

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.014

DDAH2 启动子区 -1150 C/A 多态性与中国汉族人群冠心病的遗传易感性研究

张顺芝¹ 孙吉¹ 刘丽华¹ 陈磊² 陈小平^{3△}

(1 长沙市第一医院药剂科 湖南长沙 410005; 2 中南大学药学院 湖南长沙 410078;

3 中南大学临床药理研究所 湖南长沙 410078)

摘要 目的:研究 DDAH2 启动子区 -1150 C/A rs805304 多态性与中国汉族人群冠心病之间的相关性。**方法:**应用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)的分析方法,对 381 例冠心病患者和 629 例健康人群中 DDAH2 基因 A-1150C rs805304 多态性进行基因分型。**结果:**病例组和对照组 A-1150C rs805304 位点基因型分布均符合 Hardy-Wenber 平衡;两组间 A-1150C 位点基因型间无显著性的差异(P=0.34);病例组和对照组 A-1150C 位点的等位频率分布也无显著的差别,但是在冠心病病例中,A 等位频率有低于 C 等位频率的趋势(P=0.069)。**结论:**DDAH2 启动子区 -1150 C/A rs805304 多态性与中国汉族人群冠心病的发病不相关。

关键词:冠心病;DDAH2;ADMA;多态性

中图分类号:R541 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)05-854-04

Functional Variant in DDAH2 Contributes to the Susceptibility of Coronary Heart Disease in a Chinese Population

ZHANG Shun-zhi¹, SUN Ji¹, LIU Li-hua¹, CHEN Lei², CHEN Xiao-ping^{3△}

(1 Department of Pharmacy, The first hospital of changsha, Changsha, Hunan 410005, China;

2 Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China;

3 Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha, Hunan, 410078, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the association of DDAH2 promoter -1150 C/A rs805304 polymorphisms with coronary heart disease susceptibility in a Chinese Han population by a case-control study. **Methods:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to genotype the SNP. We performed a case-control analysis including a total of 381 cases and 629 healthy controls. **Results:** Genotype distribution of the DDAH2 rs805304 polymorphism in both groups were in Hardy-Weinberg equilibrium. Our pooled result indicated that there is no significant difference in the genotype distribution between the CAD cases and controls (P=0.34). However, comparing with A allele frequency, the C allele frequency have a lower tendency in cases of coronary heart disease(P=0.069). **Conclusion:** the polymorphism(rs805304) of DDAH2 is not associated with the CAD.

Key words: Coronary artery disease; DDAH2; ADMA; Polymorphisms

Chinese Library Classification(CLC): R541 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)05-854-04

前言

据大量流行病学的资料显示,冠心病的发生发展与环境因素是密切相关的,如饮食、吸烟、肥胖等环境因素都容易引起冠心病的发病。此外,随着近几年来遗传学研究的兴起,有多项研究都表明,冠心病是一种多基因疾病,并且它是遗传因素与多个基因共同作用的结果^[1,2]。并且已经有多项研究证实,有多个基因的遗传多态性与冠心病的发病发展是相关的^[3,4]。

内源性活性物质一氧化氮(nitric oxide, NO)以及内皮素(endothelium, ET)等,参与了心血管系统稳态的调节过程。内源

性活性物质 NO 是 L-精氨酸在一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)的催化作用下所生成的。非对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)是一种内源性 NOS 抑制剂,因此,它通过竞争性的抑制 NOS 的水平从而抑制 NO 的生成^[5,7],继而影响心血管系统的稳态。

人体内 ADMA 主要通过肾脏排泄以及经二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)水解代谢而失活^[8]。体内 DDAH 酶能够影响 ADMA 的代谢继而影响 NOS 的活性以及 NO 的水平。DDAH 在体内有两个类型,DDAH1 和 DDAH2。DDAH2 主要表达于内皮源性的 NOS 组织中。研究发现,DDAH2 基因 -449G/C 多态性与中国人颅内出血的风险是相关的,C 等位频率可显著降低颅内出血的风险^[9]。另外,有研究发现位于 DDAH2 基因启动子区 -871 7G/6G 的多态性与内皮细胞 DDAH2 的表达是相关^[10]。以上多项研究都表明,DDAH2 基因多态性与多种疾病的发生发展都存在着相关性^[11-13]。所以我们

作者简介:张顺芝(1965-),女,本科,副主任药师,主要

研究方向:临床药学, Tel:15802537673,

E-mail:306138986@qq.com

△通讯作者:陈小平, E-mail:jjisun1985128@126.com

(收稿日期:2013-08-10 接受日期:2013-09-05)

推测,DDAH2 基因遗传多态性也可能与冠心病的易感性相关,目前已经报道了 DDAH2 rs805305 多态性与冠心病的相关性^[14,15],但是 DDAH2 启动子区 -1150 C/A rs805304 多态性与冠心病的相关性还未见报道。

1 材料与方法

1.1 病例资料

选择冠心病患者 381 例,其中男 200 例,女 181 例,年龄 65 ± 9 岁,来自 2007-2009 年长沙市第一医院以及湘雅医院门诊新发的病例,所有病例均符合 1979 年 WHO 关于缺血性心脏病的命名和诊断标准,并且还根据病人的病史、临床表现、心电图、心肌酶谱等来确定冠心病的诊断。而正常人群对照组来自长沙市第一医院以及湘雅医院健康体检者,无高血压病史、无糖尿病病史以及冠心病等心脑血管疾病,并且肝肾功能正常。所有入选的个体详细记录吸烟饮酒史、以及既往史、现病史以及各项生理生化指标,在入选时均告知其研究方法及其意义,做到知情同意。本研究得到了中南大学药学院伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶来自北京博大泰克生物基因有限公司,dNTP 来自北京博奥森生物技术有限公司,限制性内切酶 *Bsh* 1236 I 为 MBI 产品,琼脂糖凝胶为基因公司产品。

1.3 DDAH2 A-1150C 多态性的测定

1.3.1 外周血 DNA 提取 抽取肘静脉 EDTANa₂ 抗凝全血 5 ml,采用酚-氯仿法提取外周血白细胞 DNA,-80℃ 保存。

1.3.2 PCR 扩增 我们从 NCBI 数据库中下载人类 DDAH2 基因组 DNA 序列,应用软件 Primer3.0 设计 PCR 扩增和基因分型引物。设计后的引物由上海生工进行合成,纯化方式选择 PAGE 纯化。引物序列如下所示,上游引物为:5'-AGAGGGG-ATGAGGGAAAGAA-3',下游引物为:5'-CCTTGTGTAGGCG-AGCTCAT-3'。PCR 产物扩增反应体系如下所示:10× PCR Reaction Buffer 为 2 μL,2.5 mM dNTP Mix 为 0.3 μL,上、下游引物(10M)分别为 0.1 μL,Taq 酶(5U/μL)加入 0.2 μL 而灭菌双蒸水为 10.3 μL 最后加入基因组 DNA 2 μL,总共 15 μL。

DDAH2 基因 A-1150C 位点 PCR 扩增反应流程如下所示:95℃ 5 min;94℃ 变性 40 s,60℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 45 min,共 35 个循环;最后为 72℃ 延伸 10 min。最后扩增好的 PCR 产物放入 4℃ 保存^[16]。

1.3.3 RELP 分析 我们将 DDAH2 基因 -1150A/C 位点的 PCR 扩增产物进行酶切消化,我们选择的限制性内切酶为 *Bsh* 1236 I。酶切反应体系如下所示:10× Buffer 为 1 μL;*Bsh*1236 I 内切酶(10 U/μL)为 0.6 μL,另外再加入灭菌双蒸水 7.3 μL,PCR 产物 1.5 μL,总共 10 μL。将以上反应体系混匀后在 37℃ 恒温箱反应 4~5 小时。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳分析基因型 琼脂糖凝胶配置的浓度为 1.0% 和 2.0%,经溴化乙锭(EB)染色。在 10 μL DDAH2 基因 A-1150C 酶切产物中加入 2 μL loading buffer,共同点样到 2.0% 琼脂糖凝胶上,进行电泳。在此,我们选择的电泳条件为 150 V 电压同步电泳 25 min。之后切断电源,在紫外灯下观察内切酶酶切后的条带并且判断基因型进行记录以及照相。

1.3.5 统计分析 应用 LDA 软件检验 Hardy-Weinberg 平衡。采用 SPSS 13.0 对数据进行统计学分析,冠心病病例与正常对照组基因型、等位基因频率的分布比较我们采用 χ^2 检验,冠心病病例和正常对照组的一般临床计量资料数据我们用均数± 标准差表示,组间的比较计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 冠心病病例与正常对照人群一般情况比较

本实验研究中,我们总共收集到了冠心病病例标本 381 例,正常人群对照标本 629 例。冠心病病例组其收缩压为 132 ± 22 mm Hg,是显著高于正常对照人群(125 ± 11 mm Hg, $P < 0.001$);冠心病病例组舒张压也是显著高于正常对照人群,分别为 78 ± 13 mm Hg 和 77 ± 8 mm Hg($P < 0.001$)。在平均年龄方面,冠心病病例组人群显著高于正常对照人群,分别为 65 ± 9 岁和 43 ± 14 岁($P < 0.001$)。另外,冠心病病例与正常对照在性别、吸烟史以及高脂血症方面也存在显著差别(见表 1)。

表 1 冠心病病例与正常对照人群一般情况比较
Table 1 General characteristic of the study participants

Characteristic	Control(n = 629)	CAD patients(n=381)	P
Gender			0.039
Male (%)	372(59.1)	200 (52.5)	
Female (%)	257 (40.9)	181 (47.5)	
Age(years)	43 14	65 9	< 0.001
CAD family history(%)	105(16.7)	11(2.8)	< 0.001
SBP(mmHg)	125 11	132 22	< 0.001
DBP(mmHg)	77 8	78 13	< 0.001
Positive history of smoking (%)	156(24.8)	138(36.2)	< 0.001
Positive history of alcohol consumption (%)	131 (20.8)	83 (21.8)	0.751
Hyperlipidemia (%)	280(44.5)	145(38.1)	0.044

2.2 DDAH2 基因 A-1150C 多态性分析

DDAH2 基因包含 A-1150C 多态位点的 PCR 扩增片段为 517 bp。DDAH2 基因 A-1150C 位点 CC 基因型的个体,其 PCR 扩增产物内是存在限制性内切酶 *Bsh* 1236 I 的酶切位点,酶切后所得到的片段大小分别为 388 bp,87 bp 以及 42 bp;AA 基因型的个体,PCR 扩增产物内无 *Bsh* 1236 I 的酶切位点,酶切后所得到的片段大小分别为 475 bp 和 42 bp,AC 基因型的个体,PCR 产物扩增产物内也部分存在限制性内切酶 *Bsh* 1236 I 的酶切位点,酶切后所得到的片段大小分别为 475 bp,388 bp,87 bp 和 42 bp,然而 87 bp 和 42 bp 片段大小较小,电泳后,在图中显示不出,故只有 475 bp,388 bp 两个片段(见图 1)。随机选取样本送去南京金斯瑞公司进行 PCR 产物测序,测序分

型结果(见图 2)与 PCR-RFLP 分型结果是一致的。

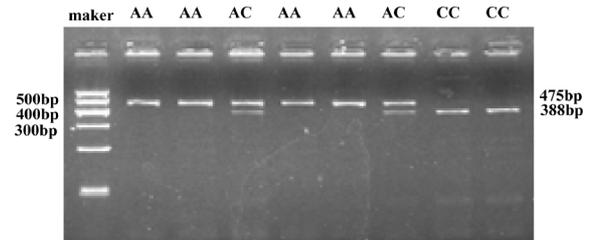


图 1 DDAH2 基因 A-1150C 多态性基因分型电泳图

注:AA AA 基因型,AC AC 基因型,CC CC 基因型。

Fig. 1 DDAH2 gene A-1150C genotyping electrophoresis.

Note: AA AA genotype, AC AC genotype, CC CC genotype.

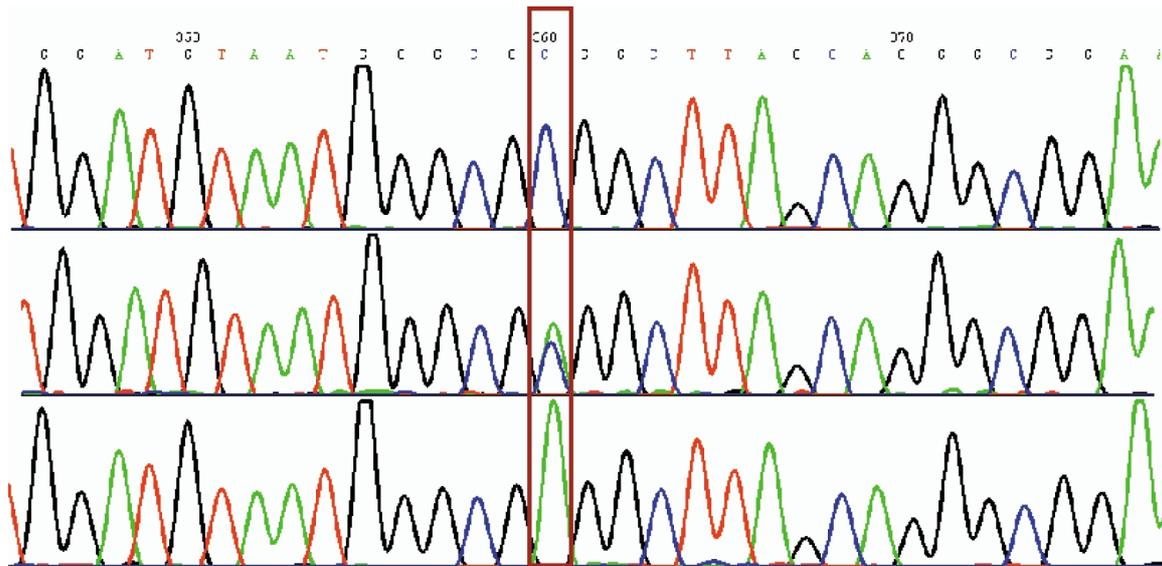


图 2 DDAH2 基因 A-1150C 多态性测序分型峰图

Fig.2 The sequencing peak figure of DDAH2 gene A-1150C polymorphism

2.3 DDAH2 基因 A-1150C 多态性在病例和对照人群中的分布

对照组 DDAH2 基因 A-1150C 位点 AA、AC 以及 CC 基因型的分布频率分别为 47.5%、42.6%和 9.9%,其中 C 等位的分布频率为 62.3%;冠心病组中 DDAH2 基因 A-1150C 位点 AA、AC 以及 CC 基因型的分布频率分别为 42.8%、46.4%和 10.8%,C 等位的分布频率为 68.0%(见表 2)。冠心病病例组和对照人群组 DDAH2 基因 A-1150C 位点基因型分布均符合 Hardy-Wenber 平衡,并且结果显示两组间 DDAH2 基因 A-1150C 位点基因型以及等位频率的分布均无显著的差异(表 2)。

通过对性别、年龄、吸烟(是或否)、饮酒(是或否)、高血脂(有或无)校正,Logistic 回归分析发现高血脂、性别、吸烟都与

与冠心病的发病风险相关。

3 讨论

动脉粥样硬化是冠心病发病的主要原因,目前研究认为内皮受损在动脉粥样硬化发生发展中起关键作用。

大量研究表明一氧化氮(nitric oxide,NO),是一种被公认的抗动脉粥样硬化因子。研究表明 NO 除了有促进血管舒张之外,还具有抗氧化、阻止血小板聚集和单核细胞粘附以及抑制平滑肌细胞增殖多种作用。ADMA 是一种内源性 NOS 的抑制剂,能够减少 NO 的生成,从而损伤内皮功能。二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)能够水解代谢体内的 ADMA,从而在心血管系统发挥作用。

表 2 冠心病病例与对照人群 DDAH2 基因 A-1150C 多态位点基因型分布情况比较

Table 2 DDAH2 gene A-1150C genotype distribution between CAD and controls

Genotype	Control n (%)	CAD n (%)	X ²	P
AA	299 (47.5)	163(42.8)		
AC	268 (42.6)	177(46.4)	2.16	0.340
CC	62 (9.9)	41(10.8)		
C Allele	62.3%	68.0%	3.315	0.069

目前,关于 DDAH2 基因多态性与心血管系统疾病的相关性已有研究,如高血压、糖尿病等,与冠心病之间的相关性也已开始有了研究^[17-20]。基于 DDAH2 在 ADMA 代谢灭活中的重要性以及对体内 NO 生物利用度重要影响,本研究通过病例对照研究,初步探讨了 DDAH2 基因 A-1150C 多态性与湖南地区汉族人群冠心病遗传易感性的关系。目前国内外对 DDAH2 遗传多态性与冠心病的研究很少,仅有两个多态性位点的报道^[17,18]。DDAH2 基因 A-1150C 多态性这一位点与冠心病的易感性的研究尚未见报道。我们研究结果发现,经过 X^2 检验,DDAH2 A-1150C 多态性与该地区人群冠心病的发病不相关,无显著性的差异。但是从我们结果可以看出,A 等位频率在冠心病病例中有要低于 C 等位频率的趋势($P=0.069$)。可能是因为样本例数偏少,还没能观察到其显著性的差异。另外也有可能是不同种族间存在着遗传差异而导致的。

我们经 logistic 回归分析发现,通过对性别、年龄、血脂、吸烟、饮酒进行校正后发现,合并有高血脂的人群,冠心病的发病风险会增加。

本研究对 DDAH2 基因 A-1150C 多态性与湖南地区汉族人群冠心病遗传易感性的关系进行了探讨,虽然结果显示其多态性与湖南地区汉族人群冠心病的发病风险不相关,但是为进一步研究冠心病的发生发展机制提供着指导意义。

参考文献(References)

- [1] Kurland L, Liljedahl U, Lind L. Hypertension and SNP genotyping in antihypertensive treatment[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2005, 5(2):133-142
- [2] Gong M, Hubner N. Molecular genetics of human hypertension[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2006, 110(3):315-326
- [3] Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of polymorphisms of SORBS1, GCK and WISP1 with hypertension in community-dwelling Japanese individuals[J]. *Hypertens Res*, 2009, 32(5):325-331
- [4] Yang HC, Liang YJ, Wu YL, et al. Genome-wide association study of young-onset hypertension in the Han Chinese population of Taiwan[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(5):e5459
- [5] Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome[J]. *Life Sci*, 2009, 84(21-22):705-712
- [6] Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-Arginine Paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor[J]. *J Nutr*, 2004, 134(10 suppl):2842-2847
- [7] Leiper J. M, Santa Maria J, Chubb A, et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases[J]. *Biochem J*, 1999, 343 Pt1:209-214
- [8] Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure[J]. *Lancet*, 1992, 339 (8793): 572-575
- [9] Bai Y, Chen J, Sun K, et al. Common genetic variation in DDAH2 is associated with intracerebral haemorrhage in a Chinese population: a multi-centre case-control study in China[J]. *Clin Sci (Lond)*. 2009, 117 (7):273-279
- [10] Jones LC, Tran CT, Leiper JM, et al. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 310(3):836-843
- [11] Abhary S, Burdon KP, Kuot A, et al. Sequence variation in DDAH1 and DDAH2 genes is strongly and additively associated with serum ADMA concentrations in individuals with type 2 diabetes [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3):e9462
- [12] Weiss SL, Yu M, Jennings L, et al. Pilot study of the association of the DDAH2 -449G polymorphism with asymmetric dimethylarginine and hemodynamic shock in pediatric sepsis [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3):e33355
- [13] Maas R, Erdmann J, Lüneburg N, et al. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension [J]. *Pharmacol. Res*, 2009, 60: 488-493
- [14] Gad MZ, Hassanein SI, Abdel-Maksoud SM, et al. Association of DDAH2 gene polymorphism with cardiovascular disease in Egyptian patients[J]. *J Genet*, 2011, 90(1):161-163
- [15] Gad MZ, Hassanein SI, Abdel-Maksoud SM, et al. Assessment of serum levels of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and L-arginine in coronary artery disease [J]. *Biomarkers*, 2010, 15(8):746-752
- [16] 陈磊. 二甲基精氨酸二甲胺水解酶 2 基因多态性与湖南地区汉族人群原发性高血压易感性的关联研究[D]. 长沙:中南大学药学院, 2009:15-20
Chen Lei. Association of genetic polymorphisms in dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 gene with essential hypertension [D]. Changsha: Central South University, 2009: 15-20
- [17] Xu AG, Xu RM, Lu CQ, et al. Association study of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene polymorphisms and coronary heart disease[J]. *Mol Med Report*, 2012, 6(5):1103-1106
- [18] Seo HA, Kim SW, Jeon EJ, et al. Association of the DDAH2 gene polymorphism with type 2 diabetes and hypertension[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 98(1):125-131
- [19] Andreozzi F, Presta I, Mannino GC, et al. A functional variant of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 gene is associated with insulin sensitivity[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e36224
- [20] Bai Y, Chen J, Sun K, et al. Common genetic variation in DDAH2 is associated with intracerebral haemorrhage in a Chinese population: a multi-centre case-control study in China [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 117(7):273-279