

• 临床检验研究论著 •

FADS 基因簇 SNP 与冠心病的易感性研究*

林 堃,黎四维,马 培,周 新[△]

(武汉大学中南医院基因诊断中心,湖北武汉 430071)

摘要:目的 评价 FADS 基因簇单核苷酸多态性与冠心病的相关性,寻找冠心病易感等位基因。方法 在冠心病组(375 例)和对照组(389 例)中,建立应用 HRM 技术对 FADS 基因簇 5 个 SNP 位点——rs174537、rs174611、rs174616、rs174450、rs174460 的基因分型方法并进行等位基因频率分析,对所有 SNP 位点进行连锁不平衡分析。结果 冠心病组和对照组相比,位点 rs174537、rs174460 和 rs174611 的基因型分布差异有统计学意义($P < 0.05$),首次发现 rs174460 的 C 等位与增高的冠心病患病风险相关,CC 型携带者罹患冠心病风险较未携带者增高 1.64 倍 [$P < 0.01, OR = 1.64, 95\% CI = (1.29 \sim 2.08)$],两组间位点 rs174616 和 rs174450 基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 基于 HRM 技术的基因分型方法快速准确;FADS 基因簇 SNP 位点 rs174537、rs174460 以及 rs174611 与冠心病易感风险密切相关。

关键词:冠心病; 脂肪酸去饱和酶类; 多态性,单核苷酸; 高分辨率熔解

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2664-03

Association between FADS gene cluster polymorphisms and the risk of CAD*

Lin Kun, Li Siwei, Ma Pei, Zhou Xin[△]

(Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: Objective To evaluate the relationship between FADS gene polymorphisms and the occurrence of coronary artery disease, looking for susceptibility alleles in CAD patients. Methods Establish SNP genotyping based on high resolution melting (HRM) platform for SNPs located in FADS gene cluster—rs174537, rs174611, rs174616, rs174450 and rs174460, in both CAD group (375 cases) and control group (389 cases). Analyze the genotypes and allele frequency, and then perform linkage disequilibrium analysis for all SNP loci. Results Remarkable differences were observed in rs174537, rs174460 and rs174611 genotype distribution between CAD group and control group ($P < 0.05$). We firstly reported that the rs174460 C allele is associated with a higher risk of CAD [$P < 0.01, OR = 1.64, 95\% CI = (1.29 \sim 2.08)$]. Neither the difference of genotype distribution nor that of allele frequency was found in the other two loci ($P > 0.05$). Conclusion HRM platform can perform genotyping with high sensitivity and accuracy. Rs174537, rs174460 and rs174611 polymorphisms are associated with the risk of CAD, and they are susceptibility loci for CAD.

Key words: coronary disease; fatty acid desaturases; polymorphism, single nucleotide; high resolution melt

冠心病是一种复杂疾病,是多基因和环境相互作用的结果。在冠心病的众多危险因素中,遗传背景是最重要的因素之一,但造成冠心病遗传特征的具体机制还不清楚。人类基因组有 99% 是相似的,剩下 1% 的差异是造成个体多样性的原因,这 1% 的差异主要来自于单核苷酸多态性(SNP)。脂肪酸去饱和酶基因簇(FADS Gene Cluster)位于 11 号染色体(11q12-13.1)上,该基因簇的 FADS1 基因和 FADS2 基因分别编码 Δ -5 脂肪酸去饱和酶(D5D)和 Δ -6 脂肪酸去饱和酶(D6D),该基因簇还包括编码未知功能蛋白的 FADS3 基因。D5D 和 D6D 去饱和酶是参与多不饱和脂肪酸(PUFAs)代谢的关键酶。近年有研究证实 PUFAs 水平改变与许多复杂疾病或慢性病相关,例如冠心病、糖尿病、代谢综合征、免疫系统疾病等等^[1-3]。有研究报道饱和脂肪酸可能可以促进冠心病发生,而不饱和脂肪酸可降低这种风险^[4]。已有研究报道 FADS 基因 SNP 与血浆 PUFAs 水平改变有关^[5-6]。可见去饱和酶活性异常可能与心血管病密切相关,本研究旨在探索中国汉族人群中冠心病患者的 FADS 基因簇 SNP 情况,为识别冠心病易感人群以及早期诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组研究对象来自武汉大学中南医院经冠

脉造影明确诊断的冠心病患者,随机抽样选取 375 例,其中,男性 197 例,女性 178 例;平均年龄(58.92 ± 6.09)岁,研究对象间无亲属关系。正常对照组来自武汉大学中南医院同期健康体检人员 389 例,其中,男性 212 例,女性 177 例;平均年龄(58.16 ± 6.19)岁,无冠心病家族史,血糖血脂等生化指标正常。本研究经武汉大学中南医院伦理委员会审核批准,本人知情。采集外周静脉血,EDTA 抗凝。

1.2 方法

1.2.1 SNP 位点选择 SNP 位点挑选准则:遵循最小等位基因频率 $MAF > 0.1$, tagSNP 的 $r^2 > 0.8$ 。从 HapMap 数据库 FADS1-FADS3 基因簇中挑选了 5 个 SNP 位点。其中 rs174537 来自区段一,rs174450 来自区段二,rs174460 来自区段三,rs174611 和 rs174616 位于区段一和二之间。SNP 位点具体信息见表 1。

1.2.2 DNA 提取 NaI 法提取新鲜 EDTA 抗凝血基因组 DNA,经 Nanodrop2000c 测定 A260、A280,计算浓度和纯度,置 -20 °C 冻存备用。

1.2.3 引物设计及 PCR 用 Light Scanner Primer Design 软件设计高分辨率熔解曲线(HRM)小片段扩增法正反引物,扩增范围约 50 bp,由上海生工合成。PCR 体系包括模板

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(“973”项目,2012CB720600)。 作者简介:林堃,女,临床检验诊断学硕士研究生,主要从事遗传性疾病的基因诊断研究。 [△] 通讯作者, E-mail:zhouxyk@163.com。

DNA 1 μL , 25 mmol/L MgCl_2 0.8 μL , $10\times$ 缓冲液 1 μL , 正反引物各 0.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL , Taq DNA 聚合酶 1 μL , LC Green 1 μL , 用水补充体系至 10 μL 。引物信息及 PCR 退火温度见表 2。

表 1 FADS 基因簇 5 个 SNP 特点描述

SNP	Gene	Position	野生型	突变型	MAF
rs174537	near FADS1	61309256	T	G	0.333
rs174616	FADS2	61384457	C	T	0.454
rs174611	FADS2	61385698	T	C	0.144
rs174460	FADS3	61389118	C	T	0.474
rs174450	FADS3	61413686	C	A	0.469

表 2 小片段扩增法引物序列和退火温度

SNP	引物 (5'→3')	片段长度 (bp)	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$)
rs174537	F CCCTGTCGCCCTGCAGAA	50	61
	R CTGGGCTCTCCCTCTGTCTTG		
rs174616	F TTGGCCGAGGGCAGGAC	50	65
	R CTCACCTTGAAGGCCACCTTATTG		
rs174611	F TCTGGCAAGGTTCCCTGTT	62	61
	R GTGAAGCGTGGGAGCATC		
rs174460	F CGCCATTGCACTCCAGTC	57	55
	R CCACCAACCGCCGAGA		
rs174450	F CTACCCGACACCCGTCA	50	61
	R TGCTCATCTCTGGAATGGAATCT		

1.2.4 基因分型 采用美国 Idaho 公司 LightScanner32 高分辨率熔解曲线 (HRM) 技术对小片段扩增子异源双链进行扫描。嵌入双链中的新型荧光染料 LC Green 随着温度升高解链而释放出来, 造成荧光信号改变, 根据分析融解曲线荧光信号的变化情况区分不同基因型, 基因分型结果经过 DNA 测序确

认和验证。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行数据统计分析, 检验水平为双侧 0.05。 χ^2 检验计算每一个 SNP 位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。各个位点两组间 3 种基因型差异比较, 采用 R \times C 卡方检验计算。应用 Haploview 软件进行 SNP 连锁不平衡分析。

2 结果

2.1 方法学评价 HRM 技术可以在没有探针的条件下分析单个碱基的改变, 是目前最好的突变扫描技术, 已经广泛应用于分子生物学领域。其灵敏度高, 能够有效区分不同 SNP 基因型以及进行突变筛查, 为本实验 SNP 分型和提供了准确快速的检测方法, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。各个位点分型结果中随机挑选部分送测序验证, 测序结果与 HRM 分型结果一致率达 100%。SNP 位点 rs174537 和 rs174611 测序结果, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 分别与 HRM 分型结果一致。

2.2 SNP 基因型和等位基因频率分析 FADS 基因簇 5 个 SNP 位点成功分型。对照组所有位点基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P>0.05$)。所有位点基因型和等位基因频率统计结果如表 3 所示。各位点基因型分布比例与 NCBI 数据库亚洲人种中基因型分布比例相似。统计结果显示, 冠心病组和对照组相比, SNP 位点 rs174537, rs174460 和 rs174611 基因型分布差异有统计学意义 ($P<0.05$)。比较冠心病组和对照组位点 rs174537 的等位基因频率, 发现在中国汉族人群中 rs174537 的 T 等位对于冠心病是一个保护因素 [$P=0.004$, $OR=0.745$, 95% $CI=(0.61\sim0.91)$], 而携带 GG 型可能是冠心病发生的危险因素。在位点 rs174460 中, C 等位基因是风险等位基因, CC 型携带者罹患冠心病风险较未携带者增高 1.64 倍 [$P<0.01$, $OR=1.64$, 95% $CI=(1.29\sim2.08)$]。位点 rs174611 的 T 等位也是冠心病发生的危险因素 [$P=0.024$, $OR=0.21$, 95% $CI=(0.05\sim0.94)$], 但该位点 C 等位携带率太小, 检验效能无法保证。

表 3 5 个 SNP 位点基因型和等位基因频率分布情况

SNP	基因型			P	等位基因		P	OR(95%CI)	
rs174537	TT	GT	GG	0.010	T	G	0.004	0.745(0.61~0.91)	
	冠心病组	65	195		115	325			425
	对照组	101	192		96	394			384
rs174616	TT	CT	CC	0.543	T	C	0.410	1.09(0.88~1.36)	
	冠心病组	37	176		162	250			500
	对照组	38	168		183	244			534
rs174611	TT	CT	CC	0.024	C	T	0.024	0.21(0.05~0.94)	
	冠心病组	373	2		0	2			748
	对照组	379	10		0	10			768
rs174460	TT	CT	CC	0.001	C	T	<0.001	1.64(1.29~2.08)	
	冠心病组	205	128		42	212			538
	对照组	259	109		21	151			627
rs174450	AA	AC	CC	0.884	C	A	0.754	1.03(0.84~1.28)	
	冠心病组	151	181		43	267			483
	对照组	163	181		45	271			507

2.3 SNP 连锁不平衡分析 应用 Haploview 软件进行 5 个 SNP 位点的连锁不平衡分析。基于 HapMap 数据库显示,所选择的 5 个 SNP 位点相互之间 $r^2 < 0.8$,提示它们相互之间不存在连锁不平衡现象。虽然 rs174616 与 rs174611 在 11 号染色体上位置相毗邻,它们之间并不存在连锁不平衡现象。分析结果见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

单核苷酸多态性在基因组中数量庞大,可以为识别疾病易感人群提供海量信息。而 HRM 技术通过实时监测与 dsDNA 结合的 LC Green 饱和荧光信号在升温变性过程中的变化情况,实现对 DNA 变异点的基因分型。此技术速度快,操作简便,适合高通量检测,已经越来越多地应用于临床疾病的分子生物学诊断^[7]。

本研究成功建立了对 FADS 基因簇 5 个 SNP 位点 HRM 分型方法,在湖北地区 764 例汉族人群中进行了 SNP 分型,并通过测序确认和验证了 HRM 分型的准确性。本研究首次发现 FADS 基因簇位点 rs174460(T/C)的 C 等位与增高的冠心病患病风险相关,同时证实了在中国汉族人群中 FADS 基因簇 SNP 位点 rs174537(T/G)和 rs174611(T/C)多态性与冠心病发生密切相关。位点 rs174537 的 G 等位,rs174460 中 C 等位以及 rs174611 的 T 等位是冠心病的风险等位基因。位点 rs174537 的 T 等位携带者罹患冠心病的风险是 G 等位基因携带者的 0.745 倍,位点 rs174460 的 C 等位携带者患病风险是 T 等位携带者的 1.64 倍,而 rs174611 的 C 等位携带者患冠心病风险仅为 T 等位携带者的 21%,但由于 C 等位在亚洲人群中携带率太小,需要更大样本量方可保证足够的检验效能。rs174537 是 FADS 基因簇上研究较为深入的一个位点,80%左右的非裔美国人是 GG 型携带者,在欧洲 GG 型携带者只占 42%~45%,有研究报道 rs174537 与血浆 EPA 以及 LDL-C 和 TC 水平有关,尤其与 AA 的含量密切相关^[8-9],从而造成不同人种对慢性疾病易感性的固有差异。rs174537 在染色体上位置靠近 FADS1 基因,rs174611 位于 FADS2 基因内,它们分别是编码去饱和酶 D5D 和 D6D 的基因。D5D 催化合成 AA 和 EPA,D6D 催化合成 GLA 和 C18:4n3。rs174460 位于 FADS3 基因,目前其编码的蛋白功能还不是非常清楚,但是 FADS3 与脂肪酸去饱和酶 FADS1-FADS2 高度同源。有研究指出 FADS 基因簇 SNP 与去饱和酶活性以及多不饱和脂肪酸水平紧密相关^[5-10],在冠心病患者中 AA/LA 和 EPA/ALA 比值明显升高,而 AA/LA 比值升高在多种 logistic 回归模型下均可作为冠心病发病的一项独立危险因素^[11]。因此我们可以推测这 FADS 基因多态性引起的脂肪酸去饱和和活性改变可能是引起组织和血浆多不饱和脂肪酸水平改变的重要因素,从而引起细胞功能改变最终导致一系列冠心病相关的病理变化。最近国外有研究报道:FADS 基因单体型对 PUFAs 水平影响显著,并与生活方式相关的疾病如冠心病联系起来^[12]。本研究中位点 rs174537,rs174460 和 rs174611 基因型分布在冠心病组和对照组间差异有统计学意义。冠心病属于多基因复杂疾病,其发病受到多个基因和环境因素双重影响,FADS 基因簇单核苷酸多态性影响的不仅限于 D6D 和 D5D 的活性,而

D6D 和 D5D 也只是调节 PUFAs 水平的众多机制之一。本研究为今后进一步探寻 FADS 基因簇在冠心病中的具体致病机制提供了理论基础,同时为识别冠心病易感人群提供了依据。

参考文献

- [1] Kwak JH, Paik JK, Kim OY, et al. FADS gene polymorphisms in Koreans: Association with $\omega 6$ polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids, lipid peroxides, and coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1): 94-100.
- [2] Aslibekyan S, Jensen MK, Campos H, et al. Fatty Acid desaturase gene variants, cardiovascular risk factors, and myocardial infarction in the costa rica study[J]. *Front Genet*, 2012, 3:72.
- [3] Sergeant S, Hugenschmidt CE, Rudock ME. Differences in arachidonic acid levels and fatty acid desaturase(FADS) gene variants in African Americans and European Americans with diabetes or the metabolic syndrome[J]. *Br J Nutr*, 2012, 107(4): 547-555.
- [4] Martinelli N, Consoli L, Olivieri O. A desaturase hypothesis for atherosclerosis: Janus-faced enzymes in omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid metabolism[J]. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 2009, 2(3): 129-139.
- [5] Gillingham LG, Harding SV, Rideout TC, et al. Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [^{13}C] α -linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition[J]. *Am J Clin Nutr*, 2013, 97(1): 195-207.
- [6] Hong SH, Kwak JH, Paik JK, et al. Association of polymorphisms in FADS gene with age-related changes in serum phospholipid polyunsaturated fatty acids and oxidative stress markers in middle-aged nonobese men[J]. *Clin Interv Aging*, 2013, 8: 585-596.
- [7] Qian J, Lin J, Yao DM, et al. Rapid detection of JAK2 V617F mutation using high-resolution melting analysis with LightScanner platform[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(23/24): 2097-2100.
- [8] Tanaka T, Shen J, Goncalo R, et al. Genome-Wide Association Study of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids in the InCHIANTI Study[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(1): e1000338.
- [9] Mathias RA, Sergeant S, Ruczinski I, et al. The impact of FADS genetic variants on $\omega 6$ polyunsaturated fatty acid metabolism in African Americans[J]. *BMC Genet*, 2011, 5(20): 12-50.
- [10] Al-Hilal M, Alsaleh A, Maniou Z, et al. Genetic variation at the FADS1-FADS2 gene locus influences delta-5 desaturase activity and LC-PUFA proportions after fish oil supplement[J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(2): 542-551.
- [11] Martinelli N, Girelli D, Malerba G, et al. FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease[J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 88(4): 941-949.
- [12] Ameer A, Enroth S, Johansson A, et al. Genetic adaptation of fatty-acid metabolism: a human-specific haplotype increasing the biosynthesis of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(5): 809-820.

(收稿日期:2013-04-17)