

冠心病与 NAD(P)H 氧化酶 p22phox 基因 C242T 多态性*

房盛夏¹, 刘同涛², 王莉莉¹, 贾崇奇¹

摘要:目的 探讨烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 [NAD(P)H 氧化酶] p22phox 基因 C242T 多态性与冠心病的关系。方法 采用病例对照研究方法, 收集早发冠心病患者 309 例, 迟发冠心病患者 437 例, 对照 470 例, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 基因分型技术对 p22phox 基因 C242T 位点的多态性进行检测; 采用单因素和多因素 logistic 回归计算 p22phox 基因 C242T 多态性与冠心病风险的 OR 值及 95% CI。结果 与对照组比较, 早发冠心病组携带 TC+TT 基因型的个体比携带 CC 基因型更容易患冠心病, OR = 1.58, 95% CI = 1.07 ~ 2.34; 迟发冠心病组 OR = 1.48, 95% CI = 1.03 ~ 2.13; 多因素调整后, 与对照组比较, 早发冠心病组 OR = 1.74, 95% CI = 1.16 ~ 2.62; 2 个病例组比较, 携带 TC+TT 基因型与携带 CC 基因型的患病风险差异均无统计学意义。结论 p22phox 基因 C242T 多态性的 T 等位基因可能是冠心病的危险因素。

关键词: NADH/NADPH 氧化酶; p22phox 基因; 多态性; 冠心病

中图分类号: R 541.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)04-0464-03

Relationship between coronary heart disease and NADH/NADPH oxidase p22phox gene C242T polymorphism

FANG Sheng-xia, LIU Tong-tao, WANG Li-li et al. Department of Epidemiology and Health Statistics, Shandong University (Jinan 250012, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between nicotinamide adenine dinucleotide hydrate/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate (NADH/NADPH) oxidase p22phox gene C242T polymorphism and coronary heart disease (CHD). **Methods** A hospital-based case-control study was conducted among 309 premature CHD, 437 late-onset CHD patients and 470 controls. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the polymorphism. Univariate and multivariate logistic regression models were performed to estimate odds ratios (ORs) and 95% confidence interval (CI) of CHD. **Results** The odds ratios of CT+TT versus CC genotype of C242T polymorphisms for CHD between early-onset CHD group and controls were statistically significant in both univariate logistic model (OR = 1.58, 95% CI: 1.07 - 2.34) and multivariate logistic model (OR = 1.74, 95% CI: 1.16 - 2.62). For the comparison between late-onset CHD group and controls, the odds ratio was statistically significant (OR = 1.48, 95% CI: 1.03 - 2.13) in univariate logistic model. However, when comparing early-onset CHD group with late-onset CHD group, the odds ratios in neither univariate analysis nor multivariate logistic regression were statistically significant. **Conclusion** T allele of p22phox gene C242T polymorphism may be a risk factor for CHD.

Key words: NADH/NADPH oxidase; p22phox gene; polymorphism; coronary heart disease

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 [NAD(P)H 氧化酶] 在心血管系统中具有重要作用^[1], 研究表明, 细胞色素 b245 基因 (p22phox 基因) C242T 多态性是冠心病患者中 NAD(P)H 氧化酶活性的主要决定因素^[2]。近年来有关 p22phox 基因 C242T 多态性与冠心病关系的研究, 由于设计和种族等差异结果不尽一致。本研究采用病例对照研究方法, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性基因分型技术, 分析比较了早发冠心病、迟发冠心病和正常人群与 p22phox 基因 C242T 多态性的关系。现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2001 年 6 月-2009 年 7 月在山东大学齐鲁医院心内科确诊的冠心病新发病例 746 例, 年龄 30~90 岁。参照文献^[3], 以其中男性 ≤55 岁、女性 ≤65 岁患冠心病为早发冠心病, 计 309 例; 男性 >55 岁、女性 >65 岁患冠心病为迟发冠心病, 计 437 例。按年龄段和性别构成比基本匹配, 选取在该医院健康体检中心进行体检、无冠心病现病史和既往史的健康人群 470 人为对照。研究对象之间无血缘关系; 所有

研究对象均经知情同意后进行调查和采集血样。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查与体检 采用自行设计调查表进行问卷调查, 内容主要包括人口学资料、吸烟、饮酒等情况。体格测量包括身高、体重、血压等, 计算体质指数 (Body mass index, BMI)。每日吸烟 ≥1 支、持续 ≥1 年者定为吸烟; 每周平均饮酒 ≥3 次, 每次饮酒折合酒精 ≥50 mL, 持续 ≥1 年者定为饮酒; 收缩压 ≥140 mm Hg 或舒张压 ≥90 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa) 或有高血压现病史者定义为高血压; BMI ≥24 定义为超重^[4]。

1.2.2 血样采集 采集研究对象空腹肘静脉血 5 mL, 其中 4 mL 分离血清, 用于血脂指标检测; 1 mL 用 5% 的乙二胺四乙酸二钠盐按 20 μl/mL 血液抗凝, 用于基因组 DNA 提取。

1.2.3 血脂检测 采用日立 717S 全自动生化分析仪和北京中生生物工程高技术公司提供的试剂盒, 用酶比色法测定血清甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量。血脂的检测由山东大学齐鲁医院检验科协助完成。

1.2.4 C242T 多态性检测 (1) 基因组 DNA 提取: 采用常规十二烷基硫酸钠及蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿提纯, 乙醇沉淀。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法检测 C242T 基因多态性。(2) PCR 引物: 上游引物: 5'-AACCCTTTGGTCTTGTGG-3', 下游引物: 5'-

* 基金项目: 山东省自然科学基金 (Y2007C005)

作者单位: 1. 山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学研究所, 山东 济南 250012; 2. 山东大学齐鲁医院心内科

作者简介: 房盛夏 (1984-), 女, 山东青岛人, 硕士在读, 研究方向: 慢性病流行病学。

通讯作者: 贾崇奇, E-mail: jiachongqi@sdu.edu.cn

CCTCGGATTTGGAGTGGAT -3'。(3) PCR 扩增反应体系: 25 μL, 其中包括基因组 DNA 100 ng, TaqDNA 聚合酶 2U, Dntp 20 μmol/L, 引物各 15 pmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, 10 × PCR buffer 2.5 μL。(4) 反应条件: 94 °C 5 min 热启动后, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 60s, 30 个循环, 最后 72 °C 延长 5 min。取扩增产物 10 μL 加入 5U Rsa I 限制性内切酶, 37 °C 水浴过夜, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪下确定基因型。(5) 判定标准: CC 为 1 条带, 451 bp; CT 为 3 条带, 分别为 451、281、170 bp; TT 为 2 条带, 分别为 281、170 bp。

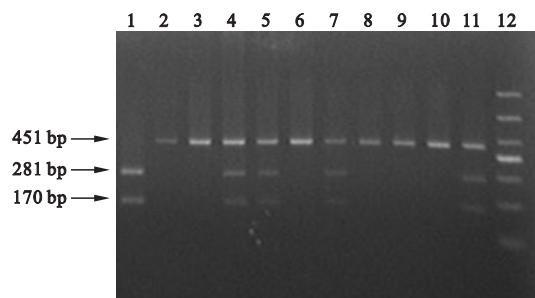
1.3 统计分析 采用 STATA 9.2 软件进行统计分析; 任意 2 组间计量资料比较采用单因素方差分析, 分类变量资料比较以及 Hardy-Winberg 平衡检验采用 χ^2 检验; 采用单因素 Logistic 回归估计基因型比值比(OR) 采用多因素 logistic 回归分析调整不同血脂水平(TG ≥ 1.7 mmol/L, TC ≥ 5.2 mmol/L)、吸烟、饮酒、高血压、超重等混杂因素; 采用双侧检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 基本情况 (1) 早发冠心病组: 309 例患者中, 男性 189 例, 女性 120 例, 性别比为 1.58:1。平均年龄(50.62 ± 7.43) 岁。收缩压(127.52 ± 17.87) mm Hg, 舒张压(78.61 ± 11.27) mm Hg, 脉压差为(48.92 ± 15.18) mm Hg, 高血压患病率为 44.01%。吸烟率为 44.66%, 饮酒率为 27.51%, 超重率为 80.58%, 血清 TG 含量为(1.96 ± 1.17) mmol/L, 血清 TC 含量为(5.12 ± 1.08) mmol/L。(2) 迟发冠心病组: 437 例, 男性 323 例, 女性 114 例, 性别比为 2.83:1。平均年龄(68.48 ± 7.68) 岁。收缩压(131.16 ± 22.16) mm Hg, 舒张压(77.30 ± 12.43) mmHg, 脉压差(53.87 ± 17.60) mmHg, 高血压患病率为 48.28%。吸烟率为 36.01%, 饮酒率为 17.66%, 超重率为 64.07%, 血清 TG 含量为(1.52 ± 0.86) mmol/L, 血清 TC 含量为(4.98 ± 1.20) mmol/L。(3) 对照组: 470 人, 男性 343 人, 女性 127 人, 性别比为 2.70:1。平均年龄(49.59 ± 8.67) 岁。收缩压(131.99 ± 16.50) mmHg, 舒张压(83.13 ± 12.81) mmHg, 脉压差(48.86 ± 10.28) mmHg, 高血压患病率为 36.17%。吸烟率为 46.67%, 饮酒率为 61.80%, 超重率为 68.72%。血清 TG 含量为(1.87 ± 1.84) mmol/L, 血清 TC 含量为(5.13 ± 0.94) mmol/L。早发冠心病组与对照组比较, 性别比、收缩压、舒张压、高血压患病率、饮酒率、超重率的差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。迟发冠心病组与对照组比较, 年龄、舒张压、脉压差、高血压患病率、吸烟率、饮酒率、甘油三酯均值的差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。早发冠心病组与迟发冠心病组比较, 年龄、性别比、收缩压、脉压差、吸烟率、饮酒率、超重率、甘油三酯均值的差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.2 p22phox 基因 C242T 扩增产物图谱(图 1) 成功扩增到与预期数量、大小一致的目的片段。

2.3 基因型及等位基因频率分布(表 1) 3 组的基因型分布均符合 Hardy-Winberg 平衡定律。表 1 可见, 早发冠心病组、迟发冠心病组 p22phox 基因 C242T 突变基因型分布和等位基因频率的差异均有统计学意义($P_{\text{早发基因型}} = 0.023$, $P_{\text{早发等位基因}} = 0.016$; $P_{\text{迟发基因型}} = 0.048$, $P_{\text{迟发等位基因}} = 0.029$)。早发冠心病组与迟发冠心病组比较, 差异均无统计学意义($P_{\text{基因型}} = 0.899$ 和 $P_{\text{等位基因}} = 0.721$)。



注: 1: 为 TT 纯合子; 4, 5, 7, 11: 为 TC 杂合子; 2, 3, 6, 8, 9, 10: 为 CC 纯合子; 12: DNA Marker。

图 1 p22phox 基因 C242T 突变区 PCR 扩增产物 Rsa I 酶切电泳结果

表 1 NAD(P)H 氧化酶 p22phox 基因 C242T 基因型和等位基因频率分布比较

C242 多态性	早发冠心病(309 例)		迟发冠心病(437 例)		对照(470 人)	
	频数	%	频数	%	频数	%
基因型						
CC	250	82.30	358	82.70	409	87.02
CT	57	17.24	77	16.90	61	12.98
TT	2	0.46	2	0.40	0	0
等位基因						
C	557	90.13	793	90.73	879	93.51
T	61	9.87	81	9.27	61	6.49

2.4 C242T 多态性与冠心病关系 单因素与多因素 logistic 回归分析结果显示, 与对照组比较, 早发冠心病携带 CT + TT 基因型的个体患冠心病的风险是 CC 基因型的 1.58 倍(95% CI = 1.07 ~ 2.34, $P = 0.021$); 经调整性别、舒张压、BMI、TC、TG、吸烟、饮酒后, 其 OR = 1.74(95% CI = 1.16 ~ 2.62, $P = 0.007$), 差异均有统计学意义。迟发冠心病携带 CT + TT 基因型的个体患冠心病的风险是 CC 基因型的 1.48 倍(95% CI = 1.03 ~ 2.13, $P = 0.034$), 差异有统计学意义, 经多因素调整后, 差异无统计学意义(OR = 1.61, 95% CI = 0.87 ~ 2.99, $P = 0.130$)。与迟发冠心病比较, 早发冠心病组携带 CT + TT 基因型的个体患冠心病的风险是 CC 基因型的 1.07 倍(95% CI = 0.74 ~ 1.55, $P = 0.725$); 调整后 OR = 1.08(95% CI = 0.73 ~ 1.59, $P = 0.715$), 差异均无统计学意义。

3 讨论

p22phox 基因是 NADPH 氧化酶的主要组成部分, 在产生活性氧的过程中起着重要作用, C242T 突变可能通过提高 NADPH 氧化酶的活性并参与脂蛋白的氧化而增加血管内的氧化压力⁽⁵⁻⁶⁾, 这与本研究结果相似, 提示 T 等位基因是冠心病的危险因素。Nasti⁽⁷⁾ 在对意大利白人的研究中, 发现 276 例冠心病患者的 T 等位基因频率高于 218 名对照(0.400 vs. 0.332, $P < 0.01$), 而且在单血管病变的早发冠心病(<55 岁)与迟发冠心病(>65 岁)的比较中, 以及在至少 1 支冠脉血管阻塞超过 98% 与无 1 支冠脉血管阻塞超过 98% 的冠心病患者的比较中, 这种差别更大。提示 T 等位基因是冠心病尤其是早发冠心病的危险因素, 而且与病情的严重程度相关。Cahilly⁽⁸⁾ 对确诊的冠心病患者进行基线冠脉造影后随访 2.5 年再行冠脉造影, 发现有 C242T 突变的患者其最小管腔直径的损失比无该突变的患者高 3 ~ 5 倍, 而且其动脉粥样硬化的进展更迅速, 恢复更慢。Cai⁽⁹⁾ 发现在 ≤45 岁的人群中, 具有该突变的研究对象患冠心病的危险性增高。Macias-Reyes⁽¹⁰⁾

采用以医院为基础的病例对照研究分析 p22phox 基因 C242T 突变同冠心病的关系 结果显示 C242T 突变在女性人群中是冠心病的危险因素。

早发冠心病和晚发冠心病在遗传背景方面可能存在较大差异。Nasti⁽⁷⁾ 研究显示,具有单血管病变的冠心病患者中,年龄 <55 岁的患者携带 TT/TC 基因型的概率(75%) 大于年龄 >65 岁的患者(47.9%)。在本研究中,将冠心病病人根据患病年龄划分为早发冠心病和迟发冠心病 2 组比较的结果无统计学意义,可能与年龄的界定不同有关。

有关 C242T 突变是否是冠心病发病的危险因素目前尚无定论。不同的研究设计,对疾病定义的不同以及遗传背景的差异可能是造成结果差异的一个原因。同时冠心病也可能与多基因遗传因素有关⁽¹¹⁾ C242T 多态性仅仅是一个遗传标记,还是与冠心病发生相关的因素,以及与冠心病之间的关系尚需进一步研究。

参考文献

- (1) Moreno MU, Zalba G. CYBA gene variants as biomarkers for coronary heart disease [J]. Drug News Perspect, 2010, 23(5): 316-324.
- (2) Mehranpour P, Wang SS, Blanco RR, et al. The C242T CYBA polymorphism as a major determinant of NADPH oxidase activity in patients with cardiovascular disease [J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2009, 7(3): 251-259.
- (3) 宁田海, 邵耕, 陈在嘉, 等. 血脂异常防治建议. [J] 中华心血管病杂志, 1997, 25(3): 169-175.
- (4) 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人超重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值 适宜体重指数和腰围切点的研究. [J] 中华流行病学杂志, 2002, 23(1): 5-10.
- (5) Shimo-Nakanishi Y, Hasebe T, Suzuki A, et al. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction [J]. Atherosclerosis, 2004, 175(1): 109-115.
- (6) Nakano T, Matsunaga S, Nagata A, et al. NAD(P)H oxidase p22phox Gene C242T polymorphism and lipoprotein oxidation [J]. Clin Chim Acta, 2003, 335(1-2): 101-107.
- (7) Nasti S, Spallarossa P, Altieri P, et al. C242T polymorphism in CYBA gene (p22phox) and risk of coronary artery disease in a population of Caucasian Italians [J]. Dis Markers, 2006, 22(3): 167-173.
- (8) Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, et al. A variant of p22(phox) involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall is associated with progression of coronary atherosclerosis [J]. Circ Res, 2000, 86(4): 391-395.
- (9) Cai H, Duarte N, Wilcken DE, et al. NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population [J]. Eur J Clin Invest, 1999, 29(9): 744-748.
- (10) Macias-Reyes A, Rodriguez-Esparragon F, Caballero-Hidalgo A, et al. Insight into the role of CYBA A640G and C242T gene variants and coronary heart disease risk: a case-control study [J]. Free Radic Res, 2008, 42(1): 82-92.
- (11) 迟东升, 凌文华, 马静, 等. MnSOD 9Ala/Val 基因多态性与冠心病的关系 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(9): 1078-1080.
- (12) 李敏, 贾崇奇, 刘同涛, 等. eNOS 基因 T-786C 变异与早发冠心病关系 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23(5): 583-585.

收稿日期: 2011-07-12

(孔繁学编辑 刘铁校对)

【流行病学研究】

藏族先天性心脏病合并肺动脉高压影响因素分析

祁生贵, 祁国荣, 陈秋红, 陆霖, 杨蕾, 李莉

摘要: 目的 了解高原低氧对藏族先天性心脏病(CHD) 并发肺动脉高压(PAH) 的影响。方法 选取 2007 年 1 月-2009 年 12 月 CHD 住院藏族患者 220 例, 采用超声心动图估测肺动脉压, 分析 CHD 合并 PAH 发生率以及性别、居住海拔高度对病种分布的影响; 采用二分类 logistic 回归分析不同病种形成 PAH 的危险因素。结果 220 例 CHD 患者中, 合并 PAH 为 115 例, 占 52.27%, 其中房间隔缺损(ASD) 合并 PAH 为 64 例, 占 64.65%, 高于动脉导管未闭(PDA) 合并 PAH 32 例, 占 41.56%; $\chi^2 = 9.312, P < 0.005$ 及室间隔缺损(VSD) 合并 PAH (19 例, 占 43.18%; $\chi^2 = 5.763, P < 0.05$); VSD 合并 PAH 患者的肺动脉收缩压(sPAP) 高于 PDA 合并 PAH 患者及 ASD 合并 PAH 患者 ($F = 15.751, P < 0.05$); 海拔 >3 000 m ASD 合并 PAH 的发生率高于其他 2 种先天性心脏缺损 ($F = 10.79, P < 0.05$), 但 sPAP 低于 PDA 合并 PAH 患者 ($t = 8.45, P < 0.05$) 及 VSD 合并 PAH 患者 ($t = 24.26, P < 0.05$); PDA 和 VSD 患者合并 PAH 主要影响因素为缺损大小 ($OR = 1.153, P < 0.05$), 而 ASD 患者合并 PAH 的影响因素为年龄 ($OR = 1.31, P < 0.05$)、缺损大小 ($OR = 1.15, P < 0.05$) 及海拔 ($OR = 2.75, P < 0.05$)。结论 高原地区 CHD 合并 PAH 的发生率远高于国内外报道; 高原低氧对 ASD 患者合并 PAH 的影响较大。

关键词: 先天性心脏病; 肺动脉高压; 低氧; 影响因素

中图分类号: R 541.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)04-0466-03

Risk factors of pulmonary arterial hypertension in Tibetan patients with congenital heart disease Qi Sheng-gui, Qi Guo-rong, CHEN Qiu-hong et al. Center Laboratory Qinghai Cardio-Cerebrovascular Disease Hospital (Xi'ning 810012 China)

Abstract: Objective To explore the risk factors of the complication of pulmonary arterial hypertension (PAH) among Tibetan patients with congenital heart disease (CHD) at high altitude. **Methods** We retrospectively analyzed the composition of 115 PAH patients who were identified from 220 Tibetan CHD inpatients in Qinghai Cardiovascular Hospital during Jan 2007 to Dec 2009 and analyze the risk factor of PAH in different type of CHD. **Results** Among the 220 CHD patients, 115 (52.27%) had PAH. PAH was found in 64.65% of atrial septal defect (ASD), which was significantly both higher than 41.56% of the patients with ductus arteriosus (PDA) ($\chi^2 = 9.312, P < 0.005$) and 43.18% of ventricular septal defects

作者单位: 青海省心脑血管病专科医院中心实验室, 西宁 810012

作者简介: 祁生贵(1979-), 男, 土族, 助理研究员, 博士在读, 研究方向: 高原医学。