1.3.1 基本指标的测量 身高及体重测量: 要求选用同一身高体重计测量, 所有能站立的对象均于入院后第一个清晨在空腹状态下, 穿单衣单裤、赤脚, 脚跟、骶骨部及两肩胛间紧靠身高计立柱上; 不能站立者采用赛康 seca985 型电子病床透析秤测量患者体重, 于患者能够站立时测量身高。所有数据均连续测两次取其平均值, 计算体重指数 (body mass index, BMI)。

所有患者均于入院后第一个清晨空腹采取外周静脉血, 测定其甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 所有标本使用德国罗氏全自动生化仪测定。

1.3.2 PCR-RFLP 检测 PDE4D 基因 rs918592 多态性

1.3.2.1 外周血基因组 DNA 提取 参照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 提取患者外周血基因组

DNA, 于 -80 °C 保存备用。

1.3.2.2 PCR 及琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 PCR 引物通过软件 Primer 5.0 设计, 由上海英俊公司合成, 上游引物 F: 5'-CAGAGTGCTGATCAACATTGGT-3', 下游引物 R: 5'-ATGGAGTCCACAGGGCTTTATT-3'。用 2×PCR Master Mix 反应液进行 PCR 扩增, 25 μl PCR 反应体系包括: 8.5 μl 灭菌超纯水, 12.5 μl 2×Taq PCR Master Mix, 1 μl 上游引物 (10 μM), 1 μl 下游引物 (10 μM), 2 μl DNA 模板。PCR 扩增条件: 95 °C 2 min; 94 °C 45 s, 63 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 10 min。PCR 结束后, PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 依据 PCR 产物片段大小, 初步检测 PCR 的特异性。

为防止 PCR 污染, PCR 前处理和后处理在不同隔离区内进行, 各工作区均有一定的隔离, 操作器材专用。另外, PCR 扩增所需试剂均在装有紫外灯的超净工作台配制和分装。操作时设阴阳性对照和空白对照, 以验证 PCR 的可靠性, 及协助判断扩增系统的可信性。

1.3.2.3 RFLP (限制内切酶酶切) 分析 20 μl 酶切反应包括: 5 μl PCR 扩增产物, 2 μl 10×Buffer G, 1 μl (20 U) 限制性内切酶 Apal I, 12 μl 灭菌超纯水。置 37 °C 水浴酶切 1 h 后, 终止酶切反应, 产物经过 1 200 rpm 离心 1 min, 于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 1 h), 分析。

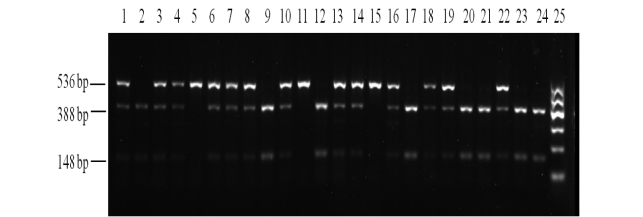
1.4 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件对结果进行统计学分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用基因计数法计算两组基因型和等位基因频率, 等位基因频率 = (2×纯合子数 + 杂合子数) / (2×受检人群), 频率比较采用 χ^2 检验, 以比值比 OR 及其 95% 可信区间 CI 表示相对风险度。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDE4D 基因 rs918592 位点 PCR 产物酶切结果 150 个样本中 AA、AG、GG 基因型频率分别为 22.67%、56.66%、20.67%, 符合 Hardy · Weinberg 定律 ($\chi^2 = 2.686, P = 0.101$)。PDE4D 基因 rs918592 位点 PCR 扩增产物大小为 536 bp, 经限制性内切酶 Apal I 酶切后, 纯合子 GG 基因型为 388、148 bp 两个片段, 纯合子 AA 无酶切位点, 为 1 个 536 bp 片段, 杂合子 AG 基因型酶切后可见 148、388、536 bp 共 3 个条带。见图 1。

2.2 ACS 组和 NC 组的临床分析 ACS 组和 NC 组患者的年龄、性别组成、高血压分布、糖尿病分布、吸烟分

布、BMI、TG、TC、LDL-C、HDL-C 等各项指标比较,可以看到,除平均年龄、性别构成、糖尿病构成外,高血压发生率、吸烟率、体重指数、TG、TC、LDL-C、HDL-C 等各项指标在两组间差异有统计学意义($P<0.05$),ACS 组高血压发生率、吸烟率、体重指数、TG、TC、LDL-C、HDL-C 显著高于对照组,见表 1。



注:泳道 1、3、4、6、7、8、10、13、14、16、18、19、22 为 AG 基因型(148、388、536 bp),泳道 2、9、12、17、20、21、23、24 为 GG 基因型(148、388 bp),泳道 5、11、15 为 AA 基因型(536 bp),泳道 25 为 100 bp DNA marker。

图 1 PDE4D 基因 rs918592 位点 PCR 扩增产物经限制性内切酶 Apal I 酶切后行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳

表 1 ACS 组与 NC 组的临床资料分析				
项目	ACS 组(n=50)	NC 组(n=100)	χ^2 值	P 值
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	61.66 \pm 12.70	64.79 \pm 8.69	1.57	0.123
性别(男/女)	41/9	77/23	0.24	0.624
高血压[例(%)]	21(42)	20(20)	7.05	0.011
糖尿病[例(%)]	9(18)	8(8)	3.32	0.065
吸烟[例(%)]	19(38)	15(15)	8.79	0.006
体重指数(kg/m ² , $\bar{x}\pm s$)	24.66 \pm 2.49	21.89 \pm 1.76	7.04	0.008
总胆固醇(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	4.91 \pm 1.46	3.56 \pm 0.65	6.24	0.009
甘油三酯(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	2.40 \pm 3.48	1.24 \pm 0.42	2.35	0.028
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	3.15 \pm 1.12	1.95 \pm 0.49	7.24	0.008
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	0.96 \pm 0.21	1.22 \pm 0.32	5.96	0.018

2.3 ACS 组与 NC 组间基因型和等位基因频率比较
见表 2。分析 PDE4D 基因 rs918592 位点多态性,经卡方检验,GG 基因型、AA+AG 基因型分布以及 G、A 等位基因频率在 ACS 与 NC 两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 ACS 组与 NC 组间 rs918592 位点基因型和等位基因频率比较(%)						
基因型和等位基因	ACS 组(<i>n</i> =50)	NC 组(<i>n</i> =100)	χ^2 值	<i>P</i> 值	OR 值	OR95%CI
rs918592 基因型						
GG	18	25	0.822	0.364	0.708	(0.336,1.495)
AA+AG	82	75				
rs918592 等位基因						
G	43	55	0.108	0.742	1.085	(0.668,1.760)
A	57	45				

3 讨论
磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)是一个多基因大家族,由 11 种不同的家族组成,且各家族包含不同的亚型,各个亚型在细胞内分布、表达、调节方式以及对抑制剂的敏感性均不同,参与了炎症、哮喘、抑郁、勃起功能障碍等多种病理过程的发生发展,这些特点使得 PDE 作为新的药物靶点得到了越来越多的关注^[6]。PDE4D 是 PDE 超家族的成员之一,PDE4D 基因位于 5q12,其长度大约 1.5 Mb,至少有 22 个外显子,编码至少 9 个不同的异构体^[2]。

Gretarsdottir 等^[3]通过对冰岛人群进行研究,认为 PDE4D 基因主要是通过促进动脉粥样硬化的形成而引起缺血性脑卒中的发生。有学者认为,PDE4D 表达增加可引起血管平滑肌增生、移行以及血管受损处局部炎症反应的加剧,从而促进动脉粥样硬化的形成、导致血管粥样斑块的不稳定性增加^[2]。

本研究对 PDE4D 基因 rs918592 位点多态性进行分析,结果显示,ACS 组与 NC 组两组间在基因型和等位基因频率上差异无统计学意义($P>0.05$),而本研究小组在其他研究中发现,ACS 组与 NC 组的 PDE 4D 蛋白水平有差异,ACS 患者血液中 PDE 4D 蛋白水平较高,笔者推测,出现该结果可能是因为 PDE4D 基因存在多个多态性位点。

综上所述,PDE4D 基因 rs918592 位点多态性与急性冠脉综合征无关。

参考文献
[1] 黄兆章,周希敏.急性冠脉综合征早期的识别和救治[J].实用临床医药杂志,2007,11(1):82-84.
[2] Le Jeune IR, Shepherd M, van Heeke Q, et al. Cyclic AMP-dependent transcriptional up-regulation of phosphodiesterase 4D5 in human airway smooth muscle cells. Identification and characterization of a novel PDE4D5 promoter[J]. J Biol Chem, 2002, 277(39): 35980-35989.
[3] Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, et al. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke[J]. Nat Genet, 2003, 35(2):131-138.
[4] Song Q, Cole JW, O'Connell JR, et al. Phosphodiesterase 4D polymorphisms and the risk of cerebral infarction in a biracial population: the Stroke Prevention in Young Women Study[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(16):2468-2478.
[5] Sex-dependent association of phosphodiesterase 4D gene polymorphisms with ischemic stroke in Henan Han population[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(13): 2255-2259.
[6] Sun YC, Zhang L, Cheng KD, et al. Progress in the study of phosphodiesterases 4[J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(10): 1161-1167.