

· 论 著 ·

# 福建地区汉族人群骨保护素基因 rs2073617T/C 多态性与急性冠脉综合征病变程度的关系

罗助荣, 林毅, 张克己, 郑磊磊, 徐高阳

**[摘要]** **目的** 探讨福建地区骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 基因启动子 rs2073617T/C 位点基因多态性与急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 病变程度的关系。**方法** 采用多聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术检测 360 例 ACS 患者和 120 例正常对照者 OPG 基因 rs2073617T/C 多态性位点基因型, 同时采用 DNA 测序对酶切产物进行鉴定, 并比较其与 ACS 及其病变枝数和冠状动脉积分的关系。**结果** OPG 基因 rs2073617T/C 多态性 TC、TT、CC 三种基因型在 ACS 组和对照组中的频率分别为 43.3%、33.3% 和 23.3%, 以及 47.7%、26.7% 和 25.6%; 两组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); ACS 患者冠状动脉单枝、双枝、多枝病变组间 OPG 基因 rs2073617T/C 基因型频率差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。**结论** OPG 基因 rs2073617T/C 多态性与福建地区汉族人群中 ACS 的发生及冠状动脉病变程度无相关性。

**[关键词]** 骨保护素; 急性冠脉综合征; 多态性; DNA 测序

**[中图分类号]** R541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)05-0385-04

## Correlation between osteoprotegerin gene rs2073617T/C polymorphism and severity of acute coronary syndromes in Fujian area

LUO Zhu-rong, LIN Yi, ZHANG Ke-ji, ZHENG Lei-lei, XU Gao-yang. Cardiology Department, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China

**[Abstract]** **Objective** To detect the association of osteoprotegerin gene rs2073617T/C polymorphisms with severity of acute coronary syndrome (ACS) in Fujian area. **Methods** The polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect OPG gene rs2073617T/C in three hundred and sixty patients with ACS (cases group) and 120 matched control group. DNA sequences of enzyme digested products were also analyzed. **Results** The frequencies of TC, TT and CC types of OPG rs2073617T/C polymorphism in ACS patients and controls were 43.3%, 33.3% and 23.3% VS 47.7%, 26.7% and 25.6%. There was no significant difference in the distribution frequency of three genotypes and two alleles of OPG rs2073617T/C between the ACS and control groups ( $P > 0.05$ ). OPG gene rs2073617T/C in all lesions was no difference among the groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** OPG gene polymorphism was existing in Hans population of Fujian Han, and have no association with acute coronary syndrome and severity of ACS in Han nationality of Fujian.

**[Key words]** osteoprotegerin; acute coronary syndrome; gene polymorphism; DNA sequences

自发现骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 在骨代谢调节中的重要功能以来, 因其在血管性疾病和动脉粥样硬化中发挥的重要作用引起了人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。但有关 OPG 基因多态性与急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 的关系, 国内鲜见文献报道。本研究旨在分析 OPG 基因启动子

rs2073617T/C 位点基因在福建汉族人群中的分布情况, 以初步了解其多态性与 ACS 的发病及病变程度是否存在相关性。

### 1 对象与方法

**1.1 研究对象** ACS 组 360 例均符合 ACS 诊断标准<sup>[2-3]</sup>, 其中男 216 例, 女 144 例; 对照组 120 例, 男 62 例, 女 58 例, 均为福建地区无血缘关系汉族人。排除标准: 合并有急慢性感染、恶性肿瘤、风湿性心脏病、瓣膜钙化、严重肝肾功能异常、重度心功能

**基金项目:** 南京军区医学科技创新项目资助 (09MA094)

**作者简介:** 罗助荣 (1965-), 男, 安徽宿松人, 主任医师, 硕士研究生导师, 从事急性冠脉综合征机制及防治策略研究

**作者单位:** 350025 福建福州, 南京军区福州总医院心内科

衰竭、甲状腺或肾上腺功能紊乱、钙代谢异常及免疫系统疾病等均予排除。

1.2 方法

1.2.1 冠状动脉造影 采用 Judkins 法按常规操作。根据 1984 年美国心脏协会规定的冠脉血管图像分段评价标准:冠脉造影显示任何 1、2、3 枝主要冠状动脉一段狭窄 >50% 为单枝、双枝、三枝病变,左主干病变计为 2 枝病变。根据 Gensini 积分系统对各枝血管狭窄程度进行定量分析:无异常发现为 0 分、狭窄 <25% 为 1 分、26% ~ 50% 为 2 分、51% ~ 75% 为 4 分、76% ~ 90% 为 8 分、91% ~ 99% 为 16 分、100% 为 32 分,患者冠状动脉病变程度的最终积分为各分支积分之和。

1.2.2 生化指标测定 清晨空腹采肘静脉血 5 ml, 3000 r/min(离心半径 8 cm),离心 10 min 取血清,采用 Olympus Au2700 全自动生化分析仪检测。

1.2.3 静脉血基因组 DNA 提取 所有受试者禁食 12 h 后清晨空腹采血,EDTA 抗凝,采用美国 OMEGA 公司全血 DNA 分离提纯试剂盒提取基因组 DNA, -20℃ 保存。

1.2.4 PCR 扩增 应用多聚合酶链式反应(PCR)扩增 OPG 基因启动子 rs2073617T/C 多态性片段。PCR 引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,由上海生工公司合成。OPG rs2073617T/C 上游引物序列:5'-GAAGTGAAGGGGTCAGGCAGC-3',下游引物序列:5'-GTCTGTCTCTCTCTTGCTGCTCTCC-3',扩增反应体系 20 μl,其中含灭菌双氧水 12.8 μl,10 × PCR 反应缓冲液 2 μl,dNTPs 0.4 μl,上游引物(10 μM) 0.4 μl,下游引物(10 μM)0.4 μl,DNA 模板 2 μl,Taq 酶 2 U,覆盖石蜡油。反应条件为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 20 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,循环 35 次;72℃ 5 min;2% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察并拍照。

1.2.5 扩增产物的限制性酶切和 DNA 测序检测 OPG rs2073617T/C PCR 产物分别用 HincII 限制性酶(TaKaRa 公司)于 37℃ 水浴消化 16 h,并经电泳证实。同时 PCR 产物利用 ABI370 型 DNA 测序仪(ABI 公司,USA)进行测序鉴定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件。计算各基因型及等位基因频率,两组间基因型分布做 Hardy-Wrinberg 平衡分析,以确定研究样本的群体代表性。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间计量资料比较采用方差分析或 *t* 检验,各组之间基因型和等位基因频率分布采用  $\chi^2$  检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 两组年龄、性别、体重指数、高血压、三酰甘油(TG)、胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)的差异均无统计学意义(*P* > 0.05),ACS 组吸烟、糖尿病、HDL-C 显著高于对照组(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 两组一般资料比较

项目	对照组( <i>n</i> = 120)	ACS 组( <i>n</i> = 360)
年龄(岁)	60 ± 10	66 ± 5
男性[例(%)]	62(51.7)	216(60.0)
体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	23.1 ± 2.8	23.1 ± 2.3
吸烟[例(%)]	24(20.0)	130(36.1)*
糖尿病[例(%)]	20(17.4)	118(32.8)*
高血压[例(%)]	70(58.3)	239(66.4)
TG(mmol/L)	2.0 ± 2.1	1.7 ± 1.2
TC(mmol/L)	5.1 ± 1.3	4.7 ± 1.1
HDL-C(mmol/L)	1.4 ± 0.4	1.1 ± 0.3*
LDL-C(mmol/L)	2.6 ± 1.2	2.5 ± 0.8

注:与对照组比较,\**P* < 0.05

2.2 研究对象的 Hardy-Weinberg 平衡检验 OPG 基因 rs2073617T/C 多态性基因型分布在两组中的观察值与理论值相吻合,表明研究对象符合 Hardy-Weinberg 平衡,具有群体代表性。

2.3 OPG rs2073617T/C 基因多态性 经 HincII 限制性酶酶切后可见三种基因型:855 bp 处出现单个条带为 TT 纯合子,杂合子 TC 产生 855 bp、460 bp 和 395 bp 三条带;纯合子 CC 产生 395 bp、460 bp 二条带。DNA 测序鉴定的结果亦证实上述 rs2073617T/C 位点 3 种基因型的存在。电泳图和测序图见图 1、图 2。

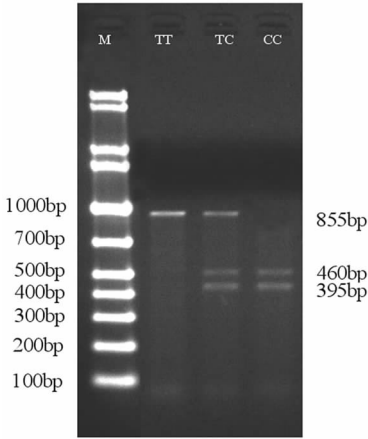


图 1 OPG 基因 rs2073617T/C 酶切电泳及测序结果

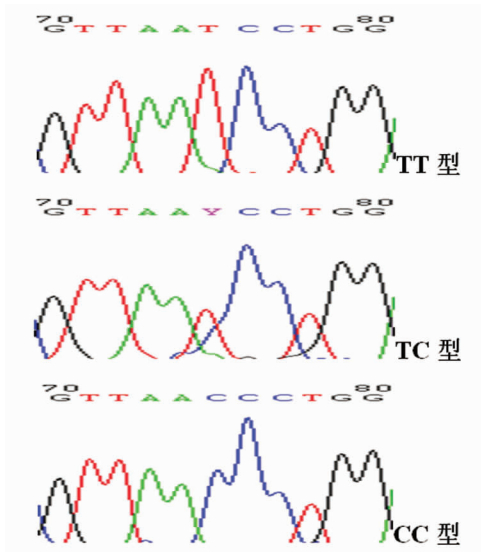


图2 OPG 基因 rs2073617T/C 测序结果

**2.4 OPG 基因 rs2073617T/C 多态性分布与比较**  
与对照组比较,ACS 组 OPG 基因 rs2073617T/C 多态位点的基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ ),见表 2。

表 2 基因型及等位基因频率在两组间的分布[例(%)]		
OPG rs2073617T/C	对照组( $n=120$ )	ACS 组( $n=360$ )
基因型 TT	40(33.3)	96(26.7)
TC	52(43.3)	172(47.7)
CC	28(23.3)	92(25.6)
等位基因 T	132(55.0)	364(50.5)
C	108(45.0)	356(49.4)

注:与对照组比较, $P$  均  $>0.05$

**2.5 OPG rs2073617T/C 位点多态性与 ACS 病变程度的关系**  
ACS 患者根据冠脉造影结果分为单枝、双枝、三枝病变组。其中单枝病变组 166 例、双枝病变组 100 例和三枝病变组 94 例,对照组 120 例。OPG rs2073617T/C 各基因型在四组之间比较的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 3。ACS 患者三种基因型与冠状动脉 Gensini 评分间的差异亦无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 4。

表 3 OPG rs2073617T/C 位点多态性与 ACS 病变枝数的关系[例(%)]				
基因型	对照组( $n=120$ )	单枝病变组( $n=166$ )	双枝病变组( $n=100$ )	三枝病变组( $n=94$ )
TT	40(33.3)	56(33.7)	40(40.0)	26(27.7)
TC	52(43.3)	72(43.3)	48(48.0)	36(38.3)
CC	28(23.3)	38(22.8)	12(12.0)	32(34.0)

注:与对照组比较, $P$  均  $>0.05$

表 4 OPG rs2073617T/C 基因多态性与冠脉病变枝数 Gensini 评分的关系		
基因型	例数	Gensini 评分
TT	122	15.32 $\pm$ 9.12
TC	156	14.57 $\pm$ 8.15
CC	82	13.45 $\pm$ 7.06

3 讨论

OPG 于 1997 年在美国和日本两家实验室同时被发现<sup>[4-5]</sup>,它是一种分泌型糖蛋白,其前体含有 401 个氨基酸的残基,N-末端的 21 个氨基酸为信号肽序列,属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,其 mRNA 在多种组织广泛表达,如心脏、肺、甲状腺、肾脏和骨等。它与细胞核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL),核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(RANK)组成 OPG/RANKL/RANK 系统。OPG 系统与骨代谢,心血管系统及免疫系统疾病等都有着密切的关联。

Palazzuoli 等<sup>[6]</sup>发现 OPG 水平在稳定性冠心病中明显增高,但低于 ST 段抬高的心肌梗死患者。不稳定心绞痛和非 ST 段抬高的心肌梗死 OPG 水平升高但无显著差异。Omeland 等<sup>[7]</sup>研究发现,与传统的危险因素相比,OPG 可以更好的预测急性冠脉综合征患者远期死亡率和心力衰竭的发生。以上研究表明,OPG 不仅能够参与骨代谢,而且参与动脉粥样硬化的进展,并与 ACS 的发病及预后密切相关。因此,探讨 OPG 基因多态性与 ACS 间的相关性具有重要意义。

人类 OPG 基因是单拷贝基因序列,全长 29 kb,位于染色体 8q23-24 上具有 5 个外显子。国外一些学者<sup>[8]</sup>初步发现 OPG 950 以及 1181 位点,其多态性与血管中层钙化密切相关。我们研究发现在福建地区汉族人群中,OPG 基因 rs2073617T/C 多态性存在 TC、TT、CC 三种基因型,其在 ACS 组和对照组中的频率分别为 43.3%、33.3% 和 23.3%,以及 47.7%、26.7% 和 25.6%,两组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );Ohmori 等<sup>[9]</sup>对日本男性冠心病患者血清 OPG 进行研究,结果显示 OPG 基因型 950C/C 与 ACS 显著相关,并且与血清 OPG 水平的升高有关。本研究根据造影结果将 ACS 患者分为单枝、双枝、多枝病变组,并分析其与 OPG 基因多态性的关系,结果发现 OPG 基因 rs2073617T/C 基因型及等位基因频率与冠状动脉病变枝数间差异无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ );对 ACS 患者病变程度 Gensini 评分,分析其与三种基因型间的关系显示差异亦无

统计学意义( $P > 0.05$ )。Soufi 等<sup>[10]</sup>研究发现 OPG 不同位点的基因型与冠心病相关性差异较大,应用多聚合酶链式反应-梯度凝胶电泳判别 OPG 基因发现存在多个突变位点:149 T/C、163 A/G、209 G/A、245 T/G、950 T/C(以上位点都在启动子区域)、1181 G/C(位于第 1 外显子)6890 A/C(位于第 4 内含子)。单个位点基因多态性与冠心病发生虽无独立相关性,但 950 T/C 和 1181 G/C 位点的联合多态性分析显示携带 950 TC/1181 GC 或 950 CC/1181 CC 基因型的患者具有冠心病发病的高危因素。

本研究发现 OPG 基因 rs2073617T/C 多态性与福建地区汉族人群中 ACS 的发生及冠状动脉病变程度无相关性。但并不能说明 OPG 基因多态性与 ACS 没有关系,因为本研究仅选取了 OPG 基因的一个多态性位点,即 OPG 950 位点,很明显探讨 OPG 基因多个位点及连锁多态性与 ACS 的相关性将更具有意义。

#### 【参考文献】

- [1] 罗助荣. 骨保护素系统与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 东南国防医药, 2010, 12(6): 523-525.
- [2] 中华医学会心血管病学分会. 不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(4): 295-304.
- [3] Antman EM, Armstrong PW, Bates ER, et al. 2007 Focused Update

of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction[J]. JACC, 2008, 51(2): 210-247.

- [4] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel seelated protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2): 309-319.
- [5] Tsuda E, Goto M, IVlochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from hurmn fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis [J]. Biochem Biophys Res Contain, 1997, 234(1): 137-142.
- [6] Palazzuoli A, Ascione R, Gallotta M, et al. Osteoprotegerin and B-type natriuretic peptide in acute coronary syndromes with preserved systolic function: relation to coronary artery disease extension[J]. Int J Cardiol, 2009, 137(3): 295-298.
- [7] Omrand T, Ueland T, Jansson AM, et al. Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(3): 627-633.
- [8] Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease [J]. JACC, 2002, 87(9): 4078-4079.
- [9] Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and coronary artery disease in Japanese men[J]. Atherosclerosis, 2006, 187(1): 215-217.
- [10] Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, et al. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease[J]. Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(8): 3764-3768.

(收稿日期: 2011-05-27; 修回日期: 2011-07-18)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

## 《南京军区卫生工作 60 年》史册出版发行

由曹文献、李富荣、初元章主编的《南京军区卫生工作 60 年》史册, 全书 19 章, 180 多万字, 历史资料照片 540 多幅, 分军内本和机密本分别出版发行。军内本最近由人民军医出版社正式出版发行, 供军区师(旅)以上卫生机关、医院(临床部)、疗养院(区)等单位公阅。该史册采取文字、图表、照片穿插编排, 结构新颖, 资料详实齐全, 是具历史性、查考性、可读性于一体的卫生历史参考书, 又是一本很好的传统教育教材。军区 60 年卫生史, 充分反映了为部队、为战备、为人民群众服务的指导思想, 真实地记载了军区卫生工作发展历程、主要成就和做好工作的基本经验。

(钟贵陵 任旭永 供稿)