

## rs1122608 多态性与中国汉族人血脂水平的关联研究\*

程小欢, 李祖华, 郑芳<sup>△</sup> (武汉大学中南医院临床基因诊断中心/检验科 430071)

**【摘要】 目的** 探讨 rs1122608(G/T) 位点多态性与中国汉族人群血脂水平的关联性。**方法** 在中南医院体检中心收集高脂血症患者 204 例作为高脂血症组, 健康者 187 例作为健康对照组。用全自动生化仪检测血脂水平, 采用聚合酶链反应-高分辨率溶解曲线分析技术(PCR-HRM)检测 rs1122608(G/T) 多态性。比较高脂血症组和健康对照组间等位基因和基因型的分布差异, 同时比较不同基因型亚组之间血脂各指标的差异。**结果** 高脂血症组与健康对照组 GG 型、GT 型和 TT 型频率比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 基因型亚组间各血脂指标总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)差异也无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** rs1122608(G/T) 多态性与中国汉族人群血脂水平无明显相关性。

**【关键词】** 高脂血症; 单核苷酸多态性; 高分辨率溶解曲线

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.14.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)14-2016-03

Association study between rs1122608 and lipid levels in Chinese Han population\* CHENG Xiao-huan, LI Zu-hua, ZHENG Fang<sup>△</sup> (Center for Gene Diagnosis, Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

**【Abstract】 Objective** To study the association of rs1122608 single nucleotide polymorphism (SNP) and serum lipid levels in the Han population. **Methods** A total of 204 hyperlipidemia cases as the hyperlipidemia group and 187 healthy people as the healthy control group were recruited for the study. Serum lipid levels were detected by automatic biochemical analyzers. The rs1122608 polymorphism was determined by polymerase chain reaction (PCR) and high-resolution melting (HRM). The genotype and allele frequency distributions were compared between the hyperlipidemia group and the healthy control group. Serum lipid levels among different genotype subgroups in the hyperlipidemia group and the healthy control were compared also. **Results** The differences in the genotypic and allelic frequencies between the the hyperlipidemia group and the healthy control had no statistical significance ( $P>0.05$ ). And there were no significant differences in TG, TC, HDL-C and LDL-C levels among different genotype subgroups in the hyperlipidemia group and the healthy control. **Conclusion** The rs1122608 polymorphism is not associated with lipid levels in Chinese Han population.

**【Key words】** hyperlipidemia; single nucleotide polymorphism; high-resolution melting

大量研究发现, 血液中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低是冠心病的重要风险因素<sup>[1-2]</sup>。目前人们已通过全基因组关联分析(GWAS)发现了大量与血脂相关的遗传易感位点<sup>[3]</sup>。但这些位点多在欧美白种人中发现与血脂相关, 在亚洲人群中的验证还不充分。由于遗传特征及其对表型的影响存在种族差异, 因此鉴定与汉族人群血脂相关的位点尤为重要。rs1122608 位于低密度脂蛋白受体(LDLR)基因附近的 SMARCA4 基因上。国外研究发现在欧美人群中该位点与 LDL-C 水平相关<sup>[4]</sup>。2009 年在 Nature Genetics 上发表了一项早发性心肌梗死的全基因组关联研究, 其中 rs1122608 被进一步发现与高加索人群中早发性心肌梗死明显关联<sup>[5]</sup>。2010 年发现该位点与中国汉族男性心肌梗死明显相关<sup>[6]</sup>。由此推测, 该位点可能与中国汉族人血脂水平相关。为此, 本文研究了 rs1122608(G/T) 的基因多态性及其与血脂水平的相关性, 旨在观察其对汉族人群血脂水平的影响, 评估患高脂血症的风险。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2012 年 11 月至 2013 年 7 月于中南医院体检

中心收集高脂血症患者 204 例作为高脂血症组, 健康者 187 例作为健康对照组。根据中国成人血脂异常防治指南<sup>[7]</sup>, 达到高脂血症标准为  $TC \geq 6.22 \text{ mmol/L}$ 、 $LDL-C \geq 4.14 \text{ mmol/L}$ 、 $HDL-C < 1.04 \text{ mmol/L}$ 、 $TG \geq 2.26 \text{ mmol/L}$ , 其中 1 项或几项符合即可; 健康对照组为血脂水平正常的体检人群。所有受试对象均排除甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退、慢性肝病、糖尿病、糖尿病肾病、肾病综合征、肾移植术后等影响脂类代谢的疾病, 排除使用影响糖脂代谢药物者。两组研究对象的一般临床资料比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 具有可比性。见表 1。

## 1.2 方法

**1.2.1 血脂水平检测** 采集受试者空腹 12 h 以上静脉血 3 mL, 肝素抗凝, 在全自动生化分析仪(雅培全自动生化分析仪)用酶法检测 TC、LDL-C、HDL-C 和 TG。

**1.2.2 基因组 DNA 制备** 采集受试者静脉血 2 mL 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝, 采用蛋白酶 K 法提取基因组 DNA, 通过电泳鉴定 DNA 提取成功, 通过 Nanodrop2000 微量紫外分光光度仪测定提取基因组 DNA 的浓度和纯度, 终浓度为  $50 \sim 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , 纯度 OD 260/280 为  $1.5 \sim 2.0$ 。

\* 基金项目: 武汉大学中南医院院内基金(201105)。

作者简介: 程小欢, 女, 硕士, 主管技师, 主要从事心血管疾病的分子生物学检验研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: zhengfang@whu.edu.cn。

**1.2.3 PCR 扩增和高分辨率熔解曲线分析** 根据引物设计原则,用 LSPDS 软件设计 PCR-HRM 引物序列,由武汉擎科新业生物技术有限公司合成。正向引物:5'-GCT CTC ATT TCG TCG TGT AAA AG-3',反向引物:5'-TGC CCC AAC ACT GCG AG-3'。PCR-HRM 反应体系总体积 10  $\mu$ L,其中 25 mmol/L  $Mg^{2+}$  0.8  $\mu$ L,2 mmol/L dNTPs 0.2  $\mu$ L,10 pmol/uL 正、反向引物各 0.5  $\mu$ L,1 U/ $\mu$ L Taq 酶 1  $\mu$ L,10 $\times$  Buffer 1  $\mu$ L,DNA 模板 1  $\mu$ L,LC 荧光 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L。PCR 反应条件为预变性 95  $^{\circ}$ C,10 min,然后 95  $^{\circ}$ C,20 s,56  $^{\circ}$ C,20 s、72  $^{\circ}$ C,30 s 行 50 次循环,最后进行 72  $^{\circ}$ C,10 min 延伸。

通过 LightScanner32 高分辨率熔解曲线仪扫描得到熔解曲线(LightScanner32 高分辨率熔解曲线仪由武汉大学中南医院科研中心提供)。

**1.2.4 测序验证** 随机选取一部分样本进行 PCR-HRM,从中选取熔解曲线不同的样本行普通 PCR,扩增产物由武汉擎科新业生物技术有限公司测序确定基因型。

**1.3 统计学处理** 用 PLINK 和 SPSS 16.0 软件对数据进行分析。用 Hardy-Weinberg 进行遗传平衡校验,用方差分析对两组基因型和血脂水平进行比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

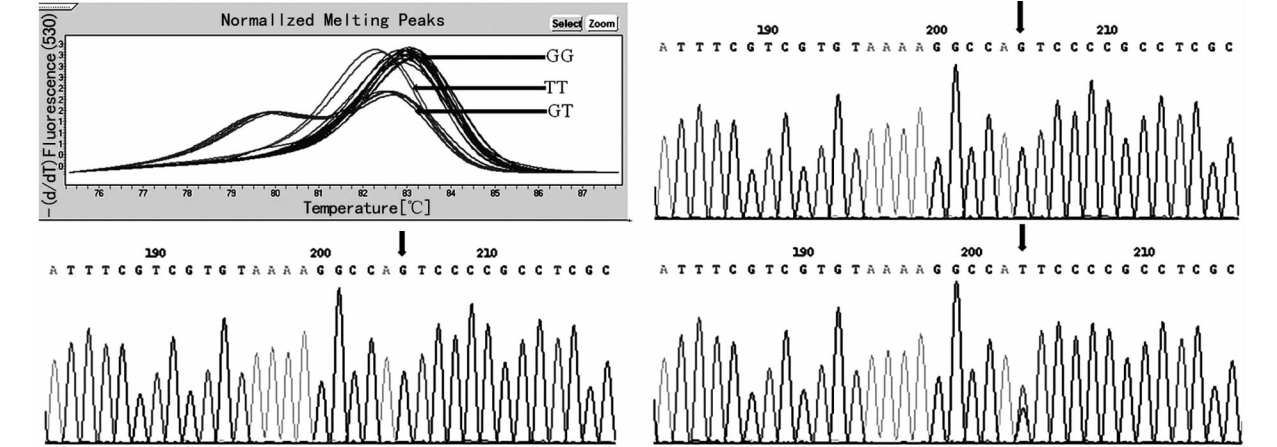
表 1 高脂血症组和健康对照组的一般资料

| 组别    | <i>n</i> | 男/女<br>( <i>n</i> / <i>n</i> ) | 年龄<br>( $\bar{x}\pm s$ ,岁) | TC<br>( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L) | TG<br>( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L) | HDL-C<br>( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L) | LDL-C<br>( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L) |
|-------|----------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 高脂血症组 | 204      | 137/67                         | 45.92 $\pm$ 7.61           | 6.31 $\pm$ 1.13                 | 2.80 $\pm$ 1.41                 | 1.22 $\pm$ 0.31                    | 4.02 $\pm$ 1.14                    |
| 健康对照组 | 187      | 120/67                         | 46.57 $\pm$ 6.82           | 4.26 $\pm$ 0.43                 | 1.03 $\pm$ 0.38                 | 1.30 $\pm$ 0.25                    | 2.51 $\pm$ 0.41                    |

2 结 果

2.1 PCR-HRM 和测序验证结果 不同基因型的样本熔解曲

线见图 1(A),对于不同熔解曲线的样本测序验证的结果见图 1(B、C、D),分别显示的是 GG、GT、TT 基因型。



注:A为3种基因型样本的熔解曲线;B为GG型基因型的测序验证图,黑色箭头指向G等位基因;C为TT型基因型的测序验证图,黑色箭头指向T等位基因;D为GT型基因型的测序验证图,黑色箭头指向GT杂合基因。

图 1 3 种不同基因型样本的扩增熔解曲线与其对应的测序结果图谱

**2.2 高脂血症组和健康对照组各基因型血脂水平的比较** 利用 PLINK 进行 Hardy-Weinberg 检验,高脂血症组  $P=0.83$ ,健康对照组  $P=0.19$ ,表明样本来自一个随机婚配的群体,不存在抽样误差。两组年龄比较  $P=0.534$ ,性别比较  $P=0.372$ ,均差异无统计学意义( $P>0.05$ )。高脂血症组与健康对照组等位基因和基因型的分布差异见表 2。各组的各基因型之间的血脂水平比较见表 3。两组各基因型间,血脂水平之间均差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

| 表 2 高脂血症组与健康对照组等位基因和基因型的比较[ <i>n</i> (%)] |          |           |          |        |                    |
|-------------------------------------------|----------|-----------|----------|--------|--------------------|
| 组别                                        | <i>n</i> | GG        | GT       | TT     | G T                |
| 高脂血症组                                     | 204      | 170(83.3) | 34(16.7) | 0      | 384(91.9) 34(8.1)  |
| 健康对照组                                     | 187      | 145(77.5) | 39(20.9) | 3(1.6) | 329(88.7) 42(11.3) |
| $\chi^2$                                  |          |           | 4.596    |        | 2.293              |
| <i>P</i>                                  |          |           | 0.100    |        | 0.147              |

表 3 高脂血症组与健康对照组各基因型亚组血脂水平的比较( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)

| 组别    | 基因型 | <i>n</i> | TC              | <i>P</i> | TG              | <i>P</i> | HDL-C           | <i>P</i> | LDL-C           | <i>P</i> |
|-------|-----|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| 高脂血症组 | GG  | 167      | 6.25 $\pm$ 1.15 | 0.07     | 2.80 $\pm$ 1.31 | 0.683    | 1.21 $\pm$ 0.32 | 0.994    | 3.98 $\pm$ 1.14 | 0.225    |
|       | GT  | 32       | 6.64 $\pm$ 0.93 |          | 2.91 $\pm$ 1.94 |          | 1.21 $\pm$ 0.23 |          | 4.25 $\pm$ 1.10 |          |
| 健康对照组 | GG  | 145      | 4.25 $\pm$ 0.43 | 0.96     | 1.03 $\pm$ 0.33 | 0.194    | 1.31 $\pm$ 0.27 | 0.337    | 2.48 $\pm$ 0.41 | 0.205    |
|       | GT  | 39       | 4.27 $\pm$ 0.45 |          | 1.07 $\pm$ 0.51 |          | 1.24 $\pm$ 0.18 |          | 2.61 $\pm$ 0.38 |          |
|       | TT  | 3        | 4.30 $\pm$ 0.30 |          | 0.67 $\pm$ 0.05 |          | 1.36 $\pm$ 0.14 |          | 2.48 $\pm$ 0.26 |          |

### 3 讨 论

心脑血管疾病一直是威胁人类健康的重要杀手之一,而心血管疾病的风险因素很多,其中高脂血症是主要的一个危险因素<sup>[7]</sup>。因此通过对血脂的遗传特性研究,有望寻找降低心血管疾病的预防方案。近年来,随着高通量技术的发展,通过 GWAS 已发现多个血脂关联的 SNPs 位点,在欧洲白种人群中的大量研究表明部分与血脂关联的 SNPs 大都与心血管疾病的发生与进展存在关联性<sup>[8]</sup>。在中国人群中也发现部分与血脂关联的 SNPs 与冠心病存在相关性<sup>[9]</sup>。

本文研究的 SNP 位点 rs1122608(G/T)位于 LDLR 附近 SMARCA4 基因的 30 号内含子上,SMARCA4 基因距 LDLR 基因仅 36 kb。该基因也被称为 BRG1(brm/SWI2-related gene 1),位于 19p13.2,包含 36 个外显子,编码 SWI/SNF 核染色质重组复合体的一个主要催化亚单位,参与干细胞更新和分化,诱导谱系特异性基因程序<sup>[10]</sup>。2009 年 Knouff 等<sup>[5]</sup>首先通过 GWAS 发现 rs1122608 与心肌梗死相关。该位点在俄罗斯人群中是心肌梗死的高风险因子,但与汉族人群的心肌梗死相关性不明显<sup>[11]</sup>,且与欧洲白种人 LDL-C 和冠心病关联<sup>[4]</sup>。在伊朗人群的研究文献中也提示 rs1122608 (GT 或 TT)与冠心病的严重程度相关,与多根血管的受累的相关度更高<sup>[12]</sup>。与本课题研究几乎同期的,关于中国汉族人群冠心病 rs1122608 (G/T)的病例-对照研究和 meta 分析报道,显示此位点与汉族人群冠心病发生无明显相关<sup>[13]</sup>,在此研究中讨论了 SNP 与多种心血管疾病的关系。而本研究着重于 SNP 与高血脂尤其是 LDL-C 的关系,本研究发现此位点与 LDL-C 水平之间并无相关性,共同印证了此位点可能具有种族遗传异质性。

在对一些人种的大量研究中发现许多 SNP 位点与血浆中 LDL-C 水平和冠心病均相关。对这些相关 SNP 的研究统计发现使 LDL-C 升高的等位基因仍然会增加使用降脂药物治疗患者患心肌梗死的风险,而对于未使用降脂药物的患者此风险并未增加<sup>[14]</sup>。所以对于有这些等位基因的患者,降脂并不是唯一降低他们患心血管疾病的方法。同时也说明这些位点对于心血管疾病的发生机制可能还涉及与血脂无关的因素。一篇关于中国汉族人群中 rs1122608 基因对于前 mRNA 剪接因子 SFRS3 表达调节的研究发现,其等位基因 T 显示出与总胆固醇水平降低有明显相关性,而它也能上调 SFRS3 编码的一个 mRNA 剪接子的表达水平,但是与 BRG1/SMARCA4 或 LDLR 的表达无明显相关性<sup>[15]</sup>。本文中各等位基因亚群与各血脂指标的关系均未发现明显相关性。一方面可能由于本研究样本例数偏少,而另一方面,该文提出 SFRS3 表达水平的增加可能会降低白细胞介素-1 $\beta$ 的表达和分泌,从而降低动脉粥样硬化和中风的风险。这些表明 rs1122608 基因对于心血管疾病的发生产生的作用可能并非直接影响了血脂相关基因的表达,而是通过上调 SFRS3 间接对其产生影响。

本研究发现在汉族人群中 rs1122608(G/T)与高血脂之间无明显相关性,可能具有种族特异性。

### 参考文献

[1] Lloyd J, Robert JA, Todd MB, et al. Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart As-

sociation[J]. Circulation, 2010, 121(7): 206-215.

- [2] Clarke R, Jonathan R, Sarah P, et al. Cholesterol fractions and apolipoproteins as risk factors for heart disease mortality in older men[J]. Arch Intern Med, 2007, 167(13): 1373-1378.
- [3] Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids[J]. Nature, 2010, 466(7307): 707-713.
- [4] Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia[J]. Nat Genet, 2009, 41(1): 56-65.
- [5] Knouff CW, Waterworth DM, Walker MC, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants[J]. Nat Genet, 2009, 41(3): 334-341.
- [6] 李蕾. rs1122608, rs11206510 和 rs1746048 多态性与汉族人心肌梗死和脑梗死的关联研究[D]. 云南: 云南大学, 2010.
- [7] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 2007 年中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 5(35): 238-240.
- [8] Roberts R, Stewart AF. Genes and coronary artery disease: where are we? [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(18): 1715-1721.
- [9] 周莉. 中国汉族人群血脂水平及冠心病的遗传易感性研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [10] Catia A, Alex SN, Zhu YW, et al. Tissue-specific SMARCA4 binding at active and repressed regulatory elements during embryogenesis[J]. Genome Res, 2014, 24(6): 920-929.
- [11] Wang Y, Wang L, Liu X, et al. Genetic variants associated with myocardial infarction and the risk factors in Chinese population[J]. Plos One, 2014, 279(1): 86332.
- [12] Jamaldini SH, Babanejad M, Mozaffari R, et al. Association of polymorphisms at LDLR locus with coronary artery disease independently from lipid profile [J]. Acta Med Iran, 2014, 52(5): 352-359.
- [13] Zhang L, Fang Y, Liu P, et al. Association between PCSK9 and LDLR gene polymorphisms with coronary heart disease: Case-control study and meta-analysis [J]. Clin Biochem, 2013, 46(9): 727-732.
- [14] Woestijne AP, Graaf Y, Bakker PI, et al. LDL-C-linked SNPs are associated with LDL-C and myocardial infarction despite lipid-lowering therapy in patients with established vascular disease [J]. Eur J Clin Invest, 2014, 44(2): 184-191.
- [15] Xiong X, Xu C, Zhang Y, et al. BRG1 variant rs1122608 on chromosome 19p13.2 confers protection against stroke and regulates expression of pre-mRNA-splicing factor SFRS3[J]. Hum Genet, 2014, 133(5): 499-508.

(收稿日期: 2015-02-28 修回日期: 2015-04-15)