

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.18.012

PAPP-A 的表达及基因多态性与冠心病患者冠状动脉病变程度的关系*

刘 慧¹,李海剑^{2#},高传玉³,毛绍芬¹,陶雅非²,任东升²

(1.河南省南阳市中心医院特需一科 473009;2.河南省南阳市中心医院肾内科 473009;

3.河南省人民医院心内科,郑州 450003)

[摘要] **目的** 探讨妊娠相关血浆蛋白 A(PAPP-A)的表达及基因多态性与冠心病患者冠状动脉(以下简称冠脉)病变程度的关系。**方法** 选取来河南省南阳市中心医院就诊的冠心病患者 98 例(观察组),根据冠脉造影检查结果将患者分为单支病变组和多支病变组。选取同期来该院健康体检者 98 例(对照组),分别于患者就诊时和对照组体检时抽取静脉血,采用 ELISA 法检测血清 PAPP-A 的蛋白水平,聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 PAPP-A 基因的 IVS6+95 多态性。**结果** 与对照组比较,观察组患者外周血 PAPP-A 蛋白水平明显升高($P<0.05$),而多支病变组患者外周血 PAPP-A 蛋白水平明显高于单支病变组患者($P<0.05$)。外周血 PAPP-A 水平与冠脉病变程度呈正相关。PAPP-A 基因 IVS6+95 位点存在 3 种基因型,包括 CG 杂合型、CC 纯合型和 GG 纯合型。其中多支病变患者 CC 纯合型位点基因频率明显高于单支病变组患者($P<0.05$)。**结论** PAPP-A 蛋白水平及 IVS6+95 多态性与冠心病患者冠脉病变程度存在密切关系,CC 基因型患者可能是冠心病患者遗传易感性基因标志之一。

[关键词] 冠心病;妊娠相关血浆蛋白 A;基因多态性;冠状动脉病变程度**[中图分类号]** R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)18-2488-03

Relationship between serum PAPP-A expression and gene polymorphism with severity of coronary lesions in patients with coronary heart disease*

Liu Hui¹,Li Haijian^{2#},Gao Chuanyu³,Mao Shaofen²,Tao Yafei²,Ren Dongsheng²

(1. First Department of Special Need;2. Department of Nephrology, Nanyang Municipal Central Hospital, Nanyang, Henan 473009, China;3. Department of Cardiology, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between serum pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) expression and gene polymorphism with the severity of coronary lesions in the patients with coronary heart disease(CHD). **Methods** Ninety-eight patients with CHD in the Nanyang Municipal Central Hospital were selected as the observation group and divided into single vessel lesion group and multiple vessel lesion group according to coronary angiographic results. Ninety-eight individuals undergoing healthy physical examination were selected as the control group. The venous blood was collected at the visiting hospital in the observation group and at the physical examination in the control group for detecting the serum PAPP-A protein level by ELISA. PAPP-A gene and IVS6+95 polymorphism were analyzed by adopting polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). **Results** Compared with the control group, peripheral blood PAPP-A protein level in the observation group was significantly increased($P<0.05$), moreover the PAPP-A protein level in the multiple vessel lesion group was significantly higher than that of the single vessel lesion group ($P<0.05$). The peripheral blood PAPP-A level was positively correlated with the severity of CHD. Three genotypes existed in PAPP-A gene IVS6+95 locus, including CG heterozygous, homozygous CC and GG homozygous type. The CC homozygous allele frequency in the patients with multiple vessel lesion was higher than that in the patients with single vessel lesion ($P<0.05$). **Conclusion** The PAPP-A protein level and IVS6+95 polymorphism have a close relation with the severity of coronary lesions in patients with CHD. CC genotype may be one of genetic susceptibility gene markers in the patients with CHD.

[Key words] coronary heart disease; pregnancy-associated plasma protein-A; gene polymorphism; severity of coronary artery lesion

冠心病是临床常见的心脑血管疾病之一,其由于冠状动脉(以下简称冠脉)粥样硬化斑块形成或血管痉挛引起管腔阻塞或狭窄导致缺血缺氧性的心脏疾病,其发病率高、致死率高,已经成为严重影响人类健康的主要疾病之一^[1-2]。冠心病的临床病理学变化的主要特征是冠脉粥样硬化斑块形成、不稳定斑块破裂、血小板聚集、继发血栓形成,引起冠脉阻塞^[3-5]。大量研究显示,炎症介质可导致动脉粥样硬化形成,增加不稳定斑块的形成,而炎症因子在功能及表达水平的异常主要是由相关基

因表达异常所致,因此,认为冠心病可能存在易感基因。妊娠相关血浆蛋白 A (pregnancy-associated plasma protein-A, PAPP-A)是基质金属蛋白酶家族成员之一,是主要的炎症因子之一,在动脉粥样硬化斑块形成和破裂过程中发挥着重要作用^[6]。有研究显示,PAPP-A 与不稳定的动脉粥样硬化斑块形成和缺血性脑血管疾病的发生关系密切^[7-8]。此外,PAPP-A 基因存在单核苷酸基因多态性,而这种现象与冠心病存在一定的关系。但是目前关于 PAPP-A 的表达水平及 PAPP-A 基因

* 基金项目:河南省科技攻关基金资助项目(324410084)。 作者简介:刘慧(1978-),副主任医师,硕士研究生,主要从事冠心病的诊断与治疗。 # 共同第一作者:李海剑(1977-),副主任医师,硕士研究生,主要从事冠心病和慢性肾衰的防治研究。

多态性与冠脉病变程度的研究尚少见报道,作者在临床研究中发现其存在一定相关性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 6 月至 2014 年 6 月南阳市中心医院住院部收治的 98 例冠心病患者作为观察组。入选标准:(1)所有患者均确诊为冠心病;(2)患者临床资料完整;(3)患者均行冠脉造影术(CAG);(4)所有患者均签署知情同意书;(5)本研究经南阳市中心医院医学伦理委员会许可并在其监督下完成。排除标准:(1)存在急性或者慢性炎症患者;(2)存在进展性心、肝、肾衰竭者;(3)肿瘤患者。根据患者 CAG 的结果以冠脉主要血管大于或等于 50%狭窄视为诊断标准,将患者分为单支病变组和多支病变组。符合上述标准的 98 例患者中男 56 例,女 42 例;年龄 51~73 岁,平均(61.40±10.20)岁。其中单支病变组 30 例,男 19 例,女 11 例,平均年龄(62.80±11.90)岁;多支病变组 68 例,男 43 例,女 25 例,平均年龄(62.50±12.10)岁。选取同期来南阳市中心医院进行常规健康体检者 98 例作为对照组,其中男 60 例,女 38 例,年龄 52~73 例,平均(61.90±10.10)岁。各组对象年龄、性别等指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 实验材料和试剂 PAPP-A ELISA 试剂盒购自罗氏/ROCHE 公司;基因组提取试剂盒购自天根生物有限公司;PAPP-A 引物由上海生工合成;Dntp,EXTaq 酶和 PCR 仪均购自 TAKARA 公司;MOWI 限制性核酸内切酶购自 NEB 公司(R0573L);其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2.2 标本采集 观察组患者于住院次日清晨抽取静脉血 5 mL,对照组于体检时抽取静脉血 5 mL。两组血液样本分为两份,一份 3 000 r/min 离心 10 min,血清用于检测 PPAP-A 的表达水平;另一份收集白细胞,用于提取基因组,检测 PAPP-A 基因单核苷酸多态性。

1.2.3 ELISA 检测血清 PAPP-A 水平 ELISA 检测 PAPP-A 水平严格按照试剂盒操作指南进行,先建立标准曲线,然后测定患者血清样本中 PAPP-A 的 OD 值,于标准曲线中计算出血清中 PAPP-A 水平。

1.2.4 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 PAPP-A 基因多态性 离心收集外周血白细胞,采用基因组提取试剂盒提取白细胞基因组,根据 Gene Bank 提供的 PAPP-A 基因组序列,合成以下引物。PAPP-A-F:5'-GTG GCT GCG AGC GGA GGG GG-3',PAPP-A-R:5'-CTT CAC ATT GTC CCA GTT CTC CTG-3'。对合成引物的退火温度及特异性进行鉴定。然后配制以下 50 μL 反应混合物:10×EXTaq 酶 buffer 5 μL,PAPP-A-F 引物(10 nmol/L)1 μL,PAPP-A-R 引物(10 nmol/L)1 μL,dNTP 4 μL,EXTaq 酶 1 μL,用水补至 50 μL。然后按照下述反应条件进行 PCR,94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,PCR 循环 30 个。PCR 反应结束后取 5 μL PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳进行分析 PCR 条带的特异性。取 10 μL PCR 产物采用 MOWI 限制性内切酶进行酶切,酶切体系如下:PCR 产物 10 μL,10×内切酶 buffer 2 μL,MOWI 限制性内切酶 1 μL,用双蒸水补至 20 μL,然后置于 37 °C 水浴中酶切 2 h,然后采用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析 DNA 片段。

1.2.5 CAG 检查 所有患者在住院治疗期间进行 CAG 检查,造影的路径有检查医师根据经验选择,分别进行左、右

CAG,常规取左前斜 30°、右前斜 45°和头足轴状位投影,观察冠脉的病变支数和狭窄程度。造影结果由 4 位经验丰富的专科医生进行判断,以各个投照体位中病变最大狭窄程度为病变狭窄程度。

1.3 统计学处理 数据均采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差检验;计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

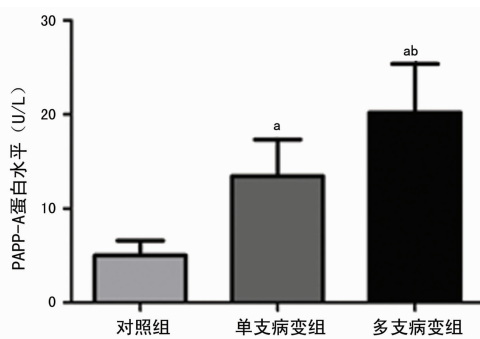
2.1 各组对象相关资料比较 各组对象在年龄和性别等指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。单支病变和多支病变组在吸烟、高血压、高血脂和糖尿病等比例明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组对象相关资料比较

项目	对照组 (n=98)	单支病变组 (n=30)	多支病变组 (n=68)
性别(男/女,n)	60/38	19/11	43/25
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	61.91±12.15	63.83±11.91	62.53±12.18
吸烟[n(%)]	31(31.63)	13(43.33) ^a	35(51.47) ^a
高血压[n(%)]	11(11.22)	8(26.67) ^a	23(33.82) ^a
糖尿病[n(%)]	7(7.14)	5(16.67) ^a	17(25.00) ^a
高脂血症[n(%)]	9(9.18)	5(16.67) ^a	19(27.94) ^a

^a: $P<0.05$,与对照组比较。

2.2 各组对象 PAPP-A 水平比较 各组对象 PAPP-A 蛋白的标准曲线 $r=0.997$,线性良好,可用于衡量患者外周血中 PAPP-A 水平变化。与对照组比较,单支病变和多支病变组患者外周血中 PAPP-A 水平明显升高($P<0.05$);与单支病变组比较,多支病变组患者外周血中 PAPP-A 蛋白水平明显升高($P<0.05$),见图 1。相关性分析显示,PAPP-A 与冠心病的发生呈正相关($r=1.368,P<0.05$),而且与冠脉病变程度也呈正相关($r=1.791,P<0.05$)。



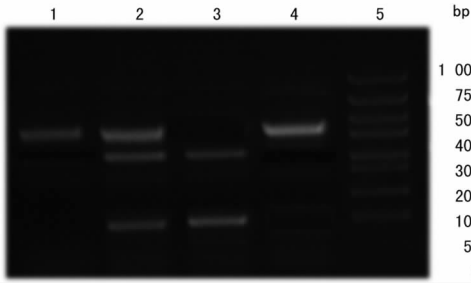
^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与单支病变组比较。

图 1 各组对象 PAPP-A 水平比较

2.3 观察组 PAPP-A 基因 IVS6+95 位点多态性分析 实验采用 PCR 扩增出了长度为 500 bp 的 DNA 片段,采用 MOWI 限制性内切酶单酶切,出现了 3 种不同的条带类型。经测序发现包括 3 种基因型:CC 纯合性(500 bp),GG 纯合型(450、50 bp)和 CG 杂合型(500、450、50 bp),见图 2。由于基因位点为 C 碱基时 MOWI 酶切位点不存在,因此无法切割成小片段。

2.4 观察组 PAPP-A 基因 IVS6+95 位点基因型与冠脉病变程度的关系 单因素方差分析结果显示,CC 基因型患者发生

多支冠脉病变的例数明显高于单支病变患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 CG 和 GG 基因型患者发生单支冠脉病变和多支冠脉病变比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。



1: 未酶切片段; 2: CG 杂合型; 3: GG 纯合型; 4: CC 纯合型; 5: Marker。

图 2 PAPP-A 基因 IVS6+95 位点多态性分析

表 2 PAPP-A 基因 IVS6+95 位点基因型与冠脉病变程度的关系 [$n(\%)$]

基因频率	单支病变组($n=30$)	多支病变组($n=68$)	χ^2	P
CG	12(40.00)	22(32.35)	0.498	0.786
CC	5(16.67)	20(29.41)	3.156	0.001
GG	13(43.33)	26(38.24)	0.399	0.401

3 讨论

冠心病已经成为严重威胁人类健康的疾病,但是目前关于其发病机制的研究尚不完全明确,研究显示遗传、高血压、糖尿病、吸烟、肥胖和高血脂均是导致冠心病的高危因素。冠心病的病理学基础是动脉粥样硬化及冠状动脉斑块的形成,而炎症在上述病理过程中发挥着重要作用。PAPP-A 是一种炎症介质,其最早被应用于孕妇中唐氏综合征等先天性疾病的筛查^[9]。但是后来发现 PAPP-A 在急性心肌梗死破裂的斑块中高水平表达,说明 PAPP-A 在急性心肌梗死过程中发挥着重要作用^[8,10]。后续的大量研究证实,PAPP-A 在冠心病患者血清中异常表达^[11-12]。本研究也发现冠心病患者外周血中 PAPP-A 水平明显高于健康者。

冠脉病变是冠心病的主要特征,冠脉病变程度直接与患者预后密切相关^[13]。目前尚少有冠脉病变程度与 PAPP-A 表达水平关系的报道。本研究分析显示,单支冠脉病变患者外周血中 PAPP-A 的表达水平低于多支冠脉病变患者,此外,相关性分析也显示 PAPP-A 的表达水平与冠脉病变程度之间呈正相关($r=1.791, P < 0.05$)。可能的机制是 PAPP-A 是炎症介质,其表达水平越高则暗示机体炎症水平越高,而炎症反应在动脉粥样硬化形成和发展中起着重要作用,是促进动脉粥样硬化斑块形成的关键环节,因此 PAPP-A 在动脉粥样硬化病变程度中起着关键作用。

遗传因素是导致冠心病发生的一个重要因素,有研究报道显示,PAPP-A 存在 IVS6+95 位点的基因多态性^[14-15]。本研究进一步分析了 PAPP-A 的基因多态性与冠脉病变程度的关系,通过 PCR、限制性内酶切和测序显示 PAPP-A IVS6+95 存在 3 种不同基因型,分别为 CC 纯合性、GG 纯合型和 CG 杂合型。本研究结果显示,多支病变患者 PAPP-A IVS6+95 CC 基因型的频率明显高于单支病变患者,提示 CC 基因型可能是冠心病患者遗传易感性基因标志之一,可能与患者冠状动脉病变程度有关。

综上所述,冠心病患者外周血 PAPP-A 蛋白的表达水平明显高于健康者,且与冠脉病变程度呈正相关。PAPP-A IVS6+95 CC 基因型可能是冠心病患者遗传易感性基因标志之一。

参考文献

- [1] Mente A, De Koning L, Shannon HS, et al. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease[J]. Arch Intern Med, 2009, 169(7): 659-669.
- [2] Iacobellis G, Corradi D, Sharma AM. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005, 2(10): 536-543.
- [3] Noyes AM, Dua K, Devadoss R, et al. Cardiac adipose tissue and its relationship to diabetes mellitus and cardiovascular disease[J]. World J Diabetes, 2014, 5(6): 868-876.
- [4] Wang CP, Hsu HL, Hung WC, et al. Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2009, 70(6): 876-882.
- [5] Poirier P, Giles TD, Bray GA, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism[J]. Circulation, 2006, 113(6): 898-918.
- [6] Li Y, Zhou C, Zhou X, et al. Pregnancy-associated plasma protein A predicts adverse vascular events in patients with coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Arch Med Sci, 2013, 9(3): 389-397.
- [7] Kalousova M, Zima T, Krane V, et al. Pregnancy-associated plasma protein A associates with cardiovascular events in diabetic hemodialysis patients [J]. Atherosclerosis, 2014, 236(2): 263-269.
- [8] Khan NU, Khan FA, Khan DA, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in individuals with and without coronary artery disease[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2011, 21(8): 450-454.
- [9] Lodh M, Goswami B, Parida A, et al. Assessment of serum leptin, pregnancy-associated plasma protein A and CRP levels as indicators of plaque vulnerability in patients with acute coronary syndrome [J]. Cardiovasc J Afr, 2012, 23(6): 330-335.
- [10] Lin TM, Galbert SP, Kiefer D, et al. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins[J]. Am J Obstet Gynecol, 1974, 118(2): 223-236.
- [11] Khan DA, Sharif MS, Khan FA. Diagnostic performance of high-sensitivity troponin T, myeloperoxidase, and pregnancy-associated plasma protein A assays for triage of patients with acute myocardial infarction(下转第 2493 页)

脂异常相关。本实验对 AMI 组 GDF-15 水平与生化指标进行相关性分析,结果发现 GDF-15 血清水平与 Glu、TC、LDL-C、hs-CRP 呈强正相关性($P < 0.01$),此结果与 Vila 等^[16]研究的部分结果相一致。AMI 组 GDF-15 血清水平为($1\ 754.60 \pm 437.10$)ng/L,明显高于 NCHD 组(685.00 ± 221.50)ng/L,且差异有统计学意义($P < 0.01$),表明 GDF-15 水平的升高与 AMI 有明显相关性,对于 GDF-15 作为一种心肌梗死监测指标,有一定应用前景。

参考文献

- [1] Ago T, Sadoshima J. GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein[J]. *Circ Res*, 2006, 98(3):294-297.
- [2] Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, et al. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(10):3742-3751.
- [3] Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, et al. The transforming growth factor-beta superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women[J]. *J Clin Endocrinol Metabolism*, 2001, 85(12):4781-4788.
- [4] Mika Y, Kitagawa T, Okawa K, et al. Phenylethylenediamine derivatives induce Gdf-15/mic-1 and inhibit adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1):294-298.
- [5] Zimmers TA, Jin XL, Edward CH, et al. Growth differentiation factor-15; induction in liver injury through P53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms 1[J]. *J Surg Res*, 2006, 130(1):45-51.
- [6] Hanatani S, Izumiya Y, Takashio S, et al. Growth differentiation factor 15 can distinguish between hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive hearts[J]. *Heart Vessels*, 2014, 29(2):231-237, 2014.
- [7] Xu XY, Nie Y, Wang FF, et al. Growth differentiation factor(GDF)-15 blocks norepinephrine induced myocardial hypertrophy via a novel pathway involving inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation[J]. *J Bio Chem*, 2014, 289(14):10084-10094.
- [8] Turner AM, Thickett DR. Molecular determinants of acute muscle wasting in the ICU: a role for growth and differentiation factor-15? [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(4):1141-1142.
- [9] Lindahl B. The story of growth differentiation factor 15: another piece of the puzzle[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(11):1550-1552.
- [10] Wallentin L, Hijazi Z, Andersson U, et al. Growth differentiation factor-15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: insights from the apixaban for reduction in stroke and other thromboembolic events in atrial fibrillation (ARISTOTLE) trial[J]. *Circulation*, 2014, 130(21):625-634.
- [11] Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, et al. Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non-ST-elevation acute coronary syndrome[J]. *Circulation*, 2007, 116(14):1540-1548.
- [12] 杨军, 谭芳, 王苏燕, 等. 急性心肌梗死患者外周血 GDF15 水平表达上调[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(6):572-574.
- [13] Lin JF, Wu S, Hsu SY, et al. Growth-differentiation factor-15 and major cardiac events[J]. *Am J Med*, 2014, 347(4):305-311.
- [14] Kempf T, Björklund E, Olofsson S, et al. Growth-differentiation factor-15 improves risk stratification in ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2007, 28(23):2858-2865.
- [15] Wollert KC, Kempf T, Peter T, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome[J]. *Circulation*, 2007, 115(8):962-971.
- [16] Vila G, Riedl M, Anderwald C, et al. The relationship between insulin resistance and the cardiovascular biomarker growth differentiation factor-15 in obese patients[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(2):309-316.

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-03-15)

(上接第 2490 页)

[J]. *Korean J Lab Med*, 2011, 31(3):172-178.

- [12] Mei WY, Du ZM, Zhao Q, et al. Pregnancy-associated plasma protein predicts outcomes of percutaneous coronary intervention in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome[J]. *Heart Lung*, 2011, 40(3):e78-83.
- [13] Bonaca MP, Scirica BM, Sabatine MS, et al. Prospective evaluation of pregnancy-associated plasma protein-a and outcomes in patients with acute coronary syndromes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(4):332-338.
- [14] Kalousová M, Jáchymová M, Muravská A, et al. Cys327Cys

polymorphism of the PAPP-A gene (pregnancy associated plasma protein A) is related to mortality of long term hemodialysis patients[J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(7/8):578-583.

- [15] Jia J, Li L, Zhao Q, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in pregnancy-associated plasma protein-A2 with developmental dysplasia of the hip: a case-control study[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(1):60-63.

(收稿日期:2015-11-22 修回日期:2016-03-09)