

学校代码: 10023
学 号: B2009082

博 士 学 位 论 文

pre-miRNA 遗传多态与冠心病的关联研究及
首钢男性人群总胆固醇水平与高血压对致死性
心血管疾病综合作用的前瞻性研究

所 院: 阜外心血管病医院

研 究 生: 杨 英

导 师: 顾东风教授

导师小组: 黄建凤教授 陈兰英教授

专 业: 遗传学

研究方向: 心血管遗传流行病学

完成日期: 二〇一二年五月



目 录

缩略语表.....	2
中文摘要.....	4
ABSTRACT.....	8
前言.....	12
第一部分 中国汉族人群 pre-miRNA 常见遗传多态与冠心病的关联研究.....	14
一、 背景与目的.....	14
二、 对象及方法.....	16
三、 结果.....	26
四、 讨论.....	32
五、 小结.....	35
参考文献.....	36
第二部分 首钢男性人群总胆固醇水平与高血压对致死性心血管疾病综合作用的前瞻性研究.....	40
一、 背景与目的.....	40
二、 对象及方法.....	40
三、 结果.....	42
四、 讨论.....	48
五、 小结.....	49
参考文献.....	50
第三部分 PPARGC1A 基因多态性与 2 型糖尿病关联研究的 meta 分析.....	53
一、 背景与目的.....	53
二、 对象和方法.....	54
三、 结果.....	55
四、 讨论.....	65
五、 小结.....	66
参考文献.....	67
文献综述 microRNA 在心血管疾病中的作用.....	72
致谢.....	86
个人简历.....	87
博士期间发表论文.....	88

缩略语表

(Abbreviations)

缩略语	英文	中文
ANXA1	Annexin A1	膜联蛋白 A1
AP	Attributable proportion	归因百分比
BMI	Body mass index	体重指数
CHB	Han Chinese in Beijing	中国北京汉族人群
CHD	Coronary heart disease	冠状动脉粥样硬化性心脏病
CI	Confidence interval	可信区间
COX-2	Cyclooxygenase-2	环氧酶-2
CVD	Cardiovascular disease	心血管疾病
DBP	Diastolic blood pressure	舒张压
Glu	Glucose	葡萄糖
GLU4	Glucose transporter 4	葡萄糖转运子 4
GWAS	Genome-wide association study	全基因组关联研究
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol	高密度脂蛋白胆固醇
HOXA9	Homeobox A9 gene	同源盒 A9 基因
HR	Hazard ratio	风险比
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium	Hardy-Weinberg 平衡
ICAM-1	Intercellular adhesive molecule-1	细胞间黏附分子-1
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇
MAF	Minor allele frequency	少见等位基因频率
MEF2C	Muscle enhance factor 2C	肌肉增强因子 2C
MI	Myocardial infarction	心肌梗死
OR	Odds ratio	比值比
PGE2	Prostaglandin E2	前列腺素 E ₂

PPARGC1A	Peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1 α	过氧化物酶体增殖活化受体 γ 协同激活因子 1 α
RERI	Relative excess risk due to interaction	交互作用超额相对危险度
SBP	Systolic blood pressure	收缩压
SI	Synergy index	协同指数
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
T2DM	Type 2 diabetes mellitus	2 型糖尿病
TC	Total cholesterol	总胆固醇
TG	Triglycerides	甘油三酯
VCAM-1	Vascular cell adhesive molecule -1	血管细胞黏附分子-1

中文摘要

第一部分：中国汉族人群 pre-miRNA 常见遗传多态与冠心病的关联研究

背景和目的

近年来大量研究表明 microRNAs (miRNAs) 在机体多个生理和病理过程中发挥着广泛而重要的作用。miRNAs 前体 (pre-miRNAs) 上的常见单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 在 miRNA 形成过程中可能具有重要的调控作用, 可通过改变成熟 miRNAs 的表达水平, 调控靶基因的表达, 从而影响疾病的易感性。既往研究已经发现一些 pre-miRNAs 编码序列上的 SNPs 位点与肿瘤疾病的易感性密切相关, 但其与冠状动脉粥样硬化性心脏病 (CHD) 之间的关联尚不明确。本研究旨在检验 pre-miRNAs 上的常见遗传多态与中国汉族人群 CHD 的关联性。

对象和方法

本研究采用两阶段的病例对照研究设计来探究 pre-miRNAs 上的常见遗传多态与 CHD 的关联。两阶段共入选 2772 名 CHD 患者和 2788 名年龄、性别匹配的对照个体。本研究利用生物信息学的方法筛选得到 6 个 SNPs 位点, 分别为 hsa-mir-196a2 rs11614913、hsa-mir-27a rs895819、hsa-mir-499 rs3746444、hsa-mir-146a rs2910164、hsa-mir-423 rs6505162 以及 hsa-mir-492 rs2289030。使用 ABI 7900 高通量实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 7900 fast Real-Time PCR System) 进行基因型鉴定。第一阶段, 在 853 名 CHD 患者和 948 名对照个体中对所有入选 SNPs 位点进行基因型鉴定, 检验 SNP 位点与 CHD 风险的关联; 第二阶段, 对第一阶段发现的与 CHD 风险相关联的 SNPs 位点在另一独立的更大规模病例对照人群 (1919 名 CHD 患者和 1840 名对照个体) 中进一步进行基因型鉴定。合并两阶段数据后分析这些位点变异与 CHD 之间的关联。应用非条件 Logistic 回归模型, 校正协变量 (包括年龄、性别、BMI 水平、HDL-C 水平、TG 水平、是否患有高血压、糖尿病以及吸烟、研究状态) 后, 以检验多态位点与 CHD 的关联性。采用分层分析的方法, 在不同重要表型的人群中检验这些位点与 CHD 的关联, 探测这些表型与遗传多态对 CHD 风险的影响是否存在交互作用。

结果

第一阶段结果显示, 在所有 6 个 SNPs 位点 (rs11614913、rs3746444、rs2910164、rs895819、rs2289030 和 rs6505162) 中, 只有 pre-miRNA-196a2 上的 SNP rs11614913 T>C 与 CHD 发病风险的关联趋于统计学显著性 ($P=0.05$), 进入第二阶段研究。合并两阶段数据进行分析, 结果显示, 经多因素调整后 SNP rs11614913 与 CHD 发病风险的关联仍具有统计学意义, 其比值比 (Odds ratio, OR) 为 1.17 (95%CI 1.01-1.36, $P=0.039$)。分层分析结果表明, 在吸烟人群和高血压人群中, rs11614913 位点变异与 CHD 发病风险的关联达到统计学显著性, OR 值分别为 1.23(95%CI 1.03-1.47, $P=0.023$)和 1.23(95%CI 1.02-1.49, $P=0.034$); 而在不吸烟人群和正常血压人群中, 该位点变异与 CHD 发病风险的关联不具有统计学意义, 这些发现提示 rs11614913 位点的 C 等位基因可以增加吸烟人群或高血压人群发生 CHD 的风险。

结论

本研究发现 hsa-mir-196a2 rs11614913 T>C 多态与中国汉族人群的 CHD 发病风险相关联。pre-miRNA196a2 编码序列上的常见 SNP 变异是一个新的冠心病易感标记, 该研究结果将为更深入地理解和研究冠心病的遗传发病机制提供新的线索。

关键词: 冠心病; microRNAs; 单核苷酸多态性; 遗传易感性

第二部分: 首钢男性人群总胆固醇水平与高血压对致死性心血管疾病综合作用的前瞻性研究

背景和目的

血压升高和总胆固醇 (TC) 水平升高是两个非常重要的心血管疾病 (CVD) 危险因素。高血压和高胆固醇血症经常同时出现, 并且罹患高胆固醇血症会增加高血压患者的死亡风险。近年来, 我国已在人群中广泛开展了 TC 水平或高血压与 CVD 的相关性研究, 然而 TC 水平升高与高血压对致死性 CVD 的影响是否存在协同作用仍有待于进一步研究。本研究旨在确证 TC 水平升高与高血压对致死性 CVD 的发生是否存在交互作用, 并进一步探讨其作用强度。

对象和方法

本研究采用前瞻性队列研究的方法, 对 1974-1980 年在北京首都钢铁公司入

选的 5092 名 18-74 岁男性工人进行随访。本次随访研究于 2001 年进行, 以 CVD 死亡为队列研究的观察终点, 包括随访期间因急性心肌梗死、缺血性心脏骤停、慢性冠心病、中风、心力衰竭及其他心血管病导致的死亡, CVD 死亡诊断依据国际疾病分类编码 ICD-9 确定 (ICD-9: 390.9-398.9, 401.0-429.9, 和 430.0-348.9)。截至 2001 年共记录致死性 CVD 302 例, 平均随访 20.84 年。应用 Cox 比例风险回归模型估计 TC 水平升高和高血压对致死性 CVD 发病风险的作用, 并采用加性交互作用模型评估 TC 水平升高与高血压之间的交互作用对 CVD 死亡风险的影响。

结果

高胆固醇血症和高血压与致死性 CVD 发病风险的增加相关联, CVD 死亡的风险比 (Hazard ratio, HR) 分别为 1.67 (95%CI 1.18-2.38, $P=0.004$) 和 2.91 (95%CI 2.23-3.80, $P<0.001$)。与正常血压和 TC<240mg/dl 的人群相比, 高胆固醇血症和高血压人群 CVD 死亡的 HR 分别为 1.11 (95%CI 0.56-2.21, $P=0.767$) 和 2.74 (95%CI 2.07-3.64, $P<0.001$), 而同时具有上述两种危险因素的人群其 HR 为 5.51 (95%CI 3.58-8.46, $P<0.001$)。本研究发现高胆固醇血症与高血压对 CVD 死亡风险存在生物学交互作用, 其交互作用超额相对危险度 (relative excess risk due to the interaction, RERI) 为 2.65 (95%CI 0.45-4.85), 归因百分比 (attributable proportion, AP) 为 48.2% (95%CI 23.7%-72.7%), 协同指数 (synergy index, SI) 为 2.43 (95%CI 1.25-4.71)。当 TC 水平切点由 240mg/dl 降至 220mg/dl, 其 RERI、AP 和 SI 分别降至 1.86 (95%CI 0.46-3.26), 42.6% (95%CI 20.1%-65.2%) 和 2.24 (95%CI 1.21-4.13)。当 TC 水平切点降至 200mg/dl 时, 未发现 TC \geq 200mg/dl 与高血压对致死性 CVD 发生风险存在交互作用。

结论:

本研究发现在中国男性人群中, 除单纯由总胆固醇水平升高或高血压所导致的 CVD 死亡风险升高以外, 总胆固醇水平升高与高血压之间存在加性交互作用, 且与致死性 CVD 的发病风险相关联。该结论提示, 对于此两种危险因素的联合预防与治疗会更好降低致死性 CVD 的发病风险, 从而降低人群 CVD 死亡率。

关键词: 胆固醇; 队列研究; 致死性心血管疾病; 高血压

第三部分：PPARGC1A 基因多态性与 2 型糖尿病关联的 meta 分析

背景和目的

世界范围内包括欧洲白人和亚洲人群已有多个研究报道了过氧化物酶体增殖活化受体 γ 协同激活因子-1 α (PPARGC1A) 基因单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的关系, 但其结果不尽一致。本研究运用 meta 分析的方法综合评价 PPARGC1A 基因多态性与 T2DM 的关联性。

对象和方法

本研究通过网络数据库文献检索的方式收集数据, 在加性遗传模型下探讨 PPARGC1A 基因的 3 个 SNPs 位点 (Gly482Ser、Thr394Thr、Thr612Met) 与 T2DM 的关联关系。当纳入的研究间存在显著异质性时, 采用随机效应模型分析合并结果, 并根据种族属性进一步进行亚组分析。

结果

通过检索 Medline、维普和中国生物医学文献数据库, 共纳入了 23 个独立的病例对照研究。其中, 有 7539 名 T2DM 病例和 9562 名对照个体纳入 Gly482Ser 位点的研究; 1818 名 T2DM 病例和 2376 名对照个体纳入 Thr394Thr 位点的研究; 2042 名 T2DM 病例和 1289 名对照个体纳入 Thr612Met 位点的研究。总体随机效应模型分析检验发现 Gly482Ser 和 Thr394Thr 位点与 T2DM 的关联关系达到统计学显著性, OR 值分别为 1.19 (95%CI 1.05-1.34, $P=0.006$) 和 1.33 (95%CI 1.04-1.70, $P=0.024$), 但研究间存在异质性。亚组分析结果显示, 在印度人群中上述两个 SNP 位点与 T2DM 的关联均达到统计学显著性, OR 值分别为 1.66 (95%CI 1.28-2.15, $P<0.001$) 和 1.72 (95%CI 1.45-2.03, $P<0.001$), 但在欧洲白人和东亚人群中此两个位点与 T2DM 的关联均未达到统计学显著性。

结论:

meta 分析结果提示 PPARGC1A 基因的 Gly482Ser 和 Thr394Thr 位点变异与 T2DM 发病风险相关联, 特别是在印度人群中; 而 Thr612Met 位点变异与 T2DM 风险的关联未达到统计学显著性。

关键词: PPARGC1A; 2 型糖尿病; 多态性; meta 分析

ABSTRACT

The first part: Common genetic variations in pre-miRNAs and the risk of coronary heart disease in a Chinese Han population

Backgrounds and objectives:

MicroRNAs (miRNAs) have been found to play pervasive roles in various basic biological and pathological processes. Common single nucleotide polymorphisms (SNPs) in pre-miRNAs may function as regulatory factors to alter miRNA expression so as to affect disease susceptibility. Several SNPs in pre-miRNAs have been found to be associated with susceptibility to human cancers. However, the association between miRNA related SNPs and coronary heart disease (CHD) remains uncertain. The objective of this study is to examine the association between common SNPs in pre-miRNAs and CHD in Chinese Han population.

Subjects and Methods:

We designed a two-stage case-control study to investigate whether common SNPs in pre-miRNAs are associated with CHD in a Chinese Han population. A total of 5560 subjects (2772 CHD cases and 2788 controls) were included in this study. Six SNPs including hsa-mir-196a2 rs11614913, hsa-mir-27a rs895819, hsa-mir-499 rs3746444, hsa-mir-146a rs2910164, hsa-mir-423 rs6505162 and hsa-mir-492 rs2289030, were selected using bioinformatic method. Genotypes of selected SNPs were determined by TaqMan SNP allelic discrimination. In stage 1, all the SNPs were genotyped in a case-control sample (853 CHD cases and 948 controls). The associations between SNPs and CHD risk were examined. In stage 2, the SNPs significantly associated with CHD were further genotyped in another large case-control sample (1919 CHD cases and 1840 controls). The statistical analysis was then performed in the total 5560 subjects. Odds ratios (OR) were estimated by logistic regression model adjusted for multivariates. Stratified analysis method was used to investigate association between SNPs and CHD in the subjects with different clinical traits, and further detect the possible interactive effects between such clinical traits and SNPs on CHD risk.

Results:

In stage 1, among six SNPs, including rs11614913, rs3746444, rs2910164, rs895819, rs2289030 and rs6505162, only rs11614913 T>C in pre-miRNA-196a2

showed a marginal significant association with CHD ($P=0.05$). In stage 2, the marker rs11614913 remained significantly associated with the increased CHD risk under dominant genetic model after multivariate adjustment, with adjusted OR 1.17 (95%CI 1.01-1.36). Stratified analysis showed that SNP rs11614913 was significantly associated with the risk of CHD in smokers or hypertension patients, with adjusted ORs 1.23 (95%CI 1.03-1.47) and 1.23 (95%CI 1.02-1.49), respectively. No significant association was found in nonsmokers or normotensive groups. The rs11614913 C allele significantly increased the risk of CHD among smokers or hypertension patients in Chinese Han population.

Conclusions:

Our study indicates that the common genetic variant rs11614913 T>C in pre-miRNA-196a2 is associated with an increased risk of CHD. These results may provide a novel genetic susceptibility marker for CHD and lead to a better understanding of CHD pathophysiology.

Keywords: Coronary heart diseases; microRNAs; Polymorphism; Genetic susceptibility

The second part: Combined effect of elevated total cholesterol level and hypertension on the risk of fatal cardiovascular disease: a cohort study in Chinese steelworkers

Background and objective:

Increased blood pressure and elevated total cholesterol (TC) level are two most important modifiable risk factors of cardiovascular disease (CVD) in the world. Hypertension and hypercholesterolemia co-exist more often than would be expected. Whether there is a synergistic impact on fatal CVD between elevated TC and hypertension need to be further examined in Chinese population.

Subjects and Methods:

We conducted a cohort study which recruited 5092 Chinese male steelworkers aged 18–74 years in 1974–1980 and followed up for an average of 20.84 years. The follow-up study was carried out in 2001, with CVD death as the end point of

observation in this study. Fatal CVD outcomes included deaths caused by acute myocardial infarction, cardiac arrest, heart failure, stroke and other CVD deaths (ICD-9 390.9 to 398.9, 401.0 to 429.9, and 430.0 to 438.9) among the participants without history of CVD. Totally 302 fatal CVD outcomes were documented by the year of 2001. Cox proportional hazards regression models were undertaken to adjust for baseline variables with fatal CVD as the outcome variable. Additive interaction model was used to evaluate the interaction between elevated TC and hypertension.

Results:

Hypercholesterolemia and hypertension were significantly associated with an increased hazard ratio (HR) of fatal CVD, 1.67 (95%CI 1.18–2.38, $P=0.004$) and 2.91 (95%CI 2.23–3.80, $P<0.001$) respectively. Compared to participants with normotension and TC < 240 mg/dl, the HR was 1.11 (95%CI 0.56–2.21, $P=0.767$) for hypercholesterolemia, 2.74 (95%CI 2.07–3.64, $P<0.001$) for hypertension, and 5.51 (95%CI 3.58–8.46, $P<0.001$) for participants with both risk factors, respectively. There was an additive interaction with a 2.65 (95%CI 0.45–4.85) relative excess risk due to the interaction (RERI) between hypercholesterolemia and hypertension on fatal CVD. The attributable proportion (AP) was 48.2 (95%CI 23.7%–72.7%), and the synergy index (SI) was 2.43 (95%CI 1.25–4.71). When the cut point of TC level decreased from 240mg/dl to 220mg/dl, the RERI, AP and SI decreased to the 1.86 (95%CI 0.46–3.26), 42.6 (95%CI 20.1%–65.2%) and 2.24 (95%CI 1.21–4.13) respectively. When the cut point of TC level decreased to 200mg/dl, no significantly additive interaction was found between TC \geq 200mg/dl group and hypertension

Conclusions:

Our study identified an additive interaction due to elevated TC level and hypertension on the risk of fatal CVD, besides a conventional main effect derived from either of them. These results highlights that the prevention and treatment of both risk factors might improve the individual risk profile thus reduce the CVD mortality.

Key words: Cholesterol; Cohort study; Cardiovascular disease; Hypertension

The third part: Association between variants in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha gene and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis

Background and objective:

The association between polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha gene (*PPARGC1A*) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) has been investigated in several studies, but these studies rendered contradictory results. We conducted a meta-analysis to assess the association between three polymorphisms (Gly482Ser, Thr394Thr, and Thr612Met) in *PPARGC1A* gene and T2DM.

Subjects and Methods:

Literature-based searching was conducted to collect data. The additive model was chosen to investigate the association between three polymorphisms and T2DM. Random effects model was used if there was heterogeneity between studies. In addition, subgroup meta-analyses were made according to the ethnic groups.

Results:

Twenty-three studies were enrolled in this meta-analysis (7539 cases and 9562 controls for Gly482Ser, 1818 cases and 2376 controls for Thr394Thr, 2042 cases and 1289 controls for Thr612Met). In the combined analysis of all eligible studies, a significant association was found between Gly482Ser, Thr394Thr and T2DM with pooled ORs 1.19 (95%CI 1.05-1.34) and 1.33 (95%CI 1.04-1.70), respectively, but large heterogeneity was found between studies. In the subgroup meta-analyses, we found that Gly482Ser and Thr394Thr polymorphisms were associated with the risk of T2DM, and the pooled ORs were 1.66 (95%CI 1.28-2.15) and 1.72 (95%CI 1.45-2.03) in Indian population, respectively, but no significant evidence was found in either Caucasian or East Asian population.

Conclusions:

This meta-analysis indicated that Gly482Ser and Thr394Thr polymorphisms of *PPARGC1A* were significantly associated with the risk of T2DM, especially in Indian population. No such relationship was found between the Thr612Met and risk of T2DM.

Key words: *PPARGC1A*; Type 2 diabetes mellitus; Polymorphism; Meta-analysis

前言

世界卫生组织 (world health organization, WHO) 2011 年 9 月的最新报告显示, 心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是全球范围内危害人类健康首要的致死、致残性疾病。CVD 的疾病分布已逐渐从发达国家蔓延至发展中国家, 并呈现愈演愈烈之态势。目前, 众多发展中国家正在经历一个 CVD 发病率快速增长的时期。在中国进行的一项大规模前瞻性研究显示, 心脏疾病已经成为中国人群的主要死因, 分列男、女性死亡原因的第 2 位和第 1 位。其中, 冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary heart disease, CHD) 作为一种重大的慢性非传染性疾病, 已成为威胁人类生命健康的头号杀手。我国每年新发心肌梗死 50 万人, 据估计, 仅考虑我国人口增加和老龄化问题, 在未来 20 年我国 CHD 发病人数将增加 780 万人, CHD 死亡人数将增加 340 万人。

CVD 是由遗传与环境因素长期相互作用所致的复杂性状疾病, 对 CVD 传统危险因素的认识与控制可大大降低 CVD 的疾病负担, 而揭示 CVD 的遗传机制对发展新的诊断、治疗策略也十分重要, 是进一步实现 CVD 预测、个体化防治的必要手段和关键性环节。随着社会经济的发展和科学技术的不断进步, 人们对疾病发病机制以及预防控制策略的探讨在微观和宏观两个研究层面都取得了很大的进展。研究者开始更加注重微观与宏观视角的结合, 在个体的遗传基因变异与疾病关系的研究中引入群体概念, 在防控与治疗疾病的群体性干预手段中引入个体化治疗概念, 并且在探讨疾病发病机制时强调遗传因素与环境因素的共同作用。

定位 CHD 遗传易感基因的策略主要包括全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 和候选基因关联研究, 研究者利用这两种策略方法近年来在 CHD 遗传发病机制方面取得了很大进展, 发现了许多重要的 CHD 遗传易感基因和多态位点。然而上述方法主要是针对蛋白质编码基因序列, 这些编码基因范围不足人类基因组序列的 2%, 大量的非编码 RNA 已开始成为学者研究冠心病发生发展遗传作用机制的新热点。在众多非编码 RNA 中, microRNA (miRNA) 的研究尤为引人注目。机体 miRNA 表达水平以及与靶基因结合过程中的异常可能是导致疾病发生发展的重要原因。已有研究表明 miRNA 编码序列上的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 变异可能会改变 miRNA 的形成以及成熟的 miRNA 水平, 而 miRNAs 前体 (pre-miRNA) 编码序列上的 SNPs 变异是否与 CHD 存在关联有待于深入探讨。

在 CVD 的传统危险因素研究方面, 高血压、高胆固醇血症、吸烟、肥胖以及年龄等都被确证是 CVD 的重要危险因素。在世界范围内, 研究者对单个危险因素致 CVD 发病及死亡风险的影响进行了广泛而深入地探讨, 但不同危险因素之间对 CVD 发病和死亡风险的影响是否存在交互作用仍需要进一步研究。

本论文第一和第二部分将从遗传学和宏观流行性病学两个角度研究中国成人遗传危险因素及传统危险因素与心血管疾病的相关性。从疾病的遗传发病机制角度, 采用两阶段病例对照的遗传关联研究设计, 探讨心脏功能相关的 pre-miRNA 编码序列上的 SNPs 在中国汉族人群中是否与 CHD 相关联, 寻找新的 CHD 遗传标记物, 提出 pre-miRNA 编码序列上 SNP 位点变异通过改变成熟 miRNA 水平, 调控靶基因 mRNA 及蛋白的表达水平, 进而导致 CHD 发病机制的假说, 并为后续的功能研究提供人群的证据支持。又从传统危险因素之间的交互作用对 CVD 死亡风险影响的角度, 采用前瞻性队列研究设计, 探讨总胆固醇水平升高与高血压对致死性 CVD 的发生是否存在交互作用及其作用强度, 从而为有效预防与治疗疾病提供依据, 降低人群 CVD 死亡率。

此外, 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 既是一种由环境因素与遗传因素共同作用导致的多基因复杂疾病, 也是心血管疾病的主要危险因素之一。近年来, T2DM 遗传致病机制的研究取得了一定进展, 其中, 过氧化物酶体增殖活化受体 γ 协同激活因子 (peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1, PPARGC1A) 是一种转录协同因子, 广泛参与能量代谢的过程, 可在转录水平上激活糖异生的关键酶, 影响血糖代谢。PPARGC1A 基因是目前 T2DM 遗传分子机制研究领域的重要候选基因, 然而已发表的关于 PPARGC1A 基因多态性与 T2DM 之间关联性的研究结果不尽一致。本论文第三部分将采用 meta 分析的方法, 综合评价 PPARGC1A 基因的 3 个遗传多态位点 Gly482Ser、Thr394Thr 和 Thr612Met 变异与 T2DM 的关联性, 并通过亚组分析的方法, 在不同种族人群中分别探讨 PPARGC1A 基因与 T2DM 的关联性。

第一部分 中国汉族人群 pre-miRNA 常见遗传多态与冠心病的关联研究

一、背景与目的

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (Coronary heart disease, CHD) 是一种重大慢性非传染性疾病, 是人类健康的主要杀手[1, 2]。2006 年世界卫生组织公布的全世界前 5 位死亡原因资料显示, 在 15-59 岁人群中 CHD 位居第 2 位, 而在 60 岁以上人群中 CHD 的死亡人数明显增加, 占死亡原因的第 1 位[3]。在中国进行的一项大规模前瞻性队列研究[4]显示, 心脏疾病已经成为中国人群的主要死亡原因, 分列男、女性死亡原因的第 2 位和第 1 位。我国每年新发心肌梗死 50 万人, 据估计, 仅考虑我国人口增加速度和老龄化问题, 在未来 20 年内我国 CHD 发病人数将增加 780 万人, CHD 死亡人数将增加 340 万人[5]。所以, CHD 已经成为我国重要的疾病负担。

CHD 作为一种由遗传与环境因素长期相互作用所致的复杂性状疾病, 定位其遗传易感基因的关联研究策略主要包括全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS) 和候选基因关联研究[6-8]。前者近年来取得了重大突破, 定位了一系列新的易感区域和位点, 这些新发现的易感基因和多态位点在冠心病发病过程中的遗传分子机制还有待于进一步研究。后者是根据疾病的发病机制提出假设, 选择动脉粥样硬化相关代谢通路的关键基因, 检测基因变异和疾病的关联程度。然而这些编码基因范围占人类基因组序列的比例仅不到 2%, 大量的非编码 RNA 已开始成为学者研究 CHD 发生发展遗传作用机制的新热点, 有待于深入探讨[9]。

在众多的非编码 RNA 中, microRNA (miRNA) 的研究进展飞快。miRNA 是一种内源性的、大小约为 21-25 个碱基的单链小分子, 是一类在生物进化过程中高度保守的非编码小分子 RNA。miRNA 主要由位于染色体上基因之间非编码区域的序列编码, 经过 RNA 聚合酶 II 的作用生成初级 miRNA (pri-miRNA)。pri-miRNA 在 Drosha-DGCR8 复合体作用下形成长度约为 60-70 个核苷酸的发夹状 miRNA, 即前体 miRNA (pre-miRNA)。pre-miRNA 在 Ran-GTP 依赖性核浆转运因子 Exportin-5 的作用下转运到细胞质后, 最终在 Dicer 酶作用下形成一个短双链 RNA 片段, 其中一条生成成熟的 miRNA, 另外一条则会被降解。成熟的

miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 区域结合,对 mRNA 进行切割或抑制其翻译,在转录后水平指导 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)调节目的基因的表达,沉默特定基因从而对生物体基因表达起到精细调节的作用[10]。

机体 miRNA 表达水平以及与靶基因结合过程中的异常可能是导致疾病发生发展的重要原因。miRNA 在心血管系统病理生理中的作用机制已经成为当前的研究热点,越来越多的研究显示 miRNA 在心肌细胞分化及病理生理过程中发挥了重要作用[11],例如 miR-27a、miR-146a、miR-196a、miR-423 和 miR-499 等。一项大鼠试验研究发现,miR-27a 在心肌细胞中可通过调控和改变主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)基因的表达水平从而引发心脏疾病[12]。人体免疫细胞中的 Th1 细胞,其表达水平上调被认为可能是导致动脉粥样硬化发生发展的重要因素。一项在中国人群中开展的研究显示在外周血单核细胞中 miR-146a 水平的变化可影响和调控 Th1 细胞的分化,且与急性冠脉综合征显著关联[13];也有研究发现中国人群血清中 miR-146a 水平与 2 型糖尿病相关联[14]。在心衰研究方面,Tijssen 等研究发现 miR-423-5p 是心衰的一个重要循环生物标志物,对于心衰的临床诊断将起到重要指导作用[15]。此外,李培峰等研究发现 miR-499 可通过抑制心肌细胞凋亡来抑制心肌梗死,具有心肌保护功能。该研究构建的心脏特异性 miR-499 转基因小鼠,缺血再灌注诱导小鼠心肌梗死,与野生型小鼠比较,转基因小鼠的凋亡心肌细胞数量减少、心肌梗死面积明显减小,心功能各项指标也显著改善,表明 miR-499 能够通过抑制心肌细胞凋亡发挥心肌保护的功能[16]。

人类的 miRNA 与传统意义上的蛋白质编码基因一样是由人类基因组中的特定序列编码。Sun 等的研究结果证实人类 miRNA 编码序列上的一些单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)会影响成熟 miRNA 的生物形成以及表达水平[17]。在肿瘤学研究中已发现一些 pre-miRNAs 编码序列中的 SNPs 与某些癌症相关联[18],并且发现 pre-miRNA 编码序列上的遗传变异与肿瘤组织中相应的成熟 miRNA 表达水平也紧密相关[19]。肿瘤与心血管疾病都是由遗传与环境因素长期相互作用所致的复杂疾病,这提示心血管疾病相关的 miRNAs 其 pre-miRNA 编码序列中的 SNPs 也可能与 CHD 相关联,这些遗传变异可能导致 miRNA 水平的变化或影响与靶基因的结合进而导致疾病的发生。在心血管疾病领域研究中,已有研究发现在中国人群中 pre-miRNA 编码序列中的常见 SNPs 变异与先天性心脏病和扩张性心肌病的发生相关联[20, 21]。但 pre-miRNA 编码序列中的遗传变异与 CHD 的关联性鲜见研究报道,其在 CHD 发病风险中的作用尚不清楚。

因此,本研究主要目的是探讨相关 pre-miRNA 编码序列中的 SNPs 是否与中国汉族人群的 CHD 风险相关联,分析其在 CHD 发病风险中可能的作用机制。本研究采用了两阶段的病例对照研究设计方案。第一阶段,先在一组病例对照人群样本中对所有 SNPs 位点进行基因型鉴定,检验 SNP 位点与 CHD 风险的关联性;第二阶段,利用另一独立的大规模病例对照人群样本对第一阶段结果中发现的与 CHD 风险显著关联的 SNPs 位点进一步验证,并在两阶段样本合并后的总人群中综合分析这些位点变异与 CHD 之间的关联关系,为后续的功能研究提供人群的证据支持。

二、对象及方法

2.1 研究人群和研究策略

本研究使用了两阶段的关联研究策略。第一阶段,随机入选 1997 年 10 月至 2001 年 12 月期间阜外心血管病医院收治的汉族 CHD 患者 853 例作为病例组,包括存活的急性心肌梗死 (acute myocardial Infarction, AMI) 患者和经冠状动脉造影证实的 CHD 患者。所有患者均发病 3 个月或 3 个月以上,且病情稳定。急性心肌梗死诊断标准:根据 WHO 诊断标准,即典型胸痛症状持续 30 分钟以上;心电图连续 2 个导联 ST 段抬高并有动态改变;心肌酶升高大于正常值高限的 2 倍,24 小时内有动态演变,心肌同工酶升高更有助于诊断。CHD 患者诊断标准:经冠状动脉造影证实左主干狭窄 $\geq 50\%$ 和/或至少一支主要的冠状动脉血管狭窄 $\geq 70\%$ 。对照样本来自亚洲国际心血管疾病协作研究 (International Collaborative Study of Cardiovascular Disease in Asia, InterAISA) 中国部分,选择年龄(± 2 岁)、性别与病例匹配的社区人群 948 例作为对照组。对照组入选标准:心电图无缺血性改变,无胸痛、胸闷等心脏病症状,经 Rose 问卷、体格检查以及病史来排除 CHD。所有病例组和对照组研究对象均排除心脏瓣膜疾病、先天性心脏病、严重的心力衰竭、肾脏及肝脏疾病、继发性高血压、心肌病、家族型高胆固醇血症、严重甲状腺疾病及恶性肿瘤患者。

第二阶段,进一步扩大研究样本量,随机入选 2002 年 2 月至 2009 年 3 月期间阜外心血管病医院收治的汉族 CHD 患者 1919 例作为病例组。对照样本来自中国心血管病流行病学多中心协作研究,选择年龄(± 2 岁)、性别与病例匹配的社区人群 1840 例作为研究的对照组。病例以及对照组的入选标准和排除标准与第一阶段相一致。

本研究两阶段共纳入了 5560 名研究对象 (2772 例 CHD 患者和 2788 例对照

个体)。所有参加者均为中国汉族人群，无血缘关系，并签署知情同意书。

2.2 调查内容

采用统一的调查表，由经过严格培训和考核的专业医务人员对所有研究对象进行详细调查，包括人口统计学和一般情况、心血管疾病个人史（包括现病史和既往史）及家族史、吸烟与饮酒史，病例组详细记录降压药、调脂药的使用情况（包括药物的种类、名称、是否规律用药等）。采用标准方法测量身高和体重，测量体重时研究对象穿单衣脱鞋，计算体重指数（body mass index, BMI）=体重/升高²（kg/m²）。高血压定义为收缩压（SBP）≥140mmHg 和/或舒张压（DBP）≥90mmHg 和/或正在服用降压药物；糖尿病定义为既往诊断过糖尿病或空腹血糖（Glucose, Glu）≥126mg/dl（7.0mmol/L）；吸烟定义为曾经吸烟 100 支或以上；饮酒定义为调查前一年饮酒≥12 次。

2.3 生化指标测定

所有研究对象晨起空腹，由受过培训的护士使用真空采血管采集肘静脉血液样本（6ml 非抗凝血和 6ml EDTA 抗凝血），于 4℃ 条件下 3000 转/分钟离心 15 分钟，分离血清和血浆，于 -80℃ 冷冻保存，用于后续生化指标检测。使用日立 7060 自动生化分析仪，根据标准的磷酸钨沉淀法分析高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol, HDL-C），而采用酶法测定血糖、总胆固醇（total cholesterol, TC）、甘油三酯（triglycerides, TG）。当 TG<4.5mmol/L 时，用 Friedewald 公式计算低密度脂蛋白胆固醇水平（low density lipoprotein cholesterol, LDL-C），即 $LDL-C = TC - HDL-C - TG/5$ 。

2.4 候选 SNP 位点的选择

在位点的选择上，利用生物信息学的方法，从 MIRbase 网站（<http://www.mirbase.org>）下载所有已经发现的人类 miRNA 相关信息，通过检索 NCBI 的 Gene 数据库（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>，更新至 2011 年 5 月）得到其对应的 pre-miRNA 编码序列，筛选出 pre-miRNA 编码序列上存在 SNP 的 miRNA。然后，通过文献阅读的方式，一方面进一步筛选出文献报道的与心脏功能以及心血管疾病相关的 miRNA，从 HapMap 数据库（http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/）中检索这些 pre-miRNA 编码序列上的 SNPs 位点在中国汉族人群中的等位基因频率，入选少见等位基因频率（MAF）≥0.05 的常见多态位点；另一方面入选与肿瘤相关的

pre-miRNA 编码序列上的功能 SNP 位点。根据上述入选标准，最终入选了 7 个 SNPs，筛选过程如图 1-1 所示，入选 SNP 位点在染色体上所处位置、等位基因和 MAF 信息详见表 1-1。

本研究使用了两阶段的关联研究策略。首先在 853 例 CHD 患者和 948 例对照者中，检测所有筛选得出的 SNP 位点的基因型；第二阶段，利用另一独立的大规模病例对照人群样本，在包括 1919 例 CHD 患者和 1840 例对照者中，对第一阶段发现的与 CHD 风险相关联的 SNP 位点进一步进行基因型鉴定，并利用两阶段合并样本的数据进行统计分析。

在所有入选的 7 个 SNPs 位点中，其中一个位于 hsa-mir-149 上的 rs2292832 位点由于不符合 Hardy-Weinberg 平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)，未纳入统计分析。

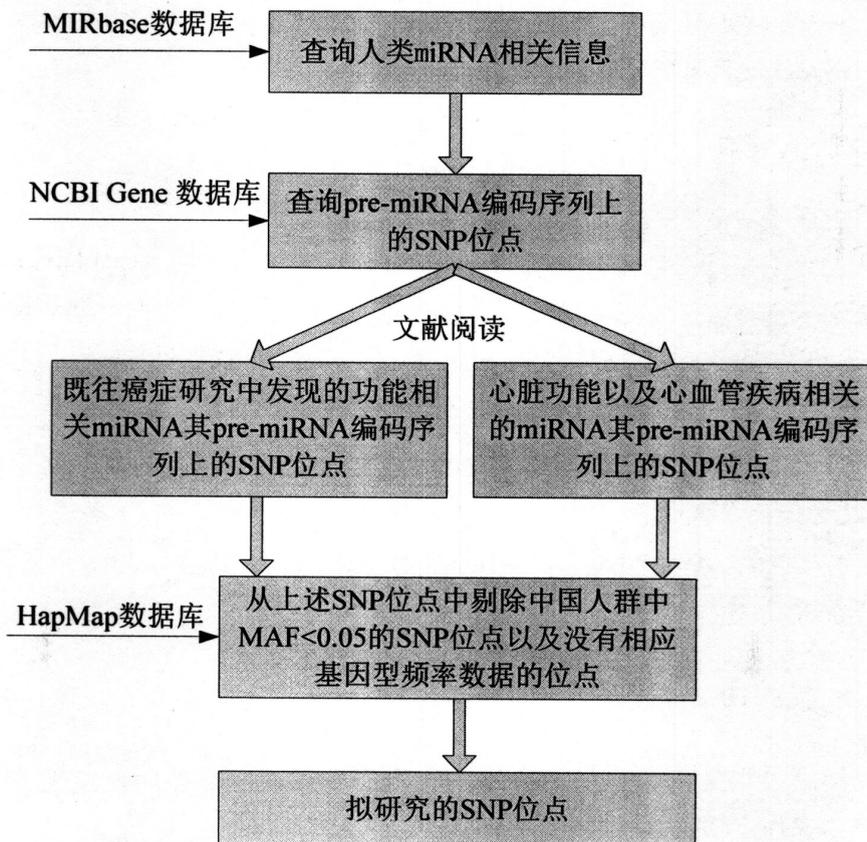


图 1-1 候选 pre-miRNA 编码序列中的 SNP 位点入选流程图

表 1-1 候选 pre-miRNA 和 SNP 位点信息

pre-miRNA	SNP	等位基因*	染色体上的位置	MAF ^a
hsa-mir-149	rs2292832	A/G	2q37.3	0.343
hsa-mir-146a	rs2910164	C/G	5q34	0.434
hsa-mir-196a2	rs11614913	T/C	12q13.3	0.449
hsa-mir-492	rs2289030	G/C	12q22	0.239
hsa-mir-423	rs6505162	C/A	17q11.2	0.164
hsa-mir-27a	rs895819	T/C	19p13.13	0.290
hsa-mir-499	rs3746444	A/G	20q11.22	0.167

MAF 少见等位基因频率

*常见等位基因/少见等位基因

^a: 在 HapMap 中国北京汉族人 (CHB) 的 MAF

2.5 DNA 提取及基因型鉴定

2.5.1 DNA 提取

a. 试剂配制

1) 生理盐水 (0.9%NaCl): 称取 9g NaCl, 溶解在大约 200ml 蒸馏水中, 充分搅拌, 最后加蒸馏水定容到 1000ml。

2) FG 缓冲液与蛋白酶 K 混合液: 45ml FG 缓冲液, 625 μ l 蛋白酶 K, 涡旋震荡混匀, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

3) 70%乙醇: 700ml 无水乙醇, 300ml 双蒸水 (一级水), 颠倒混匀充分, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

4) TE 液: 10mM Tris HCl, 1mM EDTANa₂, 调 PH 值至 8.0。放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

b. 提取 DNA

使用天根生化科技公司血液基因组提取试剂盒从外周血白细胞中提取 DNA, 操作步骤如下:

1) 将 5ml 抗凝血转移到 50ml 离心管中, 然后加入 30ml 生理盐水, 涡旋震荡混匀。4 $^{\circ}$ C 条件下, 4000 转/分, 离心 10 分钟。

2) 离心后弃上清, 保留沉淀物, 加入 10ml 细胞裂解液, 涡旋震荡混匀。静

置 10 分钟后，4℃条件下 4000 转/分，离心 10 分钟。

3) 离心后弃上清，保留沉淀物，加入 1.8ml 配制好的 FG 缓冲液与蛋白酶 K 的混合液，立即涡旋震荡混匀至溶液无团块。

4) 65℃条件下水浴 1.5 小时，期间颠倒混匀数次。

5) 水浴后，12000 转/分，离心 10 分钟。

6) 转移上清至另外离心管中，并加入 2ml 异丙醇，颠倒充分混匀至出现丝状或簇状基因组 DNA。

7) 12000 转/分，离心 10 分钟，弃上清，保留沉淀。

8) 加入 2ml 70%乙醇，涡旋震荡 5 秒钟，12000 转/分，离心 5 分钟，弃上清。9) 重复此步骤 2 次。将 DNA 沉淀晾干。

10) 待 DNA 沉淀干燥后，加入 400 μ l TE 液，溶解 DNA 备用。

c. DNA 的鉴定、定量和稀释

1) 取溶解后的 DNA 溶液原液，以 TE 液为空白对照，使用 Nanodrop2000 分光光度计测定 OD260、OD280 及 OD230。

2) DNA 的鉴定： $OD_{260}/OD_{280} > 1.7$ ， $OD_{280}/OD_{230} > 2.0$ ，说明 DNA 纯度合格，否则需要重新抽提。

3) DNA 的定量稀释：根据测定的原液 DNA 浓度，加入 TE 液，稀释 DNA 为浓度为 10ng/ μ l。

DNA 提取及基因型鉴定的相关试剂、主要仪器以及耗材如表 1-2、1-3 所示。

表 1-2 实验主要试剂

试剂名称	生产厂商
试剂盒法提取 DNA 相关试剂	
细胞裂解液 CL	北京天根生化科技有限公司
缓冲液 FG	北京天根生化科技有限公司
蛋白酶 K	北京天根生化科技有限公司
100%异丙醇	北京化学试剂公司
无水乙醇	北京化学试剂公司
RT-PCR 及基因分型相关试剂	
Taqman MasterMix 液	美国 ABI 公司
Taqman 探针 rs11614913	美国 ABI 公司
Taqman 探针 rs2292832	美国 ABI 公司
Taqman 探针 rs3746444	美国 ABI 公司
Taqman 探针 rs2910164	美国 ABI 公司
Taqman 探针 rs895819	美国 ABI 公司
Taqman 探针 rs2289030	美国 ABI 公司
Taqman 探针 rs6505162	美国 ABI 公司

表 1-3 RT-PCR 及基因分型实验主要仪器及相关耗材

仪器名称	生产厂家
ABI7900 高通量实时荧光定量 PCR 系统	美国 ABI 公司
384 孔 PCR 反应板	美国 ABI 公司
单道移液器 (0.1-2.5 μ l; 0.5-10 μ l; 20-200 μ l)	法国 Gilson 公司
8 道移液器 (0.5-10 μ l)	德国 Eppendorf 公司
单道电动连续移液器 (5-100 μ l)	德国 Eppendorf 公司
枪头 (10 μ l; 200 μ l; 1000 μ l)	美国 Axygen 公司
漩涡混合器	海门其林贝尔仪器制造有限公司
Milli-Q 纯水制备机	美国 Millipore 公司
SANYO SIM-F124 制冰机	日本 SANYO 公司
Eppendorf 5415 R 离心机	德国 Eppendorf 公司
Nanodrop2000 分光光度计	Thermo Scientific 公司
低温水平离心机	Thermo Scientific 公司
阪神 BD/BC-568 冷柜	江苏阪神电器有限公司
Haier-20 $^{\circ}$ C 冰箱	青岛海尔集团
Haier-80 度冰箱	青岛海尔集团
DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱	上海一恒科技有限公司
电热恒温水浴箱	北京东方仪器厂

表 1-4 候选 pre-miRNA 的 SNP 引物序列及探针信息

pre-miRNA	SNP	引物及探针序列信息
hsa-mir-196a2	rs11614913	ABI assay ID C_31185852_10
hsa-mir-27a	rs895819	ABI assay ID C_3056952_20
hsa-mir-499	rs3746444	Forward primer: GCTGTTAAGACTTGCAGTGATGTTT Reverse primer: CGGGAAGCAGCACAGACTT VIC-5'-CCACGTGAACATCACAG FAM-5'-CCACGTGAACGTCACAG
hsa-mir-146a	rs2910164	Forward primer: ACTGAATTCCATGGGTTGTGTCA Reverse primer: CAGAGATATCCCAGCTGAAGAAGCTG VIC-5'-TGTCAGACCTCTGAAATT FAM-5'-TCAGACCTGTGAAATT
hsa-mir-423	rs6505162	Forward primer: TTCTATTTTCCAAAAGCTCGGTCTGA Reverse primer: GCCCCTGAGAGCATCCAA VIC-5'-TTGCTTCCTAACCCGCG FAM-5'-TTGCTTCCTAACCCGCG
hsa-mir-492	rs2289030	Forward primer: CTGCAGATCAACAATGCTCAACT Reverse primer: ACCCAAACACTCAAACAAACTTG VIC-5'5CAGAAGTCATGTGCAGCC FAM-5'-CAGAAGTCATCTGCAGCC

2.5.2 基因型鉴定

所有 SNP 均使用高通量的 ABI 7900 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 7900 fast Real-Time PCR System) 进行基因型鉴定。表 1-4 列出了本研究的 SNPs 位点相应的引物及探针设计序列。

PCR 及基因分型操作步骤如下:

- 1) 配制反应混合液, 每反应孔总体积为 6 μ l, 其组成如表 1-5 所示。
- 2) 应用电动连续移液器将反应混合液分装至 384 孔 PCR 反应板内。
- 3) 使用 8 道移液器将浓度为 10 μ g/dl 的基因组 DNA 加入 384 孔板的 PCR 反应板内, 每板设置 2 个阴性对照孔。
- 4) 将 384 孔 PCR 反应板置入 ABI 7900 HT RT-PCR 仪内。使用 SDS 2.4 (Sequence Detection System) 软件, 设定待测 SNP 位点 Taq 探针 FAM 及 VIC 的碱基, 以及基因分型检测孔及阴性对照孔位置, 进行预判读, 获得本底荧光数据 (pre-read)。然后设置 PCR 反应参数: 反应体系体积为 6 μ l; PCR 循环温度为 95 $^{\circ}$ C 变性 10 分钟, 然后 92 $^{\circ}$ C 变性 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 分钟, 共 40 个循环。
- 5) 开始 PCR, 待扩增结束后, 进行基因型判读 (post-read), 保存样本 PCR 扩增曲线、基因型判读图谱以及数据。独立、双遍核对基因型并录入数据库。

表 1-5 RT-PCR 反应体系

反应体系	组成	反应量	浓度
PCR 反应 6 μ l	ABI Taq 探针	0.3 μ l	20 \times
	ABI MasterMix	3 μ l	2 \times
	ddH ₂ O	1.7 μ l	-
	基因组 DNA	1 μ l	10ng/ μ l

2.6 统计学分析方法

根据基因型频率计算等位基因频率，采用卡方检验分析 SNP 基因型分布是否符合 HWE。连续性变量用“均数±标准差”表示，应用两样本 *t* 检验（计量资料）和卡方检验（计数资料）比较病例组和对照组间人口学及人体测量、血压、生化指标之间的差异。然后，使用卡方检验来比较病例组和对照组之间多态位点的等位基因频率和基因型分布差异。

第一阶段，分别比较 SNP 位点的基因型和等位基因频率在病例组和对照组中的分布是否存在差异，检验是否与 CHD 相关联。在等位基因频率差异或任一遗传模型（显性模型和隐性模型）基因型分布比较中 *P* 值<0.10 的 SNP 位点，进入第二阶段重复验证研究。第一阶段作为一个假设的产生阶段，未对多重比较进行校正。

第二阶段，将两阶段样本合并后进一步统计分析。首先，应用非条件 logistic 回归模型（logistic regression model, LRM）分析单个 SNP 对 CHD 发病风险的影响，SNP 位点变量在显性遗传模型下，0=常见等位基因纯合子，1=少见等位基因纯合子+杂合子；在隐性遗传模型下，0=常见等位基因纯合子+杂合子，1=少见等位基因纯合子。Logistic 回归模型调整的变量包括年龄（连续型变量），性别（0=女性，1=男性），吸烟情况（0=不吸烟，1=吸烟（一生曾经吸烟 100 支或以上）），饮酒情况（0=不饮酒，1=饮酒（调查前一年饮酒≥12 次）），是否患有高血压（0=否，1=是），是否患有糖尿病（0=否，1=是），BMI（连续性变量），TG（连续性变量）和 HDL-C（连续性变量），计算比值比（odds ratio, OR）和 95% 可信区间（confidence interval, CI）。

然后，根据研究人群吸烟、饮酒情况、BMI 水平的不同以及高血压、糖尿病的患病情况进行分组，采用分层分析的方法，在不同重要表型的人群中检验这些位点与 CHD 的关联关系，探测这些表型与 SNP 位点变异对 CHD 风险的影响是否存在交互作用。

利用 SAS 9.0 软件（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）进行描述性统计分析以及卡方检验和 logistic 回归分析。另外，应用 CaTS 软件来计算病例对照关联研究每组所需样本量，并进一步计算其统计学检验效能（<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/index.html>）。本研究两阶段共入选 2772 名 CHD 病例和 2788 名对照者，若以 $\alpha=0.05$ 为假设检验水准，双边检验，在显性模型下，当 SNPs 位点的 MAF=0.20，把握度为 80% 时，可发现最小 OR 值为 1.18 的危险因素。

三、 结果

3.1 研究对象基本特征

第一阶段和第二阶段 CHD 病例组和对照组研究对象的人口统计学及临床特征如表 1-6 所示。

在第一阶段的 853 名 CHD 患者和 948 名对照者中，除饮酒率在两组间分布的差异无统计学意义外，其它基本特征在两组间分布的差异均达到统计学显著性。病例组研究对象的平均年龄、男性比例、高血压和糖尿病的患病率以及吸烟率均高于对照组人群 ($P<0.05$)。与对照组研究对象相比，CHD 患者都具有较低的 HDL-C 水平和较高的 BMI、TC、LDL-C、TG、Glu 以及血压水平 ($P<0.001$)。

在第二阶段的 1919 名 CHD 患者和 1840 名对照者中，除男性比例在病例组和对照组人群间的差异无统计学意义外，其它基本特征在两组间的差异均达到了统计学显著性。病例组研究对象的平均年龄低于对照组人群，而高血压、糖尿病的患病率以及吸烟率、饮酒率均高于对照组 ($P<0.05$)。与对照组研究对象相比，CHD 患者都具有较低的 HDL-C 水平和较高的 BMI、TG 以及 Glu 水平 ($P<0.001$)。在此病例对照样本中，病例组 CHD 患者由于服用降压和调脂药物其 TC、LDL-C 以及血压水平均低于对照组 ($P<0.001$)。

3.2 第一阶段分析结果

在病例组和对照组分别进行 HWE 检验，除 hsa-mir-149 上的 rs2292832 位点外，其余 6 个 SNP 位点在两组中均符合 HWE。所有 6 个 SNP 位点的等位基因频率和基因型分布情况如表 1-7 所示。其中，hsa-mir-196a2 上的 rs11614913 位点其少见等位基因 C 在病例组和对照组中的频率分别为 0.476 和 0.487，卡方检验结果显示只有该位点在隐性遗传模型下其基因型分布在病例组和对照组间的差异趋于显著 ($P=0.05$)，进入第二阶段研究。

3.3 第二阶段关联研究分析结果

扩大样本量至 5560 名研究对象，结果如表 1-8 所示。rs11614913 位点 C 等位基因在病例组中的频率高于对照组，该位点在两组研究对象中的 MAF 值分别为 0.482 和 0.470。在显性和隐性遗传模型下，分别比较 SNP 位点 rs11614913 的基因型分布在病例组和对照组间的差异。结果显示，在显性遗传模型下，该位点的基因型分布在病例组和对照组间的差异达到统计学显著性 ($P=0.047$)；而在隐性模型下，该位点的基因型分布在两组间的差异无统计学意义 ($P=0.934$)。

表 1-6 两阶段的冠心病病例组和对照组人群的人口统计学及临床特征

	第一阶段			第二阶段		
	病例组 (n=853)	对照组 (n=948)	P 值	病例组 (n=1919)	对照组 (n=1840)	P 值
年龄 (岁)	54.6±8.9	52.0±10.3	<0.001	55.3±7.8	58.2±8.4	<0.001
男性 (%)	78.2	73.3	0.027	86.2	87.3	0.300
高血压患病率 (%)	62.8	32.2	<0.001	55.6	39.6	<0.001
糖尿病患病率 (%)	25.8	8.1	<0.001	19.9	6.0	<0.001
吸烟率 (%)	61.7	57.0	0.038	68.0	40.3	<0.001
饮酒率 (%)	46.7	42.1	0.052	42.5	37.9	0.001
BMI (kg/m ²)	26.52±3.21	24.80±3.28	<0.001	26.16±3.20	24.21±3.62	<0.001
TC (mmol/L)	5.23±1.18	5.14±0.97	0.049	4.37±0.97	4.85±1.06	<0.001
HDL-C (mmol/L)	1.09±0.25	1.29±0.30	<0.001	1.00±0.25	1.45±0.42	<0.001
LDL-C (mmol/L)	3.30±1.03	3.18±0.85	0.006	2.46±0.92	3.20±0.80	<0.001
TG (mmol/L)	1.82±1.22	1.44±0.96	<0.001	1.75±1.03	1.49±1.18	<0.001
Glu (mmol/L)	6.01±2.06	5.51±1.55	<0.001	6.07±1.95	5.18±1.42	<0.001
SBP(mmHg)	131.10±20.55	127.26±18.17	<0.001	122.47±17.33	141.51±22.60	<0.001
DBP(mmHg)	76.31±11.02	80.25±9.93	<0.001	76.25±11.29	85.95±12.34	<0.001

连续变量用均数±标准差表示；分类变量用研究人数及百分率形式表示

BMI, 体重指数；TC, 总胆固醇；TG, 甘油三酯；HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇；LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇；Glu, 血糖；SBP, 收缩压；DBP, 舒张压

表 1-7 第一阶段所有 SNP 位点与 CHD 风险的关联分析

SNP	基因型	等位基因频率 (常见/少见)	P 值(χ^2 检验)		
			显性 模型	隐性 模型	等位 基因
rs11614913	TT/CT/CC	T/C			
病例组	202/463/163	0.524/0.476	0.395	0.050	0.534
对照组	241/463/217	0.513/0.487			
rs3746444	AA/AG/GG	A/G			
病例组	589/210/28	0.839/0.161	0.193	0.676	0.199
对照组	683/212/28	0.855/0.145			
rs2910164	CC/GC/GG	C/G			
病例组	272/392/165	0.565/0.435	0.142	0.714	0.239
对照组	271/457/189	0.545/0.455			
rs895819	TT/TC/CC	T/C			
病例组	452/316/56	0.740/0.260	0.491	0.527	0.773
对照组	499/317/67	0.745/0.255			
rs2289030	GG/GC/CC	G/C			
病例组	464/315/44	0.755/0.245	0.226	0.939	0.259
对照组	524/312/48	0.769/0.231			
rs6505162	CC/AC/AA	C/A			
病例组	530/260/34	0.801/0.199	0.376	0.793	0.398
对照组	582/261/34	0.812/0.188			

注：未校正其他因素，各模型均基于 SNP 位点少见等位基因。

表 1-8 所有个体中 rs11614913 在显性和隐性模型下的基因型分布和等位基因频率情况

基因型与等位基因	病例组	对照组	P 值 (χ^2 -test)
TT/CT+CC	695/2030	769/1990	0.047
TT+CT/CC	2129/596	2153/606	0.934
C allele freq (%)	48.2	47.0	0.233

进一步应用 logistic 回归模型分析 rs11614913 位点与 CHD 的关联关系。校正年龄、性别后, 结果显示该位点与 CHD 风险相关联, 在显性模型下, CC+CT 基因型个体发生 CHD 的风险是 TT 基因型个体的 1.13 倍 (95%CI 1.00-1.27, $P=0.049$)。在校正了年龄、性别、BMI 水平、HDL-C 水平、TG 水平、是否患高血压、糖尿病以及吸烟、饮酒状态后, SNP 位点 rs11614913 与 CHD 风险关联关系仍具有统计学显著意义。在显性模型下, CC+CT 基因型个体发生 CHD 的风险是 TT 基因型个体的 1.17 倍 (95%CI 1.01-1.36, $P=0.039$), 详见表 1-9。应用 CaTS 软件来计算关联研究的统计学检验效能, 以 $\alpha=0.05$ 为假设检验水准, 双边检验, rs11614913 位点的 MAF=0.47, 在显性模型下, 发现最小 OR 值为 1.17 的危险因素的把握度为 56%。

表 1-9 pre-miRNA-196a2 SNP 位点 rs11614913 与 CHD 危险的关联分析

遗传模型	基因型	OR (95% CI) ^a	P 值	OR (95% CI) ^b	P 值
显性	CC+CT vs TT	1.13 (1.00-1.27)	0.049	1.17(1.01-1.36)	0.039
隐性	CC vs CT+TT	0.99 (0.87-1.13)	0.885	0.91(0.77-1.07)	0.244

^a: 校正年龄和性别

^b: 校正年龄、性别、BMI、HDL-C、TG、是否患高血压、糖尿病、吸烟和饮酒

3.4 不同表型人群 SNP 位点 rs11614913 与 CHD 风险的关联分析

采用分层分析的方法, 在不同吸烟、饮酒情况、BMI 水平以及高血压、糖尿病患病情况的亚组人群中, 检验 rs11614913 点与 CHD 的关联关系, 分层分析结果如 1-10 所示。

根据研究对象的吸烟情况将人群分为吸烟组和不吸烟组。多因素调整后结果

显示,在吸烟人群中,rs11614913位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.23倍(95%CI 1.03-1.47, $P=0.023$),该位点变异与CHD风险的关联具有统计学显著意义;在不吸烟人群中,该位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.07倍(95%CI 0.87-1.30, $P=0.535$),该位点变异与CHD风险的关联未达到统计学显著性。在吸烟人群中,rs11614913位点C等位基因增加CHD的发病风险。

根据研究对象的饮酒情况将人群分为饮酒组和不饮酒组。多因素调整后结果显示,在饮酒人群中,rs11614913位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.20倍(95%CI 0.97-1.47, $P=0.092$);在不饮酒人群中,该位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.13倍(95%CI 0.95-1.35, $P=0.160$),但两组中该位点与CHD风险的关联均无统计学显著意义。

根据研究对象高血压的患病情况将人群分为高血压组和正常血压组。多因素调整后结果显示,在高血压人群中,rs11614913位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.23倍(95%CI 1.02-1.49, $P=0.034$),该位点变异与CHD风险的关联具有统计学显著意义;在正常血压人群中,该位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.13倍(95%CI 0.95-1.36, $P=0.217$),该位点变异与CHD风险的关联未达到统计学显著性。在高血压人群中,rs11614913位点C等位基因增加CHD的发病风险。

根据中国肥胖工作组对肥胖的定义[22],以 28.00kg/m^2 为切点,将研究对象分为2组:肥胖组($\text{BMI} \geq 28.00\text{ kg/m}^2$)和非肥胖组($\text{BMI} < 28.00\text{ kg/m}^2$)。多因素调整后结果显示,在肥胖人群中,rs11614913位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.25倍(95%CI 0.93-1.68, $P=0.145$);在非肥胖人群中,该位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.12倍(95%CI 0.97-1.30, $P=0.129$),但两组中该位点与CHD风险的关联均未达到统计学显著性。

根据研究对象糖尿病的患病情况将人群分为糖尿病组和正常血糖组。多因素调整后结果显示,在糖尿病人群中,rs11614913位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.34倍(95%CI 0.89-2.03, $P=0.162$);在正常血糖人群中,该位点CC+CT基因型个体发生CHD风险是TT基因型个体的1.14倍(95%CI 0.99-1.32, $P=0.065$),但两组中该位点与CHD风险的关联均无统计学显著性。

表 1-10 SNP 位点 rs11614913 与 CHD 风险关联性的环境因素分层分析

rs11614913	吸烟组				不吸烟组			
	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值
TT	447	357	1.00	-	244	412	1.00	-
CT+CC	912	1346	1.23 (1.03-1.47)	0.023	678	1077	1.07 (0.87-1.30)	0.535
	饮酒组				不饮酒组			
	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值
TT	296	302	1.00	-	395	462	1.00	-
CT+CC	889	779	1.20 (0.97-1.47)	0.092	1132	1193	1.13 (0.95-1.35)	0.160
	高血压组				正常血压组			
	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值
TT	391	300	1.00	-	304	437	1.00	-
CT+CC	1182	728	1.23 (1.02-1.49)	0.034	848	1171	1.13 (0.93-1.36)	0.217
	BMI ≥ 28.0 kg/m ²				BMI < 28.0 kg/m ²			
	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值
TT	172	117	1.00	-	492	649	1.00	-
CT+CC	525	277	1.25 (0.93-1.68)	0.145	1431	1711	1.12 (0.97-1.30)	0.129
	糖尿病组				正常血糖组			
	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值
TT	130	53	1.00	-	565	715	1.00	-
CT+CC	382	119	1.34 (0.89-2.03)	0.162	1648	1870	1.14 (0.99-1.32)	0.065

注：调整因素包括年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压、BMI 水平和糖尿病。

四、 讨论

本研究通过两阶段的病例对照研究设计,首次发现人类 pre-miRNA-196a2 上的 SNP 位点 rs11614193 T>C 与 CHD 呈现显著关联。本研究为人类 pre-miRNAs 上的 SNP 变异作为 CHD 遗传易感性的候选标记提供了重要证据,为今后 CHD 发病机制研究提供新的线索。

miRNA 是一类在生物进化过程中高度保守的非编码小分子 RNA,通过对靶 mRNA 进行切割或抑制其翻译,指导 RNA 诱导沉默复合体 (RISC) 调节目的基因的表达,它为 RNA 的沉默提供特异性的结合序列[23]。特定 miRNAs 与特定的病理生理过程紧密相关,这些 miRNAs 通过与蛋白质编码基因的靶 mRNA 不同程度的配对结合,在转录水平或转录后水平调节目的基因的表达[24]。近年来,在肿瘤研究领域,对 miRNA 靶基因上 miRNA 结合区域中的 SNPs 开展了广泛深入的研究[25],并已经逐渐扩展到 miRNA 编码序列上的 SNPs 位点变异与疾病的关联研究方面[18, 19]。已有研究报道 miRNA 编码序列上的 SNP 变异可能会改变 miRNA 的形成以及成熟的 miRNA 水平[17]。然而,pre-miRNAs 上的 SNPs 变异与 CHD 是否存在关联性却鲜有报道。

近两年,miRNAs 在冠心病发病机制中的作用以及新型诊断标记物的探索方面都取得了新的进展。Hoekstra 等人采用 miRNA 表达谱分析的方法检测了不稳定型心绞痛、稳定型心绞痛以及急性心肌梗死病例与健康对照者外周血单核细胞的 miRNA 表达水平,首次发现人类外周血单核细胞中的一些 miRNAs 在冠心病病例人群中的表达水平明显高于对照者[26]。另有研究利用 miRNA 差异表达分析的方法发现外周血血浆或血清中的循环 miRNA 与冠心病的发生发展密切相关[27, 28]。这些新的发现都表明,miRNAs 作为一种潜在新型工具在临床疾病诊断以及转归预测方面具有重要价值。而位于 pre-miRNAs 编码序列上的 SNPs 很有可能通过改变和影响 miRNA 在体内的形成与成熟过程以及靶点的选择,对疾病的发生发展进程产生复杂的影响[29]。

在中国人群中,既往已有研究发现 hsa-mir-196a2 中的 rs11614913 和 hsa-mir-499 中的 rs3746444 与扩张性心肌病的发病风险增加显著关联 [20]。另外一项研究结果显示,hsa-mir-196a2 中的 rs11614913 与先天性心脏病的遗传易感性相关联,并发现 CC 基因型的先天性心脏病病人的心脏组织样本中的成熟 miR-196a 表达水平显著高于 T 等位基因携带者[21]。在肺癌的研究中,研究者也发现 CC 基因型的肺癌病人其肿瘤组织样本中的成熟 miR-196a 表达水平显著高于 T 等位基因携带者[18]。最近,Zhi 等[30]在一项以中国东南部地区人群为研究对象的小样本 CHD 病例对照研究 (956 名 CHD 病例和 620 名对照者) 中发现

hsa-mir-499中的rs3746444位点与CHD的风险相关联,且hsa-mir-196a2中的rs11614913位点C等位基因可增加CHD患者发生急性心肌梗死等严重心血管病事件的风险,但并未发现rs11614913位点变异与CHD存在关联关系。本研究采用了两阶段病例对照的研究策略,在大样本人群中首次发现hsa-mir-196a2中的rs11614913位点变异与CHD之间存在显著关联关系($P<0.05$),采用多因素logistic回归模型调整了年龄、性别、BMI、HDL-C、TG水平、高血压、糖尿病、吸烟以及饮酒情况等因素后,该位点在显性遗传模型下仍与CHD发病风险的增加呈显著关联(CT+CC vs TT, OR=1.17, $P=0.039$)。Zhi等的研究结果显示hsa-mir-196a2上的SNP位点rs11614913与CHD患者心血管病事件的预后密切相关,这一发现也进一步支持和加强了本研究所得的结论。对于hsa-mir-499中的SNP rs3746444位点,本研究第一阶段在853例CHD病例和942例对照个体中对该位点也进行了基因分型,但分析结果显示该位点与CHD风险的关联关系未达到统计学显著性,未能验证Zhi等的研究结果。究其原因可能是由于本研究与Zhi等的研究样本人群的来源不同,或人群特征存在差异;也可能是由于这两个研究的样本量均较小,检验效能不足,有待于进一步扩大样本验证。

此外,本研究通过分层分析发现,在吸烟人群和高血压人群中,rs11614913位点C等位基因携带者发生CHD的风险显著高于TT基因型个体,而在不吸烟和血压正常人群中,该变异与CHD发病风险的关联均无统计学显著性。吸烟和高血压是CHD的重要危险因素[31],本研究结果提示rs11614913的C等位基因可以增加吸烟人群或高血压人群发生CHD的风险,该变异与吸烟、高血压对与CHD的发病风险可能存在协同的交互作用。根据饮酒情况、肥胖情况以及糖尿病患病情况的分层分析结果显示,在饮酒人群、肥胖以及糖尿病人群中,rs11614913位点变异与CHD风险的关联均未达到统计学显著性。这表明饮酒、肥胖或糖尿病可能掩盖了该位点C等位基因在CHD发病风险中的作用;但也有可能是由于分层后亚组人群样本量偏小,统计学检验效能降低所致,有待于扩大研究样本后进一步研究。

随着人们对miRNA和靶基因相互作用规律性的认识不断深入以及miRNA靶基因预测方法和软件的不断进步,生物学家开始利用先进的miRNA靶基因预测软件有针对性地锁定感兴趣的miRNA靶基因对其深入研究,探讨miRNA相关的生命调控网络[32]。Luthra等[33]利用生物信息学的方法,使用Sanger数据库通过计算分析预测得出miR-196a调控的靶基因之一是膜联蛋白A1(annexin A1, ANXA1)基因。研究者进一步通过细胞实验发现,在肿瘤细胞中成熟miR-196a的表达水平与ANXA1基因的表达水平相关,当肿瘤细胞内的miR-196a表达水平上升时ANXA1 mRNA的表达水平以及蛋白水平下降[33]。Annexin A1,是结构相关钙依赖的磷脂结合蛋白超家族成员之一,是一个重要的炎症调控蛋白。它可以影

响包括花生四烯酸(AA)代谢在内的许多炎症反应复合物的形成[34, 35]。CHD不仅仅是一种脂质浸润或损伤反应的被动过程,而是一种主动的炎症过程,从脂质沉淀、斑块形成到最终斑块破裂都有慢性炎症的参与[36]。多项研究表明Annexin A1在炎症反应的各个阶段均发挥重要的调节作用[37, 38],并且对CHD有重要的保护性作用。单核细胞与内皮细胞的黏附是启动CHD发生发展的关键环节之一[39]。外源性Annexin A1以及内源性Annexin A1外化与血管内皮细胞黏附分子-1(vascular cell adhesive molecule -1, VCAM-1)竞争与整合素 $\alpha 4\beta 1$ 的结合,抑制单核细胞与血管内皮细胞的黏附,参与早期炎症反应的调节[38]。在CHD病变中,巨噬细胞分泌生长因子、前列腺素 E_2 (PGE $_2$)和细胞因子等都可诱导环氧酶(COX-2)的表达,而抑制COX-2表达可阻止动脉粥样硬化的发生[40]。动物实验结果显示, *ANXA1*基因敲除小鼠的外周巨噬细胞表面黏附分子表达异常、吞噬功能改变,并且发现Annexin A1可抑制巨噬细胞诱导COX-2、释放PGE $_2$ 以及产生活性氧等重要功能[41]。已有研究表明Annexin A1氨基末端片段 Ac2-26可通过抑制COX-2 mRNA的表达来阻止干扰素- γ 和脂多糖对离体心脏的抑制作用,从而对心脏起到[42]。在急性心肌缺血再灌注动物模型中发现,损伤组织中的Annexin A1表达增加,缺血后给予Annexin A1可显著抑制危险区域内梗死范围的扩大[42](见图1-2)。因此, hsa-mir-196a2上的SNP位点变异rs11614913 T>C很可能是通过升高细胞内成熟miR-196a表达水平来抑制其靶基因*ANXA1* mRNA的表达,降低细胞内Annexin A1的水平,抑制Annexin A1对心脏的保护作用,从而导致CHD的发生。

最近,另外一项研究利用Targetscan在线分析软件预测得出miR-196a是特异性靶向调控同源盒A9基因(homeobox A9 gene, HOXA9)的重要miRNA[43]。研究者进一步通过细胞实验发现,miR-196a可下调来自人类急性单核细胞白血病细胞系的MV4-11细胞中*HOXA9*基因的mRNA水平及蛋白水平,提示miR-196a可以通过诱导mRNA的降解来调控*HOXA9*基因的表达。血管内皮细胞的激活是内皮细胞损伤的始动因素,是炎症反应过程中的一个重要阶段,也是CHD等血管性疾病的起始阶段[36]。在血管内皮细胞中,细胞因子诱导细胞间黏附分子-1(intercellular adhesive molecule-1, ICAM-1)、VCAM-1以及选择素E(E-selectin)的表达使内皮细胞激活,在动脉粥样硬化等炎症性疾病的发展进程中起到了关键的作用。HOXA9是一个在血管内皮细胞中表达的同源盒转录因子,它的表达可以迅速下调内皮细胞对炎症信号的反应。有研究表明,过表达HOXA9可以抑制促炎性细胞因子诱导ICAM-1、VCAM-1和选择素E的表达,从而抑制血管内皮细胞的激活;HOXA9表达的下降是机体炎症反应中内皮细胞激活过程中的重要表现[44]。因此, hsa-mir-196a2中的rs11614913位点的变异也可能是通过升高

miR-196a水平下调HOXA9基因mRNA水平及蛋白水平,从而促进血管内皮细胞的激活,启动炎症反应进而逐渐发展成CHD(见图1-2)。

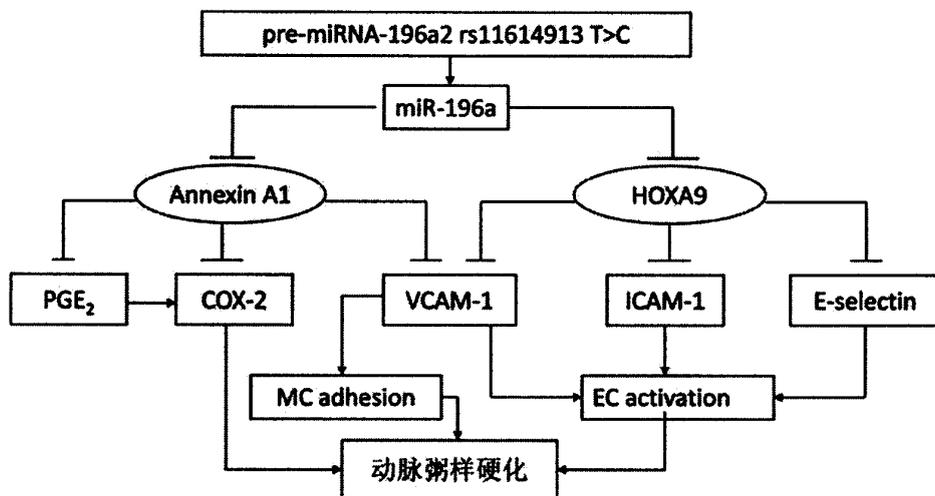


图1-2 miR-196a调控Annexin A1, HOXA9致动脉粥样硬化的分子机制示意图

本研究利用相对较大的样本量,采用了两阶段病例对照的研究策略,能够提高检验效能,大大降低基因型鉴定的工作量,具有较好的成本效益关系,并且有明确的病例和对照的纳入、排除标准,降低了假阳性的概率。但本研究尚存在一些局限和不足。研究人群样本只局限于中国汉族人群,在其他种族人群中的进一步验证研究将有助于确证 pre-miRNA-196a2 编码序列上的 rs11614913 与冠心病之间关联。另外,由于 pre-miRNAs 编码序列上的 SNP 变异导致 CHD 发生的作用机制只是基于目前相关研究结果的推测,尚不明确,因此,进一步的细胞功能实验以及以人群为基础的对不同基因型人群细胞 miRNA 表达水平、靶基因表达水平差异的研究将有助于更好地理解 SNP rs11614913 对冠心病病因以及疾病进展的潜在作用机制。

五、 小结

本研究发现 hsa-mir-196a2 rs11614913 T>C 与中国汉族人群的冠心病发病风险相关联。pre-miRNA-196a2 上的常见 SNP 变异是一个新的冠心病易感标记。本研究结果将为更好地研究冠心病的遗传发病机制提供新的线索,也为后续的功能研究提供人群的证据支持。

参考文献

- [1] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation* 2010; 121(7):e46-e215.
- [2] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. *PLoS Med* 2006; 3(11):e442.
- [3] World Health Organization. Deaths from coronary heart disease [R]. 2006.
- [4] He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, Wang J, Chen CS, Chen J, Wildman RP et al. Major causes of death among men and women in China [J]. *N Engl J Med* 2005; 353(11):1124-1134.
- [5] Moran A, Zhao D, Gu D, Coxson P, Chen CS, Cheng J, Liu J, He J, Goldman L. The future impact of population growth and aging on coronary heart disease in China: projections from the Coronary Heart Disease Policy Model-China [J]. *BMC Public Health* 2008; 8:394.
- [6] McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges [J]. *Nat Rev Genet* 2008; 9(5):356-369.
- [7] Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases [J]. *Nat Rev Genet* 2009; 10(6):392-404.
- [8] 杨英, 鲁向锋. 冠心病全基因组关联研究进展. [J]. *遗传* 2010; 32(2):97-104.
- [9] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease [J]. *Nat Rev Genet* 2011; 12(12):861-874.
- [10] Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology [J]. *Nature* 2011; 469(7330):336-342.
- [11] Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res* 2007; 100(3):416-424.
- [12] Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R et al. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone

- receptor beta1 in neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Mol Cell Biol* 2011; 31(4):744-755.
- [13] Guo M, Mao X, Ji Q, Lang M, Li S, Peng Y, Zhou W, Xiong B, Zeng Q. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome [J]. *Immunol Cell Biol* 2010; 88(5):555-564.
- [14] Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study [J]. *Acta Diabetol* 2011; 48(1):61-69.
- [15] Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure [J]. *Circ Res* 2010; 106(6):1035-1039.
- [16] Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1 [J]. *Nat Med* 2011; 17(1):71-78.
- [17] Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, Sommer SS, Rossi JJ. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function [J]. *RNA* 2009; 15(9):1640-1651.
- [18] Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, Zeng Y, Miao R, Jin G, Ma H et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival [J]. *J Clin Invest* 2008; 118(7):2600-2608.
- [19] Hu Z, Liang J, Wang Z, Tian T, Zhou X, Chen J, Miao R, Wang Y, Wang X, Shen H. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women [J]. *Hum Mutat* 2009; 30(1):79-84.
- [20] Zhou B, Rao L, Peng Y, Wang Y, Chen Y, Song Y, Zhang L. Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy [J]. *Clin Chim Acta* 2010; 411(17-18):1287-1290.
- [21] Xu J, Hu Z, Xu Z, Gu H, Yi L, Cao H, Chen J, Tian T, Liang J, Lin Y et al. Functional variant in microRNA-196a2 contributes to the susceptibility of congenital heart disease in a Chinese population [J]. *Hum Mutat* 2009; 30(8):1231-1236.
- [22] Working Group on Obesity in China. Obesity: The criteria in the Guidelines for prevention and control of overweight and obesity in Chinese adult [J]. *Acta*

- Nurimenta Sinaca 2004; 26:1-4.
- [23] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe [J]. *Nat Rev Genet* 2009; 10(2):94-108.
- [24] Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs [J]. *Nat Rev Genet* 2004; 5(5):396-400.
- [25] Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease [J]. *Trends Genet* 2008; 24(10):489-497.
- [26] Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, van Berkel TJ, Biessen EA. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3):792-797.
- [27] Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(1):73-77.
- [28] Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? [J]. *Circ Res* 2012; 110(3):483-495.
- [29] Gong J, Tong Y, Zhang HM, Wang K, Hu T, Shan G, Sun J, Guo AY. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis [J]. *Hum Mutat* 2012; 33(1):254-263.
- [30] Zhi H, Wang L, Ma G, Ye X, Yu X, Zhu Y, Zhang Y, Zhang J, Wang B. Polymorphisms of miRNAs genes are associated with the risk and prognosis of coronary artery disease [J]. *Clin Res Cardiol* 2012; 101(4):289-296.
- [31] Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events [J]. *JAMA* 2003; 290(7):891-897.
- [32] Ru S, Shen W, Yang P, Zhao Y, Shao Q. [MicroRNA target prediction algorithm: present and future] [J]. *Chin Bulletin Life Sci* 2007; 19(5):562-567.
- [33] Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers [J]. *Oncogene* 2008; 27(52):6667-6678.

- [34] Dreier R, Schmid KW, Gerke V, Riehemann K. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study [J]. *Histochem Cell Biol* 1998; 110(2):137-148.
- [35] Kim SW, Rhee HJ, Ko J, Kim YJ, Kim HG, Yang JM, Choi EC, Na DS. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site [J]. *J Biol Chem* 2001; 276(19):15712-15719.
- [36] Watkins H, Farrall M. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress [J]. *Nat Rev Genet* 2006; 7(3):163-173.
- [37] de Coupade C, Solito E, Levine JD. Dexamethasone enhances interaction of endogenous annexin 1 with L-selectin and triggers shedding of L-selectin in the monocytic cell line U-937 [J]. *Br J Pharmacol* 2003; 140(1):133-145.
- [38] Solito E, Romero IA, Marullo S, Russo-Marie F, Weksler BB. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin [J]. *J Immunol* 2000; 165(3):1573-1581.
- [39] Langheinrich AC, Bohle RM. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation [J]. *Virchows Arch* 2005; 446(2):101-111.
- [40] Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice [J]. *Circulation* 2002; 105(15):1816-1823.
- [41] Yona S, Ward B, Buckingham JC, Perretti M, Flower RJ. Macrophage biology in the Anx-A1^{-/-} mouse [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72(2):95-103.
- [42] Ritchie RH, Sun X, Bilszta JL, Gulluyan LM, Dusting GJ. Cardioprotective actions of an N-terminal fragment of annexin-1 in rat myocardium in vitro [J]. *Eur J Pharmacol* 2003; 461(2-3):171-179.
- [43] 窦立萍, 李永辉, 王莉莉, 于力. miR-196a 靶向调控 HOXA9 基因的实验研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2011; 27(2):166-169.
- [44] Trivedi CM, Patel RC, Patel CV. Homeobox gene HOXA9 inhibits nuclear factor-kappa B dependent activation of endothelium [J]. *Atherosclerosis* 2007; 195(2):e50-60.

第二部分 首钢男性人群总胆固醇水平与 高血压对致死性心血管疾病综合作用的前 瞻性研究

一、 研究背景与目的

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是全球范围内危害人类健康的主要疾病[1], CVD 已逐渐从发达国家蔓延至发展中国家并呈现愈演愈烈之态势。目前众多发展中国家正在经历一个 CVD 发病率快速增长的时期[2]。在中国, CVD 已成为导致中国成年人死亡的“头号杀手” [3]。血压升高和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平升高是世界范围内公认的两个重要的 CVD 可控危险因素 [4-8]。研究发现高血压和高胆固醇血症常常合并出现, 增加 CVD 的死亡风险 [9-11]。若高血压和 TC 水平升高二者之间存在协同作用, 则同时开展降压和调脂治疗将可以更好地预防致死性 CVD, 降低 CVD 死亡风险。在中国人群中, TC 升高或高血压对 CVD 的影响已经得到广泛的研究[12-14], 但 TC 水平升高和高血压对致死性 CVD 发生的影响是否存在交互作用仍有待于进一步探究。

本研究应用中国男性工人前瞻性队列的数据, 探讨血清 TC 水平升高和高血压单个危险因素对 CVD 死亡的影响, 并进一步检验二者之间是否存在交互作用及其对中国成年男性致死性 CVD 发病风险的影响。

二、 研究对象及方法

2.1 研究对象

北京首都钢铁公司男性工人心血管疾病的前瞻性队列研究 (简称“首钢队列”) 基线调查开始于 1974 年。来自首钢公司所属 7 个工厂的 5298 名(18-74 岁) 男性钢铁工人分别参加了 1974 年、1979 年和 1980 年的基线调查, 其中 206 名工人因基线患心血管疾病被排除, 其余 5092 名研究对象进入本研究随访队列人群。截至 2001 年最后一次随访, 有 106 人(2.1%)失访, 共 4986 名研究对象完成

随访。

2.2 基线检查

基线资料由经培训合格的研究人员采用标准方案收集[15]。基线危险因素调查主要项目包括问卷调查和体格检查。问卷调查收集包括人口学特征、个人生活方式（吸烟、饮酒状态）、疾病史和家族史等信息；体格检查包括血压测量、血清 TC 水平、身高体重测量等。血压测量为一次偶测血压，采用标准血压计按规定方法测量，受试者静坐休息 5 分钟，采用坐位，用校正的标准水银柱血压计测量右臂血压，测量前 30 分钟内禁止剧烈活动、吸烟、饮茶或咖啡；Korotkoff 第 1 音为收缩压（systolic blood pressure, SBP），Korotkoff 第 5 音为舒张压（diastolic blood pressure, DBP）。高血压定义为 SBP \geq 140mmHg 和/或 DBP \geq 90mmHg。抽取受试者空腹静脉血，先后采用乙酸酐直接提取法与三氯化铁测定显色法测定血清 TC，两方法作对比所得结果在质量控制允许范围内。吸烟定义为平均每天至少吸 1 支烟并持续 1 年以上。采用标准方法测量身高和体重，测量体重时研究对象穿单衣脱鞋。体重指数（body mass index, BMI）=体重(kg)/身高²(m²)。

2.3 随访数据收集

本次随访研究于 2001 年进行，以 CVD 死亡为队列研究的观察终点。致死性 CVD 包括随访期间因急性心肌梗死、缺血性心脏骤停、慢性冠心病、中风、心力衰竭及其他心血管病导致的死亡事件，CVD 死亡诊断依据国际疾病分类编码 ICD-9 确定（ICD-9: 390.9-398.9, 401.0-429.9, 和 430.0-348.9）。随访采用统一的调查表格，调查员由首钢心血管研究所经过统一技术培训的医护人员担任，所有调查表项目内容都经专人核实。由基层医务人员填报发病和死亡报告单至首钢总医院心血管病专科门诊，由心内科专科医生通过翻阅病历、到基层保健站或住户进行核对。若研究对象发生院外死亡，则工作人员根据研究对象家庭现住址或电话对随访对象或其家属、同事进行访谈，获取研究对象相关危险因素及死亡信息，并核查住院记录。退休去外地的人员则通过家属或厂劳资部门掌握的材料确定其发病和死亡状况。凡死于其他医院的患者先通过基层医疗点及医学统计室查明后，专业人员再进行家访核实。本研究设立专门的终点判断委员会，所有终点判断委员会成员均不知晓研究对象基线危险因素信息。所有死亡病例都具备死亡证明书，明确死因，阜外心血管病医院专科医生对每一个死亡病例的死因进行确证核实，并最终做出终点事件的判断。

2.4 统计分析方法

在本研究中,由于随访对象进入队列的起始和终止时间不同,因此应用观察人年计算发病率。观察对象随访人年数的计算方法为从基线检查开始到终点事件发生为止,分析时剔除了缺失血清 TC 检测数据者 465 例,实际 4521 人进入本次分析。

研究对象基线特征按照血清 TC 水平不同分为 3 组[12]:合适范围组 (<200mg/dl),边缘升高组 (200-239mg/dl),高胆固醇血症组 (≥ 240 mg/dl),采用卡方检验及 ANOVA 方差分析对分类变量及连续变量进行组间差异的分析检验。采用 Cox 比例风险模型调整基线变量后估计 TC 水平升高、高血压对发生致死性 CVD 的风险比 (hazards ratio, HR),利用调整后 HR 计算归因危险度百分比 (population attributable risk percentage, PAR%),计算公式为 $PAR\% = f(HR-1)/[f(HR-1)+1]$ 。

本研究采用 Rothman 和 Greenland[16]提出的加性交互作用模型来分析评价高血压联合高胆固醇血症致 CVD 死亡的生物学交互作用。该模型针对 Cox 回归的相乘模型构建了交互作用超额相对危险度 (relative excess risk due to interaction, RERI)、归因百分比 (attributable proportion, AP) 和协同指数 (synergy index, SI) 3 个指标。计算公式: $RERI = RR_{AB} - RR_A - RR_B + 1$, $AP = RERI / RR_{AB}$, $SI = [RR_{AB} - 1] / [(RR_A - 1) + (RR_B - 1)]$ 。其中 RR_{AB} 为同时暴露于 A 因素和 B 因素的相对危险度 (多因素调整后), RR_A 是仅暴露于 A 因素的相对危险度, RR_B 是仅暴露于 B 因素的相对危险度,共同的参照组为既不暴露于 A 因素也不暴露于 B 因素组。无加性交互作用的判断依据为 RERI 和 AP 的可信区间包含 0, SI 的可信区间包含 1,根据该 3 个指标的 95%可信区间 (confidence interval, CI) 估计值来判断其是否具有统计学意义 ($P < 0.05$) [17]。

本研究对基线资料和随访调查结果数据进行二次录入,对比纠错,使用 SAS9.0 (SAS institute) 和 SPSS13.0 (SPSS Inc.) 软件进行统计分析,作图使用 Excel 软件。

三、 研究结果

3.1 研究对象基线特征

按照基线血清 TC 水平分层后,研究人群基线特征如表 2-1 所示。随着人群血清 TC 水平的升高,平均年龄、BMI、血压水平、高血压患病率以及饮酒率都

呈升高趋势。

3.2 随访基本情况

本次前瞻性研究的随访调查于 2001 年完成,共随访到 4986 人,失访 106 人,随访率为 97.9%。本研究以 CVD 死亡为终点事件的总随访人年为 103,927 人年,平均随访 20.84 年。随访期间该队列人群共发生 302 例致死性 CVD, CVD 死亡率为 290.59/10 万人年。致死性 CVD 的发生年龄最小为 25 岁,最大为 85 岁。其中死于冠心病的研究对象 94 例,冠心病死亡率为 90.45/10 万人年;死于中风的研究对象 169 例,中风死亡率为 162.61/10 万人年;死于其它心血管病的研究对象 39 例。CVD 死亡分类详见图 2-1。

表 2-1 研究对象基线特征

变量	血清 TC (mg/dl)			P 值
	<200	200~240	≥240	
人数	3,032 (67.1%)	1,089 (24.1%)	400 (8.8%)	--
年龄 (岁)	44.44±8.14	46.01±7.06	46.72±6.81	<0.001
吸烟率 (%)	73.3	72.2	69.5	0.05
饮酒率(%)	45.2	50.5	52.8	0.001
BMI (kg/m ²)	22.91±2.65	23.52±2.73	24.13±2.86	<0.001
SBP (mmHg)	121.85±18.28	125.53±19.26	127.61±20.84	<0.001
DBP (mmHg)	80.20±11.54	82.41±12.43	83.46±12.69	<0.001
高血压患病人数	877 (28.9%)	429 (39.4%)	163 (40.5%)	<0.001
TC (mg/dl)	165.42±23.14	215.17±11.23	265.44±25.40	<0.001

注: 使用均数±标准差和百分率表示。

BMI, 体重指数。SBP, 收缩压。DBP, 舒张压。TC, 总胆固醇。

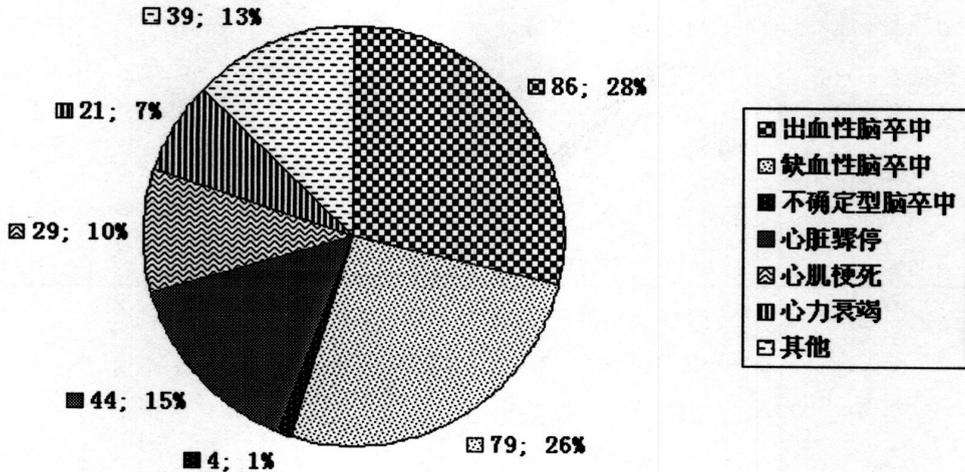


图 2-1 首钢男性钢铁工人主要 CVD 死亡分类(n; %)

3.3 危险因素的多因素分析

3.3.1 不同血清 TC 水平和高血压与致死性 CVD 的关系

不同血清 TC 水平人群 CVD 死亡率和风险比如表 2-2 所示。随着血清 TC 水平的升高, CVD 死亡率也随之升高。按照 TC 水平分层并进行多因素校正后, 结果显示: 与血清 TC 水平在合适范围内的人群相比, 高胆固醇血症对致死性 CVD 的 HR 为 1.67 (95%CI 1.18-2.38), 结果具有统计学意义 ($P=0.004$); 而 TC 水平边缘升高对致死性 CVD 的 HR 值未达到统计学显著性 ($P=0.619$)。

高血压是致死性 CVD 的独立危险因素。与正常血压人群相比, 高血压人群发生致死性 CVD 的发病风险相对较高, 其 CVD 死亡率明显增加, 相应的风险比为 2.91 (95%CI 2.23-3.80, $P<0.001$), 如表 2-2 所示。高胆固醇血症和高血压对 CVD 死亡的人群归因危险度百分比 (PAR%) 分别为 5.30% 和 38.91%。

表 2-2 不同 TC 和血压水平人群 CVD 死亡率和风险比

变量	血清 TC 水平(mg/dl)			血压	
	<200	200-239	≥240	正常血压	高血压
随访人年数	63,334	22,873	8,23	64,617	29,739
致死性 CVD (n)	165	77	42	106	178
CVD 死亡率 (1/10 万人年)	260.52	336.64	510.14	164.04	598.54
HR	1.00	1.08 ^a	1.67 ^a	1.00	2.91 ^b
(95%CI)		(0.81-1.43)	(1.18-2.38)		(2.23-3.80)

^a: 多因素 Cox 模型校正基线年龄, 吸烟、饮酒情况, 体重指数和高血压。

^b: 多因素 Cox 模型校正基线年龄, 吸烟、饮酒情况, 体重指数和血清 TC 水平。

缩写: HR, 风险比; CVD, 心血管疾病; TC, 总胆固醇; CI, 可信区间。

3.3.2 TC 水平升高与高血压的交互作用对致死性 CVD 的影响

首先, 将研究对象分为 TC<240mg/dl 和 TC≥240 mg/dl 两组, 调整了基线年龄、吸烟、饮酒情况以及体重指数后, 分析结果显示两组人群中高血压与致死性 CVD 发病风险的增加均呈现显著关联, 相应的风险比为 2.62 (95%CI 1.96-3.49, $P<0.001$) 和 6.08 (95%CI 2.84-12.99, $P<0.001$)。然后, 根据研究对象高胆固醇血症和高血压的患病情况, 采用分层分析的方法将研究对象分为四组, 如表 2-3 所示。与正常血压且 TC<240mg/dl 人群相比, 正常血压且 TC≥240 mg/dl 组人群以及患高血压且 TC<240mg/dl 组人群发生致死性 CVD 的风险比分别为 1.11 (95%CI 0.56-2.21, $P=0.767$) 和 2.74 (95%CI 2.07-3.64, $P<0.001$), 而同时患有两种疾病的人群其相应风险比为 5.51 (95%CI 3.58-8.46, $P<0.001$)。结果表明高血压和高胆固醇血症并发的人群 CVD 死亡率明显高于患上任意一种疾病的人群, 且共同暴露组人群其发生致死性 CVD 的风险比也明显高于单一暴露组人群, 提示高胆固醇血症与高血压可能对增加致死性 CVD 的风险存在协同作用。

本研究应用加性模型评价 TC 水平升高与高血压对致死性 CVD 发病风险的生物学交互作用, 调整基线年龄、BMI、吸烟和饮酒状况后, 结果显示, 高胆固醇血症联合高血压对于增加致死性 CVD 发病风险存在显著的协同作用。以 240mg/dl 为切点, 交互作用超额相对危险度、交互归因百分比和协同指数分别为 2.65 (95%CI 0.45-4.85), 48.2% (95%CI 23.7%-72.7%) 和 2.43 (95%CI 1.25-4.71)。这表明归因于高胆固醇血症和高血压两者交互作用所致的 CVD 死亡是其他因子

的 2.65 倍，共同暴露组人群发生致死性 CVD 的相对危险有 48.2% 归因于两者的交互作用，并且此交互作用对致死性 CVD 发病风险的综合作用是单一危险因素作用总和的 2.43 倍。(图 2-2，表 2-4)

表 2-3 不同暴露水平人群发生致死性 CVD 的风险比

暴露情况	HR [†]	95% CI	CVD 死亡 (n)	CVD 死亡率 (/100 000 人年)	P 值
正常组 ^a (n=2812)	1.00	-	97	162.84	-
高胆固醇血症组 ^b (n=237)	1.11	0.56-2.21	9	178.29	0.767
高血压组 ^c (n=1306)	2.74	2.07-3.64	145	545.63	<0.001
共同暴露组 ^d (n=162)	5.51	3.58-8.46	33	1,042.98	<0.001

^a: 正常血压且 TC<240mg/dl。

^b: 正常血压且 TC≥240 mg/dl。

^c: 高血压且 TC<240mg/dl。

^d: 高血压且 TC≥240 mg/dl。

[†]: 多因素 Cox 模型校正基线年龄，吸烟、饮酒，和体重指数。

缩写: HR, 风险比; CVD, 心血管疾病; CI, 可信区间。

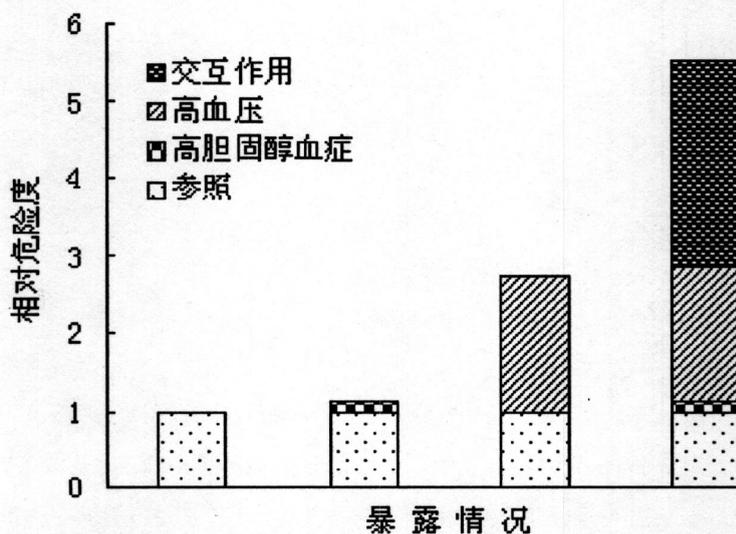


图 2-2 高胆固醇血症与高血压交互作用对致死性 CVD 的影响

表 2-4 TC 水平升高与高血压对致死性 CVD 发病风险的交互作用

TC 水平切点 (mg/dl)	RERI	AP (%)	SI
	估计值(95%CI)	估计值(95%CI)	估计值(95%CI)
240	2.65 (0.45-4.85)	48.2 (23.7-72.7)	2.43 (1.25-4.71)
220	1.86 (0.46-3.26)	42.6 (20.1-65.2)	2.24 (1.21-4.13)
200	0.92 (-0.11-1.95)	26.2 (0.3-52.2)	1.58 (0.90-2.77)

注：调整基线年龄，体重指数，吸烟和饮酒情况。

缩写：RERI，交互作用超额相对危险度；AP，交互归因百分比；SI，协同指数；CI，可信区间。

为进一步深入探讨不同 TC 水平与高血压对致死性 CVD 发病风险的交互作用强度，本研究随后将 220mg/dl 和 200mg/dl 作为 TC 水平的切点。分析结果如表 2-4 所示，当 TC 水平切点为 220mg/dl 时，TC \geq 220 mg/dl 与高血压之间存在协同作用且具有统计学显著性。交互作用超额相对危险度、交互归因百分比和协同指数分别为 1.86 (95%CI 0.46-3.26)，42.6% (95%CI 20.1%-65.2%) 和 2.24 (95%CI 1.21-4.13)。但当切点降至 200mg/dl 时，未发现 TC \geq 200 mg/dl 与高血压对致死性 CVD 发病风险存在交互作用。敏感性分析，当剔除第 1 年发生 CVD 死亡的研究对象后，高胆固醇血症与高血压对致死性 CVD 发病风险仍存在显著的加性交互作用。

四、 讨论

首钢男工队列研究是截至目前国内随访时间最长的心血管病前瞻性队列研究,研究的病例诊断均采用 WHO 统一诊断标准,并且与首钢心血管病研究所的 MONICA 登记资料进行核对。本研究通过对首钢男工队列人群的随访观察研究,对中国男性人群 TC 水平升高和高血压对致死性 CVD 的风险比进行评估。不仅发现 CVD 死亡率随 TC 水平和血压水平的升高而升高,而且分析结果还显示 TC 水平升高和高血压对致死性 CVD 的发病风险存在加性交互作用,TC 水平越高,归因于交互作用的致死性 CVD 发病风险越高。

既往西方发达国家和亚洲人群的研究结果显示,高胆固醇血症和高血压是致死性和非致死性心血管疾病重要的常见可控性危险因素[18-20],本研究结果也显示高胆固醇血症和高血压都是致死性 CVD 的独立危险因素,与既往研究结论一致[8, 13, 14]。

基于大规模人群的研究数据表明,高胆固醇血症在高血压病人中很常见,二者并发会增加心血管死亡的风险[10, 11],这可能是由于高血压和高胆固醇血症在病理生理机制方面存在着相互作用,而这种作用是由于高 TC 水平对人体外周血管张力的影响造成的[21]。截至目前为止,心血管疾病发病风险的多因素分析大多是围绕血脂与吸烟的联合作用对 CVD 风险的影响进行探讨。美国人群的一些研究发现血浆胆固醇与血压水平对心血管死亡率也存在加性效应[22-24]。近年来中国人群中也已开展了探讨血压和吸烟的联合作用对心血管疾病的影响以及不同 TC 水平人群吸烟对冠心病死亡影响的相关研究[25, 26],但血清 TC 水平升高和高血压的联合作用对 CVD 死亡的影响尚不明确,因此,我们有必要在中国人群中进一步深入探究 TC 水平升高与高血压的联合作用对致死性 CVD 风险的影响。

既往评估疾病负担的传统方法严重低估了血清总胆固醇对 CVD 发病和死亡风险的影响。尽管本研究结果显示血清 TC 水平导致致死性 CVD 事件的 PAR% 仅为 5.3%,明显低于高血压,但不应该因此而低估它对 CVD 死亡的影响。高胆固醇血症与高血压的综合作用对致死性 CVD 发病风险的影响大大超过了单一危险因素,本研究发现在中国男性人群中 TC 水平升高与高血压对致死性 CVD 发病风险的加性交互作用存在统计学显著性,即两种危险因素之间存在协同作用。此外,当将 TC 水平的切点由 240mg/dl 降至 220mg/dl 时,相应的交互作用超额相对危险度从 2.65 下降至 2.31,交互归因百分比从 48.1%下降至 42.6%,协同指数从 2.43 下降至 2.24,但当切点降至 200mg/dl 时则未发现 TC 水平与高血压之间存在显著的交互作用,由此可见交互作用超额相对危险度、交互归因百分比和

协同指数的水平都随着 TC 水平的降低而呈下降趋势，TC 水平的升高可能直接或间接在血压升高的病理生理过程中发挥重要作用。本研究的发现将给中国人群 CVD 死亡的预防以重要启示：尽管高胆固醇血症的 PAR%很低，但由于高血压和血清 TC 水平之间存在交互作用，因此高血压人群的调脂策略对于有效降低 CVD 死亡风险所发挥的作用要远高于我们的预期效果。与此同时，高血压与 TC 水平升高间交互作用的发现对临床治疗也具有重要的指导意义，在医疗诊治中同时进行降压、调脂治疗，特别是对高血压人群的调脂治疗，能获得更好的预防 CVD 死亡的效果，具有更高收益。

本研究队列人群样本量比较大，随访时间平均长达 20 余年，随访率高，统计学把握度高，但也存在一些不足之处。第一，未收集研究对象在基线和随访阶段是否服用降压或降脂药物的相关信息，因而无法检验服用此类药物对致死性 CVD 事件风险的影响，并且可能低估服用降压或调脂药物人群的血压、血脂水平，对高血压、高胆固醇血症的判断会造成一定影响，但由于我国 20 世纪 70 年代人群总体的高血压、高胆固醇血症的治疗率和控制率普遍较低，因此不会造成显著影响[12, 27-29]；第二，基线血压为一次偶测血压，可能造成对个体血压水平的过高估计；第三，基线时条件所限，未测定研究对象的血糖值，且本队列中明确诊断为糖尿病的病人很少，在多因素分析无法在模型中调整血糖水平，所以无法评估糖尿病对致死性 CVD 发病风险的影响；第四，本研究队列人群属于职业人群而非一般人群，尽管该队列人群的传统危险因素水平与我国其它一般人群的研究结果相似，但无法完全代表中国人群。

五、 小结

本随访研究证实，TC 水平升高和高血压都是致死性 CVD 的独立危险因素；血清 TC 水平与高血压对增加 CVD 死亡风险存在协同作用。这种协同作用提示在高血压人群中采取调脂治疗策略能获得更好的 CVD 防治效果，对于此两种危险因素的有效预防与治疗会更好降低致死性 CVD 的发病风险，从而降低人群 CVD 死亡率。

参考文献

- [1] Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet* 1997; 349(9061):1269-1276.
- [2] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. *PLoS Med* 2006; 3(11):e442.
- [3] He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, Wang J, Chen CS, Chen J, Wildman RP et al. Major causes of death among men and women in China [J]. *N Engl J Med* 2005; 353(11):1124-1134.
- [4] Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events [J]. *JAMA* 2003; 290(7):891-897.
- [5] Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, Ellis SG, Lincoff AM, Topol EJ. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease [J]. *JAMA* 2003; 290(7):898-904.
- [6] Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report [J]. *JAMA* 2003; 289(19):2560-2572.
- [7] Whelton PK, He J. Blood pressure reduction. In: Buring JE, Manson JE, Ridker PM, eds. *Clinical trials in cardiovascular disease* [M]. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004: 282-296.
- [8] Woodward M, Martiniuk A, Lee CM, Lam TH, Vanderhoorn S, Ueshima H, Fang X, Kim HC, Rodgers A, Patel A et al. Elevated total cholesterol: its prevalence and population attributable fraction for mortality from coronary heart disease and ischaemic stroke in the Asia-Pacific region [J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008; 15(4):397-401.
- [9] Goode GK, Miller JP, Heagerty AM. Hyperlipidaemia, hypertension, and coronary heart disease [J]. *Lancet* 1995; 345(8946):362-364.
- [10] Laurenzi M, Mancini M, Menotti A, Stamler J, Stamler R, Trevisan M, Zanchetti A. Multiple risk factors in hypertension: results from the Gubbio

- study [J]. *J Hypertens Suppl* 1990; 8(1):S7-12.
- [11] Kannel WB. Risk stratification in hypertension: new insights from the Framingham Study [J]. *Am J Hypertens* 2000; 13(1 Pt 2):3S-10S.
- [12] He J, Gu D, Reynolds K, Wu X, Muntner P, Zhao J, Chen J, Liu D, Mo J, Whelton PK. Serum total and lipoprotein cholesterol levels and awareness, treatment, and control of hypercholesterolemia in China [J]. *Circulation* 2004; 110(4):405-411.
- [13] Gu D, Kelly TN, Wu X, Chen J, Duan X, Huang JF, Chen JC, Whelton PK, He J. Blood pressure and risk of cardiovascular disease in Chinese men and women [J]. *Am J Hypertens* 2008; 21(3):265-272.
- [14] Chen J, Gu D, Whelton SP, Wu X, Chen CS, Duan X, Huang J, Kelly TN, Hamm LL, He J. Blood pressure and mortality among Chinese patients with cardiovascular disease [J]. *J Hypertens* 2008; 26(5):859-865.
- [15] Li JX, Cao J, Lu XF, Chen SF, Yu DH, Duan XF, Wu XG, Gu DF. The effect of total cholesterol on myocardial infarction in Chinese male hypertension population [J]. *Biomed Environ Sci* 2010; 23(1):37-41.
- [16] Rothman KJ, Greenland S. *Modern epidemiology*. 2nd ed [M]. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998: 255-259.
- [17] Andersson T, Alfredsson L, Kallberg H, Zdravkovic S, Ahlbom A. Calculating measures of biological interaction [J]. *Eur J Epidemiol* 2005; 20(7):575-579.
- [18] Stamler J, Davignus ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity [J]. *JAMA* 2000; 284(3):311-318.
- [19] Chen Z, Peto R, Collins R, MacMahon S, Lu J, Li W. Serum cholesterol concentration and coronary heart disease in population with low cholesterol concentrations [J]. *BMJ* 1991; 303(6797):276-282.
- [20] Eastern Stroke and Coronary Heart Disease Collaborative Research Group. Blood pressure, cholesterol, and stroke in eastern Asia [J]. *Lancet* 1998; 352(9143):1801-1807.
- [21] Borghi C. Interactions between hypercholesterolemia and hypertension: implications for therapy [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11(5):489-496.
- [22] Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Prevalence and prognostic significance of

- hypercholesterolemia in men with hypertension. Prospective data on the primary screenings of the Multiple Risk Factor Intervention Trial [J]. *Am J Med* 1986; 80(2A):33-39.
- [23] Neaton JD, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group [J]. *Arch Intern Med* 1992; 152(1):56-64.
- [24] Lowe LP, Greenland P, Ruth KJ, Dyer AR, Stamler R, Stamler J. Impact of major cardiovascular disease risk factors, particularly in combination, on 22-year mortality in women and men [J]. *Arch Intern Med* 1998; 158(18):2007-2014.
- [25] Sun D, Cao J, Liu X, Yu L, Yao C, Li J, Yu D, Chen J, Wu X, Huang J et al. Combined effects of smoking and systolic blood pressure on risk of coronary heart disease: a cohort study in Chinese women [J]. *J Womens Health (Larchmt)* 2010; 19(4):713-718.
- [26] 姜斌, 何耀, 封康, 朱善香, 李良寿, 李兰荪. 不同胆固醇水平人群吸烟与冠心病死亡的关系 [J]. *中国慢性病预防与控制* 2006; 14 (6):389-331.
- [27] Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Muntner P, Huang G, Reynolds RF, Su S, Whelton PK et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in china [J]. *Hypertension* 2002; 40(6):920-927.
- [28] 李立明, 饶克勤, 孔灵芝, 姚崇华, 向红丁, 翟凤英, 马冠生, 杨晓光. 中国居民 2002 年营养与健康状况调查 [J]. *中华流行病学杂志* 2005; 26(7):478-484.
- [29] Wang Z, Wu Y, Zhao L, Li Y, Yang J, Zhou B. Trends in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the middle-aged population of China, 1992-1998 [J]. *Hypertens Res* 2004; 27(10):703-709.

第三部分 PPARGC1A 基因多态性与 2 型 糖尿病关联研究的 meta 分析

一、 研究背景与目的

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是心血管疾病的主要危险因素之一, 目前世界范围内的糖尿病患者人数已接近 3 亿, 并呈逐年上升趋势[1]。全球糖尿病患病情况统计数据显示, 2010 年全球 20-79 岁的成年人中有 2.85 亿患有糖尿病, 患病率为 6.4%。预计到 2030 年, 糖尿病患病率将增加至 7.7% (4.39 亿患者) [2]。T2DM 是一种由环境因素与遗传因素共同作用导致的多基因复杂疾病[3]。尽管近年来 T2DM 的发病机制研究取得了一些进展, 然而其确切的遗传分子机制仍有待于进一步探究。

过氧化物酶体增殖活化受体 γ 协同激活因子 (peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1, PPARGC1A) 是近年发现的一种转录协同因子, 在人的肝脏、心脏、肾脏以及骨骼肌中都呈高水平表达。作为一种重要的多功能转录因子蛋白, PPARGC1A 在人体内葡萄糖自稳态平衡通路中充当“分子开关”的角色。它通过控制糖异生过程来调节肝脏葡萄糖的合成[4, 5], 并且通过肌肉增强因子 2C (muscle enhance factor 2C, MEF2C) 来诱导骨骼肌葡萄糖转运子 4 (glucose transporter 4, GLU4) 的基因表达从而激活和促进骨骼肌对葡萄糖的摄取[6]。鉴于 PPARGC1A 广泛参与机体代谢的过程并发挥着重要作用, PPARGC1A 基因已成为目前糖尿病遗传分子机制研究领域的重要候选基因。PPARGC1A 基因位于 4 号染色体的 p15.1, 全长 67kb, 含有 13 个外显子。在高加索人群与亚洲人群中, 有研究发现位于 PPARGC1A 基因外显子 8 上的 Gly482Ser 和 Thr394Thr(ACG→ACA) 以及外显子 9 上的 Thr612Met 变异与 T2DM 的发病风险相关联, 但其关联结果在重复验证研究中并未得到一致性结论。在高加索人群和东亚人群中, 上述 3 个 SNPs 位点彼此处于较弱的连锁不平衡状态。已发表的一篇 meta 分析报道了高加索人群中 Gly482Ser 与 T2DM 的发病风险相关联, 但仍需要大样本的重复验证研究来证实[7]。本研究采用 meta 分析的方法, 在不同种族人群中, 综合评价 PPARGC1A 基因的 3 个遗传多态位点 Gly482Ser、Thr394Thr 和 Thr612Met 变异与 T2DM 的关联关系。

二、 研究对象和方法

2.1 文献检索

为准确纳入相关的研究文献,本研究首先入选了已发表的“*PPARGC1A* 基因多态性与 T2DM 关联研究的 meta 分析”文章中所有相关的病例对照研究[7]。然后,分别以“*PPARGC1A*”,“*PGC1*”,“*PGC-1*”,“*PGC1alpha*”或“*PGC-1alpha*”与“type 2 diabetes”,“type two diabetes”,“T2DM”或“diabetes”的不同组合作为检索词,在电子数据库 PubMed 上检索所有 *PPARGC1A* 基因与 T2DM 关联的英文文献;再分别以“*PPARGC1A*”,“*PGC1*”,“*PGC-1*”,“*PGC1alpha*”或“*PGC-1alpha*”与“2 型糖尿病”,“II 型糖尿病”,或“糖尿病”的不同组合作为检索词,联合检索中国生物医学数据库(CBM)和维普医药信息资源系统数据库(Cqvip)收录的所有相关中文文献,并辅以文献追溯方法收集相关中英文文献。末次检索日期为 2010 年 4 月。本研究的文献纳入标准如下:(1)无关人群样本的病例对照研究,(2)提供完整的基因型以及等位基因频率的数据信息,(3)对照组的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)。检索到的文献若仅以摘要形式发表,通过与通讯作者联系的方式索取详细基因分型数据,若作者无法提供数据该文章予以剔除。本研究所有文献检索工作由两位研究人员独立完成,再进行比较整合。

2.2 统计分析

仔细阅读文献,按 meta 分析的数据要求进行数据整理。采用卡方检验的方法对各相关研究的基因型分布进行 HWE 检验,采用 SPSS 软件(Version 13.0; SPSS Inc, USA)分析检验各研究的对照组人群基因型分布是否符合 HWE,若不满足则剔除该文献。采用 STATA 软件(Version 10.0; Stata Corporation, College Station, TX)的“metan”程序模块计算各研究等位基因的 OR 值,在“metabias”程序模块中的 Egger 线性回归模型以及漏斗图对各研究进行发表偏倚的评估[8]。采用标准的 Cochran's 检验对各研究间的异质性进行统计学检验,统计量 $I^2 > 50\%$ 被认为研究间具有显著的异质性[9]。若无显著异质性,则采用固定效应模型(Mantel-Haenszel)进行数据合并;若存在显著异质性,需要对异质性原因进行分析,采用校正后的随机效应模型(DerSimonian-Laird)进行数据合并。计算合并 OR 值以及 95%可信区间(Confidence interval, CI),双侧检验 P 值 < 0.05 被认为具有统计学显著性。

三、 研究结果

3.1 文献筛选结果

经过初步检索筛选, 获得 33 篇符合纳入标准的相关研究, 剔除重复报告以及研究对象为家系样本的文献 6 篇[10-17], 未提供相关基因型数据的文献 1 篇[18], 研究样本对照组人群基因型分布不符合 HWE 的文献 3 篇[19-31], 数据质量差且存在基因分型错误的文献 3 篇[22-24](图 3-1), 最后来自 20 篇文献的 23 个研究被纳入 meta 分析, 具体研究信息详见表 3-1。

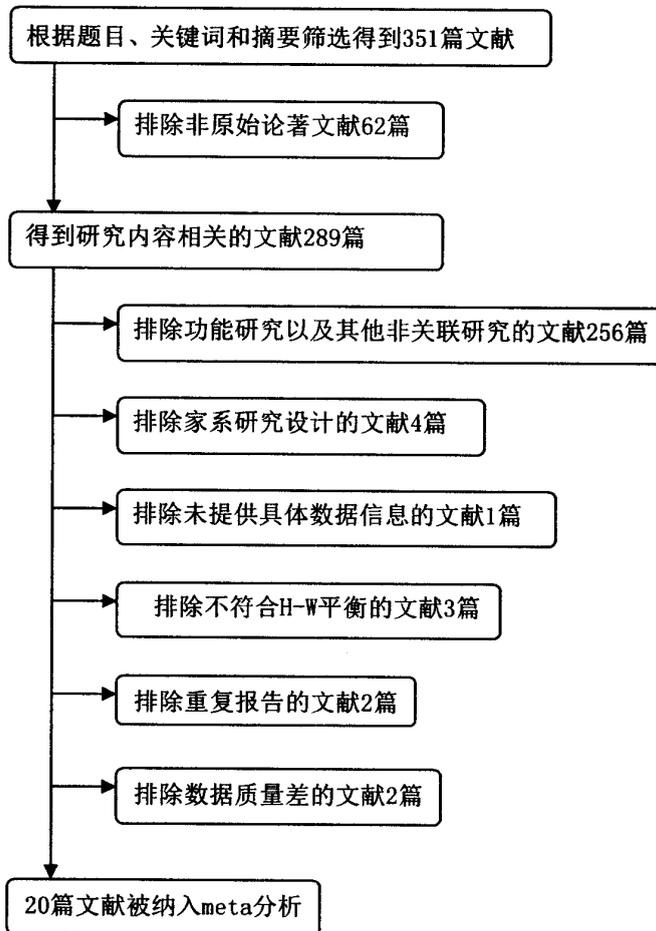


图 3-1 符合条件研究的筛选过程

表 3-1 纳入研究的文献基本特征

研究作者	种族	研究对象样本量		少见等位基因频率(%)	
		病例组	对照组	病例组	对照组
Gly482Ser					
J.Ek et al. [25]	高加索人	454	198	37.0	30.8
J.Ek et al. [25]	高加索人	201	293	38.1	30.4
Lacquenmant et al. [26]	高加索人	659	748	36.0	35.0
Barraso et al. [27]	高加索人	514	507	33.3	37.2
Oberkofler et al. [28]	高加索人	494	1478	36.4	34.8
T.Kunej et al. [29]	高加索人	305	240	32.6	29.4
Barraso et al. [7]	高加索人	337	713	35.5	33.9
Hara et al. [30]	东亚人	417	537	46.6	43.7
Chen et al. [31]	东亚人	494	555	42.8	42.9
Wang X et al. [32]	东亚人	20	39	47.5	48.7
Wang X et al. [32]	东亚人	27	36	40.7	43.1
Kim et al. [33]	东亚人	758	302	43.5	43.9
Sun et al. [34]	东亚人	390	525	44.4	41.1
Zhang S et al. [16]	东亚人	263	282	40.1	29.3
Zhu et al. [35]	东亚人	595	495	44.1	46.9
Hui et al. [36]	东亚人	140	88	54.7	39.2
Weng et al. [37]	东亚人	276	1049	43.7	43.7
Vimalleswaran et al. [38]	印度人	82	82	28.0	22.0
Bhat et al. [39]	印度人	199	213	39.9	28.6
Bhat et al. [39]	印度人	152	258	31.6	26.0
Rai E et al. [40]	印度人	762	924	52.0	33.8
Thr394Thr					
Chen et al. [31]	东亚人	494	555	21.7	22.0
Zhang S et al. [16]	东亚人	263	282	22.2	24.1
Zhang Z et al. [15]	东亚人	65	58	20.8	23.3
Zhang Z et al. [15]	东亚人	48	46	24.0	20.7
Vimalleswaran et al. [38]	印度人	82	82	29.9	17.1
Vimalleswaran et al. [41]	印度人	515	882	11.0	7.5
Bhat et al. [39]	印度人	199	213	27.9	16.7
Bhat et al. [39]	印度人	152	258	26.6	17.4
Thr612Met					
J.Ek et al. [25]	高加索人	475	203	3.5	4.9
J.EK et al. [25]	高加索人	220	291	2.0	5.3
Kim et al. [33]	东亚人	752	300	20.5	18.5
Zhu et al. [35]	东亚人	595	495	17.6	18.3

3.2 *PPARGC1A* Gly482Ser 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析结果

在 *PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态性与 T2DM 关联性的 meta 分析中, 共纳入 21 个研究, 均为病例对照研究, 累计 T2DM 病例 7539 例, 累计对照者 9562 例。其中 7 个研究来自高加索人群, 10 个研究来自东亚人群, 另外 4 个研究来自印度人群。

首先, 采用随机效应模型对来自不同种族人群的所有研究进行 meta 分析。结果显示在加性遗传模型下, 以 482Gly 等位基因为对照, 携带 482Ser 等位基因人群发生 T2DM 的合并 OR 值为 1.19 (95%CI 1.05-1.34, $P=0.006$) (图 3-2)。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, Egger 线性回归检验定量评估 meta 分析漏斗图对称性的结果显示所有纳入研究无发表偏倚 ($P=0.393$) (图 3-3)。但异质性检验发现各研究间的异质性达到统计学显著性, $I^2=83.8%$, $P<0.001$ 。

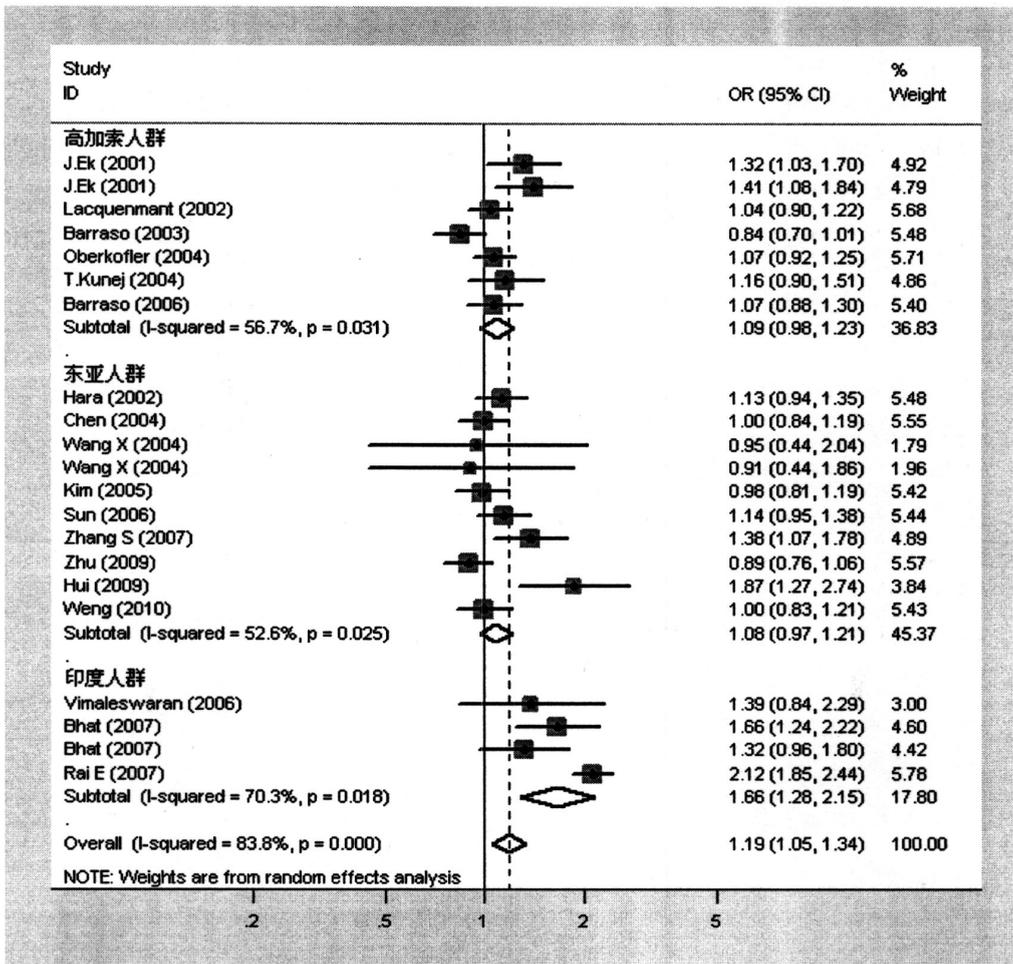


图 3-2 *PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析

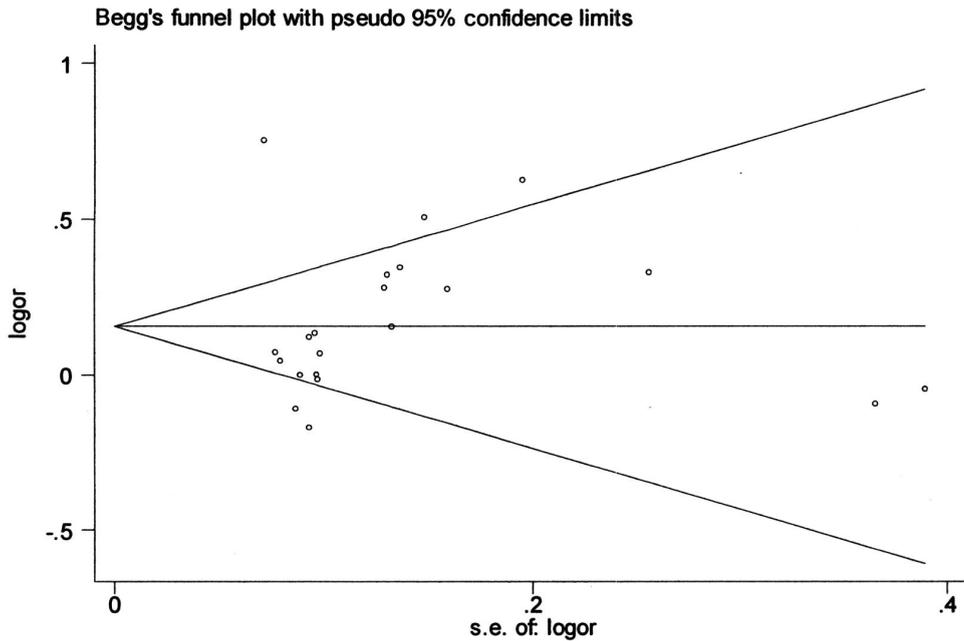


图 3-3 *PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

考虑到种族差异很可能是研究间存在显著异质性的原因,本研究随后将纳入的 21 个研究根据研究样本人群不同的种族属性分为高加索人群、东亚人群和印度人群 3 个亚组并分别进行 meta 分析。

高加索人群亚组共纳入 7 个研究,累计 T2DM 病例 2964 例,累计对照 4177 例。亚组 meta 分析结果显示,*PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态位点与 T2DM 的关联未达到统计学显著性,合并 OR 值为 1.09 (95%CI 0.98-1.23, $P=0.126$) (图 2)。异质性检验结果显示,上述 7 个研究间只有轻度的异质性 ($I^2=56.7\%$, $P=0.031$)。漏斗图对称性检验结果显示该 7 个研究不存在发表偏倚 ($P=0.361$) (图 3-4)。

东亚人群亚组共纳入 10 个研究,累计 T2DM 病例 3380 例,累计对照 3908 例。其中有 8 个研究来自中国人群,另外 2 个研究分别来自日本和韩国。亚组 meta 分析结果显示,在加性遗传模型下,482Ser 等位基因对 T2DM 发病风险的作用未达到统计学显著性,合并 OR 值为 1.08 (95%CI 0.97-1.21, $P=0.148$) (图 3-2)。异质性研究结果显示,上述 10 个研究间存在轻度异质性 ($I^2=52.6\%$, $P=0.025$)。漏斗图对称性检验结果显示该 10 个研究不存在发表偏倚 ($P=0.066$) (图 3-5)。

印度人群亚组共纳入 4 个研究,累计 T2DM 病例 1195 例,累计对照 1477 例。与高加索人群和东亚人群亚组 meta 分析的结果不同,在印度人群亚组 meta

分析中,发现了 *PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态与 T2DM 发病风险的关联关系达到统计学显著性,其合并 OR 值为 1.66 (95%CI 1.28-2.15, $P<0.001$) (图 3-2)。异质性检验结果显示上述 4 个研究间存在异质性 ($I^2=70.3%$, $P=0.018$)。漏斗图对称性检验结果显示该 4 个研究不存在发表偏倚 ($P=0.058$) (图 3-6)。

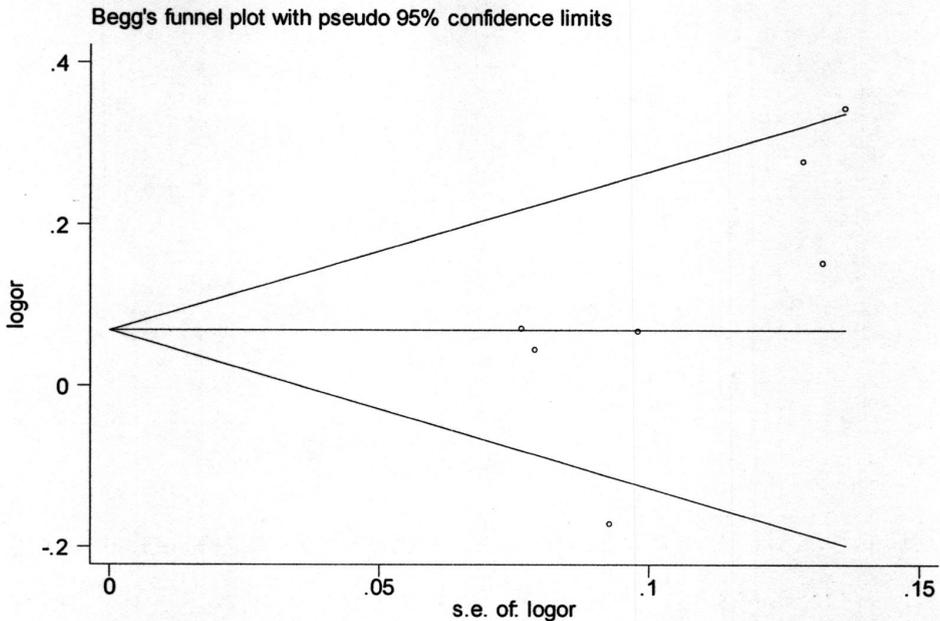


图 3-4 高加索人群 *PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

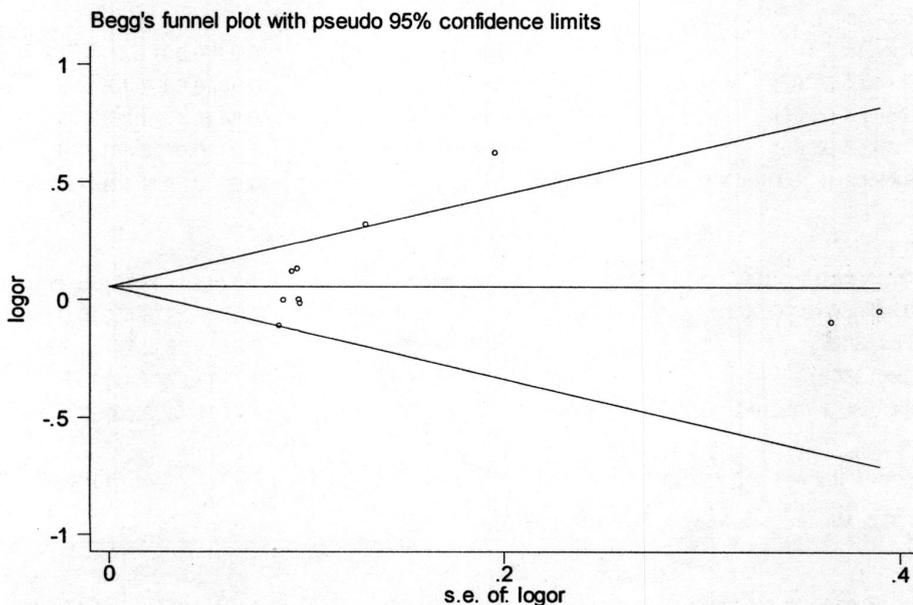


图 3-5 东亚人群 *PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

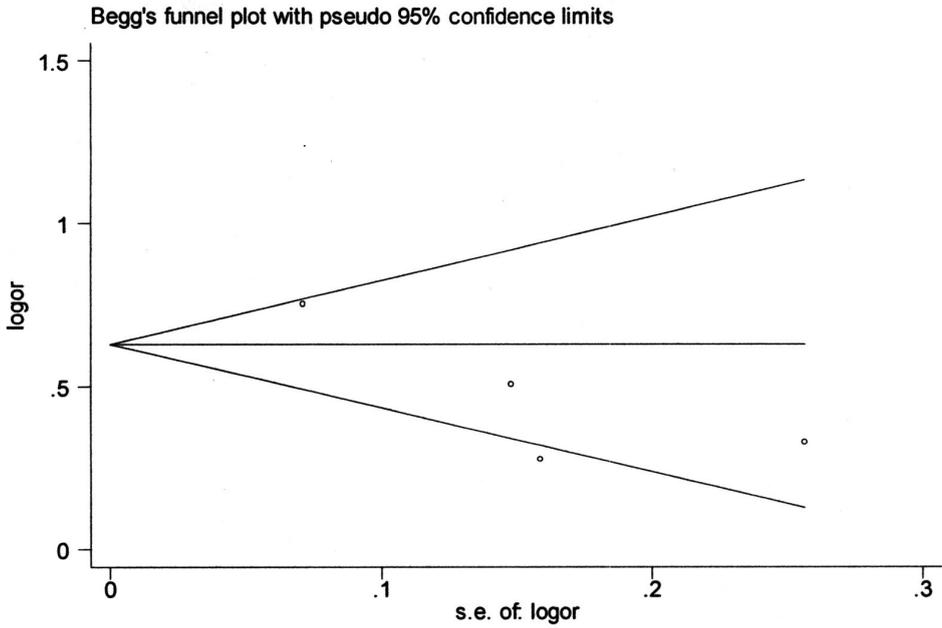


图 3-6 印度人群 *PPARGC1A* 基因 Gly482Ser 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

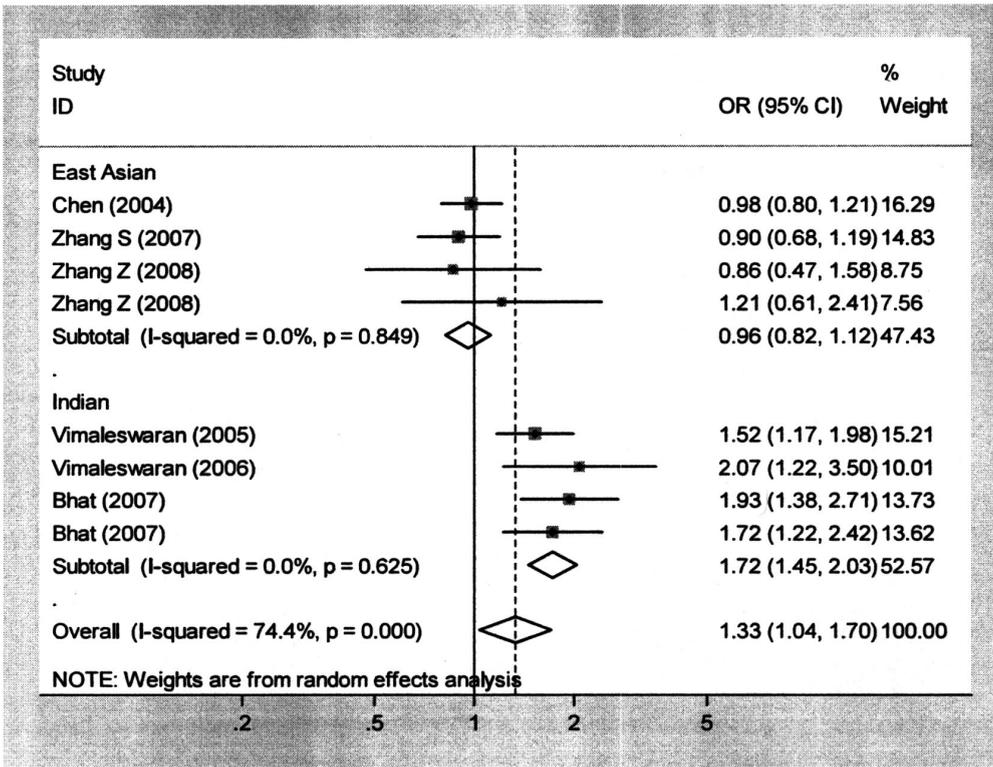


图 3-7 *PPARGC1A* 基因 Thr394Thr 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析

3.3 *PPARGC1A* Thr394Thr 多态性与 T2DM 的 meta 分析结果

在 *PPARGC1A* 基因 Thr394Thr 多态性与 T2DM 关联关系的 meta 分析中,共纳入 8 个研究,累计 T2DM 病例 1818 例,累计对照 2376 例。其中 4 个研究来中国人群,另外 4 个研究来自印度人群。先采用随机效应模型对所有纳入的研究进行 meta 分析,以 394Thr (ACG) 等位基因为对照,携带 394Thr (ACA) 等位基因的人群发生 T2DM 的合并 OR 值为 1.33 (95%CI 1.04-1.70, $P=0.024$) (图 3-7)。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, Egger 线性回归检验定量评估 meta 分析漏斗图对称性的结果显示所有纳入研究无发表偏倚 ($P=0.166$) (图 3-8)。但异质性检验发现各研究间的异质性达到统计学显著水平, $I^2=74.4%$, $P<0.001$ 。

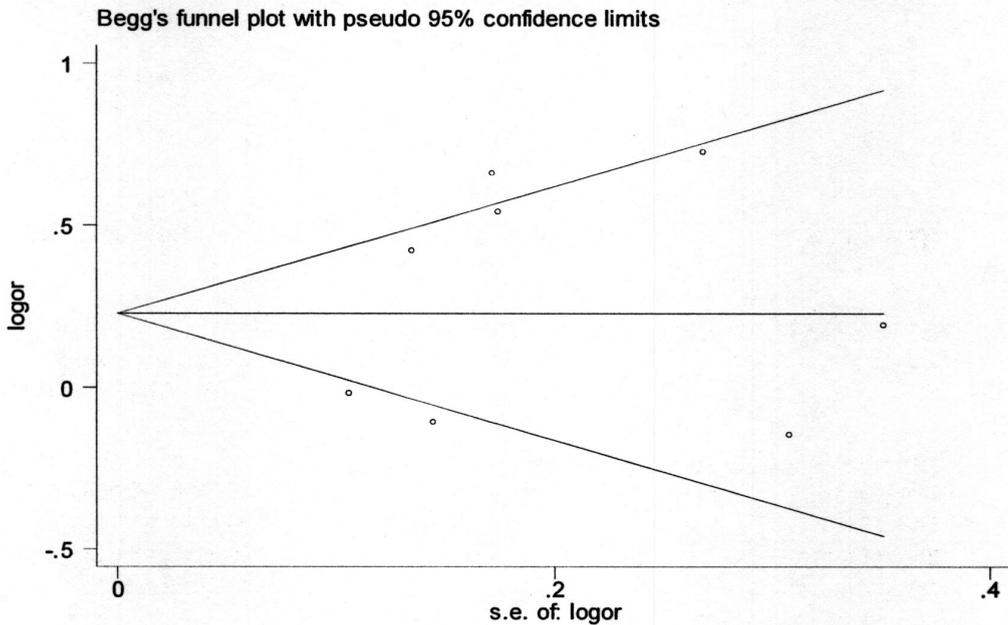


图 3-8 *PPARGC1A* 基因 Thr394Thr 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

由于考虑到种族差异很可能是研究间存在异质性的原因,随后将纳入的 8 个研究分为中国人群和印度人群 2 个亚组,并分别对亚组人群进行 meta 分析。结果显示分组后亚组内的各研究间均不存在异质性 ($I^2=0$)。中国人群亚组共纳入 4 个研究,累计 T2DM 病例 870 例,累计对照 941 例。亚组 meta 分析结果显示,在加性遗传模型下,394Thr (ACA) 等位基因对 T2DM 发病风险的作用未达到统计学显著性,合并 OR 值为 0.96 (95%CI 0.82-1.12, $P=0.587$) (图 3-7)。印度人群亚组共纳入 4 个研究,累计 T2DM 病例 948 例,累计对照 1435 例。而与中国人群不同,在印度人群亚组 meta 分析中发现 *PPARGC1A* 基因 Thr394Thr(ACG

→ACA) 多态位点与 T2DM 发病风险关联达到统计学显著性, 其合并 OR 值为 1.72 (95%CI 1.45-2.03, $P < 0.001$) (图 3-7)。漏斗图对称性检验结果显示, 两个亚组的研究均不存在发表偏倚 (图 3-9, 图 3-10)。

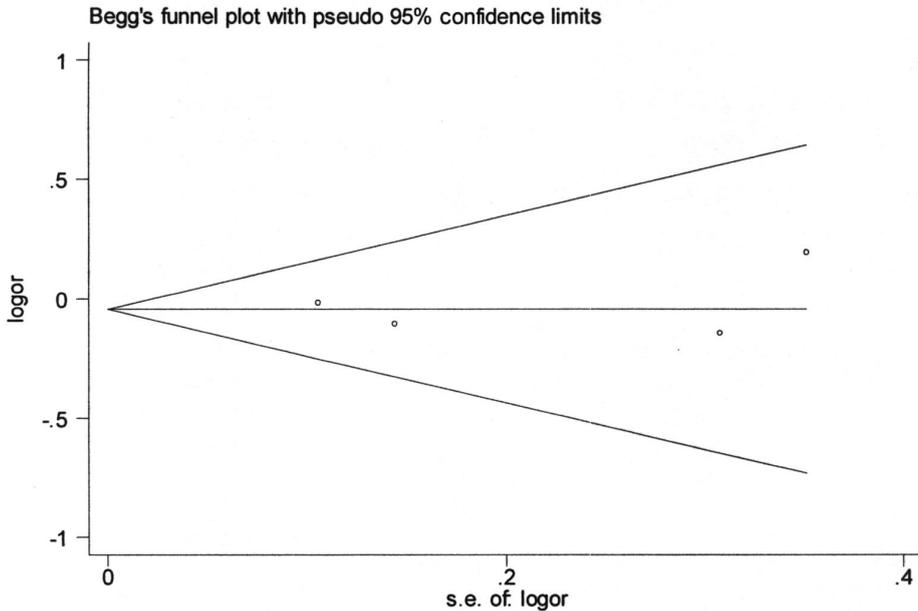


图 3-9 东亚人群 *PPARGC1A* 基因 Thr394Thr 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

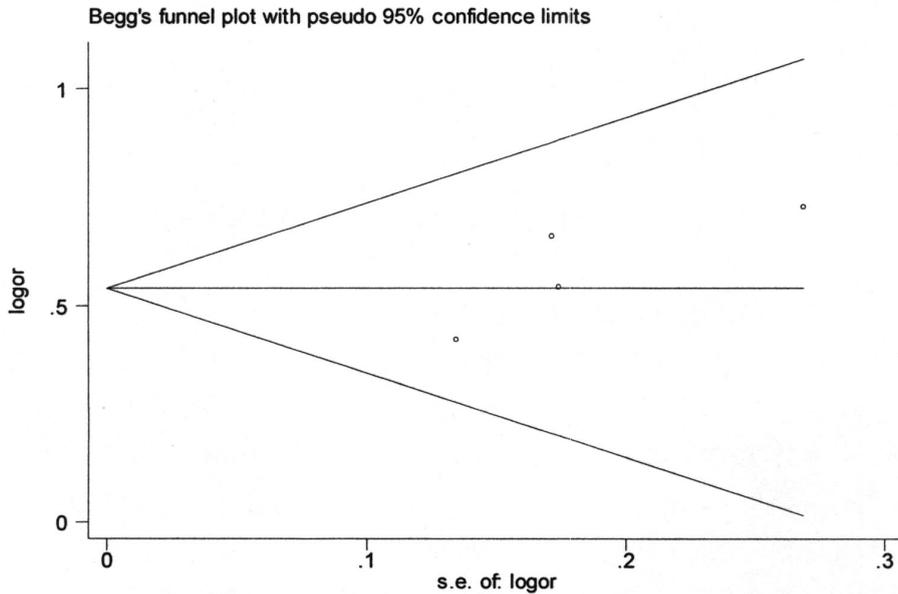


图 3-10 印度人群 *PPARGC1A* 基因 Thr394Thr 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

3.4 *PPARGC1A* Thr612Met 多态性与 T2DM 的 meta 分析结果

在 *PPARGC1A* 基因 Thr612Met 多态性与 T2DM 关联关系的 meta 分析中，共纳入 4 个研究，累计 T2DM 病例 2042 例，累计对照 1289 例。采用随机效应模型对所有纳入的研究进行 meta 分析，以 612Thr 等位基因为对照，携带 612Met 等位基因的人群发生 T2DM 风险的合并 OR 值为 1.18 (95%CI 0.86-1.63, $P=0.308$)，未达到统计学显著性 (图 3-11)。漏斗图对称性检验结果显示上述研究均不存在发表偏倚 (图 3-12)。

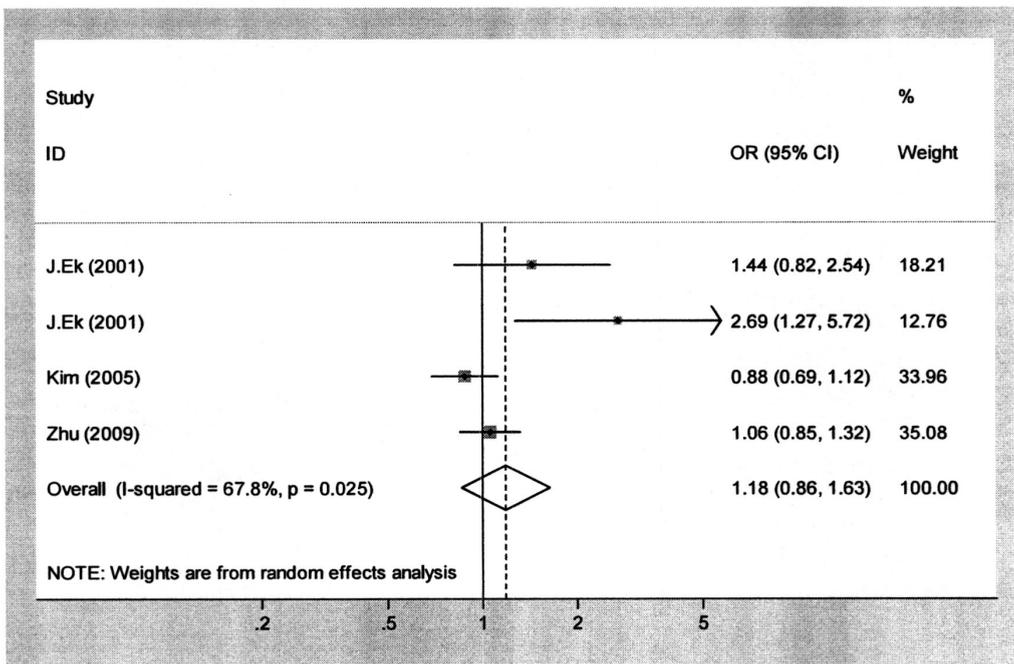


图 3-11 *PPARGC1A* 基因 Thr612Met 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析

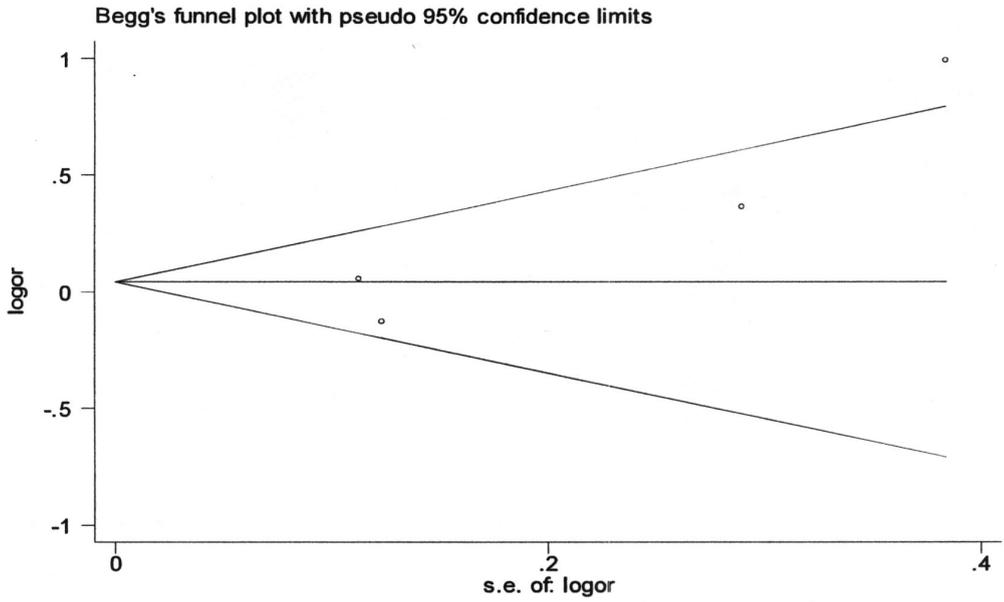


图 3-12 *PPARGC1A* 基因 Thr612Met 多态性与 T2DM 关联的 meta 分析漏斗图

四、 讨论

PPARGC1A 广泛参与能量代谢的过程, 在糖异生过程中的作用尤为重要, 可在转录水平上激活糖异生的关键酶, 从而影响血糖代谢[42]。已有研究发现 T2DM 患者及其一级亲属的 PPARGC1A 水平低于对照人群, 这提示 PPARGC1A 很可能与 T2DM 的发病风险存在紧密联系[43, 44]。由于 PPARGC1A 基因 Gly482Ser、Thr394Thr (ACG→ACA) 或 Thr612Met 多态位点的变异可能导致 PPARGC1A 的活性或表达量的改变, 从而直接或间接地影响 T2DM 相关代谢通路的作用进而引发疾病。

已发表的关于 PPARGC1A 基因 Gly482Ser、Thr394Thr 和 Thr612Met 遗传多态性与 T2DM 之间关联的研究结果不尽一致。对于复杂性疾病的研究, 原始发表文献的结果与重复验证研究的结果相左的现象是很常见的[45]。这些研究结果缺乏一致性的原因主要源于研究本身的一些局限性, 比如样本量偏小, 种族差异以及研究设计差异等[45]。近年来, meta 分析是一种被公认的用于整合分析不同研究数据结果的强大方法和工具, 它通过合并来自不同研究数据信息的途径来增加研究的样本量, 从而克服单一研究样本量小以及复杂性状遗传关联研究把握度水平过低的缺点。因此, 本研究采用 meta 分析的方法对所有已发表的 PPARGC1A 基因 Gly482Ser、Thr394Thr 和 Thr612Met 位点变异与 T2DM 易感性的关联研究结果进行合并分析。结果表明, Gly482Ser 和 Thr394Thr 的多态位点变异与 T2DM 易感性相关联, 这种关联关系在印度人群中尤为明显; 但 Thr612Met 位点变异与 T2DM 的关联性无统计学意义。

2006 年 Barroso[7]发表的关于 PPARGC1A 基因与 T2DM 关系的 meta 分析文章其结果显示, Gly482Ser 位点变异对 T2DM 风险的合并 OR 值为 1.07 ($P=0.044$)。本研究结论与该研究结果一致。此外, 考虑到此位点阳性和阴性报告结果的多重性以及种族差异, 本研究在高加索人群、东亚人群以及印度人群中分别进行了亚组 meta 分析。结果显示印度人群中 Gly482Ser 位点多态与 T2DM 显著关联, 但高加索人群与东亚人群中的关联未达到统计学显著性。高加索人群、东亚人群和印度人群 Gly482Ser 位点的少见等位基因频率分别为 0.347, 0.435 和 0.376, 三种人群该位点少见等位基因频率的差异可能是造成其关联研究结果差异以及 meta 分析异质性的原因之一。尽管本研究通过不同种族亚组分析的方法可以除去种族差异可能带来的混杂, 但 meta 分析的合并结果中仍有轻度的研究间异质性存在。究其原因, 这种残余异质性可能来源于不同研究中研究对象入选标准的差异、基因型与个体代谢、临床相关指标之间的交互作用。

对于 PPARGC1A 基因的 Thr394Thr 多态位点, 本研究结果表明该位点与

T2DM 的易感性显著关联, meta 分析总合并 OR 值为 1.33 (95%CI 1.04-1.70, $P=0.024$)。在高加索人群中, 至今尚未有关于此位点与 T2DM 关联研究的相关报道。在本文纳入的 8 个研究中, 4 个中国人群关联研究的 OR 值明显低于另外 4 个来自印度人群关联研究的 OR 值。同样采用了亚组分析的方法进一步探讨在不同种族人群 Thr394Thr 多态位点与 T2DM 的关联关系。在东亚人群中, Thr394Thr 多态位点变异与 T2DM 发病风险的关联未达到统计学显著性。而在印度人群中, 此位点与 T2DM 的发病风险显著关联, 其合并 OR 值为 1.72 (95%CI 1.45-2.03, $P<0.001$)。与此同时, 两个亚组 Meta 分析均不存在研究间异质性 ($I^2=0$)。东亚人群和印度人群 Thr394Thr 位点的少见等位基因频率分别为 0.222 和 0.142, 由此可推断该位点总的 meta 分析中存在的研究间异质性是由种族差异导致的。

本研究入选了符合纳入标准的所有高加索人群和亚洲人群的 *PPARGC1A* 基因与 T2DM 病例对照设计的关联研究, 在增加研究对象样本量的同时也增大了发现关联的把握度, 提高检验效能, 得到更客观的结论。但本 meta 分析也存在一定的局限性。首先, 未收集入选研究的参与对象其个体代谢以及临床相关指标的具体信息, 无法排除基因-环境间交互作用导致的研究间异质性, 从而降低横断面研究的 meta 分析发现真实关联性的把握度。其次, 由于检索筛选各国语言全文文献存在一定的难度, 本研究只纳入了以中文和英文两个语种发表的学术文献, 这样可能漏掉一些以其他语种语言发表的 *PPARGC1A* 基因与 T2DM 关联研究的相关文献。

五、 小结

综上所述, 本研究结果表明 *PPARGC1A* 基因的 Gly482Ser 和 Thr394Thr 多态位点与 T2DM 发病风险显著关联, 此种关联作用在印度人群中尤为显著。未来仍需要大规模样本人群的研究来发现那些微效的遗传变异所导致疾病风险。另外, 考虑到基因-环境的交互作用, 仍然需要开展关于 *PPARGC1A* 基因变异的更为全面深入的研究, 从而探究其基因变异与 T2DM 之间客观真实的关联性, 更好地去理解和进一步阐明 *PPARGC1A* 基因在 T2DM 疾病中的作用。

参考文献

- [1] Zimmet P. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Doomsday scenario be averted? [J]. *J Intern Med* 2000; 247(3):301-310.
- [2] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87(1):4-14.
- [3] Huang QY, Cheng MR, Ji SL. Linkage and association studies of the susceptibility genes for type 2 diabetes [J]. *Yi Chuan Xue Bao* 2006; 33(7):573-589.
- [4] Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1 [J]. *Nature* 2001; 413(6852):179-183.
- [5] Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. *Nature* 2001; 413(6852):131-138.
- [6] Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7):3820-3825.
- [7] Barroso I, Luan J, Sandhu MS, Franks PW, Crowley V, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Meta-analysis of the Gly482Ser variant in PPARGC1A in type 2 diabetes and related phenotypes [J]. *Diabetologia* 2006; 49(3):501-505.
- [8] Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test [J]. *BMJ* 1997; 315(7109):629-634.
- [9] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses [J]. *BMJ* 2003; 327(7414):557-560.
- [10] Muller YL, Bogardus C, Pedersen O, Baier L. A Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians [J]. *Diabetes* 2003; 52(3):895-898.
- [11] 路文盛, 颜晓东, 黄勤, 胡映玉, 钟玫, 黄忠, 陈晖, 程桦. PGC-1 α 基因

- MEF2C 结构域 482G/A 变异参与 2 型糖尿病发病的机制研究 [J]. 中华医学遗传学杂志 2008; 25(6):616-623.
- [12] Nelson TL, Fingerlin TE, Moss L, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha gene (PGC-1alpha) is not associated with type 2 diabetes mellitus or body mass index among Hispanic and non Hispanic Whites from Colorado [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115(4):268-275.
- [13] 路文盛, 黄勤, 颜晓东, 胡映玉, 钟玫, 吴潮清. PGC-1A 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性 [J]. 中国内分泌代谢杂志 2008; 24(4):404-407.
- [14] 张子波, 吕福庆, 王伟杰, 李博, 杨康娟, 金元哲. PGC-1 基因 Thr394Thr 多态性与 II 型糖尿病关系的研究 [J]. 延边大学医学学报 2007; 30(4):235-238.
- [15] 张子波, 吕福庆, 王伟杰, 李博, 杨康娟, 金元哲. 过氧化物酶体增殖受体 γ 附激活因子-1 多态性与 2 型糖尿病相关性研究 [J]. 现代预防医学 2008; 35(20):4048-4050.
- [16] Zhang S, Lu W, Yan L, Wu M, Xu M, Chen L, Cheng H. Association between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha gene polymorphisms and type 2 diabetes in southern Chinese population: role of altered interaction with myocyte enhancer factor 2C [J]. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120(21):1878-1885.
- [17] 路文盛, 颜晓东, 刘红燕, 黄忠, 谭小燕, 黄勤, 杨川, 李焱, 严励, 程桦. 中国人 PGC-1A 基因全外显子 cSNPs 分析及其 MEF2C 结构域生物学信息预测 [J]. 中华医学遗传学杂志 2007; 24(4):409-416.
- [18] Zambrano M, Fernandez E, Lopez M, Rangel A, de Romero P, Fernandez V, Marina Morales L, Molero-Conejo E, Connell L, Raleigh X et al. [Gly482Ser polymorphism of the coactivator-1alpha of the activated receptor of peroxisome gamma proliferation in individuals from Maracaibo, Venezuela] [J]. *Invest Clin* 2009; 50(3):285-294.
- [19] 苏燕, 彭姝彬, 李智琼, 黄青阳. PPARGC1A 基因 Thr394Thr/Gly482Ser 多态性与 2 型糖尿病的关联研究 [J]. 遗传 2008; 30(3):304-308.
- [20] 单莉, 王辰, 纪立农, 杨泽, 朱倩. PGC-1 基因 Gly482Ser 多态性与 2 型糖尿病的相关性研究 [J]. 中国糖尿病杂志 2006; 14(2):103-107.
- [21] 马春薇, 徐焱成. PGC-1 基因 Gly482Ser 变异与 2 型糖尿病的关系 [J]. 临床内科杂志 2003; 20(10):530-531.

- [22] 路文盛, 陈超刚, 梁蔚文, 黎锋, 戚以勤, 严励, 程桦. PGC-1 α 基因 Thr394Thr/Gly482Ser 联合变异与 2 型糖尿病的相关关系 [J]. 临床荟萃 2005; 20(24):1385-1387.
- [23] 路文盛, 程桦, 黄勤, 严励, 陈超刚, 戚以勤, 吴木潮, 黎锋. 2 型糖尿病 PGC-1 α 基因单核苷酸多态性筛查及 Gly482Ser 变异分析 [J]. 中国糖尿病杂志 2006; 14(3):192-194.
- [24] 王艳波, 于永春, 李智, 汪纯, 王吉影, 吴国亭. 中国上海地区汉族人 PGC-1A 基因多态性与 2 型糖尿病相关性研究 [J]. 中华医学遗传学杂志 2005; 22(4):453-456.
- [25] Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Gaede PH, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus [J]. Diabetologia 2001; 44(12):2220-2226.
- [26] Lacquemant C, Chikri M, Boutin P, Samson C, Froguel P. No association between the G482S polymorphism of the proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) gene and Type II diabetes in French Caucasians [J]. Diabetologia 2002; 45(4):602-603.
- [27] Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action [J]. PLoS Biol 2003; 1(1):E20.
- [28] Oberkofler H, Linnemayr V, Weitgasser R, Klein K, Xie M, Iglseider B, Krempler F, Paulweber B, Patsch W. Complex haplotypes of the PGC-1 α gene are associated with carbohydrate metabolism and type 2 diabetes [J]. Diabetes 2004; 53(5):1385-1393.
- [29] Kunej T, Globocnik Petrovic M, Dovc P, Peterlin B, Petrovic D. A Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) gene is associated with type 2 diabetes in Caucasians [J]. Folia Biol (Praha) 2004; 50(5):157-158.
- [30] Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes [J]. Diabetologia 2002; 45(5):740-743.

- [31] Chen S, Yan W, Huang J, Yang W, Gu D. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha polymorphism is not associated with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus in Chinese population [J]. *Hypertens Res* 2004; 27(11):813-820.
- [32] 王欣昊, 杨康娟, 张子波, 金雄吉, 金艳花, 金梅花. PGC-1 基因 Gly482Ser 多态与 2 型糖尿病的关系 [J]. *延边大学医学学报* 2004; 27(2):83-89.
- [33] Kim JH, Shin HD, Park BL, Cho YM, Kim SY, Lee HK, Park KS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha promoter polymorphisms are associated with early-onset type 2 diabetes mellitus in the Korean population [J]. *Diabetologia* 2005; 48(7):1323-1330.
- [34] Sun L, Yan Z, Jin F, Zhu X, Qu Y, Shi X, Wang L. The Gly482Ser Variant of the PPARGC1A gene is associated with Type 2 diabetes mellitus in northern Chinese, especially men [J]. *Diabet Med* 2006; 23(10):1085.
- [35] Zhu S, Liu Y, Wang X, Wu X, Zhu X, Li J, Ma J, Gu H. Evaluation of the association between the PPARGC1A genetic polymorphisms and type 2 diabetes in Han Chinese population [J]. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 86(3):168-172.
- [36] 回圆敕, 关玉峰, 李政, 孙崴, 张霞, 张萍, 苏本利. PGC-1A 基因 Gly482Ser 多态性与 2 型糖尿病发病的相关性研究 [J]. *大连医科大学学报* 2009; 31(3):295-298.
- [37] Weng S, Lin T, Wang P, Chen I, Lee H, Chen S, Chuang Y, Liu C. Gly482Ser polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha gene is associated with oxidative stress and abdominal obesity [J]. *Metabolism* 2010; 59(4):581-586.
- [38] Vimalaswaran KS, Radha V, Anjana M, Deepa R, Ghosh S, Majumder PP, Rao MR, Mohan V. Effect of polymorphisms in the PPARGC1A gene on body fat in Asian Indians [J]. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30(6):884-891.
- [39] Bhat A, Koul A, Rai E, Sharma S, Dhar MK, Bamezai RN. PGC-1alpha Thr394Thr and Gly482Ser variants are significantly associated with T2DM in two North Indian populations: a replicate case-control study [J]. *Hum Genet* 2007; 121(5):609-614.
- [40] Rai E, Sharma S, Koul A, Bhat AK, Bhanwer AJ, Bamezai RN. Interaction between the UCP2-866G/A, mtDNA 10398G/A and PGC1alpha p.Thr394Thr and p.Gly482Ser polymorphisms in type 2 diabetes susceptibility in North

- Indian population [J]. *Hum Genet* 2007; 122(5):535-540.
- [41] Vimalaswaran KS, Radha V, Ghosh S, Majumder PP, Deepa R, Babu HN, Rao MR, Mohan V. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene polymorphisms and their relationship to Type 2 diabetes in Asian Indians [J]. *Diabet Med* 2005; 22(11):1516-1521.
- [42] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes [J]. *Nat Genet* 2003; 34(3):267-273.
- [43] Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14):8466-8471.
- [44] Ioannidis JP, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies [J]. *Nat Genet* 2001; 29(3):306-309.
- [45] Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease [J]. *Nat Genet* 2003; 33(2):177-182.

综述

microRNA 在心血管疾病中的作用

人类基因组计划的完成将生命科学带入了后基因组时代。动物基因组非蛋白质编码区内的大量非编码 RNA 开始成为科学家关注和研究的热点, 其中, microRNA (miRNA) 的研究尤为引人注目。

miRNA 是一类在生物进化过程中高度保守的非编码小分子 RNA, 通过与其靶 mRNA 的 3'-UTR 区域的互补结合, 对 mRNA 进行切割或抑制其翻译, 在转录后水平指导 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 调节靶基因的表达, 沉默特定基因从而对生物体基因表达起到精细调控的作用[1]。miRNA 参与 30%~50% 基因的转录和表达调控, 机体 miRNA 水平以及靶基因结合过程的异常可能是导致疾病发生发展的重要原因。

miRNA 在心血管系统病理生理中的作用机制已取得不错的进展, 越来越多的研究结果显示 miRNA 在心肌细胞分化及心血管疾病病理生理过程中发挥着重要的作用[2]。本文旨在对 miRNA 的形成、作用机制及其在心血管疾病发展进程中的作用进行综述。

一、 miRNA 的发现、形成和作用机制

1.1 miRNA 的发现

1993 年, Lee 等[3]在秀丽隐杆线虫 (*C.elegans*) 细胞中发现了一个在线虫发育 L1 期暂时下调 *lin-28* 基因的表达的 22 个核苷酸的小分子非编码 RNA *lin-4*, 它可以使线虫向 L2 期发育过渡。2000 年, Reinhart 等[4]在线虫中发现了另一个具有类似的转录后调节功能的小分子非编码 RNA *let-7*, 它可调控使线虫由幼虫 L3 期向成虫发育。在此之后, 许多的 miRNA 被发现, 每一种 miRNA 调节着几十到几百种不同的靶基因, 对于细胞生物学研究产生了巨大深远的影响。至此, miRNA 迅速成为生命科学界研究的热点, 对其形成、作用机制和功能的研究很快全面开展起来。

1.2 miRNA 的形成

miRNA 是一种内源性的、大小约为 21-25 个碱基的单链小分子，它们对生物体基因表达的精细调控作用是通过在转录后水平沉默特定基因来实现的[5]。miRNA 主要由位于染色体上基因之间非编码区域的序列编码，经过 RNA 聚合酶 II 的作用生成初级 miRNA (pri-miRNA)。pri-miRNA 在 Drosha-DGCR8 复合物作用下形成长度约为 60-70 个核苷酸的发夹状 miRNA，即前体 miRNA (pre-miRNA)。pre-miRNA 在 Ran-GTP 依赖性核浆转运因子 Exportin-5 的作用下转运到细胞质后，最终在 Dicer 酶作用下形成一个短双链 RNA 片段，其中的一条生成成熟的 miRNA，另外一条则会被降解[6-8]。尽管多数哺乳动物 miRNA 由单独序列编码，仍有研究发现许多 miRNA 来源于同一 pre-miRNA：miR-23a、miR-27a、miR-24-2 三者均来自于 2.2 kb 的 pre-miRNA，三者在心肌增生中均呈明显增加趋势，提示多种 miRNA 可能协调完成某一生理功能[9]。

1.3 miRNA 的作用机制

多数 miRNA 以核蛋白复合体的形式与靶 mRNA 特异性结合，通过对 mRNA 的降解或者翻译抑制的方式来使靶基因沉默。miRNA 复合体在解螺旋酶的作用下分离，其中一条链装配入 RISC[4]，与靶 mRNA 的 3'-UTR 区结合到位于胞浆的 P-body (processing body) 中[10, 11]：①如果 miRNA 与靶 mRNA 匹配完全，则靶 mRNA 被该复合体降解；②若两者序列部分匹配，尤其是 miRNA 的 5'端 2-8 个被称为种子序列的核苷酸与靶 mRNA 完全匹配，则通过抑制靶 mRNA 的翻译来沉默特定基因[4, 12-14]。研究还表明，某些 miRNA 能够结合于某些基因富含 AU 元件 (AU rich element, ARE) 的 3'-UTR 区，可以增强靶基因的翻译，也与靶 mRNA 的降解密切相关[15, 16]。

二、 miRNA 在心血管病理生理中的作用

miRNA 广泛表达于各个组织和器官，其在机体病理生理过程中发挥着重要的作用。研究表明在心血管系统中，miRNA 在正常和患有心脏病的小鼠的心脏中均有特异性表达，miRNA 参与了心脏发育、心肌重构、心力衰竭、心律失常、心肌缺血等病理生理过程[2]，在心血管疾病中起重要作用。

2.1 miRNA 在心脏发育中的作用

心脏的发育形成需要来自多个细胞系的多种类细胞(比如心肌细胞,心内膜、

心外膜和血管细胞,纤维母细胞以及传导系统细胞等)通过相互之间精细而复杂的交互协调来共同完成。心肌细胞分化与心脏发育形成的转录调节是高度保守的,该过程需要不同基因的激活和(或)抑制来共同实现。不同的 miRNAs 会在不同类型的心脏细胞内呈现高表达,研究者还发现 miRNAs 在某些情况下会参与细胞特异性识别的过程。

miR-1 是在心肌细胞中表达量最高的 miRNA,也是在心脏发育的研究中第一个被发现的 miRNA[17]。miR-1 和 miR-133 都属于肌肉特异性 miRNA,在心脏形成的早期阶段存在特异性表达,经过微阵列分析后科学家发现 miR-1 和 miR-133 在小鼠胚胎发育周期的 12.5 到 18 天的时间内有表达增强的现象,说明这些 miRNA 是心脏发育中必不可少的调控因子[18]。同时,miR-1 和 miR-133 可以调控许多肌肉细胞调节因子,这些调节因子包括血清反应因子(Serum response factor, SRF)、肌分化因子(Myogenic differentiation, MyoD)和肌细胞增强因子 2(Myocyte enhancer factor 2, MEF2)[19-21]。在心脏形成的早期胚胎发育阶段中,miR-1 和 miR-133 二者相互协作从而促进胚胎干细胞中胚层的分化以及抑制内胚层和外胚层的细胞凋亡[22]。然而,在心脏细胞系发育晚期,miR-1 与 miR-133 却扮演着相反的角色,当 miR-1 促进心肌细胞分化时 miR-133 则起抑制作用[22]。*Hand2* (heart and neural crest derivatives expressed 2) 基因是胚胎发育初级阶段扩增前体细胞的必需基因,该基因的突变或缺失可导致心脏发育不良甚至心脏发育停滞[23]。Zhao 等[19]发现 miRNA-1-1 和 miRNA-1-2 在小鼠心肌和骨骼肌前体细胞中特异性表达,并且通过序列互补配对发现 *Hand2* 是 miRNA-1 的靶基因,能调节关键的心肌调节蛋白的表达量,而这些心肌调节蛋白控制着心肌分化与增殖之间的平衡,从而调控心脏正常发育。另外,科学家还通过斑马鱼的 miRNA 敲除实验发现 miR-138 和 miR-143-adducin3 在胚胎发育时期心房、心室形成过程中起重要作用[24, 25]。这些发现都有助于了解干细胞增殖分化为心肌细胞的机制,也为先天性心脏病的诊疗提供了新的线索。

2.2 miRNA 在心肌肥厚及心力衰竭中的作用

心脏对于机体生理上的刺激以及病理状态都是十分敏感的,即使很轻微的非稳态变化都可能导致严重的心脏重构,最终造成对机体有害的结果[26]。面对应激情况时,心脏自身将发生由于心脏细胞肥大导致的心室膨胀及室壁肥厚,从而初步代偿性地维持心脏射血功能,在持续刺激下最终发展为不可逆的心脏功能衰竭。在心肌细胞中转染特定的 miRNA 可导致心肌细胞肥大和功能改变,某些 miRNA 过表达的转基因小鼠可导致心力衰竭的发生[27]。参与肥厚性心肌病以及心力衰竭病理生理过程的一些 miRNAs 逐渐被确认,例如 miR-1、miR-133a、

miR-208、miR-23、miR-21、miR-30 和 miR-423-5p 等。

Chen等的研究发现miRNA-1-2缺陷的大鼠其心肌细胞大量增生进而导致心室壁肥厚[17]。miR-1可以通过负向调节钙离子信号通道元件心肌肥厚相关钙调蛋白(calmodulin)、*Mef2a*和GATA结合蛋白4(GATA binding protein 4, *Gata4*)基因的表达水平来调控心肌细胞的生长。它在小鼠主动脉缩窄的心肌肥厚模型中表达下降,导致其靶基因肾素-血管紧张素系统蛋白激活因子(ras p21 protein activator, *RasGAP*)基因、细胞周期依赖性激酶9(cyclin-dependent kinase 9, *Cdk9*)基因以及Ras蛋白脑组织同源类似物(ras homolog enriched in Brain, *Rheb*)基因表达的异常,从而使心肌细胞向肥厚表型转变[28]。研究发现在主动脉缩窄、心肌AKT激酶突变以及运动负荷三种大鼠心肌肥厚模型中,miR-133a的表达水平均明显下降,敲除miR-133的小鼠可诱发病理性心肌肥厚[29],这些都表明miR-133a是抑制心肌肥厚的重要因子。它可能是通过调控其靶基因Ras同源基因家族成员A(ras homolog gene family member A, *Rhoa*)基因及细胞分裂周期42蛋白(cell division cycle 42 protein, *Cdc42*)基因的表达进而影响心肌肥厚的病理过程[29],也可能是通过负向调节T细胞活化核因子4(nuclear factor of activated T cells 4, *NFATc4*)的表达来抑制心肌肥厚[30]。但是,研究者发现miR-133基因敲除小鼠的病理表现与miR-133-null小鼠的表型并不一致,后者的心肌细胞肥厚状态处于正常水平[31],这也提示遗传敲除实验并不能代表机体内源miRNA表达的精细调控作用。

除了miR-1和miR-133a外,miR-208作为一种由 α -MHC基因内含子编码、在心肌细胞中特异表达的miRNA,它在心肌生长的激素调节以及心肌肥厚的病理过程中也起到重要作用[32]。miR-208可能通过抑制不表达于正常心脏中的骨骼肌收缩蛋白基因来维持心肌细胞的收缩表型[33]。进一步研究显示,在应激状态下,miR-208通过抑制靶基因甲状腺素受体相关蛋白1(Thyroid hormone receptor associated protein 1, *THRAP1*)的表达,从而调控心肌肥厚、纤维化以及 β -MHC的表达。研究者还发现 α -MHC的基因表达在正常者中处于低水平而在心肌肥厚者中表达水平上升。此外,NFATc3作为一种心脏压力信号通路的转录调控因子,它可以促进心肌细胞的病理性肥大。NFATc3在心肌细胞中可以诱导miR-23的表达,且敲除小鼠的miR-23可消除小鼠长期注射异丙肾上腺素导致的心肌肥厚[34]。

最近,研究者发现miR-21是心力衰竭疾病的一个靶点,参与调控对整个心脏结构和功能起重要作用的心脏纤维原细胞的细胞外信号调节激酶/促分裂素原活化蛋白激酶(ERK/MAP)信号通路,在压力超负荷疾病模型的小鼠体内通过特

异性地下调miR-21的表达水平,可抑制间质纤维化并缓解心脏功能障碍[35]。Duisters[36]等研究发现miR-133和miR-30都可以直接下调一种重要的纤维变性蛋白-结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的表达水平,证实了在调控心肌细胞外基质结构改变过程中miRNA所起到的重要作用。此外研究还表明miRNA的表达变化与心力衰竭早期的重要病理机制密切相关[37]。Matkovich等通过芯片技术比较了健康对照组、未进行治疗的心力衰竭患者组和给予左心室生物力学辅助装置治疗后的心理衰竭患者组的miRNA和mRNA表达变化,结果显示与健康对照组相比,心衰组有28个miRNA上调,而经过治疗后该上调的28个miRNA均又恢复至与健康对照组相当的水平[38]。另外他们还发现衰竭的心脏中有444个mRNA表达发生改变,但治疗后仅有29个mRNA恢复到健康对照组的水平[38]。研究已经发现miR-423-5p是心力衰竭诊断的一个重要循环生物标志物[39],如果将miRNA和mRNA表达谱联合应用于心力衰竭的诊断和预后,可能具有更高价值。

越来越多的研究表明参与上述心脏疾病病理进程的各种miRNAs并非独立作用而彼此交互共同作用从而决定疾病的发生与发展[40]。因此,对于miRNAs的研究也逐渐由单一靶点向交互作用研究发展。

2.3 miRNA 在心律失常中的作用

心律失常是指心律起源部位、心搏频率与节律以及激动传导等任一项异常。心律失常经常是致死性的,是心肌梗死和心衰中心脏死亡的主要死因之一,也是当今临床中最为关注的难题之一。它主要是由心肌细胞离子通道(钠离子通道、钙离子通道、钾离子通道、起搏器通道等)的功能异常所引发[41],这种异常可能是原发的,也可能继发于某些心脏疾病。近年来研究表明心律失常与miRNA的表达异常相关。

miR-1-2 心脏条件性敲除的小鼠由于其在心脏组织中的表达缺失而引发小鼠的猝死[17]。miR-1对心脏电生理的影响可能是通过调控转录因子IRX5来实现的,IRX5能抑制钾离子通道蛋白基因*KCND2*的表达,而*KCND2*在心脏负极化过程中起重要作用。2007年,Yang[42]等发现miR-1可以通过调控其靶基因*KCNJ2*和*GJA1*的表达来减慢传导,促使细胞膜去极化。小鼠心脏内过表达miR-1可导致小鼠心律失常,通过反义寡核苷酸移除miR-1后,梗死小鼠心律失常明显缓解。进一步的实验证明*KCNQ1*和*KCNE1*分别是miR-133和miR-1调控抑制表达的靶基因,更重要的是发现了miR-133和miR-1转录产物在心脏内的空间分布因*KCNQ1*和*KCNE1*蛋白以及 I_{Kr} 的分布不同而呈现空间异质性[43]。另外,SRF因子的功能性抑制或基因沉默可以下调miR-133的表达水平以及增加 I_{Kr} 的

密度, 并且也调控抑制 *ERG* (*ether-a-go-go* 基因, 一种长 QT 间期综合征患者在心脏细胞中编码一种关键的钾离子通道蛋白的基因) 基因的表达, 从而在糖尿病型心脏疾病中引起 QT 间期延长以及伴随的心律失常[44]。

超极化激活环核苷酸门控钾离子通道基因 (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channels, HCN*), 是在舒张期选择性激活的内源性起搏通道基因。*HCN* 共有 4 种类型, *HCN2* 主要分布于心脏和脑组织, *HCN1* 和 *HCN4* 除分布于脑组织和心脏外, 还分布于窦房结[45]。在 Sp1 促进 *HCN2/HCN4* 转录翻译的同时, miR-133 和 miR-1 明显抑制 *HCN2/HCN4* 蛋白表达。但现存 miRNA 所引起的基因表达抑制不能通过移除任何一种 miRNA 实现转复, 表明 *HCN2* 受 miR-133 和 miR-1 两者共同作用, 通过反义寡核苷酸技术减少内源性 miR-133 和 miR-1 可使 *HCN2/HCN4* 表达有效增加。另外, *HERG* 基因异常可导致心肌内向整流性钾离子通道的功能出现异常, 使 3 相复极延长而导致长 QT 综合征 (LQTS)。miR-133 可靶向调节 *HERG* 基因使其表达异常, 因此应用反义寡核苷酸技术抑制 miR-133, 可以增加正常基因的表达。

心房颤动 (*atrial fibrillation, AF*) 作为一种最常见的心律失常疾病, 是当前心脏疾病临床治疗的重要难题之一。最近的一项研究发现 miR-328 与 AF 的发生密切相关。研究者通过建立 miR-328 特异性过表达的转基因小鼠和 miR-328 功能敲除小鼠模型, 发现 miR-328 的过表达可诱发小鼠 AF 的发生, 而 miR-328 功能敲除小鼠或应用反义寡核苷酸技术抑制 miR-328 的表达则可减少发颤的发生[46]。此研究发现揭示了 AF 新的分子机制, 也为抗心律失常药物的研究提供了新的治疗靶点。

2.4 miRNA 在缺血性心血管疾病中的作用

心肌缺血, 是指心脏的血液灌注减少, 导致心脏的供氧减少, 心肌能量代谢异常, 不能支持心脏正常工作的一种病理状态。研究发现 miR-29 家族在心肌梗死发作后表达水平下降, 并且抑制一些胶原蛋白和细胞外基质蛋白的表达, 从而导致心肌损伤形成以及纤维化[47]。相类似的, 研究者发现 miR-199 家族在缺氧条件下的心肌细胞中表达水平迅速下调, 并且在缺氧预处理模型中对去乙酰化酶 1 和缺氧诱导因子 1- α (*hypoxia-inducible factor 1- α , HIF1- α*) 的抑制作用也有所减弱[48]。研究者构建的心脏特异性 miRNA-499 转基因小鼠, 缺血再灌注诱导小鼠心肌梗死, 与野生型小鼠比较, 转基因小鼠的凋亡心肌细胞、心肌梗死面积明显减少, 心功能各项指标也显著改善, 并且发现 miRNA-499 可以通过抑制心肌细胞凋亡来抑制心肌梗死, 具有心肌保护功能[49]。在抑制心肌细胞凋亡方面, 研究者通过体外实验证实骨髓源性单核细胞分泌的胰岛素生长因子-1 (*insulin*

growth factor-1, IGF-1) 可以下调促心肌细胞凋亡的 miR-34a 的表达水平, 从而阻止心肌细胞凋亡[50]。另一项研究发现 miR-24 的表达对恢复梗死后成心肌细胞功能以及缓解心脏纤维化有重要作用, 它可能成为今后心肌梗死以及其他纤维化心脏疾病的重要治疗靶点[51]。此外, miR-27a 在心肌细胞中可通过调控靶基因 *MHC* 的表达水平引发心脏疾病[52]; miR-27 家族广泛参与血管形成、脂肪形成、炎症反应、脂质代谢、氧化应激以及胰岛素抵抗等过程的调控, 是动脉粥样硬化引起的缺血性心血管疾病发病机制中重要的调控 miRNA[53]。

随着研究的不断深入以及技术手段的不断提高, 在进行动物试验的同时研究者也开始在人群样本中探究人心肌组织、外周血等的 miRNA 表达水平与心血管疾病的关系。研究者发现在血浆或血细胞中 miRNA 水平的变化与心血管疾病的发生密切相关[54]。Th1 细胞的上调被认为可能是导致动脉粥样硬化发生发展的重要因素, 一项在中国人群中开展的病例对照研究表明在人外周血单核细胞中的 miR-146a 水平的变化可调节 Th1 细胞的分化, 并且与急性冠脉综合征相关联[55]。Hoekstra 等人采用 miRNA 表达谱分析的方法, 检测了不稳定性心绞痛、稳定型心绞痛以及急性心肌梗死病例与健康对照者外周血单核细胞的 miRNA 表达水平差异, 首次发现人类外周血单核细胞中的一些 miRNA 在冠心病患者中的表达水平明显高于对照者[56]。研究者将人颈动脉粥样硬化斑块与健康对照者的正常血管组织进行 miRNA 表达谱的差异对比分析, 发现 miR-99b、miR-152 和 miR-422a 共同表达于斑块组织和单核细胞中, 并且在单核细胞募集以及靶向促发动脉粥样硬化中起重要作用, 提示这些 miRNA 可能作为临床上炎症性血管类疾病的重要治疗靶点[57]。近年来, 临床研究者开始探讨将某些与心血管疾病发生密切相关的外周血中的 miRNAs 作为心血管疾病的重要循环生物标志物[58, 59]。研究发现人体血浆中的循环 miR-1 在急性心肌梗死患者中显著升高[60], 并且与血清中的肌酸激酶 (CK-MB) 水平呈正相关[61], 它可以作为急性心肌梗死的一种新型生物标志物, 有望用于临床急性心肌梗死的预测和诊断。另有研究发现人体血浆中的 miR-208a 水平升高也可以作为早期探测心肌损伤的生物标志物[62]。上述研究对缺血性心血管疾病的临床诊断都起到重要指导价值, 也是将科学研究的发现与临床应用紧密联系的体现。

三、 展望

miRNA 是基因表达调控网络中的关键成员, 参与影响多条信号传导通路。研究 miRNA 在各种心血管疾病中的作用机制, 更加准确地预测 miRNA 的靶基因, 明确 miRNA 调控机制, 寻找临床治疗的 miRNA 靶点, 增强治疗效果, 仍是 miRNA 研究领域面临的主要问题。一方面, 需要使用合适的动物模型深入研究 miRNA

在心血管系统中的功能，深入探讨miRNA调控网络的复杂机制。另一方面，应该充分注重转化医学，将miRNA的研究结果从动物模型过渡到人体，将功能机制研究与临床流行病学研究方法相结合。近两年，研究者的目光已不单纯局限于miRNA本身在疾病进程中的作用，一些基于miRNA及其靶位点多态性与疾病关系的研究也取得了许多新的进展，拓宽了科研思路，也更有助于探寻疾病的药物治疗靶点。可以相信，随着人们对miRNA在心血管疾病发病机制中所发挥作用的不断深入了解，以敏感的循环miRNA作为心血管疾病的新型生物标志物，更快更准确地预测和诊断疾病，争取治疗时间；以miRNA靶点设计药物，进行心脏疾病靶向治疗，推动个体化治疗进程，提高疗效，都将为心血管疾病患者带来福音。

参考文献

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature* 2004; 431(7006):350-355.
- [2] Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology [J]. *Nature* 2011; 469(7330):336-342.
- [3] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* [J]. *Cell* 1993; 75(5):855-862.
- [4] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature* 2000; 403(6772):901-906.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell* 2004; 116(2):281-297.
- [6] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S et al. The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing [J]. *Nature* 2003; 425(6956):415-419.
- [7] Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs [J]. *Nature* 2004; 432(7014):235-240.
- [8] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme *Dicer* in the maturation of the *let-7* small temporal RNA [J]. *Science* 2001; 293(5531):834-838.
- [9] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *EMBO J* 2004; 23(20):4051-4060.
- [10] Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies [J]. *Nat Cell Biol* 2005; 7(7):719-723.
- [11] Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs [J]. *Genes Dev* 2006; 20(5):515-524.
- [12] Cannell IG, Kong YW, Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? [J]. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(Pt 6):1224-1231.

- [13] Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells [J]. *Trends Genet* 2007; 23(5):243-249.
- [14] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? [J]. *Trends Cell Biol* 2007; 17(3):118-126.
- [15] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science* 2007; 318(5858):1931-1934.
- [16] Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, Han J. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability [J]. *Cell* 2005; 120(5):623-634.
- [17] Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell* 2007; 129(2):303-317.
- [18] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. *Nat Genet* 2006; 38(2):228-233.
- [19] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. *Nature* 2005; 436(7048):214-220.
- [20] Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(52):20844-20849.
- [21] Meder B, Katus HA, Rottbauer W. Right into the heart of microRNA-133a [J]. *Genes Dev* 2008; 22(23):3227-3231.
- [22] Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, Hsiao EC, Schwartz RJ, Conklin BR, Bernstein HS et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell* 2008; 2(3):219-229.
- [23] McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, Srivastava D, Olson EN. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner [J]. *Development* 2005; 132(1):189-201.

- [24] Morton SU, Scherz PJ, Cordes KR, Ivey KN, Stainier DY, Srivastava D. microRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(46):17830-17835.
- [25] Deacon DC, Névis KR, Cashman TJ, Zhou Y, Zhao L, Washko D, Guner-Ataman B, Burns CG, Burns CE. The miR-143-adducin3 pathway is essential for cardiac chamber morphogenesis [J]. *Development* 2010; 137(11):1887-1896.
- [26] Catalucci D, Latronico MV, Ellingsen O, Condorelli G. Physiological myocardial hypertrophy: how and why? [J]. *Front Biosci* 2008; 13(1):312-324.
- [27] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(48):18255-18260.
- [28] Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res* 2007; 100(3):416-424.
- [29] Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy [J]. *Nat Med* 2007; 13(5):613-618.
- [30] Li Q, Lin X, Yang X, Chang J. NFATc4 is negatively regulated in miR-133a-mediated cardiomyocyte hypertrophic repression [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298(5):H1340-1347.
- [31] Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart [J]. *Genes Dev* 2008; 22(23):3242-3254.
- [32] Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice [J]. *J Clin Invest* 2009; 119(9):2772-2786.
- [33] van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. *Science* 2007; 316(5824):575-579.
- [34] Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li PF. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad*

- Sci USA 2009; 106(29):12103-12108.
- [35] Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts [J]. *Nature* 2008; 456(7224):980-984.
- [36] Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling [J]. *Circ Res* 2009; 104(2):170-178.
- [37] Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure [J]. *Circ J* 2011; 75(2):336-340.
- [38] Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, Dorn LE, Watson MA, Margulies KB, Dorn GW, 2nd. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support [J]. *Circulation* 2009; 119(9):1263-1271.
- [39] Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure [J]. *Circ Res* 2010; 106(6):1035-1039.
- [40] Wang Z, Luo X, Lu Y, Yang B. miRNAs at the heart of the matter [J]. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86(7):771-783.
- [41] Akar FG, Tomaselli GF. Ion channels as novel therapeutic targets in heart failure [J]. *Ann Med* 2005; 37(1):44-54.
- [42] Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2 [J]. *Nat Med* 2007; 13(4):486-491.
- [43] Luo X, Xiao J, Lin H, Li B, Lu Y, Yang B, Wang Z. Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKs-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions [J]. *J Cell Physiol* 2007; 212(2):358-367.
- [44] Xiao J, Luo X, Lin H, Zhang Y, Lu Y, Wang N, Yang B, Wang Z. MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts [J]. *J Biol Chem* 2007; 282(17):12363-12367.

- [45] Zhou YF, Yang XJ, Li HX, Han LH, Jiang WP. Mesenchymal stem cells transfected with HCN2 genes by LentiV can be modified to be cardiac pacemaker cells [J]. *Med Hypotheses* 2007; 69(5):1093-1097.
- [46] Lu Y, Zhang Y, Wang N, Pan Z, Gao X, Zhang F, Shan H, Luo X, Bai Y, Sun L et al. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation [J]. *Circulation* 2010; 122(23):2378-2387.
- [47] van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(35):13027-13032.
- [48] Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes [J]. *Circ Res* 2009; 104(7):879-886.
- [49] Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1 [J]. *Nat Med* 2011; 17(1):71-78.
- [50] Iekushi K, Seeger F, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Paracrine Regulation of Cardiac miRNAs by Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy in Myocardial Infarction [J]. *Circulation* 2012; 125(14):1765-1773.
- [51] Wang J, Huang W, Xu R, Nie Y, Cao X, Meng J, Xu X, Hu S, Zheng Z. MicroRNA-24 Regulates Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction [J]. *J Cell Mol Med* 2012. [Epub ahead of print]
- [52] Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R et al. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta1 in neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Mol Cell Biol* 2011; 31(4):744-755.
- [53] Chen W, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. The magic and mystery of MicroRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012 [J]. [Epub ahead of print]
- [54] Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? [J]. *Circ Res* 2012; 110(3):483-495.

- [55] Guo M, Mao X, Ji Q, Lang M, Li S, Peng Y, Zhou W, Xiong B, Zeng Q. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome [J]. *Immunol Cell Biol* 2010; 88(5):555-564.
- [56] Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, van Berkel TJ, Biessen EA. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3):792-797.
- [57] Bidzhekov K, Gan L, Denecke B, Rostalsky A, Hristov M, Koeppel TA, Zerneck A, Weber C. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans [J]. *Thromb Haemost* 2012; 107(4):619-625.
- [58] Salic K, De Windt LJ. MicroRNAs as Biomarkers for Myocardial Infarction [J]. *Curr Atheroscler Rep* 2012 Mar 6. [Epub ahead of print]
- [59] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction [J]. *Eur Heart J* 2010; 31(22):2765-2773.
- [60] Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 391(1):73-77.
- [61] Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, Dong X, Qin S, Zhang C. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction [J]. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119(2):87-95.
- [62] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans [J]. *Eur Heart J* 2010; 31(6):659-666.

致 谢

值此论文完成之际，谨向导师顾东风教授致以最诚挚的敬意和最衷心的感谢。导师扎实的理论基础，严谨求实的治学态度，忘我工作的敬业精神，以及不断探索的创新意识，使我受益终生。五年来，他对我的严格要求和悉心培养给了我面对挑战的勇气和攻克难题的信心，他渊博的知识和开阔的视野更为我的科研道路指明方向。

衷心感谢黄建凤老师在科研和生活方面给予我的关心和帮助。感谢陈兰英教授、吴锡桂教授对我学习和工作的指导。

感谢鲁向锋老师和陈恕凤老师对我英文写作及论文撰写方面的耐心指导，感谢李建新老师在数据库分析方面的帮助，感谢王来元老师、李宏帆老师在实验室工作方面的支持与帮助，感谢杜振涵老师、陈纪春老师、曹杰老师、陈京萍老师、刘东华老师、李向东师兄等在日常生活和学习中给予我的热心帮助。

感谢所有参加本课题人群资料和遗传资源收集的工作人员的辛勤劳动和无私奉献。本课题的实验过程是在国家人类基因组北方中心完成，感谢北方中心的领导和相关工作人员在工作生活上提供的友好协助。

感谢教育处黄建凤处长和牛雨老师在学习、工作以及生活上给予的极大关怀和帮助。

感谢协和基础所彭晓忠教授和中科院动物所李培峰教授对我博士课题设计方案给予的指导和帮助。

感谢王倩倩、莫兴波、杨学礼、郝永臣、陈盼盼、戚文威等同学在学习和生活上对我的帮助和关心，感谢刘雪会、刘芳超、葛增、王超、胡永艳、樊森、黄辰等在课题工作上对我的支持，在这个集体中生活和学习让我倍感温馨。感谢已毕业的孙冬玲、王宏伟、梁小华等师兄师姐在研究生学习期间曾给予我的帮助。

感谢父母多年来对我的培养教育，深深感谢爱人五年来给予我的理解、支持和帮助！

由衷感谢各位教授在百忙中对我的论文予以评阅指导。

最后，向此处未提及的其他所有关心帮助过我的老师、同学和朋友表示感谢！

个人简历

一、个人资料

姓名：杨英

性别：女

出生年月：1984年6月

民族：汉族

二、教育经历

1999.9-2002.7 河北省秦皇岛市一中

2002.9-2007.7 首都医科大学公卫学院 预防医学专业
医学学士学位

2007.9-2012.7 北京协和医学院阜外心血管病医院 遗传学专业
心血管遗传流行病学方向 博士研究生

三、参与课题情况

国家“973”计划子课题“中国人动脉粥样硬化遗传分子基础”项目
中美盐敏感性遗传流行病学网络研究

中国人群冠心病、高血压全基因组研究的遗传资源及临床资料收集工作
高血压社区规范化管理卫生经济学效果评价项目流行病学现场工作

四、博士期间获奖情况

2008年至2011年 连续获得北京协和医学院研究生奖学金

2012年 获得北京协和医学院优秀研究生荣誉

博士期间撰写、发表论文情况

期刊杂志论文

1. Yang Y, Li JX, Chen JC, Cao J, Lu XF, Chen SF, Wu XG, Duan XF, Mo XB, Gu DF. Effect of elevated total cholesterol level and hypertension on the risk of fatal cardiovascular disease: a cohort study of Chinese steelworkers. *Chin Med J (Engl)*, 2011; 124(22):1702-1706.
2. Yang Y, Mo XB, Chen SF, Lu XF, Gu DF. Association of peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PPARGC1A) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011; 27(2): 177-184.
3. 杨英, 鲁向锋. 冠心病全基因组关联研究进展. *遗传*, 2010; 32(2):97-104.
4. 邹晓璇, 李莹, 张红菊, 陈祚, 王浩, 郭敏, 王倩倩, 赵连成, 杨英, 郑润平, 蔡玉岭, 顾东风. 社区中老年人群代谢综合征与颈动脉粥样硬化的关系. *中华流行病学杂志*, 2010; 31(4): 361-365.
5. Common genetic variations in pre-miRNAs and the risk of coronary heart disease in a Chinese Han population. (拟投)

国际会议论文摘要

6. 杨英, 李立华, 刘雪会, 陈纪春, 王来元, 李宏帆, 黄建凤, 顾东风. 中国人群内皮系统基因多态与血压对冷加压试验反应的关联研究. *中国循环杂志*, 2011; 26(增刊): 12.
7. Yang Y, Li JX, Chen JC, Cao J, Lu XF, Chen SF, Wu XG, Duan XF, Mo XB, Gu DF. Effect of elevated total cholesterol level and hypertension on the risk of fatal cardiovascular disease: a cohort study of Chinese steelworkers. *Cardiology*, 2011; 120(suppl1): 8-9.
8. Yang Y, Mo XB, Chen SF, Lu XF, Gu DF. Association of peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PPARGC1A) gene

- polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Cardiology*, 2010; 117(suppl1): 61-62.
9. Li LH, Yang Y, Liu XH, Chen SF, Lu XF, Wang LY, Li HF, Gu DF. Genetic variants in the natriuretic peptide pathway and blood pressure response to dietary potassium intervention in Chinese: a gensalt study. *Cardiology*, 2011; 120(suppl1): 33.

独创性声明

本人声明所提交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：杨莫 签字日期：2012年5月28日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 北京协和医学院 有关保存、使用学位论文的管理办法。有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 北京协和医学院 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：杨莫

导师签名：

签字日期：2012年5月28日

签字日期：2012年5月28日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编