

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00822

· 论 著 ·

染色体 9p21 和 1p13 上单核苷酸多态性位点与中国人群急性心肌梗死的关联：中国急性心梗研究

郭 晋¹, 李 卫^{1*}, 刘 欣², 王兴宇², 王 杨¹, 刘力生^{1,2}

1. 北京协和医学院 & 中国医学科学院, 阜外心血管病医院防治中心生物统计部, 北京 100037

2. 北京高血压联盟研究所, 北京 100039

[摘要] **目的** 探讨中国人群染色体 9p21 和 1p13 区域单核苷酸多态性(SNP)位点与急性心肌梗死(AMI)的关联强度,以及风险 SNP 位点的等位基因频率在中国东北、华北、东南 3 个区域人群之间的差异。**方法** 采用病例对照研究,选择 1999~2003 年初发急性心肌梗死的患者 1 148 例作为病例组,选择非心血管病患者或正常人 1 185 例作为对照组,按年龄与性别进行匹配。共研究 9p21、1p13、1p32、1q41、10q11、19p13 第 6 个区域 20 个 SNPs 位点,利用 Illumina GoldenGate 技术和 BeadStudio 软件包进行 SNP 分型,利用 SAS/genetics、SAS/STAT 和 Haploview 软件对结果进行分析和图形绘制。**结果** 9p21 区域 4 个 SNPs 和 1p13 区域 2 个 SNPs 与中国人群急性心肌梗死发病风险存在关联性(多重 Logistic 回归, $P < 0.000 1$),其中 SNP rs10757274 与急性心肌梗死关联性最强($P = 0.006$)。9p21 区域 4 个 SNPs(rs10757274、rs2383206、rs10757278 和 rs1333049)的 GG 纯合形态增加了急性心肌梗死的发病风险($OR = 1.40, 95\% CI: 1.10 \sim 1.79$; $OR = 1.33, 95\% CI: 1.04 \sim 1.69$; $OR = 1.35, 95\% CI: 1.07 \sim 1.72$; $OR = 1.34, 95\% CI: 1.06 \sim 1.71$)。但是本研究并未发现 1p32、1q41、10q11、19p13 区域 9 个 SNPs 位点与急性心肌梗死存在明显关联。在正常对照组或急性心肌梗死组,中国东北和南方地区人群 SNP rs646776 的 G 等位基因频率高于北方地区,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** SNP rs10757274 是中国人群急性心肌梗死发生的易感位点。

[关键词] 心肌梗死;单核苷酸多态性;单体型;中国**[中图分类号]** R 542.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0822-08

Association of single-nucleotide polymorphisms on chromosome 1p13 and 9p21 with acute myocardial infarction in a Chinese population: the AMI study in China

GUO Jin¹, LI Wei^{1*}, LIU Xin², WANG Xing-yu², WANG Yang¹, LIU Li-sheng^{1,2}

1. Division of Biometrics, National Center for Cardiovascular Diseases, Cardiovascular Institute & Fuwai Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China

2. Beijing Hypertension League Institute, Beijing 100039, China

[Abstract] **Objective** To determine whether the single nucleotide polymorphism (SNPs) on chromosome 9p21 and 1p13 were associated with acute myocardial infarction(AMI) in a Chinese population, and to compare the allelic frequencies of risk SNP between populations living in northeast China, north China, and southeast China. **Methods** We conducted a case-control study. Cases were those developed initial AMI ($n=1 148$) between 1999 and 2003; controls ($n=1 185$) were randomly selected age- and sex-matched non-cardiovascular disease patients or normal controls. Twenty SNPs sites in 6 domains (9p21, 1p13, 1p32, 1q41, 10q11 and 19p13) were studied using the Illumina GoldenGate technology and the BeadStudio software package. SAS/genetics, SAS/STAT and Haploview were used for result analysis and for completing the drawing. **Results** Four SNPs in 9p21 and 2 SNPs in 1p13 were associated with AMI risk in Chinese population (Global P value for multiple logistic regression, $< 0.000 1$), with rs10757274 showing the strongest association with AMI($P = 0.006$). GG carriers of four SNPs (rs10757274, rs2383206, rs10757278 and rs1333049) in 9p21 were associated with higher risk of AMI ($OR = 1.40, 95\% CI: 1.10-1.79$; $OR = 1.33, 95\% CI: 1.04-1.69$; $OR = 1.35, 95\% CI: 1.07-1.72$; $OR = 1.34, 95\% CI: 1.06-1.71$). The present study failed to find a significant association of 9 SNPs in 1p32, 1q41, 10q11, and 19p13 regions with AMI. In the control or cases groups, G allele frequencies of rs646776 in populations living in north and northeast China were significantly higher than

[收稿日期] 2011-04-27**[接受日期]** 2011-05-20**[基金项目]** 加拿大人群健康研究所资助。Supported by Canadian Institute of Population Health Research.**[作者简介]** 郭 晋, 博士生。E-mail: guojin85827501@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 010-88396408, E-mail: liwei0325@yahoo.com.cn

those living in south China ($P < 0.05$). **Conclusion** SNP rs10757274 is the susceptible locus of AMI in Chinese population.

[Key words] myocardial infarction; single-nucleotide polymorphisms; haplotype; China

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8): 822-829]

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是世界范围内严重危害人类健康的疾病,近年来研究显示,其发病率和死亡率在发展中国家日益增高。预计到2020年,超过全球80%的心血管疾病将发生在发展中国家,由于城市化进程的加快,中国和印度将首当其冲^[1]。心血管病的危险因素包括年龄增加、性别、遗传因素等不可改变的危险因素,以及吸烟、高血压、高血脂、肥胖、缺乏体力活动、糖尿病等可以改变的危险因素^[2-4]。对于遗传危险因素的研究表明某些分子标记可以与传统的危险因素共同预测心血管病事件^[5]。2007年的心血管疾病全基因组关联研究发现在染色体9p21区域CDKN2A和CDKN2B基因附近的一些单核苷酸多态性(SNP)序列与心血管病发病存在关联^[6-7]。

对于急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)这类心血管病,很少有研究探讨其在中国人群中发病的危险位点。中国急性心梗研究已经发现9个可改变的危险因素是AMI高发的原因^[8-9]。我们试图进一步研究在中国人群中与AMI高发相关的危险位点以及探讨危险位点基因频率在中国南北方人群中的差异。本研究以中国汉族人为研究对象,采用病例对照研究的方法,探索中国人群染色体9p21区域8个SNP位点、1p13区域3个SNP位点以及其他区域9个位点同AMI患病的相关性,为AMI患病的遗传学研究提供新的线索。

1 对象和方法

1.1 研究对象 研究对象的人排标准在中国急性心梗研究开展时制定^[8-9]。患者初发急性心肌梗死并入院接受治疗,3 022例患者均经冠状动脉造影证实存在至少1支血管狭窄 $> 50\%$ 以上。依据年龄(± 5 岁)和性别匹配,选择对照组人群2 960例。

对照组的入选标准:选择范围为非心血管病房的患者或其亲属,或者心血管患者的非一级亲属。选择顺序为:(1)屈光或白内障患者;(2)体检人群;(3)常规图片检查人群;(4)常规胸部检查人群;(5)小型外科治疗患者;(6)整形外科患者。与冠心病及其危险因素明显无关。对照组的排除标准为:不能完成知情同意书;伴随慢性疾病(例如:肝病、未治疗的甲亢或甲减、肾病、恶性肿瘤、怀孕);之前无心脏病或劳累型胸痛的诊断。本研究所选受试者均与心血管病或其他慢性疾病无关,接近正常人群,可以

作为本次研究的试验人群。

排除仅有血样没有接受基因型测序的个体,最终确定2 333例受试者(1 148例AMI患者与1 185例对照)。

1.2 标本的收集与保存 调查员通过询问填写问卷,并以标准统一的方式对患者进行体检。调查变量包括人口学指标、收入和教育情况、生活方式、吸烟史、饮酒情况、个人及家族病史、心理因素等可能与AMI相关的危险因素,生理学指标包括血压、身高、体质量、腰围、臀围等指标。

所有研究对象抽取外周静脉血20 ml,2 h内冷冻离心,采用酚氯仿法抽提DNA,并置于 -70°C 冰箱或 -170°C 液氮中保存。

1.3 SNP分型 2 333受试者(1 148例AMI患者与1 185例对照)提供了血样。利用Illumina GoldenGate技术和BeadStudio软件包进行SNP分型^[10],所有SNP基因型测序准确率为98%。研究检测了染色体不同区域20个SNP位点基因型(分别位于PCSK9基因附近1p32区域,CELSR2-PSRC1-SORT1基因附近1p13区域,MIA3基因1q41区域,CDKN2A、CDKN2B基因附近9p21区域,CKCL12基因附近10q11区域,LDLR基因附近19p13区域)。

1.4 单体型的构建 利用Haploview和SAS软件(9.1.3版本)计算单体型概率,取人群中连锁不平衡系数 $D' > 0.90$ 可认为两位点存在连锁不平衡关系^[11-12],并估计不同单体型在AMI患者与正常人群中是否存在差别。

1.5 统计学处理 数据中连续性变量使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对照组与病例组差别运用 t 检验分析;分类变量使用百分数表示,组间差别使用Pearson检验;哈代-温伯格平衡定律运用拟合优度检验予以证明,以上过程均使用SAS/Genetics Allele过程实现。对于每一个位点与AMI的关联分析,均使用单因素和多因素Logistic回归模型,并计算OR值(优势比)与其95%的置信区间。多因素Logistic回归分析调整BMI、吸烟、高血压病史、糖尿病史、AMI家族病史、生活压力。年龄变量和BMI近似服从正态分布。Logistic回归使用SAS/STAT Logistic过程,模型假设检验使用Wald检验和似然比检验,拒绝水准0.05。考察基因频率和基因型频率在AMI患病组和正常对照组的差别,假设检验使用四格表和 2×3

表的 Pearson 检验或 Fisher 精确检验,以及趋势检验,使用 SAS/Genetics casecontrol 过程实现。单体型概率的估计使用 EM 算法计算,运用 SAS/Genetics Haplotype 过程实现^[13-15],图形运用 Haploview 软件绘制。

2 结果

2.1 研究对象的基线特征 AMI 组和对照组的基线特征见表 1。由表 1 可见,两组患者除年龄、性别、月收入、腰臀比差异无统计学意义外,其余指标包括高血压病史、糖尿病史、卒中病史、AMI 家族病史、当前吸烟、饮酒、持续精神压力、意志消极、受教育程度、体质量指数(BMI)等差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 急性心肌梗死(AMI)病例组与正常对照组基线特征
Tab 1 Baseline characteristics of acute myocardial infarction group and control group

Clinical variable	AMI case (N=1 148)	Control (N=1 185)	P value
Age (year, $\bar{x} \pm s$)	59.4 \pm 9.2	60.4 \pm 10.7	0.187 5 ^a
Female (%)	27.87	28.69	0.661 2
Hypertension (%)	38.24	25.99	<0.000 1
Diabetes (%)	11.50	4.22	<0.000 1
Stroke (%)	10.19	4.21	<0.000 1
AMI family history (%)	4.01	1.95	0.003 3
Current smoking (%)	47.39	29.11	<0.000 1
Alcohol intake (%)	43.58	37.58	0.003 2
Continuous stress (%)	60.02	54.14	0.004 2
Depressed (%)	19.16	9.54	<0.000 1
Educated >9 years (%)	50.39	59.07	<0.000 1
Income >USD 600/month (%)	87.36	86.63	0.345 2
Body mass index (kg · m ⁻² , $\bar{x} \pm s$)	25.00 \pm 3.42	24.35 \pm 2.92	<0.000 1 ^a
Waist hip rate ($\bar{x} \pm s$)	0.87 \pm 0.09	0.87 \pm 0.09	0.663 3 ^a

P-value by Pearson chi-squared test; ^a: P-value by *t* test

2.2 基因型、等位基因频率分析与 SNP 的患病风险评估 我们共检测了 20 个位点,包括 CELSR2-PSRC1-SORT1 基因附近位于 1p13 区域的 3 个 SNP 位点,CDKN2A、CDKN2B 基因附近位于 9p21 区域的 8 个 SNP 位点,其他区域 9 个位点。在 AMI 患病人群和正常对照组人群中,这些 SNP 位点除 rs646776 外基因型频率均服从哈代-温伯格平衡定律(Hardy-Weinberg equilibrium)。单因素 Logistic 回归分析显示,8 个位于 1p13 和 9p21 区域 SNP 与 AMI 存在关联(表 2)。进一步,我们利用多重 Logistic 回归分析调整了 AMI 的危险因素肥胖、吸烟、饮酒、高血压病史、糖尿病病史、卒中、生活压力对结果的混杂。调整后,所

分析的 SNPs 的最小等位基因(MAF)的影响仍然有统计学意义(表 2)。其中,SNP rs10757274 与 AMI 关联强度最高,rs10757274 的 G 等位基因频率在 AMI 组高于正常对照组,差异有统计学意义(50.6% : 46.1%, $P = 0.002$)。并且,相对于 A 等位基因,SNP rs10757274 G 等位基因增加急性心肌梗死危险性($OR = 1.182, 95\%CI: 1.048 \sim 1.333$)。位于 9p21 区域的 4 个 SNP (rs10757274, rs2383206, rs10757278 和 rs1333049)与 AMI 的发生存在一定的关联,其 GG 基因型有较高的危险性($OR = 1.40, 95\%CI: 1.10 \sim 1.79$; $OR = 1.33, 95\%CI: 1.04 \sim 1.69$; $OR = 1.35, 95\%CI: 1.07 \sim 1.72$; $OR = 1.34, 95\%CI: 1.06 \sim 1.71$, 表 2)。

2.3 分层分析 我们对 9p21 区域 3 个位点进行了分层分析。由表 3 可见,2 个 SNPs (rs2383206 和 rs10757278)的 GG 基因型高血压病史人群中具有较高的 AMI 危险性($OR = 1.62, 95\%CI: 1.05 \sim 2.49$; $OR = 1.61, 95\%CI: 1.05 \sim 2.48$, 具有统计学意义)。2 个 SNPs (rs10757274 和 rs10757278)的 GG 基因型在肥胖人群中($BMI \geq 25$)有较高的 AMI 危险性($OR = 1.48, 95\%CI: 1.03 \sim 2.13$; $OR = 1.48, 95\%CI: 1.03 \sim 2.12$, 具有统计学意义)。对于基因与临床变量的交互作用分析,没有发现 SNP 基因型与 BMI、高血压病史等变量存在明显的交互作用。

2.4 9p21 区域连锁不平衡分析与单体型频率 我们利用 1 185 例正常对照人群 8 个 SNPs 位点的基因型,计算得到 9p21 区域 8 个 SNPs 位点单体型频率,并定义了中国人 9p21 的区域范围内的一个 SNPs 的单体型(haploblock)结构。通过连锁不平衡系数 $D' > 0.90$,我们确定了该单体型(图 1)。进一步,我们考察了单体型频率在 AMI 患病人群与正常对照人群间的差别。单体型 AAAC 在正常对照人群中的频率高于病例组(49.2% vs 44.8%),而单体型 GGGG 在正常对照人群中的频率低于病例组(44.4% vs 48.2%,表 4)。研究显示,在中国人群中染色体 9p21 区域该单体型可能与 AMI 的发生存在一定关联。

2.5 不同地区人群 1p13 区域 SNP 位点等位基因频率 1p13 区域 2 个 SNPs 位点(rs646776, rs599839)已被确为与 MI 存在明显的相关^[16-17]。我们选择了 3 个候选 SNPs 位点(rs611917, rs646776 和 rs602633),分析结果显示在中国人群中 rs602633 与 AMI 发病存在着明显的关联。A 可以是风险等位基因,杂合度降低 AMI 的发病风险增高。SNP rs646776 和 rs611917 与 AMI 存在一定的关联,且 2 个 SNPs 处于连锁不平衡状态($r^2 = 0.9$)。进一步依

据人群原居住地进行分层分析, 以确定中国不同地区人群的等位基因频率是否存在差异。共计得到 2 225(95.4%) 个体原居住地信息, 按东北地区、北方地区和南方地区分类, SNP rs646776 在不同地区

等位基因频率存在差异, 假设检验有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 5)。在正常对照人群中, 中国北方人群 SNP rs646776 G 等位基因频率高于东北、南方人群 ($P < 0.05$, 图 2)。

表 2 20 个 SNPs 基因型及其基因型概率
Tab 2 20 SNP genotypes and their probability

SNP	Control [n(%)]	AMI case [n(%)]	Chromosome	Position	Nearby gene	P^a	P^b	Crude OR (95% CI) ^c	Adjusted OR (95% CI) ^d
rs11206510			1p32	55496039	PCSK9	0.537	0.576		
GG	4 (0.34)	2(0.17)						1.00	1.00
AG	137(11.57)	122(10.64)						1.78(0.32-9.89)	1.26(0.22-7.30)
AA	1 043(88.09)	1 023(89.19)						1.96(0.36-10.73)	1.35(0.24-7.68)
rs11591147			1p32	55505647	PCSK9	0.480	0.348		
CC	1 097(92.57)	1 068(93.19)						1.00	1.00
AC	88(7.43)	77(6.72)						0.90(0.65-1.23)	0.83(0.59-1.16)
AA	0(0)	1(0.09)							
rs562556			1p32	55524237	PCSK9	0.038	0.651		
GG	2(0.17)	9(0.79)						1.00	1.00
AG	29(2.46)	19(1.67)						0.15(0.03-0.75)	0.12(0.02-0.63)
AA	1 146(97.37)	1 111(97.54)						0.22(0.05-1.00)	0.20(0.04-0.94)
rs505151			1p32	55529187	PCSK9	0.481	0.223		
AA	1 046(88.72)	997(87.00)						1.00	1.00
AG	129(10.94)	145(12.65)						1.18(0.92-1.52)	1.20(0.92-1.56)
GG	4(0.34)	4(0.35)						1.05(0.26-4.21)	0.90(0.21-3.90)
rs611917			1p13	109815252	CELSR2- PSRC1- SORT1	0.014	0.0670		
GG	3(0.25)	3(0.26)						1.00	1.00
AG	167(14.09)	118(10.28)						0.71(0.14-3.56)	0.74(0.13-4.10)
AA	1 015(85.65)	1 027(89.46)						1.01(0.20-5.03)	1.09(0.20-5.93)
rs646776			1p13	109818530	CELSR2- PSRC1- SORT1	0.018	0.016		
AA	911(76.88)	937(81.69)						1.00	1.00
AG	228(19.24)	177(15.43)						0.76(0.61-0.94)	0.79(0.63-0.99)
GG	46(3.88)	33(2.88)						0.70(0.44-1.10)	0.69(0.43-1.12)
rs602633			1p13	109818530	CELSR2- PSRC1- SORT1	0.002	0.005		
AA	3(0.25)	3(0.26)						1.00	1.00
AC	169(14.27)	110(9.58)						0.65(0.13-3.28)	1.08(0.18-6.41)
CC	1 012(85.47)	1 035(90.16)						1.02(0.21-5.08)	1.74(0.30-10.20)
rs17465637			1q41	222823529	MIA3	0.605	0.416		
CC	435(36.77)	434(37.84)						1.00	1.00
AC	561(43.42)	549(47.86)						0.98(0.82-1.17)	0.95(0.79-1.14)
AA	187(18.81)	164(14.30)						0.88(0.69-1.13)	0.90(0.70-1.17)
rs7044859			9p21.3	22018781	CDKN2A, CDKN2B	0.026	0.059		
TT	468(39.73)	516(45.10)						1.00	1.00
AT	569(48.30)	502(43.88)						0.80(0.67-0.95)	0.81(0.68-0.97)
AA	141(11.97)	126(11.01)						0.81(0.62-1.06)	0.85(0.64-1.12)
rs564398			9p21.3	22029547	CDKN2A, CDKN2B	0.033	0.021		
AA	894(75.89)	915(79.84)						1.00	1.00
AG	271(23.01)	226(19.72)						0.82(0.67-0.99)	0.81(0.66-1.00)
GG	13(1.10)	5(0.44)						0.38(0.13-1.06)	0.44(0.15-1.31)

(续下表)

(接上表)

SNP	Control [n(%)]	AMI case [n(%)]	Chromosome	Position	Nearby gene	<i>P</i> ^a	<i>P</i> ^b	Crude OR (95% CI) ^c	Adjusted OR (95% CI) ^d
rs1333040			9p21.3	22083404	CDKN2A, CDKN2B	0.03	0.053		
GG	109(9.22)	73(6.36)						1.00	1.00
AG	484(40.95)	476(41.46)						1.47(1.06-2.03)	1.52(1.08-2.13)
AA	589(49.83)	599(52.18)						1.52(1.11-2.09)	1.56(1.11-2.18)
rs10757274			9p21.3	22096055	CDKN2A, CDKN2B	0.004	0.006		
AA	343(29.04)	291(25.46)						1.00	1.00
AG	587(49.70)	547(47.86)						1.10(0.90-1.34)	1.11(0.90-1.36)
GG	251(21.25)	305(26.68)						1.43(1.14-1.80)	1.40(1.10-1.79)
rs2383206			9p21.3	22115026	CDKN2A, CDKN2B	0.037	0.022		
AA	329(27.81)	285(24.85)						1.00	1.00
AG	588(49.70)	553(48.21)						1.09(0.89-1.32)	1.09(0.89-1.34)
GG	266(22.49)	309(26.94)						1.34(1.07-1.68)	1.33(1.04-1.69)
rs10757278			9p21.3	22124477	CDKN2A, CDKN2B	0.031	0.013		
AA	320(27.07)	273(23.82)						1.00	1.00
AG	580(49.07)	550(47.99)						1.11(0.91-1.36)	1.13(0.91-1.39)
GG	282(23.86)	323(28.18)						1.34(1.07-1.69)	1.35(1.07-1.72)
rs1333049			9p21.3	22125503	CDKN2A, CDKN2B	0.055	0.016		
CC	316(26.71)	267(23.28)						1.00	1.00
CG	583(49.28)	560(48.82)						1.14(0.93-1.39)	1.14(0.92-1.41)
GG	284(24.01)	320(27.90)						1.33(1.06-1.68)	1.34(1.06-1.71)
rs10811661			9p21.3	22134094	CDKN2A, CDKN2B	0.39	0.419		
GG	270(22.78)	244(21.25)						1.00	1.00
AG	592(49.96)	564(49.13)						1.05(0.86-1.30)	1.01(0.82-1.26)
AA	323(27.26)	340(29.62)						1.17(0.93-1.47)	1.10(0.86-1.40)
rs501120			10q11.21	44753867	CXCL12	0.40	0.198		
GG	188(15.91)	162(14.14)						1.00	1.00
AG	542(45.85)	522(45.55)						1.12(0.88-1.42)	1.04(0.81-1.35)
AA	452(38.24)	462(40.31)						1.19(0.93-1.52)	1.16(0.89-1.50)
rs6511720			19p13	11202306	LDLR	0.41	0.143		
CC	1165(98.31)	1134(98.78)						1.00	1.00
AC	20(1.69)	14(1.22)						0.72(0.36-1.43)	0.57(0.27-1.21)
AA	0(0)	0(0)							
rs6511721			19p13	11206575	LDLR	0.956	0.845		
GG	85(7.17)	80(6.97)						1.00	1.00
AG	447(37.72)	430(37.46)						1.02(0.73-1.43)	1.06(0.75-1.50)
AA	653(55.11)	638(55.57)						1.04(0.75-1.44)	1.06(0.75-1.48)
rs1433099			19p13	11242658	LDLR	0.59	0.263		
GG	625(52.83)	629(54.84)						1.00	1.00
AG	465(39.31)	427(37.23)						0.91(0.77-1.08)	0.90(0.75-1.08)
AA	93(7.86)	91(7.93)							

^a: *P*-value, significance of difference between groups were done by Pearson chi-square test, permutation=1 000; ^b: *P*-value, multivariate Logistic regression model was used to control the influence of BMI, smoking, drink, hypertension, diabetes, stroke, AMI of family, stress; ^c: Crude Odds ratio (OR) was obtained by univariate Logistic regression analysis; ^d: Multivariate Logistic regression model was used to adjust the crude OR value

表 3 9p21 区域 3 个 SNP 位点基因型与 AMI 的关联性的分层分析

Tab 3 Stratified analysis of association between 3 SNPs in 9p21 genotype and AMI

	rs10757274 [OR(95% CI)]			rs2383206 [OR(95% CI)]			rs10757278 [OR(95% CI)]		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
BMI(kg · m ⁻²)									
<25	1.00	1.00	1.34	1.00	1.03	1.26	1.00	1.03	1.25
		(0.76-1.31)	(0.97-1.84)		(0.78-1.36)	(0.92-1.74)		(0.78-1.31)	(0.91-1.72)
≥25	1.00	1.28	1.48	1.00	1.19	1.40	1.00	1.28	1.48
		(0.94-1.75)	(1.03-2.13)		(0.87-1.62)	(0.97-2.01)		(0.93-1.75)	(1.03-2.12)
Hypertension									
No	1.00	1.06	1.30	1.00	1.00	1.17	1.00	1.02	1.19
		(0.83-1.37)	(0.97-1.74)		(0.78-1.29)	(0.87-1.56)		(0.79-1.31)	(0.89-1.58)
Yes	1.00	1.16	1.53	1.00	1.26	1.62	1.00	1.34	1.61
		(0.81-1.66)	(0.99-2.36)		(0.88-1.81)	(1.05-2.49)		(0.94-1.93)	(1.05-2.48)

All P for interaction, >0.05

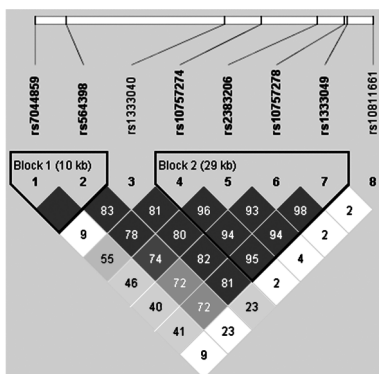


图 1 正常对照人群 9p21 区域 8 个 SNPs 之间的连锁不平衡关系
Fig 1 Eight SNPs in 9p21 linkage disequilibrium in control group

The numbers in table are linkage disequilibrium coefficient (D') × 100

表 4 9p21 区域 4 个 SNPs 可能构成的单体型及频率
Tab 4 4 SNPs in 9p21 possible haplotype frequency

Haplotype	1	2	3	4	Haplotype frequency		
					All	Case	Control
Hap1	A	A	A	C	0.470	0.448	0.492
Hap2	G	G	G	G	0.463	0.482	0.444
Hap3	A	A	G	G	0.024	0.026	0.023
Hap4	A	G	G	G	0.011	0.008	0.012
Hap4	G	A	A	C	0.010	0.012	0.007
Others					0.022	0.024	0.022

1: rs10757274; 2: rs2383206; 3: rs10757278; 4: rs1333049

表 5 中国不同地区人群 SNP rs646776 等位基因频率
Tab 5 SNP rs646776 allele frequency of different regions in China

Region	Control		AMI case	
	G	A	G	A
Northeast China	0.113	0.887	0.085	0.915
North China	0.166	0.834	0.131	0.869
South China	0.099	0.901	0.061	0.939

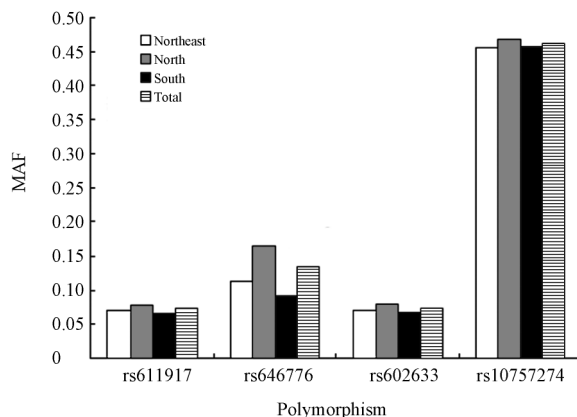


图 2 正常对照人群依据不同地区分层 4 个 SNPs 的最小等位基因频率 (MAF)
Fig 2 Minimum allele frequency (MAF) of 4 SNPs in control group according to stratification of different regions in China

Northeast area: Heilongjiang (n = 7), Jilin (n = 2), Liaoning (n = 755); Northern area: Beijing (n = 179), Tianjin (n = 95), Hebei (n = 105), Henan (n = 40), Shanxi (n = 182), Shandong (n = 323), Inner Mongolia (n = 216), Gansu (n = 4), Shanxi (n = 6); Southeast area: Jiangsu (n = 232), Shanghai (n = 5), Zhejiang (n = 5), Anhui (n = 11), Jiangxi (n = 3), Hubei (n = 125), Hunan (n = 10), Sichuan (n = 10), Guizhou (n = 1), Yunnan (n = 1), Guangxi (n = 1), Guangdong (n = 3), Fujian (n = 4), Hainan (n = 1); Not reported (n = 7)

3 讨论

全基因组关联研究已经确定了一些 SNP 与心肌梗死 (MI) 发生风险存在关联。研究显示 9 个区域与 MI 发病风险存在关联: MRPS6-SLC5A3-KC-NE 基因附近 21q22 区域, PHACTR1 基因 6p24 区域, WDR12 基因 2q33 区域, 9p21 区域, CELSR2-PSRC1-SORT1 基因 1p13 区域, CXCL12 基因附近

10q11 区域, MIA3 基因 1q41 区域, LDLR 基因附近 1p32 区域, PCSK9 基因附近 9p13 区域^[6-7,16,18]。

染色体 9p21 区域中包括细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的编码序列 CDKN2A 和 CDKN2B, 与动脉粥样硬化关系密切^[19]。动脉粥样硬化是 MI 的重要病理学特征。McPherson 等^[7]对加拿大 23 000 例高加索人研究发现, 在染色体 9p21 区域上的 rs10757274、rs2383206 位点中, 与 AA 纯合子人群比较, AG 杂合子人群发生早发冠心病(CHD) 的风险增加 15%~20%, GG 纯合子人群增加 30%~40%, 然而直接对 2 个基因编码区测序与 CHD 进行关联研究, 未发现编码区位点与 CHD 存在关联性。对于 9p21 区域与 CHD 的关联研究, 全球其他研究结果显示: rs1333049 (18 个研究, OR = 1.23)、rs10757274 (17 个研究, OR = 1.24)、rs2383207 (6 个研究, OR = 1.28)、rs2891168 (4 个研究, OR = 1.29)、rs10757278 (2 个研究, OR = 1.27), 均与 CHD 的发病风险存在着一定程度的关联^[2]。在亚洲人群中, 已有研究显示 rs1333049 (日本, 中国)、rs10757274 (中国)、rs10757278 (中国) 与心肌梗死存在一定关联^[2]。本研究的结果验证了中国人染色体 9p21 区域 3 个 SNPs 与 AMI 相关的结果, 而且还提示 rs564398、rs2383206 也可能是 AMI 发病风险相关位点, 其中, rs10757274 显示较强关联。在北美人群研究 HapMap 数据显示, rs10757274 和 rs2383206 位于染色体 9p21 区域 20 kb 内, 有较强的连锁不平衡关系 ($r^2 = 0.89$)^[5]。以往中国人群研究中, 5 个 SNPs (rs2383206, rs2383207, rs10757274, rs10757278, 和 rs1333049) 在同一个单体型区域内, 连锁不平衡系数 (D') = 1.0^[19]。在本研究中, 我们确定了中国人位于 9p21 区域一个单体型块 (rs10757274, rs2383206, rs10757278 和 rs1333049), 结果类似于北美人群的单体型研究。近年来有些研究提示 9p21 区域 CDKN2A 和 CDKN2B 基因的编码序列与 2 型糖尿病也存在着一定的关联^[20-21]。以上结果均表明, 9p21 区域在多种复杂疾病过程中可能发挥很大的作用。进一步的研究应集中在冠心病等疾病的发病机制。

全基因组关联研究显示, rs646776 以及 1p13 区域其他位点与低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和载脂蛋白 B (ApoB) 存在关联, 这与 SORT1 基因影响蛋白在膜泡运输这一研究结果是一致的^[22]。最近一个 176 份全血样本的转录分析发现 SORT1 基因的

危险等位基因会减弱 SORT1 基因的表达, 从而使得血浆中 LDL-C 富集, 增加冠状动脉性心脏病 (CAD) 的发病率^[23]。SORT1 基因产物 sortilin 蛋白可以协助从血浆清除 LDL^[23-26]。另一个 400 例肝脏标本的全基因组关联分析表明, LDLC 的富集与 SORT1 和 CELSR2 基因表达减弱有关^[27]。对于 1p13 区域的关联研究, 证明了 1p13 区域 SNP 位点与 LDL-C 和 ApoB 的关联性导致心血管病发病率增高, SORT1 基因周围是一个重组区域, 能否排除 CELSR2 和 PSRC1 基因而仅证明 SORT1 基因对心血管病发病率增高有影响, 还有待于研究。对于大规模人群的关联研究, 在欧洲人群研究显示, CELSR2-PSRC1-SORT1 基因的危险等位基因频率达到 81%, 与心血管疾病关联 (OR = 1.19)^[18,28]。rs646776 和 rs599839 被证实与 AMI 发病风险存在关联^[16-17]。在东亚人群中, 极少有研究报道 1p13 区域与 AMI 的关联研究。在本研究中, 我们发现在中国人人群中, rs646776 和 rs602633 与 AMI 发病风险存在着一定的关联。但是 rs646776 的基因型频率不服从哈代-温伯格平衡定律 (Hardy-Weinberg equilibrium), 可能是检测存在误差或是其他因素影响造成, 这是本研究的一个局限。

对于基因和环境的交互作用研究, 本研究利用多重 Logistic 回归模型并未发现 9p21 区域、1p13 区域 SNP 位点同吸烟、饮酒、高血压病史、肥胖、糖尿病等生活方式、环境因素存在交互作用。基因与环境交互作用的统计分析和算法仍有待于深入研究, 同时, 对于 9p21 区域、1p13 区域与相关生活方式、环境因素在心血管病研究中的交互作用应该在更多的人群中加以验证。

(志谢 本研究得到了中国急性心梗研究协作组的帮助, 特此感谢。)

[参考文献]

- [1] Teo K K, Liu L, Chow C K, Wang X, Islam S, Jiang L, et al. Potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in China: the INTERHEART China study[J]. Heart, 2009, 95: 1857-1864.
- [2] Palomaki G E, Melillo S, Bradley L A. Association between 9p21 genomic markers and heart disease: a meta-analysis[J]. JAMA, 2010, 303: 648-656.
- [3] Hobbs F D. Cardiovascular disease: different strategies for primary and secondary prevention [J]? Heart, 2004, 90: 1217-1223.
- [4] van Wyk J T, van Wijk M A, Sturkenboom M C, Moorman P W, van der Lei J. Identification of the four conventional cardio-

- vascular disease risk factors by Dutch general practitioners[J]. *Chest*,2005,128:2521-2527.
- [5] Wang T J, Gona P, Larson M G, Tofler G H, Levy D, Newton-Cheh C, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death[J]. *N Engl J Med*,2006,355:2631-2639.
- [6] Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction[J]. *Science*,2007,316:1491-1493.
- [7] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox D R, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease[J]. *Science*,2007,316:1488-1491.
- [8] Ounpuu S, Negassa A, Yusuf S. INTER-HEART, a global study of risk factors for myocardial infarction[J]. *Am Heart J*,2001,141:711-721.
- [9] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study[J]. *Lancet*,2004,364:937-952.
- [10] Clarke R, Peden J F, Hopewell J C, Kyriakou T, Goel A, Heath S C, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease[J]. *N Engl J Med*,2009,361:2518-2528.
- [11] Lemaitre R N, Rice K, Marciano K, Bis J C, Lumley T S, Wiggins K L, et al. Variation in eicosanoid genes, non-fatal myocardial infarction and ischemic stroke[J]. *Atherosclerosis*,2009,204:e58-e63.
- [12] Carlson C S, Eberle M A, Rieder M J, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson D A. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium[J]. *Am J Hum Genet*,2004,74:106-120.
- [13] Chang M H, Yesupriya A, Ned R M, Mueller P W, Dowling N F. Genetic variants associated with fasting blood lipids in the U. S. population; Third National Health and Nutrition Examination Survey[J]. *BMC Medical Genetics*,2010,11:62-74.
- [14] Dempster A, Laird N, Rubin D. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm[J]. *J Royal Statistic Soc Series B*,1977,39:1-38.
- [15] Schaid D J. Genetic epidemiology and haplotypes[J]. *Genet Epidemiol*,2004,27:317-320.
- [16] Myocardial Infarction Genetics Consortium, Kathiresan S, Voight B F, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants[J]. *Nat Genet*,2009,41:334-341.
- [17] Ding K, Kullo I J. Genome-wide association studies for atherosclerotic vascular disease and its risk factors[J]. *Circ Cardiovasc Genet*,2009,2:63-72.
- [18] Samani N J, Erdmann J, Hall A S, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*,2007,357:443-453.
- [19] Zhou L, Zhang X, He M, Cheng L, Chen Y, Hu F B, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21 and risk of coronary heart disease in Chinese Han population[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2008,28:2085-2089.
- [20] Zeggini E, Weedon M N, Lindgren C M, Frayling T M, Elliott K S, Lango H, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes[J]. *Science*,2007,316:1336-1341.
- [21] Scott L J, Mohlke K L, Bonnycastle L L, Willer C J, Li Y, Duren W L, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants[J]. *Science*,2007,316:1341-1345.
- [22] Johansen C T, Lanktree M B, Hegele R A. Translating genomic analyses into improved management of coronary artery disease[J]. *Future Cardiol*,2010,6:507-521.
- [23] Chasman D I, Par G, Zee R Y, Parker A N, Cook N R, Buring J E, et al. Genetic loci associated with plasma concentration of LDL-C, HDLC, triglycerides, ApoA1, and ApoB among 6382 Caucasian women in genome-wide analysis with replication[J]. *Circ Cardiovasc Genet*,2008,1:21-30.
- [24] Jansen P, Giehl K, Nyengaard J R, Teng K, Lioubinski O, Sjoegaard S S, et al. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury[J]. *Nat Neurosci*,2007,10:1449-1457.
- [25] Nielsen M S, Jacobsen C, Olivecrona G, Gliemann J, Petersen C M. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase[J]. *J Biol Chem*,1999,274:8832-8836.
- [26] Nilsson S K, Christensen S, Raarup M K, Ryan R O, Nielsen M S, Olivecrona G. Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families[J]. *J Biol Chem*,2008,283:25920-25927.
- [27] Schadt E E, Molony C, Chudin E, Hao K, Yang X, Lum P Y, et al. Mapping the genetic architecture of gene expression in human liver[J]. *PLoS Biol*,2008,6:e107.
- [28] Linsel-Nitschke P, Heeren J, Aherrahrou Z, Bruse P, Gieger C, Illig T, et al. Genetic variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*,2010,208:183-189.