

ABCG1 基因多态对转录活性及冠心病易感性的影响

马秋洁 刘本荣 田朝伟 陈晓辉

【摘要】目的 探讨三磷酸腺苷结合盒子转运体 G1 (ATP binding cassette transporter, ABCG1) 启动子多态性对其转录活性的影响及其与冠心病 (coronary atherosclerotic disease, CAD) 易感性的关系。**方法** 采用病例对照研究, 对 217 例 CAD 患者和 142 例对照者的 ABCG1 近端启动子区转录起始位点上游约 1 000 bp 核苷酸序列进行测序分析, 分析 CAD 组和对照组、早发冠心病组和非早发冠心病组、多支病变组和单支病变组间核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 和单倍型的频率分布差异。采用等位基因特异引物测序或基因克隆测序鉴定启动子单倍型, 选用双荧光素酶报告基因系统检测不同单倍型转录活性的差异。两组间的频率分布比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验, 组间荧光素酶活性差异比较采用成组 *t* 检验或单因素方差分析。**结果** 在约 1 000 bp 启动子序列中发现 3 个 SNPs [-384 (A/G)、-204 (A/C) 和 -134 (T/G)], 可形成 ACG、GAT 和 GCG 3 种单倍型, 3 个 SNPs 间连锁不平衡, Tajima's D = 2.655 ($P < 0.01$)。3 个 SNPs 频率和单倍型频率在 CAD 组和对照组间无统计学意义, 与冠状动脉血管病变严重程度和早发冠心病无显著相关性。3 种启动子单倍型的转录活性比较无统计学意义, 但将 GAT 突变为 GAG 后, 转录活性明显增强 ($P < 0.05$)。**结论** ABCG1 启动子 A 区的 3 个 SNPs 组成的 3 种单倍型对启动子活性无影响, 该区域的 SNPs 及其组成的单倍型的频率分布与 CAD 的易感性无显著性相关。

【关键词】 冠心病; 三磷酸腺苷结合盒转运体 G1; 启动子; 单核苷酸多态性; 单倍型; 连锁不平衡; 基因克隆; 双荧光素酶报告基因系统

Effects of the polymorphisms in ABCG1 gene on the transcription activity and the susceptibility with coronary artery disease

Ma Qiuji, Liu Benrong, Tian Chaowei, Chen Xiaohui
Department of Emergency, The 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China (Ma QJ, Tian CW, Chen XH); Department of Cardiology, The 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Cardiovascular Disease, Guangzhou 510260, China (Liu BR)
Corresponding author: Chen Xiaohui, Email: cxhg168@126.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of the polymorphisms in the promoter of ATP binding cassette transporter (ABCG1) on the transcription activity, and the relationship of the polymorphisms with the susceptibility to coronary artery disease (CAD). **Methods** A case-control study was conducted, 217 CAD patients and 142 controls were enrolled in this study. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter of ABCG1 were identified by sequencing. The promoter haplotypes of ABCG1 were determined with allele specific primer sequencing or Gene cloning sequencing. The transcription activity of the promoter haplotypes were evaluated with dual luciferase reporter system. The frequency of SNPs and haplotypes were analyzed between CAD group and the control group, premature CAD and non-premature CAD group, as well as multivessel lesion and single vessel lesion group. The frequency distribution was compared between two groups with χ^2 test or Fisher exact test. The difference of the luciferase activity was compared between groups by *t*-test or one-way analysis of variance. **Results** Only 3 SNPs were found in ABCG1 promoter sequence of about 1 000 bp upstream of the transcription start site, which are -384 (A/G), -204 (A/C) and -134 (T/G), respectively. The 3 SNPs are in strong linkage disequilibrium, Tajima's D = 2.655 ($P < 0.01$), which constituted 3 haplotypes. There was no significant difference in SNPs and haplotype frequency between the

CAD group and the normal control group, and the severity of vascular disease and the early onset of coronary heart disease were not associated with the polymorphisms in ABCG1 promoter. There was no significant difference in the transcriptional activity of the three constitutive promoter haplotypes, but the transcriptional activity was notably elevated as the GAT haplotype was mutated into GAG ($P < 0.05$). **Conclusions** The 3 SNPs identified in ABCG1 promoter region A did not alter the promoter activity. There was no significant correlation between the frequency distribution of SNPs and promoter haplotypes and the susceptibility to CAD.

【Key words】 Coronary atherosclerotic disease; ATP binding cassette transporter G1; Promoter; Single nucleotide polymorphisms; Haplotype; Linkage disequilibrium; Gene cloning; Dual luciferase reporter system

三磷酸腺苷结合盒转运体 G1 (ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1) 参与细胞内胆固醇 (cholesterol) 和磷脂 (phospholipid) 向高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 转运的过程, 从而避免胆固醇严重沉积于外周细胞, 在胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 中起重要作用^[1-2]。ABCG1 基因内或启动子区的 SNPs 与 CAD 的易感性有关^[3-4]。启动子区的 SNPs 能导致 ABCG1 的表达水平改变, 从而导致个体对 CAD 易感性的差异, 致使启动子活性下降的 SNPs 降低 CAD 的发病风险, 其主要机制可能是诱导巨噬细胞的凋亡所致^[5-6]。然而 ABCG1 存在多个转录调控区 (promoter region A, B, C 等), 对于启动子区 A 中的 SNPs 是否与 CAD 的易感性有关也有研究报道^[3], 且与冠脉病变血管数相关^[7]。但 rs1378577 是否影响 ABCG1 启动子活性, 以及在启动子 A 区是否存在其他与 CAD 易感性有关的 SNPs 尚不清楚, 本研究拟通过 Sanger 法 (双脱氧末端终止法) 测序和双萤光素酶报告基因系统鉴定 ABCG1 启动子 A 区与 CAD 易感性相关的 SNPs 和单倍型, 进一步揭示 ABCG1 参与 CAD 发生发展的分子遗传机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象 CAD 组选择 2008 年 10 月到 2009 年 11 月期间, 在广州医科大学附属第二医院、广东省人民医院心血管疾病研究所、中山大学孙逸仙纪念医院和南方医科大学珠江医院心血管内科住院行冠状动脉造影确定为 CAD 的患者 217 例, 对照组纳入同一时期在广州医科大学附属第二医院体检部健康者 142 例。所有研究对象经询问均为确定三代以内为中国南方汉族人群。

1.1.2 入组标准和排除标准 (1) CAD 入选标准: ①CAD 患者年龄 < 80 岁; ②需经冠状动脉造影显示, 在左冠状动脉主干、左前降支 (含主要

对角支)、回旋支 (含主要边缘支) 或右冠状动脉 (含后降支或左室后侧支) 中, 至少有一支血管的狭窄程度 $\geq 50\%$, 且至少 2 名副高及以上职称医师共同评判造影结果; ③CAD 患者既往通过冠状动脉造影确诊为冠状动脉狭窄程度 $\geq 50\%$, 或陈旧性心肌梗死。(2) CAD 组排除标准: 患者年龄 ≥ 80 岁者、癌症患者和多器官功能衰竭患者都不予纳入 CAD 组。(3) CAD 亚分组入选标准: 病变数为二支血管及以上者纳入多支病变组 ($n = 128$), 一支血管病变纳入单支病变组 ($n = 77$); 冠心病患者中, 男性年龄 ≤ 55 岁、女性 ≤ 65 岁纳入早发冠心病 (premature coronary heart disease, pCAD) 组, 男性 > 55 岁、女性 > 65 岁者纳入非早发冠心病 (non-premature coronary heart disease, non-pCAD) 组, pCAD 组 ($n = 121$), non-pCAD 组 ($n = 96$)。 (4) 健康人群对照组入选标准: 每年均参加健康体检, 无胸闷、胸痛症状, 无高血压病、高脂血症、糖尿病、CAD、心力衰竭、慢性肾功能不全、周围血管病、脑卒中等疾病, 无既往心电图显示心肌缺血史, 无肥胖 (腰围: 男 < 90 cm, 女 < 80 cm) 和无吸烟习惯 (即吸烟年龄 \times 每天吸烟支数 < 100); 或经冠状动脉造影显示冠状动脉血管及其主要分支血管腔无狭窄。

1.1.3 主要试剂和仪器 E-Z 96TM Blood DNA Kit (OMEGA 公司, 美国); Prime STAR Max DNA Polymerase (高保真聚合酶)、限制性内切酶: *Kpn* I 和 *Hind* III、T4 连接酶、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α (Takara 公司, 日本); 去内毒素质粒小提试剂盒 (TIANGEN 公司, 中国); 胎牛血清、高糖培养基 (Gibco 公司, 美国); 内皮细胞基础培养基 (Lonza 公司, 瑞士); Luria-Bertani 培养基 (自配); Lipofectamine 3000 (Life 公司, 美国); Dual luciferase reporter assay system (Promega 公司, 美国); VeritiTM 梯度 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, 美国); 细胞培养箱 (Thermo 公司, 美国); Berthold LB 9507 超灵敏管式发光仪 (Berthold

Technologies 公司, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 样本收集与处理 采集 CAD 患者 ($n = 217$) 和对照者 ($n = 142$) 静脉血 2 mL, EDTA 抗凝, 血液样本分装成 0.5 mL/份存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱备用。本研究已得到广州医科大学医学伦理委员会批准, 并同所有受试者签订知情同意书。采用 E-Z 96TM Blood DNA Kit 提取血液基因组, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 临床指标检查 所有受试对象均检测空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇等相关生化指标。

1.2.3 引物设计 用 NCBI 数据库中的 ABCG1 基因序列 (Accession No.: NW_004078109) 为参考序列, 利用 Primer premier 5.0 进行引物设计。扩增 ABCG1 启动子区及构建组成型启动子单倍型的引物序列如下: *Kpn* I-ABCG1, 5' -CGGGGTACCAAGAATAACA AAGC-3'; 下游引物: *Hind* III-ABCG1, 5' -CCCAAGCTTAGTGAGCAGGGTTACTAAAG-3'; 构建突变型启动子单倍型的引物包括 *Kpn* I-ABCG1、*Hind* III-ABCG1、M-P2F、M-P3R、K-P2F 和 K-P3R, 序列如下: M-P2F, 5' -GTGAGAGCTGGGTAGATTTTCCTA-3'; M-P3R, 5' -TAGGAAAATCTACCCAGCTCTCAC-3'; K-P2F, 5' -GTGACTTGGGAGGGAACAGAACTG-3'; K-P3R, 5' -CAGTTCTGTTCCCTCCCAAGTCAC-3'; 等位基因特异测序引物为: ABCG1-SEQ2R, 5' -GCAGTTCGTTCCTCA-3'。

1.2.4 PCR 扩增 反应体系: ddH₂O (双蒸水) 22.4 μL , Prime STAR Max DNA Polymerase 25 μL , 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , gDNA (10~30 ng/ μL) 1.6 μL , 总体积 50 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环, 最后 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min。

1.2.5 载体构建 利用限制性内切酶: *Kpn* I 和 *Hind* III 分别对得到组成型和突变型 ABCG1 启动子单倍型 PCR 产物和 pGL 3.0 control 载体进行酶切, 纯化后利用 T4 连接酶将 ABCG1 启动子片段定向连接到 pGL 3.0 control 载体, 从而替换掉 Luciferase 基因上游的 SV40 启动子。载体与目的基因片段连接后, 将它们的产物转入大肠杆菌感受态细胞 (DH 5 α), 涂板, 培养过夜, 挑取单个菌落于 5 mL Luria-Bertani 培养基里, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、225 r/min 振荡培养过夜, 用去内毒素质粒小提试剂盒提取质粒, 后通过测序鉴定克隆片段序列的准确性。

1.2.6 细胞培养和转染 人宫颈癌细胞 (Hela 细胞) 和人冠状动脉内皮细胞 (Human coronary artery endothelial cell, HCAEC) 分别用高糖培养基 (含 10% 胎牛血清) 和内皮细胞基础培养基 (含 2% 胎牛血清和生长因子) 培养。于转染前一天铺板, Hela 细胞和 HCAEC 分别按 5 000/cm² 和 15 000/cm² 铺板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% CO₂ 的二氧化碳培养箱培养过夜。利用 Lipofectamine 3000 将上一步中提取的 ABCG1 启动子载体质粒和 pRL-SV40 质粒共转染到 Hela 细胞及 HCAEC 中, 以 pGL3.0control 载体作为对照, 操作严格按照 lipofectamine 3000 说明书进行。

1.2.7 双萤光素酶报告基因活性分析 质粒转染细胞 48 h 后进行双萤光素酶报告基因活性分析, 具体步骤按 Dual luciferase reporter assay system 厂家说明书进行, 细胞裂解液的萤光素酶活性用 Berthold LB 9507 超灵敏管式发光仪进行测量, ABCG1 各启动子单倍型的相对活性以其对应的萤光素酶活性比内参 pRL-SV40 的萤光素酶活性, 然后除以对照 pGL 3.0 control 的萤光素酶活性的校正值。各单倍型的萤光素酶活性以 3 次独立实验的平均值为最终结果。

1.3 统计学方法及生物信息学分析

采用 clustalx 1.81 对测序的原始序列进行比对, 应用 TFSEARCH (<http://www.Cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 对 ABCG1 启动子转录因子结合位点进行预测。采用 SPSS 13.0 统计软件, 对数据进行统计。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布资料以中位数 (四分位数) [$M (P_{25}, P_{75})$] 表示。计数资料采用频数及频率 n (%) 表示。一般临床资料不符合正态分布, 采用两独立样本的 Mann-Whitney U 秩和检验进行比较。所有单倍型的萤光素酶活性均值结果均符合正态分布, 采用成组 t 检验; 对于不符合方差齐性的两组均值比较采用校正的 t 检验。多组间单倍型的萤光素酶活性均值结果比较: 如符合正态分布、方差齐性, 采用单因素方差分析; 只符合正态分布不符合方差齐性, 采用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验进行比较。采用 GraphPad Prism 6 对每种单倍型转录活性结果进行作图。两组间的等位基因、基因型及单倍型的频率分布比较: 当 $n > 40$, 采用 χ^2 检验, 当 $n < 40$, 采用 fisher 精确检验进行比较。采用 Arlequin 3.5 对所有研究对象的基因分型结果进行 Hardy -Weinberg 平衡分析。中性检验和 SNPs 位点间的连锁分析利用 DNASP 4.50 进行。

2 结果

2.1 一般临床资料

与对照组相比较, CAD 组的年龄较高, 且 CAD

组的女性比例较对照组低。相关生化指标空腹血糖、甘油三酯水平在 CAD 组增高, 而 CAD 组总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平降低 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 入组人群的基线资料
Table 1 Baseline data of the enrolled population

指标	CAD 组 ($n = 217$)	对照组 ($n = 142$)	P
男性 [例, %]	159 (73.27)	67 (47.18)	<0.01
女性 [例, %]	58 (26.73)	75 (52.82)	
年龄 [岁, $\bar{x} \pm s$]	58.00 (52.00, 68.00)	54.00 (50.75, 61.25)	0.0012
空腹血糖 [mmol/L, M (P_{25} , P_{75})]	5.59 (4.96, 6.74)	4.67 (4.38, 5.10)	<0.01
甘油三酯 [mmol/L, M (P_{25} , P_{75})]	1.44 (1.03, 1.99)	1.05 (0.82, 1.34)	<0.01
总胆固醇 [mmol/L, M (P_{25} , P_{75})]	4.42 (3.84, 5.46)	4.945 (4.58, 5.34)	0.0033
高密度脂蛋白胆固醇 [mmol/L, M (P_{25} , P_{75})]	1.02 (0.88, 1.22)	1.30 (1.13, 1.48)	<0.01
低密度脂蛋白胆固醇 [mmol/L, M (P_{25} , P_{75})]	2.64 (2.12, 3.42)	3.16 (2.70, 3.52)	0.0002

2.2 ABCG1 近端启动子 SNPs 处于强连锁不平衡

通过对 359 个个体的 ABCG1 基因近端启动子区 (约 1 000 个碱基对) 进行测序分析, 发现了 3 个 SNPs 位点, 利用 DNASP 4.50 对所有序列进行 Tajima's D 检验, Tajima's D 值为 2.655, $P < 0.01$, 提示该区域在进化过程中受到很强的自然选择压力, 3 个 SNPs 位点的等位基因频率较高且比较接近, 是受到平衡选择的显著特征。本研究中鉴定出的 3 个 SNPs 位点分别位于 ABCG1 转录子 A 转录起始位点上游 384, 204 和 134 位, 即 -384 (A/G)、-204 (A/C) 和 -134 (T/G)。对 3 个 SNPs 位点的连锁分析显示它们处于强连锁不平衡, 只组成 3 种单倍型, 即 ACG、GAT 和 GCG, 其中, -204 和 -134 位紧密连锁, 即 A-T 和 C-G 连锁。

2.3 ABCG1 启动子多态性与 CAD 的相关性分析

-384 (A/G)、-204 (A/C) 和 -134 (T/G) 等位基因频率和基因型频率分布在 CAD 组与对照组, pCAD 组与 non-pCAD 组和单支血管病变亚组与多支血管病变亚组间差异无统计学意义。单倍型 ACG、GAT 和 GCG 在 CAD 组与对照组、pCAD 组与 non-pCAD 组、单支血管病变组与多支血管病变组间中的频率分布也差异无统计学意义 (表 2~4)。

为了排除年龄、性别、吸烟、高血压、高脂血症、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、血糖和尿酸等混杂因素对结果的影响, 利用二元 Logistic 回归分析, 结果显示 CAD 与 ABCG1 启动子区多态性和单倍型没有显著相关性, ABCG1 启动子 SNPs 和启

动子单倍型没有最终进入方程。

表 2 CAD 组和对照组 ABCG1 启动子多态性的等位基因、基因型及单倍型频率比较 (例, %)

Table 2 Comparison of allele, genotype and haplotype frequencies of ABCG1 promoter polymorphisms between the CAD group and the control group (case, %)

SNPs 位点	等位基因、基因型、单倍型	CAD 组 ($n = 217$)	对照组 ($n = 142$)	χ^2 值	P 值
等位基因					
-384 (A/G)	A	87 (20.05)	56 (19.72)	0.012	1.000
	G	347 (79.95)	228 (80.28)	0.012	1.000
-204 (A/C)	A	224 (51.61)	152 (53.52)	0.251	0.647
	C	210 (48.39)	132 (46.48)	0.251	0.647
-134 (T/G)	T	224 (51.61)	152 (53.52)	0.251	0.647
	G	210 (48.39)	132 (46.48)	0.251	0.647
基因型					
-384 (A/G)	AA	7 (3.23)	7 (4.93)	-	0.419
	AG	73 (33.64)	42 (29.58)	0.651	0.488
	GG	137 (63.13)	93 (65.49)	0.208	0.649
-204 (A/C)	AA	57 (26.27)	43 (30.28)	0.688	0.407
	AC	110 (50.69)	66 (46.48)	0.609	0.435
	CC	50 (23.04)	33 (23.23)	-	1.000
-134 (T/G)	TT	57 (26.27)	43 (30.28)	0.688	0.407
	TG	110 (50.69)	66 (46.48)	0.609	0.435
	GG	50 (23.04)	33 (23.23)	-	1.000
单倍型					
	ACG	100 (23.04)	56 (19.72)	1.115	0.291
	GAT	200 (46.08)	152 (53.52)	3.801	0.051
	GCG	134 (30.88)	76 (26.76)	1.405	0.236

注: “-” 表示该组间频率分布比较的 $n < 40$, 采用 Fisher 精确检验进行比较, 无 χ^2 值

在两种细胞中 3 个组成型单倍型的转录活性之间相比较差异仍无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1B、1C)。在 HeLa 细胞中 GAG 单倍型启动子活性与其他四个单倍型活性比较, 差异皆有统计学意义 ($P < 0.01$), 另一种突变单倍型 GCT 在 heLa 细胞中的转录活性与 GCG、GAT 型单倍型活性比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 所有组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0106$) (见图 1B); 在 HCAEC 细胞中 GAG 单倍型启动子活性与 ACG、GCG、GCT 单倍型活性比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), GCT 单倍型的转录活性与组成型单倍型活性比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 所有组间比较采用单因素方差分析, 差异具有统计学意义 ($F = 4.72$, $P = 0.0063$) (见图 1C)。

为了进一步排除年龄和性别的影响, 对年龄和性别进行校正。年龄校正: 排除对照组中年龄 < 50 岁的个体, 校正后 CAD 组 [$M(P_{25}, P_{75})$, $n = 217$] 与对照组 [$M(P_{25}, P_{75})$, $n = 114$] 间年龄分布差异无统计学意义 ($P = 0.581$), 性别校正是在年龄匹配的情况下, CAD 组男性 ($n = 159$) 与对照组男性 ($n = 58$)、CAD 组女性 ($n = 58$) 与对照组女性 ($n = 56$) 分别进行比较。结果显示, CAD 男性亚组与对照组男性亚组间, 以及 CAD 女性亚组与对照组女性亚组间的 ABCG1 启动子 SNPs 频率分布差异无统计学意义, 三种启动子单倍型 GCG、GAT 和 ACG 的频率分布差异也无统计学意义 (表 5)。

2.4 单倍型启动子的转录活性比较

将含有 ACG、GAT 和 GCG 单倍型的启动子载体转染至 heLa 细胞中, 双萤光素酶报告基因系统分析显示, 各组成型启动子单倍型的启动子活性相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), (见图 1A)。但当将 GAT 单倍型-134 T 突变为 G, 得到新的单倍型 GAG; 或将 GAT 单倍型的 -204 位 A 突变为 C, 得到新单倍型 GCT, 将构建的 2 种突变启动子单倍型 GAG 和 GCT 及 3 种组成型载体 ACG、GCG 和 GAT 分别转染至 HeLa 细胞和 HCAEC 中, 利用双萤光素酶报告基因分析启动子活性。结果显示:

表 3 pCAD 组和 non-pCAD 组 ABCG1 启动子多态的等位基因、基因型及单倍型频率比较 (例, %)

Table 3 Comparison of allele, genotype and haplotype frequencies of ABCG1 promoter polymorphisms between the pCAD group and the non-pCAD group (case, %)

SNPs 位点	等位基因、基因型、单倍型	pCAD 组 (n = 121)	non-CAD 组 (n = 96)	χ^2 值	P 值
等位基因					
-384 (A/G)	A	45 (37.19)	42 (43.75)	0.719	0.401
	G	197 (81.40)	150 (78.13)	0.719	0.401
-204 (A/C)	A	127 (52.48)	97 (50.52)	0.164	0.700
	C	115 (47.52)	95 (49.48)	0.164	0.700
-134 (T/G)	T	127 (52.48)	97 (50.52)	0.164	0.700
	G	115 (47.52)	95 (49.48)	0.164	0.700
基因型					
-384 (A/G)	AA	4 (3.31)	3 (3.12)	-	1.000
	AG	37 (30.58)	36 (37.50)	-	0.313
	GG	80 (66.11)	57 (59.38)	1.045	0.307
-204 (A/C)	AA	30 (24.79)	27 (28.13)	-	0.642
	AC	67 (55.37)	43 (44.79)	2.397	0.122
	CC	24 (19.84)	26 (27.08)	-	0.256
-134 (T/G)	TT	30 (24.79)	27 (28.13)	-	0.642
	TG	67 (55.37)	43 (44.79)	2.397	0.122
	GG	24 (19.84)	26 (27.08)	-	0.256
单倍型					
	ACG	45 (37.19)	42 (43.75)	0.719	0.397
	GAT	127 (52.48)	97 (50.52)	0.164	0.685
	GCG	70 (28.92)	53 (27.60)	0.092	0.762

注: “-” 表示该组间频率分布比较的 $n < 40$, 采用 Fisher 精确检验进行比较

表 4 多支病变组和单支病变组 ABCG1 启动子多态的等位基因、基因型及单倍型频率比较 (例, %)

Table 4 Comparison of allele, genotype and haplotype frequencies of ABCG1 promoter polymorphisms between the multiple vessel disease group and the single vessel disease group (case, %)

SNPs 位点	等位基因、基因型、单倍型	多支病变组 (n = 128)	单支病变组 (n = 77)	χ^2 值	P 值
等位基因					
-384 (A/G)	A	54 (42.19)	26 (33.77)	-	0.368
	G	202 (78.91)	128 (83.12)	-	0.368
-204 (A/C)	A	131 (51.17)	82 (53.25)	0.166	0.684
	C	125 (48.83)	72 (46.75)	0.166	0.684
-134 (T/G)	T	131 (51.17)	82 (53.25)	0.166	0.684
	G	125 (48.83)	72 (46.75)	0.166	0.684
基因型					
-384 (A/G)	AA	4 (3.12)	2 (2.60)	-	1.000
	AG	46 (35.94)	22 (28.57)	-	0.289
	GG	78 (60.94)	53 (68.83)	1.299	0.254
-204 (A/C)	AA	34 (26.56)	21 (27.27)	-	1.000
	AC	63 (49.22)	40 (51.95)	0.143	0.705
	CC	31 (24.22)	16 (20.78)	-	0.611
-134 (T/G)	TT	34 (26.56)	21 (27.27)	-	1.000
	TG	63 (49.22)	40 (51.95)	0.143	0.705
	GG	31 (24.22)	16 (20.78)	-	0.611
单倍型					
	ACG	55 (42.97)	38 (49.35)	-	0.467
	GAT	131 (51.17)	82 (53.25)	0.166	0.684
	GCG	70 (27.34)	34 (22.08)	-	0.244

注: “-” 表示该组间频率分布比较的 $n < 40$, 采用 Fisher 精确检验进行比较

表 5 校正年龄和性别后的各亚组间的等位基因、基因型及单倍型频率比较 (例, %)

Table 5 Comparison of allele, genotype and haplotype frequencies of ABCG1 promoter polymorphisms between the subgroups after adjustment for age and gender (case, %)

SNPs 位点	等位基因、基因型、单倍型	CAD 组 (n=217)	对照组 (n=114)	χ^2 值	P 值
女性亚组					
等位基因					
-384 (A/G)	A	22 (10.14)	18 (16.07)	-	0.605
	G	94 (43.31)	94 (83.93)	-	0.605
-204 (A/C)	A	55 (25.34)	58 (51.79)	0.436	0.596
	C	61 (28.11)	54 (48.21)	0.436	0.596
-134 (T/G)	T	55 (25.34)	58 (51.79)	0.436	0.596
	G	61 (28.11)	54 (48.21)	0.436	0.596
基因型					
-384 (A/G)	AA	1 (0.46)	2 (3.57)	-	0.615
	AG	20 (9.22)	14 (12.50)	-	0.310
	GG	37 (17.05)	40 (35.43)	-	0.428
-204 (A/C)	AA	11 (5.07)	15 (13.21)	-	0.376
	AC	33 (15.16)	28 (24.56)	-	0.573
	CC	14 (6.45)	13 (11.40)	-	1.000
-134 (T/G)	TT	11 (5.07)	15 (13.21)	-	0.376
	TG	33 (15.16)	28 (24.56)	-	0.573
	GG	14 (6.45)	13 (11.40)	-	1.000
单倍型					
	GCG	39 (17.97)	36 (31.58)	-	0.888
	GAT	55 (25.34)	58 (51.79)	0.436	0.509
	ACG	22 (10.14)	18 (16.07)	-	0.605
男性亚组					
等位基因					
-384 (A/G)	A	65 (30.41)	27 (23.28)	-	0.510
	G	253 (117.59)	89 (76.72)	-	0.510
-204 (A/C)	A	169 (78.34)	63 (54.31)	0.046	0.829
	C	149 (69.04)	53 (45.69)	0.046	0.829
-134 (T/G)	T	169 (78.34)	63 (54.31)	0.046	0.829
	G	149 (69.04)	53 (45.69)	0.046	0.829
基因型					
-384 (A/G)	AA	6 (2.78)	4 (6.90)	-	0.463
	AG	53 (24.42)	19 (16.67)	-	1.000
	GG	100 (46.80)	35 (30.34)	-	0.753
-204 (A/C)	AA	46 (21.23)	19 (16.67)	-	0.617
	AC	77 (35.48)	25 (21.84)	-	0.540
	CC	36 (16.59)	14 (12.14)	-	0.856
-134 (T/G)	TT	46 (21.23)	19 (16.67)	-	0.617
	TG	77 (35.48)	25 (21.84)	-	0.540
	GG	36 (16.59)	14 (12.14)	-	0.856
单倍型					
	GCG	84 (38.71)	26 (22.41)	-	0.455
	GAT	169 (78.34)	63 (54.31)	0.046	0.829
	ACG	65 (30.41)	27 (23.28)	-	0.510

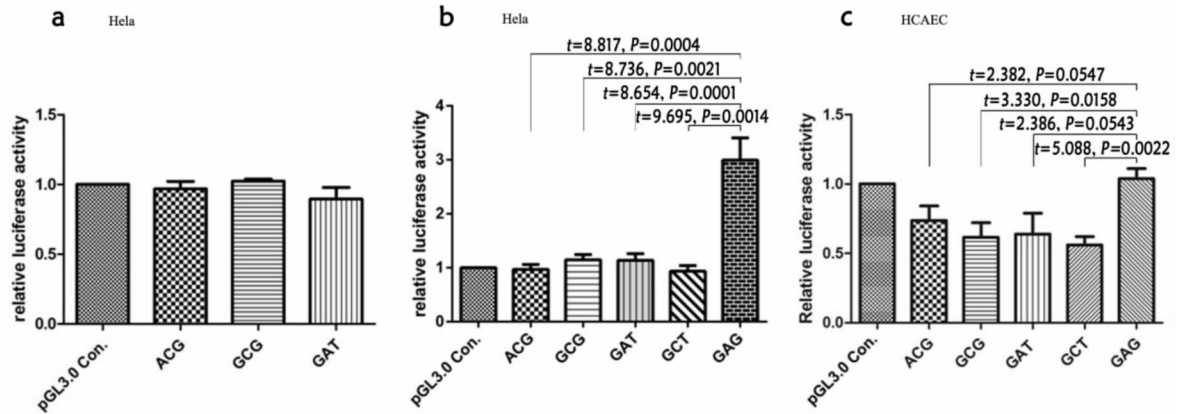
注：“-”表示该组间频率分布比较的 $n < 40$ ，采用 Fisher 精确检验进行比较

3 讨论

CAD 是一种严重危害人类健康的疾病，动脉粥样硬化的形成是由多方面因素所致^[8]，其主要病理变化为动脉管壁沉积的粥样斑块，胆固醇和胆固醇酯则是构成粥样斑块的主要成分^[9-10]。ABCG1 蛋白不仅在富脂的单核巨噬细胞中高表达，在动脉内皮细胞中也高表达^[11]。单核巨噬细胞和动脉内皮细胞内的胆固醇变化会影响细胞的正常生理功能，如当巨噬细胞内胆固醇过高时，巨噬细胞会转变为泡沫细胞，参与动脉粥样硬化的发生；而内皮细胞的胆固醇增高会降低内皮细胞内的一氧化氮合酶活性和增加内皮细胞炎症反应，参与动脉粥样硬化的发生^[12]，所以影响 ABCG1 基因表达的因素将导致 CAD 易感性的差异。既往许多研究已证实 ABCG1 基因内或启动子区的 SNPs 与 CAD 的易感性有关，尽管 ABCG1 在 CAD 发生发展中的角色尚存在争议^[13]。SNPs 是近年来研究发展的最有潜力的第三代分子标记，充分反映了不同个体间的遗传差异，具有数量多、分布广及遗传稳定性强等特点，目前已广泛应用于生物、生物进化、群体遗传学、疾病等领域研究中^[14]。Liu 等^[15]发现 ABCG1 启动子 SNPs (rs57137919 G > A) A 等位基因携带者 ABCG1 表达水平明显下降，与 CAD 易感性降低有关。

本研究中 -134 (T/G) 即为数据库中的 SNPs (rs1378577)，王延凤等^[3]曾报道 rs1378577 位点 A/C 基因多态性可能与中国人群心肌梗死有关联，C 等位基因型携带者增加了心肌梗死风险。本研究中未观察到 -134G (rs1378577C) 与 CAD 的易感性、早发 CAD 及血管多支病等间的相关性，这与启动子活性检验结果相互印证。王延凤等^[3]发现 rs1378577 C 等位基因增加 MI 的发生风险，但未检测附近其他 SNPs 位点，如果他们的研究中 MI 患者中较多个体 rs1378577C 与 -204T、-384C 组成单倍型 CTC (即本研究中的 GAG 单倍型，本研究中为正义链)，ABCG1 的表达水平将升高，发生 CAD 的风险升高，这与 Liu 等^[15]的研究结果一致。

ABCG1 有 7 种不同的变异体，其中变异体 5 和变异体 6 都是由最上游启动子 (启动子 A) 调控，转录后选择性剪接所得；变异体 7 和变异体 4 则有不同启动子调控区，变异体 4 的启动子区位于变异体 5 的第 2 内含子中^[16-17]。本研究中的启动



“pGL 3.0 con”表示“pGL 3.0 control”的荧光值。A：表示3个 ABCG1 启动子单倍型在 HeLa 细胞中的转录活性；B：表示各 ABCG1 启动子单倍型及突变单倍型在 HeLa 细胞中的转录活性；C：表示各 ABCG1 启动子单倍型及突变单倍型在 HCAEC 中的转录活性

图1 各 ABCG1 启动子单倍型及突变单倍型在 HeLa 细胞和/HCAEC 中的转录活性

Fig 1 Transcriptional activity of ABCG1 promoter and mutant haplotype in HeLa cell and /HCAEC

子区为变异体5、6的启动子（启动子A），编码最长的转录本，而Liu等发现的影响启动子活性且与CAD易感性有关的SNPs（rs57137919G>A）则位于变异体4的启动子内。变异体4和其他变异体相比，不但前导肽不同，在功能区（268-277位）还有一段9个氨基酸的插入缺失，可见不同变异体在细胞间的定位和功能可能有差异，检测不同变异体的表达水平差异与CAD易感性的关系，也许可以进一步揭示ABCG1参与CAD发生发展的分子遗传机制。

有研究报道发现ABCG1启动子区-257T>G位点上，携带G等位基因可能会增加CAD多支病变的风险^[4]；Schou等^[6]报道ABCG1启动子区SNPs位点-376C>T可能与心肌梗死、缺血性心脏病发病增加相关；笔者前期研究发现在隐性遗传模型下，rs1378577A/C与CAD多支血管病变相关^[7]。以上研究发现的CAD相关SNPs较少重复，不同的SNPs可能位于ABCG1的不同启动子区，调控不同的变异体。对于哪一个ABCG1变异体在细胞功能中发挥主导作用，哪一个启动子发挥主要调控作用，以及在不同人种间ABCG1的主要调控子是否不同也需要进一步研究。

本研究在ABCG1启动子A中发现3个SNPs位点，3个SNPs位点强连锁不平衡，只组成3种启动子单倍型，而且三种启动子单倍型的转录活性无统计学意义。但将组成型单倍型GAT突变为GAG后，转录活性升高1倍以上。在3个SNPs位点间，-204A和-134T，-204C和-134G紧密连锁，

如果两位点间发生重组，与-384（A/G）中的G形成GAG和GCT单倍型，GAG导致启动子活性大大升高，然而，本研究在359例受试者中并未发现GAG单倍型，Liu等^[15]发现高表达ABCG1可诱导细胞凋亡，提示高转录活性的GAG单倍型可能不利于本研究群体个体的生长发育，在长期进化过程中逐渐被淘汰。核苷酸序列分析Tajima's D值=2.655，提示该启动子区受到强自然选择压力，ABCG1的表达可能受到稳定性选择压力，因此，笔者推测ABCG1可能在个体发育中也扮演重要角色。

总之，ABCG1启动子A内的3个SNPs[-384（A/G）、-204（A/C）和-134（T/G）]的基因型、等位基因及单倍型的频率在CAD与对照组及各CAD亚组间分布无统计学意义，与CAD的易感性无显著相关性，3个单倍型对启动子转录活性无显著影响。

参考文献

- [1] Tarling EJ. Expanding roles of ABCG1 and sterol transport [J]. *Curr Opin Lipido*, 2013, 24 (2): 138-146. DOI: 10.1097/MOL.0b013e32835da122.
- [2] Demina EP, Miroshnikova VV, Schwarzman AL. Role of the ABC transporters A1 and G1, key reverse cholesterol transport proteins, in atherosclerosis [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2016, 50 (2): 223-230. DOI: 10.7868/S002689841602004X.
- [3] 王延凤, 陈敬洲, 王曙霞, 等. ABCG1启动子区基因多态性与心肌梗死有关联[J]. *心脏杂志*, 2008; 67 (3): 309-312. DOI: 10.13191/j.chj.2008.03.67.wangyf.012.
- [4] Furuyama S, Uehara Y, Zhang B, et al. Genotypic Effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery

- disease severity in Japanese men [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2009, 16 (3): 194-200. DOI: 10. 5551/jat. E380.
- [5] Xu Y, Wang W, Zhang L, et al. A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219 (2): 648-654. DOI: 10. 1016/j. atherosclerosis. 2011. 05. 043.
- [6] Schou J, Frikke-Schmidt R, Kardassis D, et al. Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2012, 32 (2): 506-515. DOI: 10. 1161/ATVBAHA. 111. 234872.
- [7] 田朝伟, 莫沛, 李爱群, 等. ABCG1 基因启动子区多态性与中国南方汉族人群冠心病多支血管病变的相关性 [J]. *中国急救医学*, 2015 (7): 619-622, 623. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-1949. 2015. 07. 001.
- [8] 路亚枫, 吕树铮, 陈韵岱, 等. 冠心病临界病变患者血管因子与冠脉斑块形态学特征的相关性研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24 (3): 267-272. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2015. 03. 008.
- [9] 王越越, 汪琦瑛, 韩国鑫, 等. 青年冠心病患者临床特点及危险因素分析 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24 (4): 386-390. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2015. 04. 010.
- [10] Yao H, Sun T, Wan Y, et al. Domestic versus imported drug-eluting stents for the treatment of patients with acute coronary syndrome [J]. *World Journal Emerg Med*, 2014, 5 (3): 175. DOI: 10. 5847/wjem. j. issn. 1920-8642. 2014. 03. 003.
- [11] Westerterp M, Koetsveld J, Yu S, et al. Increased atherosclerosis in mice with vascular ATP-binding cassette transporter G1 deficiency--brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (11): 2103-2105. DOI: 10. 1161/ATVBAHA. 110. 212985.
- [12] Westerterp M, Tsuchiya K, Tattersall IW, et al. Deficiency of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Endothelial Cells Accelerates Atherosclerosis in Mice [J]. *Arterioscler, Thromb Vasc Biol*, 2016, 36 (7): 1328-1337. DOI: 10. 1161/ATVBAHA. 115. 306670.
- [13] Meurs I, Lammers B, Zhao Y, et al. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221 (1): 41-47. DOI: 10. 1016/j. atherosclerosis. 2011. 11. 024.
- [14] Peng L, Li J, Zhou G, et al. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and septic shock in a Chinese Han population [J]. *World J Emerg Med*, 2015, 6 (2): 123. DOI: 10. 5847/wjem. j. 1920-8642. 2015. 02. 007.
- [15] Liu F, Wang W, Xu Y, et al. ABCG1 rs57137919G > A; a polymorphism is functionally associated with varying gene expression and apoptosis of macrophages [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e97044. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0097044.
- [16] Langmann T, Porsch-Ozcurumez M, Unkelbach U, et al. Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1494 (1/2): 175-180. DOI: 10. 1016/S0167-4781 (00) 00215-3.
- [17] Lorkowski S, Rust S, Engel T, et al. Genomic sequence and structure of the human ABCG1 (ABC8) gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280 (1): 121-131. DOI: 10. 1006/bbrc. 2000. 4089.

(收稿日期: 2017-02-10)

(本文编辑: 何小军)

读者 · 作者 · 编者

World Journal of Emergency Medicine 被 ESCI 收录

World Journal of Emergency Medicine 于 2010 年由浙江大学医学院附属第二医院创办, 季刊, 报道内容为国内外急诊医学及相关学科的研究报道、最新进展、临床观察与经验总结、病例报告等。期刊网站 (<http://www.wjem.org>) 提供全文免费开放获取, 欢迎下载阅读。

杂志编委会总成员数为 81 位, 国际编委比例 58%, 主要来自美国、英国、德国、新加坡、土耳其、马来西亚、韩国、印度等国家和地区。期刊国际稿源呈逐年上升趋势, 2013 年、2014 年国际稿源占总稿源的 50%; 2015 年、2016 年国际稿源占总稿源的 90%。

期刊目前采用国际先进的在线投审稿系统——ScholarOne Manuscripts。

近年来, 期刊的国际影响力不断上升。目前已被以下国内外数据库收录: Emerging Sources Citation Index (ESCI), PubMed, Pubmed Central, Google Scholar, Chemical Abstracts, VINITI database, EBSCO, Directory, J-Gate, EMBASE and EMCare, Ulrich's Periodicals, 清华万方数据库等。