

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.19.006

文章编号: 1005-8982(2017)19-0028-06

临床研究·论著

房颤患者 Cx40 基因单核苷酸多态性研究*

梁志红, 刘科成, 全智华, 唐惠芳

(南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421000)

摘要:目的 探讨缝隙连接蛋白 40 基因(*GJA5*)单核苷酸多态性在房颤发生中的作用。方法 选择 2012 年 6~12 月南华大学附属第一医院心血管内科住院患者 200 例,分为房颤组 98 例(持续性发颤)及对照组 102 例(窦性心律)。收集患者一般临床资料并通过经胸心脏彩超采集患者左房内径值,静脉采血提取 DNA,经聚合酶链反应(PCR)及电泳法检测 SNP 的位点,PCR 扩增产物纯化后直接测序查看 SNP 位点;哈德温伯格平衡检验后,比较各组间基因分型和基因频率,就房颤危险因素非条件 Logistic 回归分析。结果 *GJA5* 基因 rs10465885 存在 A/G 多态性,房颤组等位基因 A、G 频率分别为 0.54 和 0.46。对照组等位基因 A、G 频率分别为 0.45 和 0.55。哈德温伯格平衡检验显示组间均符合其平衡,房颤组 AA 基因型高于对照组,AG、GG 基因型以及等位基因频率差异无统计学意义。*GJA5* 基因(rs10465885)AA 基因型(OR=2.49)和左房直径(OR=1.29)是房颤的危险因素,*GJA5* 基因(rs10465885)基因型和左房直径无关。结论 *GJA5* 基因 rs10465885 位点存在基因多态性,AA 基因型与左房直径是房颤的危险因素。

关键词: *GJA5* 基因;rs10465885;基因型;等位基因;心房颤动

中图分类号: R394.5

文献标识码: A

Study on Cx40 gene single nucleotide polymorphism in patients with atrial fibrillation*

Zhi-hong Liang, Ke-cheng Liu, Zhi-hua Quan, Hui-fang Tang

(The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China)

Abstract: Objective To discuss the correlations of *Cx40* gene (*GJA5*) single nucleotide polymorphism (SNP) with atrial fibrillation. **Methods** Two hundreds of patients were selected in the Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of University of South China from June 2012 to December 2012 and divided into atrial fibrillation group (98 cases with continuous fibrillation) and control group (102 cases with sinus rhythm). Clinic information of the patients was collected. Left atrial diameters of the patients were collected through chest and cardiac color ultrasonography. DNA was extracted from venous blood. The locus of SNP was detected through PCR and electrophoresis, and directly examined after PCR products were purified. Based on Hardy-Weinberg Equilibrium examination, the genotype and gene frequency of each group were compared. And non-conditional logistic regression analysis was carried out on the risk factors of atrial fibrillation. **Results** *GJA5* gene rs10465885 had A/G polymorphism. The frequency of allele A and G of the atrial fibrillation group was 0.54 and 0.46 respectively, and that of the control group was 0.45 and 0.55 respectively. In accordance with Hardy-Weinberg Equilibrium examination, the groups complied with the equilibrium. The AA genotype of the atrial fibrillation group was significantly higher than that of the control group. There was not significant difference in AG, GG genotype or allele frequency between the two groups. The AA genotype of rs10465885 locus of *GJA5* gene (OR = 2.49) and left atrial diameter (OR = 1.29) were the risk factors of atrial fibrillation. The genotype of *GJA5* gene (rs10465885) had no correlation with the left atrial diameter. **Conclusions** Gene polymorphism exists at rs10465885 locus of *GJA5* gene.

收稿日期:2016-12-18

* 基金项目:国家自然科学基金(No:30900625)

[通信作者] 唐惠芳, E-mail: 1132226235@qq.com; Tel:18573405159

AA genotype and left atrial diameter are the risk factors of atrial fibrillation.

Keywords: *GJA5* gene; rs10465885; genotype; allele; atrial fibrillation

心房的电重构和结构重构在房颤的发生和维持中起着重要的作用^[1],房颤时结构重构分子水平的改变之一为缝隙连接蛋白排列混乱^[2]。心脏缝隙连接由 40 个左右的缝隙连接通道构成,心肌细胞主要表达缝隙连接蛋白 40 (Connexin40,Cx40) 和 Cx43 (Connexin43,Cx43) 等。房颤时 Cx40 表达量减少,分布出现侧边化改变,影响细胞间的连接和传导,从而增加房颤的易感性^[3-9]。*GJA5* 基因是 Cx40 蛋白的编码基因。GROENEWEGEN 等^[10]在患有心房静止家族的研究中发现:Cx40 基因启动子 A 的 -44 区域由 G 转变为 A(-44G→A),转录起始位点 71 区域由 A 转变为 G(+71A→G)。FIROUZI 等^[11]对 Cx40 基因启动子研究证明其存在单核苷酸多态性(-44AA/+71GG)。这类患者通过延长心房不应期,更加容易诱导房颤发生。该 2 项研究人群均为欧洲白种人群,由于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)存在地域和人种的差异,本研究对衡阳地区房颤患者 *GJA5* 基因位点分布情况进行研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例来自 2012 年 6 ~ 12 月南华大学附属第一医院心血管内科住院患者 200 例,分为房颤组和对照组。房颤组为持续性房颤患者(98 例),对照组为窦性心律患者(102 例)。

排除标准:①肝肾功能衰竭;②心功能 IV 级;③合并严重瓣膜狭窄、心包炎、心肌病、肺心病、先天性心脏病、甲状腺功能亢进、肥厚性梗阻性心肌病、限制性心肌病、缩窄性心肌病、起搏器术后或 30 d 内心脏手术后;④不在衡阳地点居住,不符合调查对象的条件;⑤不能完成全部的调查步骤,调查内容有缺失或者调查数据有明显的错误,且数据无法进行更正或者核对者。

入组对象为随机选择的衡阳地区汉族人群,年龄 ≥ 18 岁。资料收集及血样采集经研究对象的知情同意。患者入组后,收集患者一般资料:性别、年龄、有无长期吸烟史、嗜酒史、高血压病史及相关实验室检查等,并通过经胸心脏彩超采集患者左房内径值。

1.2 主要仪器与试剂

ABI3730XL 测序分析仪(Applied biosystems 公

司,美国),PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国),凝胶成像分析仪(Applied Biosystems 公司),DNA 琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad 公司),低温低速桌面离心机(Beckman 公司,美国),低温高速桌面离心机(Beckman 公司),0.1 ~ 2.5 μl 移液器(Eppendorf 公司),0.5 ~ 10 μl 移液器(Eppendorf 公司),2~20 μl 移液器(Eppendorf 公司,德国),50 ~ 200 μl 移液器(Eppendorf 公司,德国),100 ~ 1 000 μl 移液器(Eppendorf 公司),CPA 225D 电子天平(Sartorius 公司,德国),超净工作台(Heal Force 公司,中国),恒温水浴箱(上海金宏公司,中国),超纯水仪(ELGA 公司,英国),圆周震荡器(IKA 公司,德国),DW-FL253 冰箱(中科美菱公司,中国),-20℃冰柜(海尔公司),WP700P21 型微波炉(格兰仕电器有限公司,中国),OMEGA 血样 DNA 提取试剂盒(D3471-02)BDv3.0 检测试剂盒。

1.3 标本采集

采集患者住院次日清晨空腹时静脉血 3 ~ 5 ml 置于 K3EDTA 采血管和普通生化管内,立即置于离心机将血清、血浆和血细胞分离,放入 -80℃冰箱中保存以备检测和 DNA 提取。

1.4 DNA 提取

使用华大基因(武汉分公司)提供的 OMEGA 血样 DNA 提取试剂盒(D3471-02),按照说明书提取血液基因组 DNA。

1.5 引物设计

通过 NCBI 基因数据库和 Ensembl 数据库获得 *GJA5* 基因的全基因组序列,找出目标 SNP 片段位置,用 Primer5.0 软件(加拿大 Primer 公司)进行设计扩增引物对。rs10465885 引物:*GJA5* 正向引物:CCATACCTCACCTACCAG,*GJA5* 反向引物:CAGTGCTTGCTGCCTTGT。

1.6 PCR 扩增

由华大公司负责合成引物。收到引物以先用高速离心机以 12 000 r/min 转速离心约 2 min,然后再开盖,加入适量的双蒸水溶解为 100 pmol/μl 储存液,再从储存液中取出用双蒸水稀释的 20 pmol/μl 工作液,最后将工作液分装进入多个小管后,同储存液一起放入 -20℃冰箱中保存以备。先用 5 个样品进行实验,获得满意扩增效果的条件才确定为最终使用条件。PCR 反应总体积为 25 μl,其中 10 × CoralLoad PCR Buffer(QIAGEN)2.5 μl,25 mmol MgCl₂

0.5 μ l, dNTP 2 μ l, 正向引物、反向引物各 1 μ l, DNA 模板 2 μ l, Taq DNA Polymerase 0.5 μ l, 去离子水 15.5 μ l。按顺序依次加入 dNTP、P1、P2、Taq 酶和双蒸水, 加盖后先放置在振荡器上, 振荡 30 s, 然后再离心 30 s。在 Mixture 中分别加入 DNA、10 \times CoralLoad PCR Buffer (QIAGEN), 加样后进行封盖, 再离心 30 s, 开启 PCR 仪, 输入确定的反应条件参数, 将样本放入后, 自动进行 PCR 扩增。

1.7 基因分型

PCR 反应及电泳法被用来检测 SNP 的位点。PCR 扩增产物纯化后进行直接测序。SNP (rs 10465885) 位点由美国生产的 ABI3730XL 测序仪检测, 应用 BDv3.0 检测试剂盒检测, 最后使用 Lasergene 软件来寻找 SNP 位点。经琼脂糖凝胶电泳检测, 发现目的条带后, Axygen 凝胶回收试剂盒纯化, 应用第一代测序仪, 双脱氧链末端终止法 (sanger 法) 进行测序。测序结果使用 Lasergene 软件分析

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。哈德温伯格平衡 (Hardy-Weinberg Equilibrium) 检验样本的群体代表性。计数资料、基因型、等位基因频率分布的比较用 χ^2 检验; 计量资料之间的比较用 t 检验和方差分析。房颤危险因素分析使用多因素非条件 Logistic 回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 房颤组和对照组临床资料的比较

房颤组与对照组的年龄和左房直径符合正态分

布; 房颤组与对照组之间性别、年龄、吸烟、饮酒史差异均无统计学意义, 但左房内径 (left atrial diameter, LAD) 在房颤组高于对照组。见表 1。

2.2 PCR 结果分析

随机抽取 16 个 PCR 样本进行电泳检测。PCR 扩增的产物经凝胶电泳后显示一条特异性荧光带, 即为目的 DNA 片段。根据所设计正反向引物之间的碱基对数, 该片段长度为 250 ~ 300 bp, 电泳后所示的特异性荧光带符合该长度, 故该产物是目的基因 (GJA5 基因) 片段扩增产物。见图 1。

2.3 SNP 位点的核苷酸序列分析

ABI3730XL 测序仪直接测序后使用 lasergene 软件发现 GJA5 rs10465885 存在 A/G 多态性。见图 2 ~ 4。

2.4 哈德温伯格平衡检验

GJA5 基因 rs10465885 位点 AA、AG 和 GG 在房颤组实际分布与预期分布差异无统计学意义; 在对照组实际分布与预期分布差异无统计学意义, 表明两组研究样本具有群体代表性。见表 2。

2.5 GJA5 基因 rs10465885 多态性基因分型分析结果

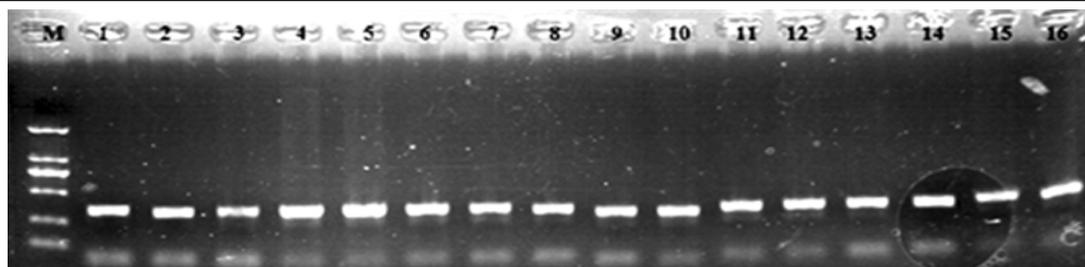
GJA5 基因 rs10465885 位点位于启动子 B 区的 TATA 盒区域。AA 基因型分布频率在房颤组高于对照组 ($P = 0.02$), GG 基因型和 AG 基因型在两组间差异无统计学意义。见表 3。

2.6 GJA5 基因 rs10465885 多态性基因频率比较

GJA5 基因 rs10465885 位点 A、G 基因频率在房

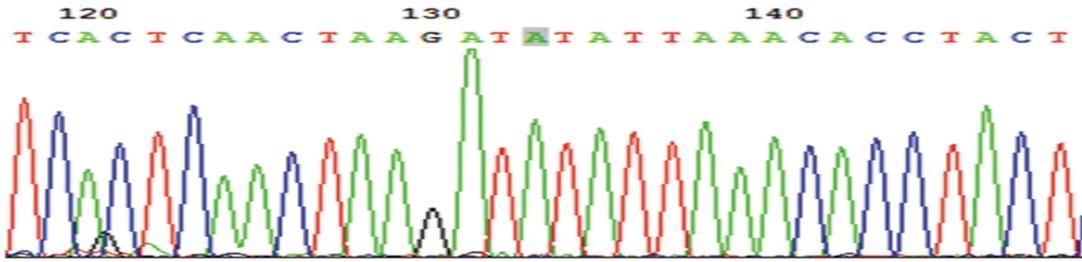
表 1 房颤组和对照组临床资料比较

组别	男 / 女 / 例	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	吸烟 / 例	饮酒 / 例	高血压 / 例	LAD / (mm, $\bar{x} \pm s$)
房颤组 ($n = 98$)	55/43	64.48 \pm 11.44	35	24	49	40.55 \pm 6.22
对照组 ($n = 102$)	57/45	62.93 \pm 10.68	34	19	52	33.36 \pm 4.68
χ^2/t 值	0.001	0.992	0.125	1.018	0.019	9.254
P 值	0.973	0.322	0.723	0.313	0.890	0.001



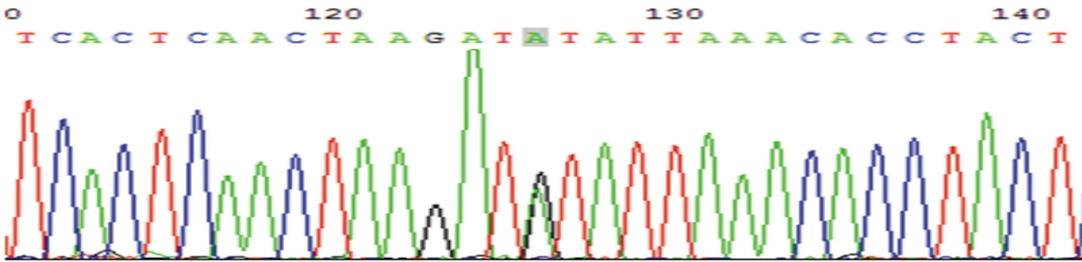
DS 2 000 Marker 各条带大小分别为: 100、250、500、750、1 000 和 2 000 bp; 1 ~ 16 分别代表: A2, A8, A12, A22, A38, A42, A66, A88, B3, B14, B25, B43, B52, B68, B75, B92 (A1~A98: 房颤组; B1~B102: 对照组)。

图 1 GJA5 PCR 产物电泳图



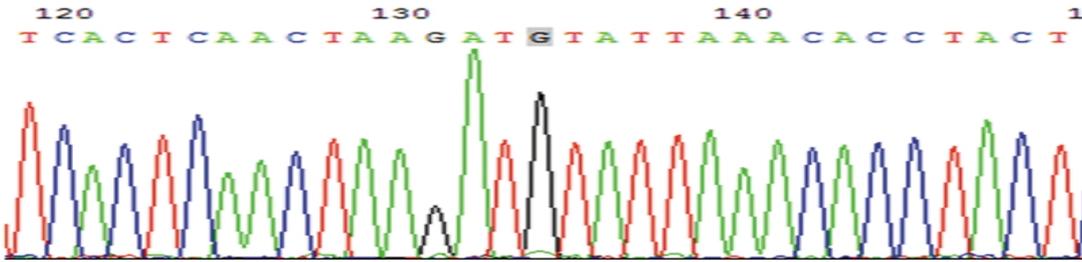
图中 base133 位置即为 GJA5 多态位点 rs10465885,提示为绿色单峰

图 2 基因型 AA(标本 A1)



图中 base126 位置即为 GJA5 多态位点 rs10465885,提示为绿黑色双峰重叠

图 3 基因型 AG(标本 A2)



图中 base133 位置即为 GJA5 多态位点 rs10465885,提示为黑色单峰

图 4 基因型 GG(标本 A11)

表 2 各组间哈德温伯格平衡检验

组别	SNP			χ^2 值	P 值
	AA	AG	GG		
房颤组(n=98)					
实际	31	44	23	0.421	0.810
预期	28.58	48.69	20.74		
对照组(n=102)					
实际	18	56	28	0.612	0.736
预期	20.75	50.51	30.74		

表 3 房颤组与对照组基因分型比较 例(%)

组别	SNP		
	AA	AG	GG
房颤组(n=98)	31(0.32)	44(0.45)	23(0.23)
对照组(n=102)	18(0.18)	56(0.55)	28(0.27)
χ^2 值	5.285	2.001	0.417
P 值	0.022	0.157	0.518

颤组以等位基因 A 为主,对照组以等位基因 G 为主,虽然房颤组 A 基因频率高于对照组,但是差异无统计学意义($\chi^2=3.227, P=0.072$)。见表 4。

2.7 房颤危险因素的非条件多因素 Logistic 回归分析

该研究纳入分析的房颤患者危险因素有性别、年龄、吸烟史、饮酒史、LAD 及 3 种基因型。以房颤作为因变量,性别、年龄、吸烟史、饮酒史、LAD 及 3 种基因型作为自变量,分别进行赋值。使用非条件多因素 Logistic 回归分析,模型的自变量选择 Forward: LR 法纳入预测变量,自变量的纳入模型的概率水平取 0.05,剔除的概率水平为 0.1,检验水准取 0.05,最终进入回归方程的变量有 LAD 与基因型 AA。见表 5。

2.8 GJA5 基因 rs10465885 基因分型与左房直径的关系

对不同基因型患者的左房直径比较使用方差分

析,其中 AA 型 49 例,AG 型 99 例,GG 型 52 例。3 种基因型患者的 LAD 差异没有统计学意义。见表 6。

表 4 GJA5 基因 rs10465885 多态性基因频率 例(%)

组别	等位基因 A	等位基因 G	χ^2 值	P 值
房颤组(n=98)	106(0.54)	90(0.46)	3.227	0.072
对照组(n=102)	92(0.45)	112(0.55)		

表 5 房颤非条件 Logistic 回归分析

危险因素	b	S _b	Wald χ^2	P 值	OR	95%CI	
						下限	上限
LAD	0.26	0.04	34.90	0.003	1.29	1.18	1.41
基因型 AA	0.91	0.45	4.70	0.042	2.49	1.02	6.06

表 6 基因型与左房直径关系 ($\bar{x} \pm s$)

基因分型	LAD/mm	F 值	P 值
AA(n=49)	37.47 ± 6.56	0.971	0.379
AG(n=99)	36.23 ± 6.54		
GG(n=52)	37.58 ± 6.58		

3 讨论

Cx40 是心房的主要缝隙连接蛋白,和 Cx43 相比较,它在心房特异性表达,而心室表达量极少^[12]。SNP 是指在基因组水平上,由单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性,这种突变包括错意突变和同义突变^[13]。GJA5 基因编码 Cx40 蛋白是连接蛋白基因家族中重要的一员,因编码蛋白的分子质量为 40 kD 而得名,定位 1q21.1^[12]。GJA5 基因有 2 个外显子,外显子 1A(100 bp)或 1B(132 bp)和外显子 2。外显子 1A 与 1B 的差异在于 5' 端非编码区,分别受启动子 A 和启动子 B 控制,影响蛋白表达的组织特异性。在心脏中 2 种连接蛋白 40 都有表达,并特异地表达于人类心房肌、房室结、His 束、左右束支和近端蒲肯野纤维,心室中表达量极少,所有表达的 Cx40 蛋白均由 358 个氨基酸组成^[12]。

SUN 等^[14]发现 Cx40 蛋白基因突变 V85I、L221I 与房颤相关。与野生型 GJA5 相比,这 2 种突变均可通过调控 Cx40 蛋白表达来显著增加缝隙连接半通道电流从而增加房颤发生,表明 GJA5 基因变化与房颤的发病机制具有相关性。WIRKA 等^[15]发现 GJA5 基因启动子 B 区域 TATA 盒上存在多态位点 rs10465885,该位点突变引起 Cx40 表达下降,并与房颤相关。WIRKA 对 rs10465885 位点的基因分型资料进行荟萃分析,同样得出 rs10465885 位点与房颤的发生相关。CHRISTOPHERSEN 等^[16]发现

rs10465885 与房颤相关,该位点与房颤相关的机制可能是由于该位点通过改变启动子 B 的 TATA 盒序列,影响该启动子的活动性,从而使 Cx40 表达下降,从而诱发房颤的发生。上述研究均表示 rs10465885 位点的改变通过调整 Cx40 的表达从而影响房颤的发生。

本研究纳入衡阳地区汉族人群作为研究对象,连续在南华大学附属第一医院随机选取 98 名持续性房颤患者和 102 例条件匹配的窦性心律患者,选定 GJA5 基因启动子 B 区的 TATA 盒子区域 rs10465885 位点,与房颤进行关联分析。采用准确性最高的直接测序法,发现房颤组 AA 基因型高于对照组;该结果与加拿大学者 CHRISTOPHERSEN 等^[16]一致,房颤组等位基因 A 位点频率高于对照组,但差异无统计学意义,可能与本实验样本偏少及人种不同有关。采用多因素非条件 Logistic 回归分析结果提示:基因型 AA 携带者患房颤风险是非此基因型的 2.49 倍;在校正年龄、性别、吸烟饮酒史、高血压病史等因素的影响后,基因型 AA 仍是衡阳地区汉族人群房颤的危险因素。该结果提示 GJA5 基因 rs10465885 AA 型可能为衡阳地区汉族人群房颤的易患基因型。

本研究通过 3730XL 测序仪直接测序后还发现:入选的房颤患者在 rs10465885 位点存在 A/G 多态性,分别为 AA 型、AG 型和 GG 型。LAD 增大是房颤发生的危险因素,为了明确该位点不同基因型和左房直径之间是否存在关联,对房颤患者不同基因型及其对应的 LAD 之间做方差分析,其中 GG 型的 LAD 略大,但差异没有统计学意义,提示该位点的多态性与房颤患者 LAD 无关。但也可能是因为 LAD 的扩大是多因素造成,其改变是多种影响综合引起,亦可能与本实验样本量较小相关。二者之间是否存在关联以及其中的机制,仍需要进一步的研究和扩大样本量。

参 考 文 献:

- [1] European Heart Rhythm Association. Guidelines for the management of atrial fibrillation:the task force for the management of atrial fibrillation of the european society of cardiology (ESC)[R]. Europace, 2010(10): 1360-1420.
- [2] EDWARD P A. Sequencing deeper to find the genetic mechanism of atrial fibrillation[J]. Heart Rhythm, 2014, 11(3): 458.
- [3] HSIEH M H, LIN Y J, WANG H H, et al. Functional charac-

- terization of atrial electrograms in a pacing-induced heart failure model of atrial fibrillation: importance of regional atrial connexin40 remodeling [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2013, 24 (5): 573-582.
- [4] CHALDOUPI S M, LOH P, HAUER R N. The role of connexin 40 in atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 84(1): 15-23.
- [5] DUPAYS L, MAZURAS D, RÜCKER-MARTIN C. Genomic organization and alternative transcripts of the human Connexin40 gene[J]. *Gene*, 2003, 305(1): 79-90.
- [6] BAGWE S, BERENFELD O, VAIDYA D et al. Altered right atrial excitation and propagation in connexin40 knockout mice[J]. *Circulation*, 2005(112): 2245-2253.
- [7] ROSENBERG M A, DAS S, PINZON P Q et al. A novel transgenic mouse model of cardiac hypertrophy and atrial fibrillation [J]. *J Atr Fibrillation*, 2012, 2(9): 1-15.
- [8] ZHOU S H, HE X Z, LIU Q M. et al. Study on the spatial distribution pattern of Cx40 gap junctions in the atria of patients with coronary heart disease[J]. *Cardiol J*, 2008, 15(1): 50-56.
- [9] LI J Y, LAI Y J, YEH H I. et al. Atrial gap junctions, NF- κ B and fibrosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery: the relationship with postoperative atrial fibrillation [J] *Cardiology*, 2009, 112(2): 81-88.
- [10] GROENEWEGEN W A, FIROUZI M, BEZZINA C R, et al. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin 40 genotype in familial atrial standstill[J]. *Circ Res*, 2003 (92): 14-22.
- [11] FIROUZI M, RAMANNA H, KOK B, et al. Association of human connexin 40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation [J]. *Circ Res*, 2004, 95: e29-33.
- [12] 臧小彪, 张树龙. 缝隙连接蛋白 40 和心房颤动[J]. *心血管病学进展*, 2011, 32(4): 554-557.
- [13] 杨昭庆, 洪坤学, 褚嘉佑. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. *国外医学: 遗传学分册*, 2000, 23(1): 4-8.
- [14] SUN Y, HILLS M D, YE W G, et al. Atrial fibrillation-linked germline GJA5/connexin40 mutants showed an increased hemichannel function[J]. *PLoS One*, 2014, 19(4): e95125.
- [15] WIRKA R C, GORE S, VAN WAGONER D R, et al. A common connexin-40 gene promoter variant affects connexin-40 expression in human atria and is associated with atrial fibrillation [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4(1): 87-93.
- [16] CHRISTOPHERSEN I E, HOLMEGARD H N, JABBARI J, et al. Rare variants in GJA5 are associated with early-onset lone atrial fibrillation[J]. *Can J Cardiol*, 2013, 29(1): 111-116.

(张西倩 编辑)