

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因多态性与下肢动脉粥样硬化的相关性

林小凤 戴成家 连霞 费燕 (解放军第 175 医院药学科/厦门大学附属东南医院 福建漳州 363000)

摘要 目的: 进行三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 与下肢动脉粥样硬化 (lower extremity atherosclerotic disease, LEAD) 的关联分析。方法: 收集福建省闽南地区 630 例体检者(314 例 LEAD 者和 316 例正常者) 的临床资料及外周血; 采用 Sequenom MassArray 系统对该人群的 ABCA1 基因 9 个 SNP 位点进行检测。结果: 9 个 SNP 位点中 rs2980083 位点不符合 Hardy-Weinberg 平衡, 分析中舍去; rs2066714 与 rs2066715, rs1800976 与 rs2246293, rs2246293 与 rs2980083, rs1800976 与 rs2980083 等 4 组位点之间存在明显的连锁不平衡 ($D' > 0.9$, $r^2 > 1/3$), 对其构建的 6 种单倍型在两组的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 该 8 个 SNP 位点的基因型统计在病例对照分析中的分布频率未见显著差异 ($P > 0.05$), 基因 logistic 回归分析未显示有患病风险。结论: 闽南汉族人群 ABCA1 基因 rs10124755、rs2980083、rs1800976、rs4149341、rs2066714、rs2066715、rs2066716、rs2230808、rs2246293 多态性可能与 LEAD 的遗传易感性无关。

关键词 ABCA1 基因; 多态性; 关联分析; 下肢动脉粥样硬化

中图分类号: R968 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2017)02-0242-04

Correlation of ATP Binding Cassette Transporter A1 Gene Polymorphisms and Lower Extremity Atherosclerotic Disease

Lin Xiaofeng, Dai Chengjia, Lian Xia, Fei Yan (Department of Pharmacy, the 175th Hospital of PLA, Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Fujian Zhangzhou 363000, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the correlation of single nucleotide polymorphisms (SNP) of ATP binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) and lower extremity atherosclerotic disease (LEAD). **Methods:** The clinical data and peripheral blood were collected from 630 participants (314 LEAD cases and 316 normal controls) in Han population of Minnan. The 9 SNP genotypes in the ABCA1 gene were detected by Sequenom MassArray. **Results:** Among the 9 SNP genotypes, rs2980083 was rejected because it wasn't in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. Obvious linkage disequilibrium was found between rs2066714 and rs2066715, rs1800976 and rs2246293, rs2246293 and rs2980083, and rs1800976 and rs2980083 ($D' > 0.9$, $r^2 > 1/3$). There were no significant differences ($P > 0.05$) in 6 haplotypes of ABCA1 gene groups between the LEAD cases and the normal controls. No significant differences ($P > 0.05$) were found in frequency distribution between the LEAD cases and the normal controls in 8 SNP according to the results of genotype statistics. There was no onset risk of LEAD according to the gene logistic regression analysis. **Conclusion:** The SNPs of rs10124755, rs2980083, rs1800976, rs4149341, rs2066714, rs2066715, rs2066716, rs2230808 and rs2246293 might not correlate with the susceptibility of LEAD in Han population of Minnan.

KEY WORDS ATP binding cassette transporter A1 gene; Polymorphisms; Correlation study; Lower extremity atherosclerotic disease

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 是将胆固醇从细胞中移出的主要运载工具, 通过消耗三磷酸腺苷进行跨膜转运脂质和其他代谢物, ABCA1 还参与高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的生成, 并发挥抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的作用^[1]。在 Tangier 疾病患者中, 其 ABCA1 功能缺失突变, 使 As 风险及严重程度增加^[2]。研究表明, ABCA1 在预防心血管疾病中起重要作用, 且在动物和人类模型中已得到验证^[3]。经检索, 尚未见 ABCA1 基因多态性与下肢动脉粥样硬化 (lower extremity atherosclerotic dis-

ease, LEAD) 的相关性报道。本研究拟采用病例对照研究, 探讨 ABCA1 基因 rs10124755、rs2980083、rs1800976、rs4149341、rs2066714、rs2066715、rs2066716、rs2230808、rs2246293 等 9 个多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 位点多态性与 LEAD 的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 4 月~2016 年 7 月在我院健康体检中心的体检者 630 例(男 420 例, 女 210 例), 汉族, 年龄 50~80(62.48±6.23) 岁, 以 2012 年美国临床内分

基金项目: 2013 年度南京军区医学科技创新课题(编号: MS098)

通讯作者: 费燕 Tel: (0596) 2975795 E-mail: feiyanfy@126.com

泌协会标准和《老年人四肢动脉粥样硬化性疾病诊治中国专家建议2012》LEAD为诊断标准^[4,5]:①静息时踝肱指数(ankle brachial index, ABI) ≤ 0.90,或运动后ABI下降20%,或趾肱指数(toe brachial index, TBI) < 0.60;②下肢缺血症状、股动脉可闻及杂音、胫后动脉(或足背动脉)搏动减弱(或消失);③多普勒彩超和其他影像学检查显示LEAD狭窄或闭塞性病变。将既往史有冠心病、症状性卒中,近1年内有外科手术、恶性肿瘤史、肥胖、糖尿病和慢性炎症等慢性疾病,不规律服用某些药物(包括中药药膳)者剔除。本研究经厦门大学附属东南医院伦理委员会批准,入组受试者均知情同意。

1.2 位点选择、引物设计和基因分型

1.2.1 位点选择 找到候选基因(从NCBI网站)打开SNP中的Geneview链接,选择该基因可能对蛋白质水平产生影响的SNP位点,依据hapmap数据库或1000 Genomes,选取在中国汉族人群中最小等位基因频率大于0.05,且等位基因对等分布的SNP位点,综合pubmed和Google文献检索,所选位点通过<http://snpinfo.niehs.nih.gov/>进行功能预测^[6],信息核实后选出9个位点。

1.2.2 引物设计 根据ABCA1基因中rs10124755、rs2980083、rs1800976、rs4149341、rs2066714、rs2066715、rs2066716、rs2230808、rs2246293位点多态性和已知的脱氧核糖核酸序列设计聚合酶链反应引物,由北京博森生物科技有限公司合成,正向引物、反向引物和延伸引物序列见表1。

1.2.3 基因分型 采用Sequenom MassArray系统,基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱分析质谱技术分辨未延伸产物与延伸引物的相对分子量差异而进行SNP分型。各位点的检出率均在99.8%以上。

1.3 统计学方法

数据分析均采用SPSS18.0和plink 1.07统计软件,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。连续变量采用非配对t检验,对分类变量采用 χ^2 检验。连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析采用Haploview软件, $D' > 0.9$, $r^2 > 1/3$ 视为两位点连锁不平衡。采用Haploview 4.2进行Hardy-Weinberg平衡检验。采用非条件Logistic回归计算优势比(odds Ratio, OR)校正性别和年龄因素的影响后,对SNP位点与LEAD的易感性进行关联分析。进行多位点Adjust(数据分析校正)多重检验控制错误率在较低水平。

2 结果

2.1 入组受试者的临床特征

比较两组的年龄、性别、体质指数(BMI)、吸烟、

表1 SNP位点引物序列

位点	引物	引物序列(5'-3')
rs10124755	F	ACGTTGGATGTCGACTCACTGTAACCTCTG
	R	ACGTTGGATGATTAGCCAGATGTGGTGGCC
	U	GGGCTGCCGCTCC
rs2980083	F	ACGTTGGATGTTATGTAGCCACTCCAGACC
	R	ACGTTGGATGTTTGGCCCTCCAGTGTTTTG
	U	GCCAAAGGCAAACAGA
rs1800976	F	ACGTTGGATGAGCGCTTCCCAGCGCTCTTA
	R	ACGTTGGATGACAGCAGGTGCTTTAGGGTC
	U	CCCCGGTCCGCGCTTGCCT
rs4149341	F	ACGTTGGATGAATCAAAGGCACTGTGAAC
	R	ACGTTGGATGCTACCTTCCAGAGAGGTCC
	U	GGGCCTTTCAATCTGTATTAATAATGT
rs2066714	F	ACGTTGGATGAAAGAGCAGGAGGTCAACAG
	R	ACGTTGGATGGGAAAGTGATGAGAAGAGCC
	U	GATGTTTCCAACCAGAAGAGAAT
rs2066715	F	ACGTTGGATGAGAGGAATGTTCCCTGCAC
	R	ACGTTGGATGACTAAGAGCAGTGCCTTCC
	U	CTGACTTCTGGACCCACCTTAA
rs2066716	F	ACGTTGGATGAAGAGGTCCATGATGGTCTG
	R	ACGTTGGATGCTTGTCTTCTCCCTTTGC
	U	CCCCTTCTCCCTTTGCAGAGACAC
rs2230808	F	ACGTTGGATGGCAGATCGATTTCTCAACAG
	R	ACGTTGGATGACAGCGGCTTACCTTGAC
	U	GCGGTTTACCTTGACATTATT
rs2246293	F	ACGTTGGATGCTCCGGCTGAGAACTAAC
	R	ACGTTGGATGAAGGGCACCAGTGAATTTG
	U	GAGTGAATTTGCTTCTCTAAATC

注: F为正向引物; R为反向引物; U为延伸引物。

饮酒、高血压、空腹血糖、TC、TG、HDL、LDL、载脂蛋白(apolipoprotein A-1, apoA1)、载脂蛋白B(apolipoprotein B, apoB)等临床检验参数,可见LEAD组的高血压比例明显高于正常组($P = 0.01$),TG、HDL水平两组间差异有统计学意义($P = 0.03$),相应的阿司匹林和他汀类药物使用率也明显高于正常组。见表2。

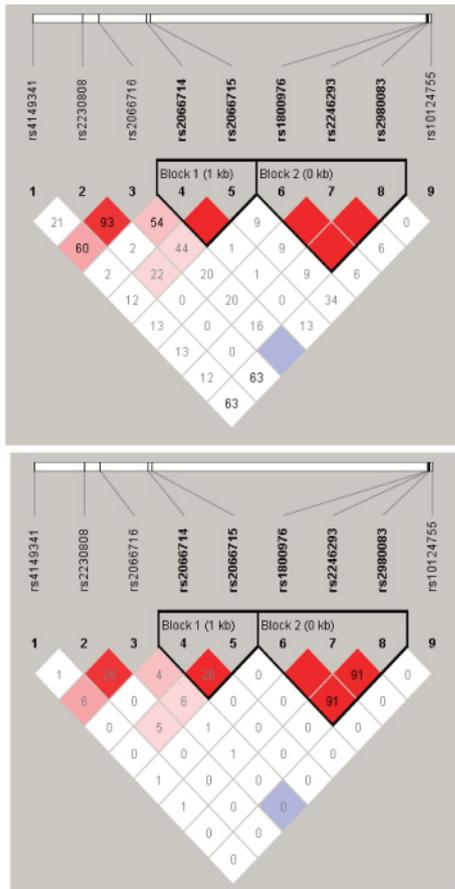
表2 入组受试者的临床特征($\bar{x} \pm s$, n(%))

项目	正常组(n=316)	LEAD组(n=314)
年龄(岁)	62.28 ± 4.96	63.07 ± 5.36
男性/女性	211/105	209/105
BMI(kg·m ⁻²)	22.87 ± 1.47	23.49 ± 1.49
空腹血糖(mmol·L ⁻¹)	5.88 ± 1.7	5.92 ± 1.5
高血压	44(13.92)	95(30.25) ^a
饮酒	66(20.89)	71(22.61)
吸烟	68(21.52)	70(22.29)
阿司匹林	13(4.11)	26(8.28) ^a
降压药	20(6.32)	35(11.15) ^a
他汀类	15(4.75)	32(10.19) ^a
TC(mmol·L ⁻¹)	5.89 ± 0.42	5.40 ± 0.53
TG(mmol·L ⁻¹)	1.28 ± 0.50	1.89 ± 0.55 ^a
HDL(mmol·L ⁻¹)	1.80 ± 0.31	1.14 ± 0.37 ^a
LDL(mmol·L ⁻¹)	3.68 ± 0.25	3.61 ± 0.47
apoA1(g·L ⁻¹)	1.66 ± 0.37	1.59 ± 0.40
apoB(g·L ⁻¹)	1.39 ± 0.20	1.31 ± 0.19

注:与正常组比,^a $P < 0.05$ 。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验、LD 和单倍体分析

本研究的 9 个 SNP 位点除 rs2980083 其余均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.01$) ,因此 rs2980083 不再做下一步分析。以年龄和性别为调整因素 ,评估病例对照组单体型分布差异与 LEAD 易感性之间的关联。采用 LD、 r^2 检验 ,rs2066714 与 rs2066715 , rs1800976 与 rs2246293 ,rs2246293 与 rs2980083 , rs1800976 与 rs2980083 之间存在明显 LD 现象 ($D' > 0.9$ $r^2 > 1/3$) ,而进一步比较发现 病例对照组间 $P > 0.05$ 提示此 LD 与 LEAD 发病不相关(图 1)。构建出 6 种单倍型 ,两组的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 表明此 6 种单倍型与 LEAD 的发生无关。



注: 方格中数值为左右 2 个 SNP 位点的 D 值或者 r^2 值百分比

图 1 ABCA1 基因位点 LD 分析结果

2.3 基因型统计

通过基因型 (genotypic test ,GENO) 检验、等位基因检验 (Allelic test , ALLELIC)、显性基因检验 (Dominant gene action test ,DOM) 和隐性基因检验 (recessive gene action test ,REC) 等 4 种检验 ,评价 LEAD 与正常组人群中 ABCA1 基因 8 个位点的基因型分布情况。该 8 个位点的 4 种检验中未见 LEAD 与正常组之间的分布频率存在差异 ($P > 0.05$) ,见表 3。

表 3 基因型统计

SNP	TEST	LEAD 组	正常者
rs10124755	GENO	0/3 /221	0/5 /155
	ALLELIC	3 /445	5 /315
	DOM	3 /221	5 /155
	REC	0 /224	0 /160
rs1800976	GENO	49 /93 /82	24 /80 /56
	ALLELIC	191 /257	128 /192
	DOM	142 /82	104 /56
	REC	49 /175	24 /136
rs4149341	GENO	24 /82 /118	16 /70 /74
	ALLELIC	130 /318	102 /218
	DOM	106 /118	86 /74
	REC	24 /200	16 /144
rs2066714	GENO	17 /80 /126	14 /54 /92
	ALLELIC	114 /332	82 /238
	DOM	97 /126	68 /92
	REC	17 /206	14 /146
rs2066715	GENO	37 /123 /64	31 /72 /56
	ALLELIC	197 /251	134 /184
	DOM	160 /64	103 /56
	REC	37 /187	31 /128
rs2066716	GENO	25 /79 /112	11 /70 /77
	ALLELIC	129 /303	92 /224
	DOM	104 /112	81 /77
	REC	25 /191	11 /147
rs2230808	GENO	40 /103 /81	36 /76 /47
	ALLELIC	183 /265	148 /170
	DOM	143 /81	112 /47
	REC	40 /184	36 /123
rs2246293	GENO	49 /93 /82	24 /80 /56
	ALLELIC	191 /257	128 /192
	DOM	142 /82	104 /56
	REC	49 /175	24 /136

注: GENO: 基因型检验 (AA/Aa/aa) ; ALLELIC: 等位基因检验 (2AA + Aa/2aa + Aa) ; DOM: 显性基因检验 (AA + Aa/aa) ; REC: 隐性基因检验 (AA/Aa + aa) ; NA, 未检出。

表 4 基因型 logistic 回归表

SNP	AI	TEST	OR	L95	U95
rs10124755	T	ADD	NA	NA	NA
	T	DOMDEV	NA	NA	NA
	T	GENO_2DF	NA	NA	NA
rs1800976	G	ADD	0.842	0.210	3.382
	G	DOMDEV	1.19	0.274	5.17
	G	GENO_2DF	NA	NA	NA
rs4149341	C	ADD	0.970	0.685	1.374
	C	DOMDEV	0.757	0.472	1.214
	C	GENO_2DF	NA	NA	NA
rs2066714	T	ADD	0.942	0.645	1.375
	T	DOMDEV	1.149	0.688	1.917
	T	GENO_2DF	NA	NA	NA
rs2066715	T	ADD	1.022	0.758	1.377
	T	DOMDEV	1.463	0.964	2.219
	T	GENO_2DF	NA	NA	NA
rs2066716	T	ADD	1.25	0.852	1.834
	T	DOMDEV	0.62	0.376	1.024
	T	GENO_2DF	NA	NA	NA
rs2230808	T	ADD	0.803	0.602	1.071
	T	DOMDEV	0.979	0.648	1.481
	T	GENO_2DF	NA	NA	NA
rs2246293	G	ADD	1.181	0.877	1.59
	G	DOMDEV	0.672	0.441	1.025
	G	GENO_2DF	NA	NA	NA

注: ADD, 等位基因的加和作用; DOMDEV, 从加性显性偏差, 而不专指特定的显性或隐性等位基因; GENO_2DF, 2 df 加性显性的测试; NA, 未检出。

2.4 基因 logistic 回归分析

构建携带 A1 等位基因与病例对照的 logistic 回归模型, plink 软件分析该模型中 A1 与疾病的关联程度。OR 值 >1, U95 >1 时, 表明该等位基因确实有致病作用; OR 值 <1, U95 <1 时, 表明该等位基因有保护作用。如表 4 所示, 未见有致 LEAD 或保护作用的位点。

3 讨论

ABCA1 基因至少有 50 种突变体, L1097P 纯合子突变的 Tangier 患者 随着时间推移高 TC、高 TG、低 LDL 颗粒加剧 As 的发展^[7]。研究普通人群 ABCA1 的多个 SNPs 中, E1172D 和 R1587K 位点突变与降低 HDL 水平和增加心血管疾病风险有关; R219K、V771M 和 I883M 突变可抗 As; V8251、I883M 和 E1172D 可增加临床事件及 As 严重性, 而 C-17G 变异则不通过改变 HDL 影响 As 的严重性; K219 和 M883 可增加 HDL 水平, 降低 TG; M771 可上调 HDL 和 apoA-I 水平^[8,9]。可见, ABCA1 的多个 SNP 位点与 As 发生发展密切相关, 但基于闽南汉族人群的本研究并未发现 9 个 SNP 位点可能与 LEAD 的遗传易感性相关。这种不一致性的可能原因: ①ABCA1 从基因和蛋白层面对 LEAD 的发生和进展影响程度不同。人 ABCA1 第 5 个 ABCA1 突变体的突变显著降低 ABCA1 介导的胆固醇外流, 但未影响 ABCA1 与 apoA-I 结合作用, 后被证实整个外流过程可能 ABCA1 赖氨酸残基是与 apoA-I 作用的必要步骤^[8]。②种族和地区差异。其他国家、地区和民族与闽南汉族人的遗传多态性存在区别。据报道 ABCA1 基因 R1587K 多态性与冠心病易感性的系统评价显示其遗传易感性在高加索人群中较显著^[9]。③LEAD 的炎症病理机制与其它 As 亦有不同。目前 ABCA1 基因多态性的报道集中在症状较明显, 危及救治的冠心病, 与 LEAD 最相关的报道为 rs2230806 位点的 AA 基因型与男性周围动脉闭塞疾病相关^[10]。本研究人群为严格入选和排除的 LEAD 者, 其与报道的结果存在不吻合性, 一方面说明基因多态性中研究对象对研究结果的决定性, 另一方面显示 rs10124755、rs2980083、rs1800976、rs4149341、rs2066714、rs2066715、rs2066716、rs2230808、rs2246293 多态性可能与闽南汉族人群 LEAD 的发病无关。

LEAD 以中老年人居多, 大多患者临床症状不明显, 易被误为劳累或老年退化, 重视不够诊疗易延误。如进行基因检测等预防性干预或治疗, 采取针对性措施延缓或逆转病变, 可能避免肢体坏疽、截肢

及其他心脑血管大事件。本研究由于缺乏基因-环境或相关数据, 可能限制其多态性与环境或者其他基因位点功能的分析, 且样本容量较小, 为闽南地区汉族人, SNP 的结果可能也因合并其他疾病而受影响, 且未进行临床诊断指标与 LEAD 的关联研究, 结果外推时需谨慎。因此, 下一步可进行基础性研究及其随机、大样本、多中心的前瞻性试验, 结合临床诊断指标分析 ABCA1 基因多态性与 LEAD 的相关性, 深入探讨 ABCA1 基因及蛋白在 LEAD 疾病发生发展中的作用机制。

参 考 文 献

- 1 Feig JE, Hewing B, Smith JD, et al. High-density lipoprotein and atherosclerosis regression: evidence from preclinical and clinical studies [J]. *Circ Res*, 2014, 114: 205-213
- 2 Shao B, Tang C, Sinha A, et al. Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase [J]. *Circ Res*, 2014, 114: 1733-1742
- 3 张玲. DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂以依赖 LXR 的方式诱导巨噬细胞 ABCA1 表达及胆固醇外输 [D]. 天津: 南开大学博士学位论文, 2014
- 4 吴娜琼. 2012 年美国内分泌医师协会血脂异常与动脉粥样硬化预防管理指南简介 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2013, 5(6): 85-91
- 5 《老年人四肢动脉粥样硬化性疾病诊治中国专家建议 2012》写作组. 老年人四肢动脉粥样硬化性疾病诊治中国专家建议(2012) [J]. *中华老年医学杂志*, 2013, 32(2): 121-131
- 6 林小凤, 李红娜, 石鹤坤, 等. MTHFR 基因单核苷酸多态性与下肢动脉粥样硬化的关联研究 [J]. *中国药师*, 2016, 19(10): 1821-1825
- 7 Murano T, Yamaguchi T, Tatsuno I, et al. Subfraction analysis of circulating lipoproteins in a patient with Tangier disease due to a novel ABCA1 mutation [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 452: 167-172
- 8 Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85: 1343-1372
- 9 Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, et al. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 1322-1332
- 10 Nagao K, Kimura Y, Ueda K. Lysine residues of ABCA1 are required for the interaction with apoA-I [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(3): 530-535
- 11 董渊, 冉启军, 魏泽红, 等. ABCA1 基因 R1587K 多态性与冠心病遗传易感性的系统评价 [J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(10): 1312-1317
- 12 杨景慧. 老年代谢性疾病及周围动脉闭塞性疾病基因关联研究 [D]. 北京: 解放军医学院硕士学位论文, 2014

(2016-08-30 收稿 2016-09-22 修回)