

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.03.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0035-06

GUCY1A3 基因位点 rs7692387 单核苷酸多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关性研究

周爽, 尤昕

(延边大学附属医院检验科, 吉林 延吉 133000)

摘要: **目的** 探讨 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 单核苷酸多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病 (冠心病) 的相关性。**方法** 选取延边大学附属医院收集延边地区汉族冠心病患者 204 例 (冠心病组) 以及健康体检的正常人群 201 例 (对照组)。采用基于荧光标记单碱基延伸原理的 SNaPshot 技术对 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 单核苷酸多态性进行分型检测。**结果** 冠心病组和对照组的 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。冠心病组 GG 基因型频率高于对照组, 而对照组 GA+AA 基因型频率高于冠心病组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。G 和 A 两等位基因频率分布差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。应用 Logistic 回归分析调整混杂因素, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并发现 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的 GG 基因型可增加冠心病的患病风险 ($\hat{OR} = 1.543$, 95%CI: 1.022, 2.327, $P = 0.039$), 而 A 等位基因可降低冠心病的患病风险 ($\hat{OR} = 0.691$, 95%CI: 0.494, 0.968, $P = 0.031$)。**结论** 延边地区汉族人群 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 单核苷酸多态性可能与冠心病具有相关性, 其 GG 基因型很可能是冠心病发病的易感基因型, 而 A 等位基因可能是冠心病的保护性基因。

关键词: *GUCY1A3* 基因; 单核苷酸多态性; 冠状动脉粥样硬化性心脏病

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

Effect of single nucleotide polymorphisms at rs7692387 site of *GUCY1A3* gene on coronary atherosclerotic heart disease

Shuang Zhou, Xin You

(Clinical Laboratory, Yanbian University Hospital, Yanji, Jilin 133000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between single nucleotide polymorphisms at rs7692387 site of *GUCY1A3* gene and coronary atherosclerotic heart disease (CAD). **Methods** Totally 204 patients with CAD (CAD group) and 201 healthy volunteers (control group) from Yanbian Han population of Yanbian University Hospital were involved in this study. SNaPshot technique was utilized to identify single nucleotide polymorphisms at rs7692387 site of *GUCY1A3* gene. Statistical analysis was performed for the association between polymorphisms and CAD. **Results** The genotype frequency at rs7692387 site of *GUCY1A3* gene in both groups fitted the Hardy-Weinberg equilibrium. Frequency of GG genotype in the CAD group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), while frequency of GA + AA genotype in the control group was dramatically higher than that in CAD group ($P < 0.05$). G and A allele were differently distributed in two groups ($P < 0.05$). GG genotype at rs7692387 site of *GUCY1A3* gene increased risk of CAD ($\hat{OR} = 1.543$, 95% CI = 1.022, 2.327, $P = 0.039$) while the A allele could reduce the risk of CAD ($\hat{OR} = 0.691$, 95% CI = 0.494, 0.968, $P = 0.031$). Logistic regression analysis plus adjustments for the confounding factors confirmed these results. **Conclusion** Single nucleotide polymorphisms

收稿日期: 2017-04-20

[通信作者] 尤昕, E-mail: xin.you@163.com

at rs7692387 site of *GUCY1A3* gene is associated with CAD in Yanbian Han population, and GG genotype is potentially detrimental while A allele may be beneficial for occurrence of CAD.

Keywords: *GUCY1A3* gene; single nucleotide polymorphism; CAD

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CAD) (简称冠心病) 是一种全球范围内常见的慢性病, 已经成为导致人类死亡的最主要病因之一。冠心病的发病机制复杂, 目前普遍认为受环境和遗传两大因素的共同影响, 随着分子遗传生物学的迅速发展, 对其遗传因素方面的研究也越来越受到重视^[1]。自人类基因组计划实施以来, 人们对冠心病有更加深入了解, 文献表明, 遗传因素在冠心病发病过程中的贡献高达 50%^[2]。近年来, 全基因组关联分析 (genome-wide association studies, GWAS) 被广泛应用于复杂多基因疾病的研究之中, 以单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 为基础的全基因组关联分析已成为研究冠心病遗传易感性的主流方法, 通过该方法研究发现的冠心病相关基因位点已达 50 多个^[3]。*GUCY1A3* 基因位于 4 号染色体 q32.1, 长 77353 bp, 含有 13 个外显子, 编码 690 个氨基酸, 这些氨基酸组成可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylate cyclase, sGC) 的 (α 1 亚基。*GUCY1A3* 基因已被认为在 CAD 的高遗传风险中发挥着重要作用^[4]。可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylyl cyclase, sGC) 作为 1 种信号转导酶广泛分布于人体中, 并介导心血管系统的许多生理过程, 例如促进血管平滑肌舒张, 抑制血小板聚集和血管重构等, 因此 sGC 成为维持心血管稳态的关键酶^[5]。该试验选取 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 进行研究, 分析其单核苷酸多态性与延边地区汉族人群 CAD 遗传易感性之间的关系, 为开展针对性的人群预防提供新线索, 同时也为延缓或防止 CAD 的发生提供更多的理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取延边大学附属医院心血管内科住院且相互之间无血缘关系的汉族冠心病患者 204 例, 均符合世界卫生组织制定的缺血性心脏病的诊断标准, 且经冠状动脉造影检查证实至少 1 支冠脉狭窄 $\geq 50\%$ 。对照组 201 例选自延边大学附属医院健康体检科体检结果正常, 且通过询问病史、辅助检查等明确排除心血管疾病的健康人。通过查阅病案资料、问卷访谈等形式收集研究对象的基本资料及既往病史等, 所有研究对

象均签署知情同意书。

1.2 试剂

DNA 提取试剂盒 (美国 Promega 公司), SNaPshot 试剂盒: ABI PRISM SNa Pshot Multiplex Kit (美国 ABI 公司), Taq 酶: KAPA Taq Hot Start DNA Polymerase (Kapabiosystems 公司), SAP 酶 (Fermentas 公司)、ExoI 酶和 CIP 酶 (NEB 公司), 琼脂糖 (美国 Invitrogen 公司)。

1.3 仪器与设备

Beckman Allgre 21R 高速冷冻离心机 (Beckman 公司), BC-subMIDI 电泳仪 (北京六一仪器厂), JY300 C 电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司), Bio Sens SC 810B 凝胶成像仪 (上海山富科学仪器有限公司), PTC-100PCR 仪 (MJ 公司), ABI 9700 扩增仪 (ABI 公司), 3730XL 测序仪 (美国 ABI 公司)。

1.4 试验方法

研究对象的 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的基因型及等位基因的检测过程主要包括设计合成引物、提取 DNA、预扩增、预扩增产物纯化、延伸反应、延伸产物纯化、上机检测及整理分析数据。根据 Genbank 获得的 *GUCY1A3* 基因所在序列的信息, 应用 Primer 5.0 软件设计 rs7692387 位点的特异性引物。正向引物: 5'-CACTTCACTGTGGAAC (C/T) GAG-3', 反向引物: 5'-GTGCCTACAATGATGCCTGG-3'。入选的研究对象均在清晨空腹状态下采集外周静脉血 2 ml 于抗凝管中, 室温摇匀后置 -20℃ 冰箱冷冻保存备用, 采用 DNA 提取试剂盒按使用说明书提取并纯化 DNA。以聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增含有目的位点的基因片段。PCR 反应体系包含提取 DNA (10~20 ng/ μ l) 2 μ l, 2.5 \times Buffer IV 4.0 μ l, Taq (5 u/L) 0.15 μ l, 引物 (5 μ mol, F+R) 1.5 μ l, 加去离子水至 10 μ l。PCR 扩增条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环, 72℃ 终末延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳质检。将所得产物用 ExoI 酶消化后纯化再加入延伸体系, 延伸体系包括消化后预扩增产物 1.2 μ l, Primers Mix 2 μ l, ABI Mix 0.5 μ l, 10 \times Buffer I 0.4 μ l, 加去离子水至 5 μ l。将所得延伸产物纯化

后加入 3730XL 测序仪,采用美国 ABI 公司开发的 Sna Pshot 技术进行检测,该技术是基于荧光标记单碱基延伸原理的 1 种分型技术。最后应用分析软件将检测所得的原始数据文件进行整理分析。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。两组研究对象的基因型分布采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验其是否具有群体代表性。等位基因频率及基因型频率分布差异情况采用 χ^2 检验进行分析。应用 Logistic 回归分析校正混杂因素对冠心病的影响,并计算 OR 值和 95% 可信区间 (95%CI),以检测 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 单核苷酸多态性和冠心病的相关性,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般临床资料比较

冠心病组和对照组在性别、年龄、BMI、收缩压、舒张压、糖尿病史、TC 及 TG 方面比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$),研究对象平均年龄符合冠心病的高发年龄。冠心病组高血压、吸烟史及 LDL-C 均高于对照组,HDL-C 低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 基因测序结果

研究对象的 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 共有 3 种基因型 (见图 1): 纯合子 GG、AA,杂合子 GA,纯合子基因型显示的峰型是单峰,杂合子基因型显示的峰型是套峰。延伸体系中包含 4 种荧光标记的 ddNTP,分别用蓝色、黑色、绿色、红色代表延伸加

表 1 两组的临床资料比较

组别	男/女/ 例	年龄/ (年, $\bar{x} \pm s$)	BMI/ (kg/m^2 , $\bar{x} \pm s$)	收缩压/ (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	舒张压/ (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	糖尿病比率/ %
冠心病组 ($n=204$)	119/85	64.68 \pm 9.88	24.07 \pm 3.26	135.02 \pm 18.08	82.25 \pm 12.46	26.0
对照组 ($n=20$)	111/90	64.85 \pm 9.26	23.87 \pm 3.35	134.39 \pm 20.18	81.66 \pm 12.83	20.4
<i>t</i> / χ^2 值	0.399	-0.178	0.588	0.334	0.468	1.770
<i>P</i> 值	0.528	0.859	0.557	0.738	0.640	0.183

组别	高血压比率/ %	吸烟者比率/ %	TC/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	TG/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	HDL-C/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	LDL-C/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)
冠心病组 ($n=204$)	59.8	39.7	4.47 \pm 1.08	1.54 \pm 0.96	1.14 \pm 0.29	2.69 \pm 0.75
对照组 ($n=201$)	48.3	28.9	4.39 \pm 1.09	1.39 \pm 0.71	1.22 \pm 0.34	2.53 \pm 0.72
<i>t</i> / χ^2 值	5.434	5.288	0.825	1.773	-2.438	2.241
<i>P</i> 值	0.020	0.021	0.410	0.077	0.015	0.026

入 ddGTP、ddCTP、ddATP 及 ddTTP 的延伸产物,根据峰的颜色可得知掺入的碱基种类,从而确定该样本的基因型。

2.3 两组 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 单核苷酸多态性与冠心病的关系

两组分别进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,两组研究对象 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 基因型频率的观察值与理论预测值比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$),表明该研究的人群符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。*GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 G/A 多态性检测结果显示,冠心病组 GG 基因型频率高于对照组,而对照组 GA+AA 基因型频率高于冠心病组,差

异有统计学意义 ($P < 0.05$),G 和 A 2 等位基因频率分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的基因型与冠心病患病风险评估

将研究对象作为整体进行分析,以 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的基因型 (GG=1, GA+AA=2)、年龄、性别、BMI、高血压、糖尿病、吸烟史、收缩压、舒张压作为自变量,有无冠心病 (有=1,无=0) 作为因变量建立 Logistic 回归模型。结果显示,排除可能与冠心病有关的一些混杂因素后,*GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的 GG 基因型与 GA+AA 基因型比较,其可增加冠心病的患病风险 ($\hat{OR}=1.543$, 95%CI=1.022,

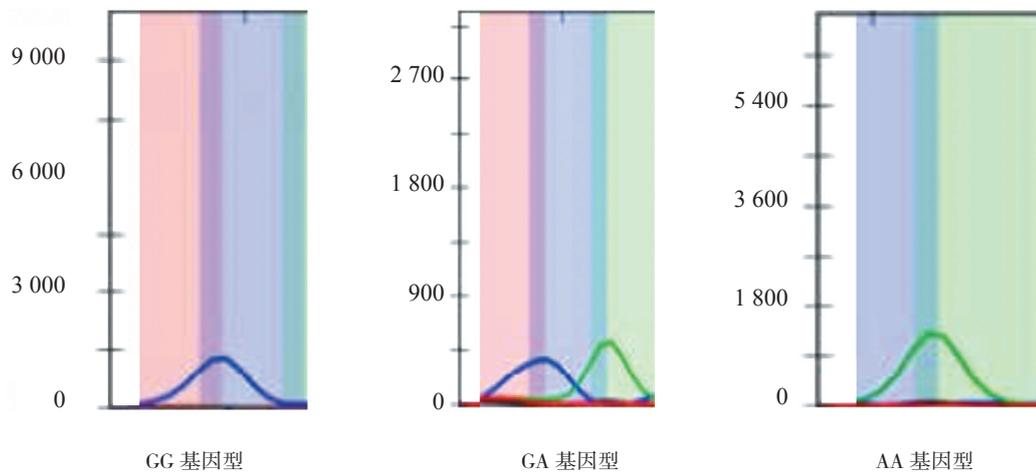


图 1 GUCY1A3 基因位点 rs7692387 的基因型测序结果

2.327, $P=0.039$), 表明 GG 基因型可能是冠心病发病的易感基因型。见表 3。

表 2 GUCY1A3 基因位点 rs7692387 基因型频率及等位基因频率分布比较

组别	例数	基因型		等位基因	
		GG	GA+AA	G	A
冠心病组	204	134	70	326	82
对照组	201	112	89	297	105
χ^2 值		4.216		4.135	
P 值		0.040		0.042	

2.5 GUCY1A3 基因位点 rs7692387 的等位基因与冠心病患病风险评估

将研究对象作为整体进行分析, 以 GUCY1A3 基因位点 rs7692387 的等位基因($A=1, G=2$)、年龄、性别、BMI、高血压、糖尿病、吸烟史、收缩压、舒张压作为自变量, 有无冠心病(有=1, 无=0)作为因变量建立 Logistic 回归模型。结果显示, 排除可能与冠心病有关的一些混杂因素后, GUCY1A3 基因位点 rs7692387 的 A 等位基因与 G 等位基因比较, 其可降低冠心病的患病风险($\hat{OR}=0.691, 95\%CI=0.494, 0.968, P=0.031$), 表明 A 等位基因可能是冠心病的保护性基因。见表 4。

表 3 GUCY1A3 基因位点 rs7692387 的基因型与冠心病的 Logistic 回归分析

因素	b	S_b	Wald χ^2	P 值	\hat{OR}	95%CI	
						下限	上限
基因型	0.433	0.210	4.267	0.039	1.543	1.022	2.327
年龄	-0.002	0.012	0.030	0.862	0.998	0.975	1.021
性别	-0.182	0.255	0.509	0.476	0.833	0.505	1.375
BMI	-0.015	0.035	0.176	0.675	0.985	0.920	1.056
高血压	-0.664	0.262	6.426	0.011	0.515	0.308	0.860
糖尿病	-0.285	0.247	1.325	0.250	0.752	0.463	1.221
吸烟史	-0.609	0.266	5.238	0.022	0.544	0.323	0.916
收缩压	-0.010	0.009	1.361	0.243	0.990	0.973	1.007
舒张压	0.006	0.012	0.219	0.640	1.006	0.982	1.029
常量	2.176	1.657	1.724	0.189	8.807	-	-

表4 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的等位基因与冠心病的 Logistic 回归分析

因素	b	S _b	Wald χ^2	P 值	\hat{OR}	95%CI	
						下限	上限
等位基因	-0.370	0.172	4.629	0.031	0.691	0.494	0.968
年龄	-0.002	0.008	0.068	0.794	0.998	0.982	1.014
性别	-0.176	0.180	0.959	0.327	0.838	0.589	1.193
BMI	-0.014	0.025	0.296	0.587	0.987	0.940	1.036
高血压	-0.680	0.185	13.573	0.000	0.506	0.353	0.727
糖尿病	-0.273	0.174	2.446	0.118	0.761	0.541	1.071
吸烟史	-0.605	0.188	10.367	0.001	0.546	0.378	0.789
收缩压	-0.010	0.006	2.776	0.096	0.990	0.978	1.002
舒张压	0.005	0.008	0.333	0.564	1.005	0.988	1.021
常量	2.561	1.168	4.809	0.028		-	

3 讨论

冠心病是严重影响人类健康和生活质量的心血管疾病之一,其发病率和死亡率逐年上升,如今已成为我国城乡居民疾病死亡的首要原因^[6]。冠心病是1种多基因疾病,遗传因素对其发生和发展有影响,该基因的多态性和冠心病之间的关系是目前研究的主要方向。基因多态性反映基因的选择性表达,是人类基因组在抵御不良环境影响过程中的1种适应性表现,包括 SNP、DNA 重复序列多态性以及 DNA 片段长度多态性,在疾病易感性和人体对疾病的抵抗力等方面发挥重要作用^[7]。SNP 是基因多态性中最常见的1种,已被列为对复杂性疾病产生影响的最主要因素之一^[8]。已有研究证实,单个或多个基因的遗传易感性会对 CAD 的发病产生直接影响,且不同地域、种族或同种族不同地域人口的 CAD 易感性具有差异^[9]。全基因组关联分析检测到 *GUCY1A3* 基因座常见的非编码区突变与 CAD 之间具有很强的关联性^[10]。*GUCY1A3* 基因是编码 sGC 的 $\alpha 1$ 亚基, sGC 是 NO-sGC-cGMP 信号转导通路中的关键酶,大部分以 $\alpha 1/\beta 1$ 异二聚体的形式广泛分布于许多实质脏器及各种组织细胞中^[11]。当体内的 sGC 被 NO 激活,激活的 sGC 可以将 GTP 转化为 cGMP,后者则作为细胞内调节信息的传递者,介导舒张血管、降低血压及促进 Na^+ 排泄等正常生理活动^[12]。动物实验研究也证明,若将大鼠的 *sGC $\alpha 1$* 、 *$\alpha 2$* 或 *sGC $\beta 1$* 基因敲除,其血管平滑肌舒张、血压调节及血小板聚集等方面的

功能均会较正常对照组产生不同程度的紊乱,部分会发生严重疾病,甚至死亡^[13]。与之类似,心血管系统疾病患者体内的 NO-sGC-cGMP 信号通路也常为紊乱状态,其根本原因是 NO 在病理状态下被清除,导致通路中最重要的第二信使 cGMP 无法被正常激活,从而不能发挥其正常生理功能^[14]。综上,NO-sGC-cGMP 通路在心血管疾病的发生和发展过程中显得尤为重要,其将成为多种心血管系统疾病(如冠心病、心肌梗死、心力衰竭和慢性肺心病等)有效治疗靶标^[15]。

本研究结果显示,入选的研究对象基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,表明所收集的样本基本能代表延边地区汉族人群 *GUCY1A3* 基因多态性分布。本研究中冠心病组 GG 基因型频率高于对照组,而对照组 GA+AA 基因型频率高于冠心病组,有差异。应用 Logistic 回归分析排除年龄、性别、BMI、高血压、糖尿病、吸烟史、收缩压、舒张压该混杂因素的作用后,有差异,与基因型为 GA+AA 者比较,基因型为 GG 者其患 CAD 的危险性增加,表明 GG 基因型很可能是延边地区汉族人群冠心病发病的易感基因型。*GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的 A 等位基因频率分布在对照组中高于 CAD 组,而 G 等位基因频率分布在 CAD 组中高于对照组,有差异。应用 Logistic 回归分析排除年龄、性别、BMI、高血压、糖尿病、吸烟史、收缩压及舒张压该混杂因素的影响后,有差异,与携带 G 等位基因比较,携带 A 等位基因可降低冠心病的患病风险,表明 A 等位基因可能是延边地区汉族人群冠心病的保护性基因。

本研究在一定程度上为冠心病易感人群的筛选及保护提供理论依据,从而根据不同个体的基因多态性实施针对性的早期干预,对冠心病的预防及个性化治疗具有重要意义。同时由于国内外对 *GUCY1A3* 基因位点 rs7692387 的研究较少,该试验的结果仍需在扩大样本含量的基础上,对不同种族、不同地域的人群进行更加深入的研究。

参 考 文 献:

- [1] LYU Y, JIANG X, DAI W. The roles of a novel inflammatory neopterin in subjects with coronary atherosclerotic heart disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 169-172.
- [2] HOLFMANN M M, RENNER W. Insight from genome-wide association studies into coronary heart disease[J]. *Pharmacogenomics*, 2012, 13(4): 361-363.
- [3] OZAKI K, OHNISHI Y, IIDA A, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction[J]. *Nat Genet*, 2002, 32(4): 650-654.
- [4] JANA WOBST, SIMON VON AMELN, BERNHARD WOLF, et al. Stimulators of the soluble guanylyl cyclase: promising functional insights from rare coding atherosclerosis-related *GUCY1A3* variants[J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111(4): 51.
- [5] TAKIMOTO E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes [J]. *Circ J*, 2012, 76(8): 1819-1825.
- [6] CHEN W W, GAO R L, LIU L S, et al. The general views of report of Chinese cardiovascular disease 2014[J]. *Chin Circ J*, 2015, 30(7): 617-622.
- [7] 单雪峰, 刘成, 孙清超, 等. 新疆维吾尔族 PCSK9 基因多态性与冠心病的相关性探讨 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(17): 1953-1958.
- [8] 高静, 刘相飞, 陈玉东. 黄三角地区人群中 PDGF-D 基因多态性与冠心病的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(9): 944-948.
- [9] DANDONA S, ROBERTS R. The role of genetic risk factors in coronary artery disease[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2014, 16(5): 479.
- [10] LU X, WANG L, CHEN S, et al. Genome-wide association study in Han Chinese identifies four new susceptibility loci for coronary artery disease[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 890-894.
- [11] 雷铁涛. 可溶性鸟苷酸环化酶 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基在雄性大鼠生殖系统中表达的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [12] 石蕊, 李玉明. 可溶性鸟苷酸环化酶基因突变与盐敏感性高血压 [J]. *武警医学院学报*, 2002, 11(1): 62-63.
- [13] FRIEBE A, KOESLING D. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models[J]. *Nitric Oxide*, 2009, 21(3): 149-156.
- [14] SCHMIDT H H, HOFMANN F, STASCH J P. cGMP: Generators, effectors and therapeutic implications[M]. Germany: Springer, 2009: 485-488.
- [15] IRVINE J C, GANTHAVEE V, LOVE J E, et al. The soluble guanylyl cyclase activator Bay 58-2667 selectively limits cardiomyocyte hypertrophy[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e44481.

(王荣兵 编辑)