

P2Y₁₂ 基因单核苷酸多态性与冠心病的相关性研究

张新霞, 陈晓燕, 张文斌, 莫怡浩, 包世敏, 吴剑胜, 胡雪松, 伍贵富
(广东医学院附属深圳市福田区人民医院心内科, 广东深圳 518033)

摘要:目的 探讨血小板二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)受体亚基 12(P2Y₁₂)基因单核苷酸多态性位点 rs2046934、rs6787801、rs6798347 及 rs6801273 与冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)发生的相关性。方法 入选 455 例冠心病患者和 90 例健康对照。所有冠心病患者均行冠状动脉造影检查或冠状动脉计算机断层扫描血管造影确诊冠心病。应用 MassARRAY 时间飞行质谱技术对 P2Y₁₂ 基因的单核苷酸多态性位点进行基因分型。比较两组在基因型分布及等位基因频率上的差别。结果 冠心病组与对照组在 rs2046934 位点的基因型分布(CC: 2.4% vs. 4.4%、TT: 71.0% vs. 74.4%、CT: 26.6% vs. 21.2%)和等位基因频率(C 等位基因: 15.7% vs. 15.0%、T 等位基因: 84.3% vs. 85.0%)比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。两组 rs6787801 位点的基因型分布(GG: 17.4% vs. 17.8%、AA: 36.9% vs. 31.3%、GA: 45.7% vs. 51.1%)和等位基因频率(G 等位基因: 40.2% vs. 43.3%、A 等位基因: 59.8% vs. 56.7%)比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。两组 rs6798347 位点的基因型分布(AA: 9.1% vs. 6.7%、GG: 41.6% vs. 52.2%、AG: 49.3% vs. 41.1%)和等位基因频率(A 等位基因: 29.9% vs. 27.2%、G 等位基因: 70.1% vs. 72.8%)比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。两组 rs6801273 位点的基因型分布(CC: 13.4% vs. 10.0%、TT: 42.6% vs. 50.0%、CT: 44.0% vs. 40.0%)和等位基因频率(C 等位基因: 35.4% vs. 30.0%、T 等位基因: 64.6% vs. 70.0%)比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 P2Y₁₂ 基因单核苷酸多态性位点(rs2046934、rs6787801、rs6798347 及 rs6801273)与冠心病发生无相关性。

关键词: 冠状动脉疾病; 血小板二磷酸腺苷受体亚基 12; 多态性; 单核苷酸

中图分类号: R541.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-9688(2015)02-0163-04

Correlation analysis between P2Y₁₂ gene single nucleotide polymorphisms and coronary heart disease

ZHANG Xin-xia, CHEN Xiao-yan, ZHANG Wen-bin, MO Yi-hao, BAO Shi-min, WU Jian-sheng, HU Xue-song, WU Gui-fu

(Department of Cardiology, Shenzhen Futian Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518033, China)

Abstract: Objectives To investigate the correlation between platelet adenosine diphosphate acceptor subunit 12 (P2Y₁₂) gene polymorphisms (rs2046934, rs6787801, rs6798347 and rs6801273) and coronary heart disease.

Methods Totally 455 patients with coronary artery disease who were diagnosed by coronary angiography or coronary artery computed tomography angiography and 90 healthy control individuals were enrolled in this study. The single nucleotide polymorphisms (rs2046934, rs6787801, rs6798347 and rs6801273) of P2Y₁₂ gene were detected by MassARRAY Time of Flight Mass Spectrometry. The genotypes and allele frequencies between the two groups were compared.

Results Genotypes and frequencies of P2Y₁₂ gene polymorphisms rs2046934 in coronary heart disease group and control group were as below: CC genotype 2.4% vs. 4.4%, TT genotype 71.0% vs. 74.4%, CT genotype 26.6% vs. 21.2%; and C allele frequencies were 15.7% vs. 15.0%, T allele frequencies were 84.3% vs. 85.0%. There were no significant differences between the two groups ($P>0.05$). As for gene polymorphisms rs6787801, GG genotype was 17.4% vs. 17.8%, AA genotype 36.9% vs. 31.3%, GA genotype 45.7% vs. 51.1%; and G allele frequencies were 40.2% vs. 43.3%, A allele frequencies were 59.8% vs. 56.7%. There were no significant differences in genotypes and frequencies of P2Y₁₂ gene polymorphisms rs6787801 between these two groups ($P>0.05$). As for gene polymorphisms rs6798347, AA genotype was 9.1% vs. 6.7%, GG genotype 41.6% vs. 52.2%, AG genotype 49.3% vs. 41.1%; and A allele frequencies were 29.9% vs. 27.2%, G allele frequencies were 70.1% vs. 72.8%. There were no significant differences in genotypes and frequencies of P2Y₁₂ gene polymorphisms rs6798347 between these two

groups ($P>0.05$). As for gene polymorphisms rs6801273, CC genotype was 13.4% vs. 10.0%, TT genotype 42.6% vs. 50.0%, CT genotype 44.0% vs. 40.0%; and C allele frequencies were 35.4% vs. 30.0%, T allele frequencies were 64.6% vs. 70.0%. There were no significant differences in genotypes and frequencies of P2Y12 gene polymorphisms rs6801273 between these two groups ($P>0.05$). **Conclusions** Single nucleotide polymorphisms of P2Y12 gene in rs2046934, rs6787801, rs6798347 and rs6801273 are not associated with coronary heart disease.

Key words: coronary heart disease; platelet adenosine diphosphate acceptor subunit 12; polymorphism; single nucleotide

二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)通过与血小板表面的 ADP 受体亚基 12(P2Y12)受体结合,发挥诱导血小板聚集的功能。血小板聚集参与了动脉粥样斑块的发生、发展,是发生动脉血栓性疾病的关键环节^[1]。有研究发现,心血管疾病的患者使用 P2Y12 受体拮抗剂(噻吩并吡啶)的获益较阿司匹林的大^[2],提示拮抗 P2Y12 受体在控制心血管病症的发生、发展中发挥着一定的作用。另有研究发现,P2Y12 基因的 H2 单倍型 C34T、G52T 与动脉粥样硬化的形成存在显著相关性^[3]。但国内有研究认为,P2Y12 受体的多态性位点 C34T 和 G52T 在中国汉族人群中对氯吡格雷的抗血小板聚集率无明显影响^[4]。鉴于这些矛盾的结论,有必要深入研究 P2Y12 基因多态性与动脉粥样硬化的形成和氯吡格雷的抗血小板作用之间的关系。本研究旨在分析 P2Y12 基因单核苷酸多态性位点 rs2046934、rs6787801、rs6798347 及 rs6801273 的多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)的相关性。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择 2011 年 9 月至 2012 年 9 月在深圳福田人民医院心内科就诊的冠心病患者共 455 例为研究对象,男 300 例,女 155 例,年龄(61.7 ± 10.1)岁。另外,选深圳福田人民医院体检科体检的健康成年人 90 名作为对照组,男 55 名,女 35 名,年龄(58.6 ± 9.2)岁。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。入选的患者经冠状动脉造影或是冠状动脉计算机断层扫描血管造影(CTA)明确诊断为冠心病;健康对照组无原发性高血压(高血压)、糖尿病、高脂血症或外周动脉粥样硬化等疾病。

1.2 DNA 提取方法

两组均清晨空腹常规采取静脉血 4 mL,与 3.8%枸橼酸钠按 9:1 混合抗凝,将血液于 3 000 r/min 离心 20 min,弃去上清,将血细胞置于 -80°C 冰箱保

存备用。按照金麦格全血基因组 DNA 提取试剂盒(北京金麦格生物技术有限公司)说明书提取基因组 DNA。

1.3 临床生化指标检测方法

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)等临床生化指标在本院检验科检测。取入组人群清晨空腹血清,用 DXC800 全自动生化检测仪(库尔特公司)进行检测。检测之前用 BECKMAN 高、中、低三个水平的生化质控品监测仪器状况,结果如果在控,则进行下一步的检测。

1.4 基因型的检测方法

P2Y12 基因 rs2046934、rs6787801、rs6798347 及 rs6801273 位点基因型分析:根据基因组序列,设计扩增以上四个多态性位点的引物(表 1)。先通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增目标序列,PCR 扩增条件:首次 94°C 15 s,然后按 94°C 20 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min,进行 45 个循环后, 72°C 3 min。待 PCR 反应完成后,加入单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)序列特异延伸引物,在 SNP 位点上延伸 1 个碱基即不再延伸。将制备的样品分析物与芯片基质共结晶,将该晶体放入质谱仪的真空管,而后用瞬时纳秒(10^{-9} s)强激光激发,变成亚稳态离子。在加速电场中获得相同的动能后,带电离子在真空小管中飞行到达检测仪。离子质量越小,越快到达检测仪,从而区分出 SNP 位点不同的碱基,确定其基因型。

1.5 统计学分析

全部数据均运用 SPSS 19 软件进行统计学分析。计量资料数据采用($\bar{x}\pm s$)表示,并进行单样本 K-S 正态分布检验,两组间均数比较采用 t 检验,多组均数间比较采用方差分析(ANOVA);计数资料间比较采用 χ^2 检验,若 $R\times C$ 例表任何一个格子 $1\leq T<5$,则用 Fisher 精确检验;运用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验来进行群体代表性检测。

表 1 P2Y12 基因四个多态性位点

SNP位点	基因定位	基因型	引物
rs2046934	3q25.1 c.-15+742C>T	T→C	1st-PCR: 5'-ACGTTGGATGTATGGCATCTACATCTTGGG 2nd-PCR: 5'-ACGTTGGATGCAATTTTCACTTATCTCTGG
rs6798347	3q25.1 c.5346+198G>A	G→A	1st-PCR: 5'-ACGTTGGATGTACAATGGAAGCCTACAAT 2nd-PCR: 5'-ACGTTGGATGCACAGACAAAAGATTAAGC
rs6787801	3q25.1 c.4486-703A>G	A→G	1st-PCR: 5'-ACGTTGGATGGATGACTCTCATTAATGACC 2nd-PCR: 5'-ACGTTGGATGCAAAAACAAAAACCCTAAC
rs6801273	3q25.1 c.2146-5017T>C	T→C	1st-PCR: 5'-ACGTTGGATGAACATGCATGCCAAAACCC 2nd-PCR: 5'-ACGTTGGATGCTAAGGACATTTGGCTCAAG

以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料比较

冠心病与健康对照组血清低密度脂蛋白和尿素氮浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两组血糖、肌酐、胆固醇、三酰甘油和高密度脂蛋白浓度比较,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表 2。

表 2 冠心病组与健康对照组患者一般生化检测指标

组别	冠心病组	健康对照组
n	455	90
血糖/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	6.3±2.2*	5.4±1.0
尿素氮/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.30±1.77	5.16±3.16
肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	87.63±30.91*	75.82±25.82
总胆固醇/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	4.56±1.22*	4.85±1.03
三酰甘油/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.75±1.13*	1.30±0.73
低密度脂蛋白/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.51±0.89	2.58±0.74
高密度脂蛋白/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.04±0.44*	1.24±0.38

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$

2.2 各单核苷酸多态性位点 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验结果

经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,冠心病组与健康对照组在各 SNP 位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验($P>0.05$),见表 3。

表 3 各位点 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验结果

SNP位点	组别	基因型(实际频数/理论频数)			P 值
rs6798347	冠心病组	AA(41/40.3)	AG(188/189.4)	GG(223/222.3)	0.879
	健康对照组	AA(6/6.7)	AG(37/35.7)	GG(47/47.7)	0.722
rs2046934	冠心病组	CC(11/11.2)	CT(121/120.5)	TT(323/323.3)	0.933
	健康对照组	CC(4/2)	CT(19/23)	TT(67/65)	0.103
rs6787801	冠心病组	AA(168/162.6)	GA(208/218.8)	GG(79/73.6)	0.292
	健康对照组	AA(28/28.9)	GA(46/44.2)	GG(16/16.9)	0.699
rs6801273	冠心病组	CC(61/57)	CT(200/208)	TT(194/190)	0.409
	健康对照组	CC(9/8.1)	CT(36/37.8)	TT(45/44.1)	0.651

说明样本来自一个较大的、处于随机分配平衡状态的群体,具有一定的群体代表性。

2.3 两组 P2Y12 基因各单核苷酸多态性位点多态性比较

冠心病组 rs6798347 位点 452 例分型成功,其中 AA 型 41 例、GG 型 188 例、AG 型 223 例,A 等位基因频率 270 (29.9%)、G 等位基因频率 634 (70.1%);健康对照组 90 例,AA 型 6 例、GG 型 47 例、AG 型 37 例,A 等位基因频率 49 (27.2%)、G 等位基因频率 131 (72.8%)。该位点的基因型分布和等位基因频率在冠心病组与健康对照组间分布比较,差异无统计学差异($P>0.05$),见图 1 和图 2。

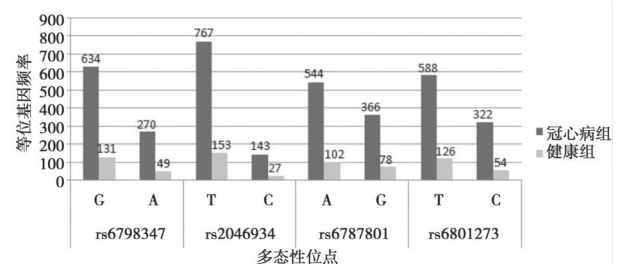


图 1 冠心病组与健康组基因型分布比较

冠心病组 rs2046934 位点成功分型 455 例,CC 型 11 例、TT 型 323 例、CT 型 121 例,C 等位基因频率 143 (15.7%)、T 等位基因频率 767 (84.3%);

健康对照组 90 例,CC 型 4 例、TT 型 67 例、CT 型 19 例,C 等位基因频率 27(15%)、T 等位基因频率 153(85%)。rs2046934 位点的基因型分布和等位基因频率在冠心病组与健康对照组间分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1 和图 2。

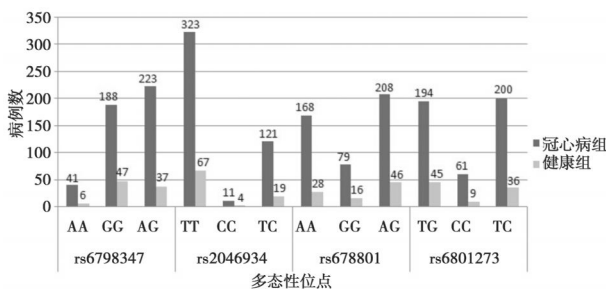


图 2 冠心病组与健康组等位基因频率的比较

冠心病组 rs6787801 位点成功分型 455 例,AA 型 168 例、GG 型 79 例、GA 型 208 例,A 等位基因频率 544 (59.8%)、G 等位基因频率 366 (40.2%);健康对照组 90 例,AA 型 28 例、GG 型 16 例、GA 型 46 例,A 等位基因频率 102(56.7%)、G 等位基因频率 78(43.3%)。rs6787801 位点的基因型分布和等位基因频率在冠心病组与健康对照组间分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1 和图 2。

冠心病组 rs6801273 位点 455 例成功分型,CC 型 61 例、TT 型 194 例、CT 型 200 例,C 等位基因频率 322(35.4%)、T 等位基因频率 588(64.6%);健康对照组 90 例,CC 型 9 例、TT 型 45 例、CT 型 36 例,C 等位基因频率 54(30.0%)、T 等位基因频率 126(70.0%)。rs6801273 位点的基因型分布和等位基因频率在冠心病组与健康对照组间分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1 和图 2。

3 讨论

冠心病是一种复杂的多基因疾病^[5],病理过程的始动因素是血管内皮损伤,血小板活化、黏附、聚集和凝血系统的激活^[3]。血小板膜 ADP 受体 P2Y12 在血小板的活化中起到关键的作用^[6]。并且,国内、外的研究已证实了 P2Y12 受体与动脉粥样硬化疾病的发生有相关性。Fontana 等^[3]的研究发现,P2Y12 受体基因上的 H2 单倍型与外周动脉粥样硬化存在相关性(病例组 vs. 对照组:30% vs. 21%;OR=1.6;95%CI: 1.1~2.5; $P=0.02$)。Ugo 等^[7]也做了关于 P2Y12 基因 H2 单倍型的研究,发

现 H2 单倍型与冠心病有明显的相关性,特别是在非吸烟人群中。

在国外对这 4 个 P2Y12 基因多态性位点(rs2046934、rs6787801、rs6798347 及 rs6801273)的研究中,Bouman 等^[8]发现 rs6787801 位点的突变型等位基因能降低 5%的血小板聚集率。Rudez 等^[8]的研究也证实了 rs6787801 的突变型能降低血小板聚集率,特别是含有这种突变型基因的患者,其服用氯吡格雷治疗后的血小板聚集率是所有研究对象中最低的,与之相对的,携带 rs6798347 突变型基因的患者血小板聚集率最高。因为血小板活化、聚集是冠心病发病的中心环节,所以推测 P2Y12 基因多态性与冠心病发病有关。但本研究结果显示,病例组与对照组之间的基因型分布及等位基因频率比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。提示 P2Y12 基因这 4 个 SNP 位点与冠心病无相关性。由于动脉粥样硬化是一种多因素疾病,受到环境和基因因素的双重影响,因此,多态性位点决定的遗传性状表现出来的频率较低,则可能会被环境因素所掩盖,不出现临床表型^[7]。而在本研究中,对照组均是健康的成年人,平均年龄较病例组低,无高龄、高血压、糖尿病、高脂血症等冠心病高危因素,所以在与病例组比较时,这些与冠心病发生、发展有显著相关性的因素可能会掩盖掉 P2Y12 基因 SNP 对冠心病的影响。而单独的血小板聚集率变化对冠心病的发生、发展有何影响目前不明确,故需要进行大规模的前瞻性队列研究来进一步分析相关的因素。

血小板在冠状动脉斑块破裂后的血栓形成过程中起着关键的作用。在急性冠脉综合征患者中,其主要机制正是由于血小板参与导致血栓形成所致,因此,抗血小板治疗对急性冠脉综合征患者获益巨大。国内、外的研究均证实 P2Y12 基因多态性会影响到血小板聚集率,所以冠心病患者抗血小板聚集治疗的疗效肯定会受到 P2Y12 受体不同基因型的影响^[8-10]。因此,对冠心病患者 P2Y12 基因进行分型,也许能早期识别这部分存在抗血小板聚集治疗抵抗的患者,能对这部分患者进行更加个体化的抗血小板聚集治疗。

参考文献:

[1] ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
 [2] CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of (下转第 248 页)