

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 20. 009

miR-27a rs895819(T>C)的基因多态性与广东地区冠心病遗传易感性的关系*

熊卿圆¹,岑锦明²,熊兴东³,曾赤佳¹

1. 广东省佛山市禅城区中心医院检验科,广东佛山 528000;2. 广东省佛山市第一人民医院
心血管内科,广东佛山 528000;3. 广东医科大学衰老研究所,广东东莞 523808

摘 要:目的 探讨 miR-27a rs895819(T>C)的基因多态性与广东地区冠心病遗传易感性的关系,为冠心病的防治提供新思路。**方法** 提取广东地区 563 例冠心病患者与 650 例排除冠心病的对照者血液基因组 DNA,使用聚合酶链反应-连接酶检测反应(PCR-LDR)方法对本标本进行基因分型。采用非条件 Logistic 回归评价该位点基因多态性与冠心病风险的相关性。**结果** TT、CT、CC 基因型在病例组中的分布频率分别为 5.7%、38.0%、56.3%,在对照组中分别为 5.9%、37.3%、56.8%。两组间基因型分布差异无统计学意义($P>0.05$)。携带 miR-27a rs895819 T 等位基因或 C 等位基因与冠心病的遗传易感性无明显相关性($OR=0.94$, $95\%CI=0.72\sim1.27$, $P=0.518$)。**结论** miR-27a rs895819(T>C)的基因多态性与广东地区冠心病遗传易感性无相关性。

关键词:miR-27a; 单核苷酸多态性; 冠心病; 遗传易感性
中图法分类号:R541.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2020)20-2944-04

Relationship between miR-27a rs895819(T>C) gene polymorphism and genetic susceptibility to coronary artery disease in Guangdong area *

XIONG Qingyuan¹,CEN Jinming²,XIONG Xingdong³,ZENG Chijia¹

1. Department of Clinical Laboratory, Cancheng District Central Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China ;
2. Department of Cardiology, Foshan Municipal First People's Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China ;
3. Institute of Aging Research ,Guangdong Medical University ,Dongguan ,Guangdong 523808, China

Abstract:**Objective** To explore the relationship between miR-27a rs895819(T>C) gene polymorphism and genetic susceptibility to coronary heart disease (CHD) in Guangdong area to provide a new idea for the prevention and treatment of CHD. **Methods** Blood genomic DNA in 563 cases of CHD and 650 controls excluding CHD in Guangdong area was extracted and conducted the genotyping by polymerase chain reaction-ligase detection reaction (PCR-LDR). The correlation between the miR-27a rs895819 gene polymorphism and the risk for CHD was evaluated by adopting the unconditional Logistic regression analysis. **Results** The distribution frequencies of TT,CT,and CC genotypes in the CHD case group were 5.7%,38.0% and 56.3% respectively, which in the control group were 5.9%,37.3% and 56.8% respectively, the difference in genotype frequency distribution between the two groups had no statistical significance ($P>0.05$). Carrying the miR-27a rs895819 T allele or C allele had no significant correlation with genetic susceptibility to CHD ($OR=0.94$, $95\%CI=0.72-1.27$, $P=0.518$). **Conclusion** miR-27a rs895819(T>C) gene polymorphism has no correlation with the susceptibility to CHD in the Guangdong area.

Key words:miR-27a; snlge nucleotide polymorphism; coronary heart disease; genetic susceptibility

随着我国人口老龄化趋势的加快以及人们生活、饮食习惯的改变,心血管疾病的发病率和病死率呈逐年上升及年轻化趋势,已成为导致我国成年人住院和死亡的首要原因。而冠心病在广东地区的发病率也呈逐年升高趋势。目前已经证实的引起冠心病的主

要危险因素包括高血压、吸烟、血脂异常、糖尿病、年龄、性别、超重和肥胖等。研究发现,微小核糖核酸(miRNA)的单核苷酸多态性(SNP)会影响成熟 miRNA 的表达,或引起靶基因表达的改变^[1]。有研究表明,miRNA 在动脉粥样硬化斑块形成、心肌梗死后心

* 基金项目:广东省佛山市卫生和计生局医学科研项目(20190166)。
作者简介:熊卿圆,女,主管技师,主要从事细胞衰老分子机制、细胞遗传等研究。

肌细胞坏死及凋亡、缺血性心律失常、心肌梗死后的血管再生及心肌重构、血管内皮细胞损伤与衰老等冠心病的病理生理过程中发挥了重要的作用^[2]。这提示 miRNA 的基因多态性(以下简称多态性)可能与冠心病的遗传易感性密切相关。本研究前期结果(尚未发表)显示,携带 miR-27a rs895819 C 等位基因的个体在冠心病患者中的分布频率为 21.4%,对照组中 rs895819 C 等位基因的分布频率为 27.7%,差异有统计学意义($OR = 1.21, 95\%CI = 1.02 \sim 1.50, P = 0.013$)。另外,没有发现其余 8 个多态性位点与广东地区冠心病的遗传易感性具有相关性。本研究采用聚合酶链反应-连接酶检测反应(PCR-LDR)技术检测 miR-27a rs895819(T>C)多态性位点基因型在广东佛山地区冠心病患者及对照人群中的分布情况,以验证及深入研究其遗传易感性的分子机制,并进一步阐明该多态性位点对冠心病遗传易感性的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究采用病例对照研究方法。随机收集 2016 年 6 月至 2019 年 7 月在广东省佛山市禅城区中心医院治疗,并经冠状动脉造影等检查确诊为冠心病的 563 例患者作为病例组研究对象。冠心病均符合国际心脏病学会及 WHO《缺血性心脏病的命名及诊断标准》中相关诊断标准。收集经心脏核素扫描、冠状动脉 CT 成像或冠状动脉造影等检查排除冠心病的 650 例对照者作为对照组研究对象。所有冠心病患者和对照者均无血缘关系,排除先天性心脏病、充血性心力衰竭、周围血管疾病、风湿性心脏病、肺源性心脏病、慢性肾病、肝病或恶性肿瘤。每例研究对象都记录年龄、性别、吸烟史、血压,以及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、三酰甘油水平等一般资料。在标本采集过程中,所有研究对象在入选时均被告知研究方法及意义,做到知情同意。本研究得到了广东省佛山市禅城区中心医院医学伦理委员会的批准。

1.2 仪器与试剂 TIANamp 血液基因组 DNA 提取试剂盒(TianGen), Thermo Nano Drop2000 DNA 检测仪, Mastercycler[®] ep PCR 仪, ABI PRISM 3730 DNA 测序电泳仪(ABI)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 抽提 每例研究对象取静脉血 2 mL, EDTA-K₂ 抗凝,按照 TIANamp 血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取外周血基因组 DNA,紫外分光光度计检测水平为 40 ng/ μ L 以上, A_{260}/A_{280} 为 1.7~1.9 方可进行后续试验。标本于 -80℃ 保存备用。

1.3.2 基因分型 采用 PCR-LDR 方法对 miR-27a

rs895819(T>C)进行基因分型。采用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物。PCR 反应的上游引物为 5'-GCA AGG CCA GAG GAG GTG AG-3',下游引物为 5'-GTG CCT GGC CTG AGG AGC AG-3'。探针序列: rs895819-modify 探针为 P-CCA AGT CGT GTT CAC AGT GGT TTT TTT TTT TTT TTT TT-FAM; rs895819-T 探针为 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGC TGC TTG TGA GCA GGG TCC ACA-3'; rs895819-C 探针为 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT GCT GCT TGT GAG CAG GGT CCA CG-3'。采用 20 μ L 多重 PCR 反应体系,反应程序: 95℃ 预变性 15 min, 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 90 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 次循环,最后 72℃ 延伸 7 min。3% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察 PCR 产物,确定其作为模板在连接酶检测反应(LDR)中加入的量,扩增目标片段长度为 110 bp。LDR 反应体系为 10 μ L, 95℃ 2 min 预变性, 94℃ 变性 15 s, 50℃ 反应 25 s, 共 40 次循环。产物经 ABI 3730 测序仪测序,结果运用 Gene Mapper 4.0 软件进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据处理和分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用拟合优度的 χ^2 检验(goodness-of-fit χ^2 检验)判断各多态性位点的基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,采用 Pearson's χ^2 检验比较冠心病患者与对照者的基因型分布差异;应用非条件 Logistic 回归分析各多态性位点基因型与冠心病的相关性,关联程度用比值比(OR)及 95%CI 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

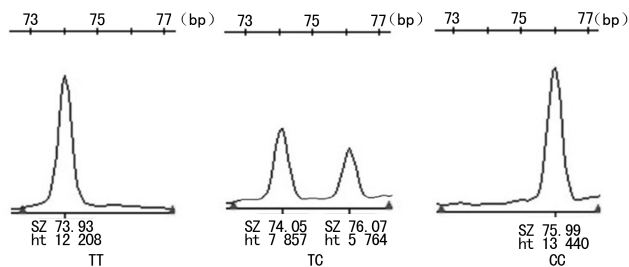
2.1 病例组和对照组的一般资料对比 两组之间年龄、性别、总胆固醇水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其他变量的均数或分布在两组间均差异有统计学意义($P < 0.05$)。冠心病患者高血压、高脂血症和糖尿病患病率较高,三酰甘油和 LDL-C 水平较高, HDL-C 水平较低。见表 1。

2.2 miR-27a rs895819 (T>C) 基因型的分布及 Hardy-Weinberg 平衡检验 外周血 DNA PCR 扩增,随机取 3 份标本及空白对照进行电泳,提示 PCR 成功。miR-27a rs895819(T>C)多态性位点的电泳测序分型结果见图 1。病例组和对照组中等位基因和基因型分布见表 2。miR-27a rs895819(T>C)多态性的基因型分布频率在对照组中分别为 56.8%(CC)、37.3%(CT)和 5.9%(TT)。Goodness-of-fit χ^2 检验表明该多态性位点在对照人群中具有群体代表性,观察到的基因型分布没有偏离 Hardy-Weinberg 平衡

($P>0.05$)。

表 1 病例组和对照组的一般资料对比

项目	病例组 ($n=563$)	对照组 ($n=650$)	P
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	63.69 $\pm$ 11.98	62.94 $\pm$ 12.28	0.601
男性[$n(\%)$]	393(69.8)	423(65.1)	0.653
吸烟[$n(\%)$]	314(55.8)	165(25.4)	<0.001
饮酒[$n(\%)$]	142(25.2)	92(14.2)	<0.001
高血压[$n(\%)$]	367(65.3)	228(35.1)	<0.001
糖尿病[$n(\%)$]	272(48.3)	106(16.3)	<0.001
高脂血症[$n(\%)$]	409(72.6)	239(36.8)	<0.001
收缩压($\bar{x}\pm s$,mm Hg)	141.70 $\pm$ 18.36	132.20 $\pm$ 18.73	<0.001
舒张压($\bar{x}\pm s$,mm Hg)	76.38 $\pm$ 10.51	72.73 $\pm$ 10.39	<0.001
空腹血糖($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	6.69 $\pm$ 1.66	5.80 $\pm$ 1.91	<0.001
三酰甘油($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	2.08 $\pm$ 0.99	1.48 $\pm$ 0.80	<0.001
总胆固醇($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	4.69 $\pm$ 1.25	4.62 $\pm$ 1.14	0.305
HDL-C($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	1.18 $\pm$ 0.37	1.38 $\pm$ 0.67	<0.001
LDL-C($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	3.03 $\pm$ 0.93	2.63 $\pm$ 0.92	<0.001



注:该图为 LDR 测序结果,为非连续的常规坐标图;TC 基因型为双峰;TT、CC 基因型为单峰;73~77 bp 代表该基因在所测序的整条序列上的相对位置;曲线代表检测到的信号;SZ 即确切的相对位置值;ht 为检测到的信号强度。

图 1 miR-27a rs895819 多态性 LDR 电泳测序分型结果

表 2 miR-27a 多态性等位基因和基因型在两组中的分布[$n(\%)$]

基因型	病例组 ($n=563$)	对照组 ($n=650$)	OR(95%CI) ^a	P^a
等位基因				
C	848(75.3)	987(75.9)	1.00(1.00~1.00)	—
T	278(24.7)	313(24.1)	0.94(0.72~1.27)	0.518
基因型				
TT	32(5.7)	38(5.9)	1.00(1.00~1.00)	—
CT	214(38.0)	243(37.3)	1.29(0.58~2.76)	0.516
CC	317(56.3)	369(56.8)	1.28(0.57~2.60)	0.569
CT+TT	246(43.7)	281(43.2)	1.03(0.72~1.42)	0.867
CC+CT	531(94.3)	612(94.2)	1.53(0.58~2.61)	0.385

注:a 为非条件 Logistic 回归分析,并对年龄、性别等因素进行校正;每组等位基因 C+T=本组例数 $\times$ 2;基因型中 TT 例数+CT 例数+TT 例数=本组总例数;CT+TT、CC+CT 用于评估 C 等位基因或 T 等位基因对冠心病的影响;—表示无数据。

2.3 miR-27a rs895819 多态性与冠心病遗传易感性的关系 对可能的混杂因素(年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病、高脂血症)进行校正后,miR-27a rs895819 TT、CT、CC 基因型在病例组中的分布频率分别为 5.7%、38.0%、56.3%,对照组分别为 5.9%、37.3%、56.8%,两组基因型分布差异无统计学意义($\chi^2=4.212,P=0.578$)。非条件 Logistic 回归发现,以 TT 基因型作为参照,CT 和 CC 基因型均与冠心病无相关性(OR 值分别为 1.29、1.28,95%CI 分别为 0.58~2.76 和 0.57~2.60)。等位基因分析结果也显示,携带 miR-27a rs895819 C 等位基因与冠心病的遗传易感性无明显相关性(OR = 0.94,95%CI = 0.72~1.27, $P=0.518$)。

3 讨论

miR-27a 是从 hela 细胞中克隆得到的,pre-miR-27a 的常见多态性位点 rs895819 已被报道与 2 型糖尿病(T2DM)^[3]和多种癌症的风险显著相关^[4]。最初的研究可以追溯到 YANG 等^[5]报道 rs895819 的变异可能抑制 miR-27a 的成熟,从而与家族性乳腺癌风险相关。

脂质代谢障碍是冠心病的常见危险因素。miR-27a 不仅为致癌 miRNA,还通过改变许多脂质代谢相关基因的表达来调控脂质代谢,如抑制胆固醇调节元件结合蛋白 1、胆固醇调节元件结合蛋白 2、过氧化物酶体增殖剂激活受体 α 、过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ 、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 E 等基因的表达^[6]。最近对脂质代谢中 miRNA 的研究也表明,miR-27a 是胆固醇生物合成的关键调控因子^[7],它还能通过靶向调节白细胞介素-10(IL-10)相关通路,保护心肌细胞在缺氧/再灌注损伤过程中不被线粒体介导的凋亡所影响。

此外,miR-27a 在内皮细胞功能障碍过程中发挥着独特的作用,可能导致动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗死等心血管疾病的发生^[8]。URBICH 等^[9]证明,miR-27a 通过靶向调节信号素 6A(SEMA6A)促进血管生成,诱导邻近内皮细胞发生排斥反应。此外,miR-27a 已被证明与肾素-血管紧张素系统(RAS)相关,并通过靶向调节人类血管紧张素转换酶(ACE)基因影响高血压患者的心血管稳态和抗动脉粥样硬化机制。这些研究表明,miR-27a 在不同的状态下具有多种功能,可能参与心血管疾病的发生、发展。

有研究表明,miR-27a rs895819 的 SNP 与多种癌症相关^[10],而 miR-27a 前体 rs895819(G>A)在我国汉族人群中与冠心病的遗传易感性存在相关性^[11]。本研究评估了 miR-27a rs895819 多态性中的另一多态性位点 T>C 对冠心病的影响,前期试验提示该多

态性位点的 C 等位基因可能为预防冠心病的保护基因。本研究结果提示 miR-27a rs895819(T>C)多态性与广东佛山地区人群的冠心病发生没有关联性。可能该结果需要更大的样本量来验证其与遗传易感性的关系,且 miR-27a 及其靶点调控心肌梗死发生和发展的机制尚不清楚,在对 miR-27a rs895819 多态性和冠心病之间的联系进行功能评估之前,可能还需要进行更多的研究。

参考文献

- [1] FICHTLSCHERER S, ROSA S D, FOX H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. *Cir Res*, 2010, 107(5): 677-684.
- [2] ZHANG Q W, KANDIC I, KUTRYK M J. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(1): 42-46.
- [3] WANG T T, CHEN Y J, SUN L L, et al. Affection of single-nucleotide polymorphisms in miR-27a, miR-124a, and miR-146a on susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Chinese Han people[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(4): 533-539.
- [4] SHANKARAN Z S, WALTER C E J, PRAKASH N, et al. Investigating the role of microRNA-27a gene polymorphisms and its interactive effect with risk factors in gastrointestinal cancers[J]. *Heliyon*, 2020, 6(3): e03565.
- [5] YANG R, SCHLEHE B, HEMMINKI K, et al. A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a

- reduced familial breast cancer risk[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 121(3): 693-702.
- [6] SHIRASAKI T, HONDA M, SHIMAKAMI T, et al. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells[J]. *J Virol*, 2013, 87(9): 5270-5286.
- [7] KHAN A A, AGARWAL H, REDDY S S, et al. MicroRNA-27a is a key modulator of cholesterol biosynthesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(9): e00470-e00519.
- [8] CHISTIYAKOV D A, OREKHOV A N, BOBRYSHV Y V. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 47-55.
- [9] URBICH C, KALUZA D, FRÖMEL T, et al. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A[J]. *Blood*, 2012, 119(6): 1607-1616.
- [10] DAI J, CHEN Y T, GONG Y, et al. Association of microRNA-27a rs895819 polymorphism with the risk of cancer: an updated Meta-analysis[J]. *Gene*, 2020, 728: 144185.
- [11] CAI M Y, CHENG J, ZHOU M Y, et al. The association between pre-miR-27a rs895819 polymorphism and myocardial infarction risk in a Chinese Han population[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 7.

(收稿日期: 2019-11-10 修回日期: 2020-05-02)

(上接第 2943 页)

- for stage IV lung adenocarcinoma with and without EGFR-sensitizing mutations[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 574-580.
- [3] MILLER I, MIN M, YANG C, et al. Ki67 is a Graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1105-1112.
- [4] MOSES M A, GEORGE A L, SAKAKIBARA N, et al. Molecular mechanisms of p63-mediated squamous cancer pathogenesis[J]. *Int J Molec Sci*, 2019, 20(14): 3590.
- [5] ZHANG C, SCHMIDT L A, HATANAKA K, et al. Evaluation of napsin A, TTF-1, p63, p40, and CK5/6 immunohistochemical stains in pulmonary neuroendocrine tumors[J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 142(3): 320-324.
- [6] CHEN C, SHEN D, LI J, et al. TTF-1 and EGFR expression are related to EGFR mutation in lung adenocarcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(9): 4650.
- [7] 汪潜云, 严煜. 甲状腺转录因子-1 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(4): 482.
- [8] KUCUKMETIN N T, CICEK B, SARUC M, et al. Ki67 as a prognostic factor for long-term outcome following

- surgery in gastrointestinal stromal tumors[J]. *Euro J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 27(11): 1276-1280.
- [9] MA Y L, PENG J Y, ZHANG P, et al. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer[J]. *Med Oncol*, 2010, 27(2): 304-309.
- [10] 纪勇, 张梓威, 陈静瑜, 等. 非小细胞肺癌组织中 PTEN 基因与 Ki67 蛋白的表达及其意义[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2013, 32(2): 141-145.
- [11] KRIEGSMANN K, CREMER M, ZGORZELSKI C, et al. Agreement of CK5/6, p40, and p63 immunoreactivity in non-small cell lung cancer[J]. *Pathology*, 2019, 51(3): 240-245.
- [12] GURGUS D, GRIGORAS M L, MOTOC A G M, et al. Clinical relevance and accuracy of p63 and TTF-1 for better approach of small cell lung carcinoma versus poorly differentiated nonkeratinizing squamous cell carcinoma[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2019, 60(1): 139-143.

(收稿日期: 2019-12-14 修回日期: 2020-05-02)