

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000780

MEF2A 基因单核苷酸多态性与冠心病相关性研究

雷家俨¹, 黄 玮², 柳 青³, 丁艳辉³, 冯 瑞²

(重庆医科大学附属第一医院 1. 人事处; 2. 心血管内科; 3. 临床研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 MEF2A 基因单核苷酸多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary artery disease, CAD)的相关性研究。**方法:**用聚合酶链反应结合核苷酸测序技术分析 90 例经冠脉造影检查确诊的 CAD 患者及 130 例健康体检正常对照者的 MEF2A 基因 rs325400 和 rs34851361 SNP 多态性位点基因型的分布情况, 比较组间基因型、等位基因频率的分布差异及其与 CAD 发生的关系。**结果:**rs325400 多态性位点的基因型和等位基因频率分布在 CAD 组和对照组比较有统计学差异($P<0.05$), 符合 Hard-Wenber 平衡, 其结果具有群体代表性。多态性位点 rs34851361 在两组均只发现 AA 基因型, 不符合 Hard-Wenber 平衡, 其结果不具备群体代表性。**结论:**MEF2A 基因单核苷酸多态性 rs325400 可能与 CAD 发生有关系, 携带 A 等位基因的人群患 CAD 的风险性可能较正常人高。

【关键词】冠状动脉粥样硬化性心脏病; 单核苷酸多态性; MEF2A 基因

【中图分类号】R543.3¹

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-02-18

Association of the single nucleotide polymorphisms of MEF2A with coronary artery disease in Chinese Han population

Lei Jiayan¹, Huang Wei², Liu Qing³, Ding Yanhui³, Feng Rui²

(1. Department of Human Resources; 2. Department of Cardiology; 3. Department of Clinical Research Center, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the association of single nucleotide polymorphism(SNP rs325400 and rs34851361) of MEF2A gene on chromosome 15q26 with coronary artery disease(CAD). **Methods:** A case-control association study of 90 unrelated CAD patients and 130 normal controls from a Chinese Han population was performed. Genotype and allele were determined by polymerase chain reaction(PCR) and nucleotide sequencing for SNP rs325400 and rs34851361 in MEF2A gene. **Results:** The frequencies of the genotype and alleles of rs325400 in MEF2A had statistical significance between two groups($P<0.05$), but there was only the AA in both groups of rs34851361. **Conclusion:** The present findings suggest that the genetic polymorphism in rs325400 may be associated with the development of the CAD in Chinese Han population and the attack rate of the CAD in the crowd with allele A may be higher.

【Key words】coronary artery disease; single nucleotide polymorphism; MEF2A gene

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary artery disease, CAD, 简称冠心病)是一种受环境因素和遗传因素综合作用影响所产生的复杂性疾病, 是威胁人类健康导致人类死亡的重大疾病之一^[1]。由于我国社会经济的发展和生活水平的提高, 冠心病的发

病率与死亡率呈不断上升趋势, 严重威胁人民生命健康安全。由于目前对该疾病的分子发生机理尚不完全清楚, 因此, 从分子水平研究冠心病的易感基因对理解其病因和发生机制具有重要的理论和实际意义。

近年来, 国内外学者研究发现, 位于第 15 号染色体 15q26 的 MEF2A 基因与骨骼肌细胞和血管内皮细胞的发育和结构形成密切相关^[2]。MEF2A 基因, 系肌细胞增强因子 2 (myocyte specific-enhancer

作者介绍: 雷家俨, Email: 360401001@qq.com,

研究方向: 冠心病的分子发病机制研究。

通信作者: 黄 玮, Email: weihuangcq@gmail.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151012.1543.002.html>
(2015-10-12)

factor 2, MEF 2) 基因家族成员, 其转录产物 MEF2A 蛋白是一类 DNA 结合蛋白, 能够通过与基因启动子中特定序列结合而调节基因的表达, 转录因子 MEF2A 在血管平滑肌细胞的增殖以及内皮细胞的发育、功能和结构的维持中起着非常重要的调控作用^[2]。

2014 年 8 月, Foroughmand 等^[3]以阿拉伯人群为研究对象探讨了 MEF2A SNPrs325400 和 rs34851361 与冠状动脉粥样硬化性心脏病发生的相关性, 并提出 SNPrs325400 与冠状动脉粥样硬化性心脏病的发生相关。Ali 的发现尚属首次, 仍需经过不同种族, 不同人群的研究进行验证。目前国内尚未见 MEF2A 基因 2 个 SNP 位点 (rs325400 和 rs34851361) 与汉族人群 CAD 发生相关的研究报道。本研究以西南地区汉族人群为研究对象, 通过病例-对照研究, 探讨 MEF2A 基因突变是否与 CAD 发生有关系。

1 对象与方法

1.1 对象

所有受试者均来自重庆医科大学附属第一医院, 且遵循知情同意原则。(1)CAD 组: 90 例, 男性 66 例, 女性 24 例, 年龄 29~85 岁, 平均年龄 (65.51 ± 10.77) 岁, 均为经冠状动脉造影检查确诊的 CAD 患者, 来自中国西南地区汉族人群, 无血缘关系。(2)对照组: 130 例, 男性 81 例, 女性 49 例, 年龄 25~76 岁, 平均年龄 (49.59 ± 12.28) 岁, 均来自中国西南地区汉族人群, 无血缘关系, 为正常健康体检人群。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 EDTA 抗凝肘静脉血 5 ml, 利用饱和盐析法制备外周血白细胞 DNA, 微量分光光度计测定 DNA 浓度, -80 °C 保存。

1.2.2 PCR 扩增 MEF2A 多态性位点所在区域 使用软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物 (F: AACATCAGCATCAA-GTCCG R: TATGTAGGGCAGGTCAGTGC), 利用 NCBI (美国生物信息中心) 的 Blast 功能校验其扩增特异性后统一交上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应体系: 2 × Es Taq MasterMix (北京康为世纪公司) 25 μl, DNA template 4/10 μl, 引物 5 μl (10 μmol/L), 加水至 50 μl。反应体系上层用 2 μl 石蜡油封闭后放入 ABI PCR 仪中进行扩增反应 (95 °C 2 min, 1 个循环; 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min, 1 个循环)。反应结束后, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 (130 V 30 min), 用 goldview 染色, 凝胶成像系统观察 PCR 产物扩增特异性 (图 1)。

1.2.3 测序 (sequencing) 将达到测序浓度要求的 PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司测序 (图 2)。

1.2.4 酶切 从不同的基因型分组中随机选出 PCR 样本用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Mfe* I 进行酶切, 以印证测序结果分析的可靠性 (图 3)。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件处理数据, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料用率表示。针对 SNP 的基因型分布做 Hardy-Weinberg 平衡检验, 估计样本的群体代表性, 要求 $P > 0.05$ 。用基因计数法计算各组基因型和等位基因频率, 各组基因型和等位基因频率之间比较用卡方检验, 计量资料用两独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 CAD 组与对照组的一般特征比较

见表 1, 2 组的性别和 BMI 资料基本匹配, 传统 CAD 危险因素如年龄、吸烟、高血压、糖尿病及 TC 水平在 2 组构成上有统计学差异。

2.2 CAD 组和对照组 2 个 SNP 位点基因型检测结果

MEF2A rs325400 (A/G) 检测到 AA/AG/GG 3 种基因型,

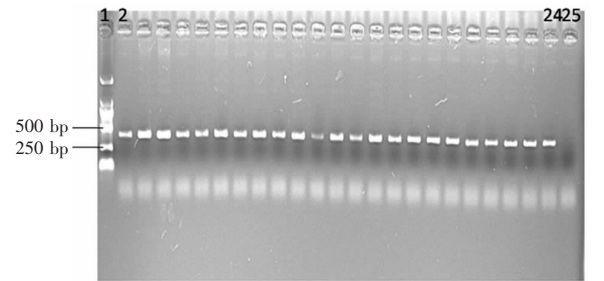
表 1 CAD 组与对照组的临床特征

Tab.1 Clinical characteristics of CAD group and control group

指标	CAD 组	对照组	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别 (男/女)	66/24	81/49	2.916	0.088
年龄 (岁)	65.58 ± 10.56	51.28 ± 11.97	5.621	0.000
BMI (kg/m ²)	24.15 ± 3.41	25.28 ± 6.77	1.755	0.233
吸烟 (%)	31.1	20.8	19.458	0.000
高血压 (%)	42.2	16.9	37.600	0.000
糖尿病 (%)	12.2	6.2	11.037	0.000
TC (mmol/L)	3.94 ± 1.73	4.84 ± 0.91	7.976	0.000
TG (mmol/L)	1.84 ± 0.78	1.89 ± 1.94	3.371	0.851
HDL (mmol/L)	1.11 ± 0.48	1.30 ± 0.37	0.106	0.017
LDL (mmol/L)	2.42 ± 1.07	2.51 ± 0.66	3.683	0.603

其中 CAD 组 AA 型 21 例,AG 型 38 例,GG 型 31 例;对照组 AA 型 14 例,AG 型 53 例,GG 型 63 例。CAD 组和对照组人群经过 Hardy-Weinberg 平衡定律检验, $P>0.05$,说明群体基因遗传平衡,即可认定研究对象来源于同一群体,具备群体代表性。PCR 产物结果见图 1、测序结果见图 2 及酶切验证见图 3。

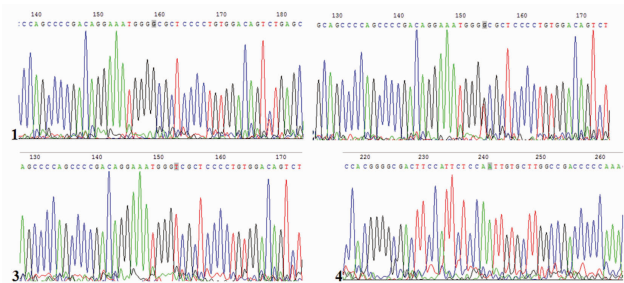
MEF2A rs34851361 (A/G) 在 CAD 组和对照组均仅检测到 AA 基因型,不符合 Hardy-Weinberg 平衡, $P<0.05$,即该位点的检测结果不具有群体代表性。PCR 产物结果见图 1、测序结果见图 2 及酶切验证见图 3。



注:1, DNA marker; 2~24. MEF2A PCR 产物(385 bp); 25. Negative

图 1 MEF2A PCR 产物图

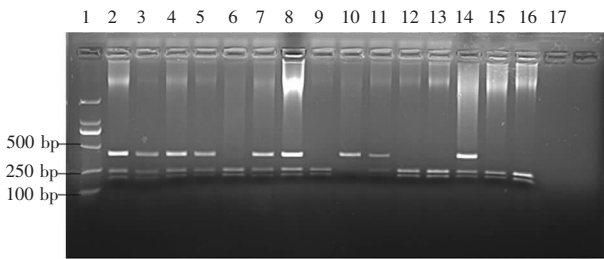
Fig.1 Products of MEF2A PCR



注:1. MEF2A rs325400-GG; 2. MEF2A rs325400-AG;
3. MEF2A rs325400-AA; 4. MEF2A rs34851361-AA

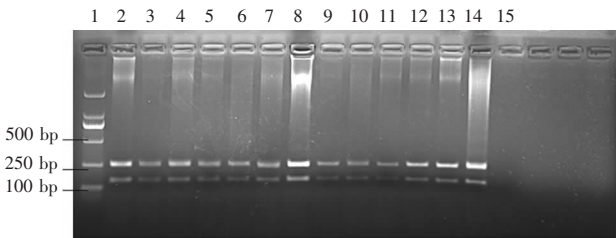
图 2 MEF2A PCR 产物 385 bp 片段测序图

Fig.2 Sequence of 385 bp of MEF2A PCR products



注:1, DNA Marker; 6、9、12、13、15、16: MEF2A rs325400-GG;
2~5、7、8、11、14: MEF2A rs325400-AG; 10: MEF2A rs325400-AA;
17: Negative

A. *Hha* I 酶切图



注:1, DNA Marker; 2~14: MEF2A rs34851361-AA; 15: Negative

B. *Mfe* I 酶切图

图 3 MEF2A PCR 产物 385 bp 片段 *Hha* I 和 *Mfe* I 酶切图

Fig.3 *Hha* I and *Mfe* I enzyme of 385 bp of MEF2A PCR products

2.3 CAD 组与对照组基因多态性比较

本研究数据显示(表 2), CAD 组与对照组 MEF2A rs325400 位点 GG 基因型频率分别为 34.4%、48.5%, AG 基因型频率分别为 42.2%、40.8%, AA 基因型频率分别为 23.3%、10.8%, 组间差异有统计学意义($\chi^2=7.750, P=0.021$); MEF2A rs325400 等位基因 G 为野生型, G 等位基因频率在 CAD 组与对照组分别为 55.6%、68.8%, A 为突变型, A 等位基因频率在 CAD 组与对照组分别为 44.4%、31.2%, 组间差异有统计学意义($\chi^2=8.098, P=0.004$)。

表 2 CAD 组与对照组基因多态性分布情况

Tab.2 Gene polymorphism distribution between CAD group and control group

		组别		χ^2 值	P 值
		CAD 组(90)	对照组(130)		
rs325400	基因型	AA	21	14	7.750 0.021
		AG	38	53	
		GG	31	63	
	等位	A	80	81	8.098 0.004
	基因	G	100	179	

3 讨 论

肌细胞增强因子 2(myocyte enhancer factor 2, MEF2) 属于转录调节因子 MADS-Box 家族, 是一种特定的转录因子。在脊椎动物中, MEF2 基因家族由 4 个基因组成, 包括 MEF2A、MEF2B、MEF2C 和 MEF2D, 它们在肌肉生成、神经系统发育和分化、肝纤维化方面均有着非常重要的作用^[4-6]。MEF2A 基因位于 15q26, 全长约 150 kb, 包含 11 个外显子和 10 个内含子。该基因编码的 MEF2 蛋白由 499 个氨基酸组成, 是一种 DNA 结合蛋白, 主要与基因启动子中特异序列结合, 从而调节基因的表达, 属于一种

转录调控因子。

2003年美国克利夫兰大学心血管遗传中心主任王擎博士^[2]首次发现 MEF2A 基因与冠状动脉粥样硬化性心脏病的关系。他们通过对一个冠心病的家系(13 个 CAD 患者中有 9 例发展为心肌梗死 MI)的研究中发现了 MEF2A 基因与冠心病发生的关系,首次揭示了独立于脂质代谢紊乱的 CAD 致病基因,这对于心血管病学的发展和 CAD 病人的诊断和治疗将具有非常深远的意义^[7]。

近年研究发现,MEF2A 基因的突变、缺失和表达异常与冠心病的发生密切相关^[8-9]。MEF2A 基因突变会导致其编码蛋白的构象改变,进而影响 MEF2A 蛋白的核内定位,降低其介导的转录酶活性,导致血管内皮细胞发育不良,从而引起单核细胞浸润到内皮细胞和暴露内皮下基质,成为动脉粥样斑块和血栓形成的根源^[1]。除外血管内皮损伤、脂质沉积炎症反应^[10-11]、单核-巨噬细胞泡沫化^[12],血管平滑肌细胞在 CAD 发生和发展过程中也起着非常重要的作用,而 MEF2A 的突变会导致血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力增强^[13]。

2014 年 8 月, Ali Mohammad Foroughmand 等^[6]以阿拉伯人群为研究对象探讨了 MEF2A SNPrs325400 和 rs34851361 与冠状动脉粥样硬化性心脏病发生的相关性,并提出 SNPrs325400 与冠状动脉粥样硬化性心脏病的发生密切相关。本研究以西南地区汉族人群为研究对象,通过病例-对照研究,探讨 MEF2A 基因的 2 个 SNP 位点(rs325400 和 rs34851361)与 CAD 发生的关系。研究发现,MEF2A 基因 SNP 位点 rs325400AA 基因型与 CAD 的发生密切相关。而 rs34851361 位点的全部为 AA 基因型,与 CAD 的发生无关系。本研究结果与 Ali 的研究结果高度一致,说明 MEF2A 基因与汉族人群 CAD 发生密切相关。但 MEF2A 基因 SNPrs325400 G-A 的突变是否引起了 MEF2A 编码的蛋白质结构或构象的改变,最终导致其功能改变还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. *Plos Med*, 2006, 3(11): 2011-2029.
- [2] Wang L, Fan C, Topol SE, et al. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with the feature of coronary artery disease[J]. *Science*, 2003, 302(5650): 1578-1581.
- [3] Foroughmand AM, Shahbazi Z, Galehdari H, et al. Association of MEF2A Gene Polymorphisms with coronary artery disease[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2014, 16(8): e13533.
- [4] Xu J, Gong N L, Bodi I, et al. Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(14): 9152-9162.
- [5] Petrik D, Jiang Y, Birnbaum SG, et al. Functional and mechanistic exploration of an adult neurogenesis-promoting small molecule[J]. *FASEB J*, 2012, 26(8): 3148-3162.
- [6] Bai X, Wu L, Liang T, et al. Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(1): 83-91.
- [7] Wang Q. Molecular genetics of coronary artery disease[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20(3): 182-188.
- [8] Elhawari S, Al-Boudari O, Muiya P, et al. A study of the role of the myocyte-specific enhancer factor-2A gene in coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2010(209): 152-154.
- [9] Li J, Chen HX, Yang JG, et al. MEF2A gene mutations and susceptibility to coronary artery disease in the Chinese population[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(4): 8396-8402.
- [10] Cho E, Kim M, Ko YS, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of cardiorenal syndrome in a rat myocardial infarction[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(1): 2766-2778.
- [11] Jialal L, Remaley AT. Measurement of low-density lipoprotein cholesterol in assessment and management of cardiovascular disease risk[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96(1): 20-22.
- [12] Liu H, Liu Q, Lei H. Inflammatory stress promotes lipid accumulation in the aorta and liver of SR-A/CD36 double knock-out mice[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2010, 3(6): 1053-1058.
- [13] 赵旺, 赵水平, 吴鹏翠, 等. MEF2A 基因突变对血管平滑肌细胞增殖迁移及其表型的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(6): 1034-1038.

(责任编辑:冉明会)