

飞行员 CX-37 基因多态性与冠状动脉硬化的关系*

牟宗阳¹, 殷雪娇², 刘兴德¹, 罗惠兰^{3**}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 锦州医科大学, 辽宁 锦州 121001; 3. 中国人民解放军空军总医院, 北京 100036)

[摘要] 目的: 研究飞行员冠状动脉粥样硬化(AS)患者血清间隙连接蛋白 37(CX-37)水平及 CX-37 基因-1019C>T 位点的基因多态性与 AS 的关系。方法: 选取确诊有 AS 的飞行员及普通人, 健康飞行员和普通健康体检者, 测定血清 CX-37 水平, 比较 4 组受检者 CX-37 基因-1019C>T 位点的基因型分布和等位基因的频率。结果: 飞行员 AS 组及普通人 AS 组血清 CX-37 水平明显高于飞行员正常组及普通人正常组($P<0.05$), 但是普通人 AS 组与飞行员 AS 组 CX-37 水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 4 组 CX-37 基因-1019C>T 位点 CC、CT、TT 基因型分布及等位基因频率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论: 飞行员的工作性质不影响血清 CX-37 的表达水平, CX-37 基因-1019C>T 位点基因多态性与 AS 发病无关。

[关键词] 飞行员; 缝隙连接蛋白质类; 多态性; 单核苷酸; 冠状动脉疾病; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R543.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)08-0872-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.08.002

Correlation Study on Pilots' Connexin-37 Gene Polymorphism and Coronary Atherosclerosis

MOU Zongyang¹, YIN Xuejiao², LIU Xingde¹, LUO Huilan³

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning, China; 3. General Hospital of Air Force PLA, Beijing 100036, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between pilots' coronary atherosclerosis (AS), serum CX-37 level and CX-37 gene-1019C>T site polymorphism. **Methods:** Selecting atherosclerosis pilots, healthy people, healthy pilots, ordinary healthy subjects, testing their serum CX-37, and comparing CX-37 gene-1019C>T site geno-distribution and allele frequency of four groups. **Results:** The serum CX-37 level in AS pilot group and in healthy people AS group were significantly higher than those in pilot group and normal group($P<0.05$); comparing CX-37 level of healthy people AS group and AS pilot group, differences were not statistically significant($P>0.05$); comparing CX-37 gene-1019C>T site CC, CT and TT geno-distribution and allele frequency, differences were not statistically significant($P>0.05$). **Conclusion:** The work itself of pilot has no effect on CX-37 expression, CX-37 gene-1019C>T site polymorphism has no significant effect on coronary atherosclerosis.

[Key words] pilot; connexin-37; polymorphism, mononucleotide; coronary artery diseases; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种动脉血管壁的慢性炎症性疾病,当 AS 发生在冠状动脉,导致血管狭窄或阻塞,冠脉血流供应不足,导致

心肌细胞缺血、缺氧、坏死时会出现冠心病^[1-2]。冠状动脉不同程度粥样硬化是发生冠心病的病理学基础,涉及损伤、炎症、渗出、变性和血栓形成等

*[基金项目] 全军“十二五”重点基金资助项目(BWS11J054)

**通信作者 E-mail: luo-huilan@sina.com

网络出版时间:2017-8-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170817.1032.025.html>

病理过程^[3-5]。AS 早期主要的生理学变化是内皮细胞功能失调,而维持血管内皮细胞功能的完整性,需要单个细胞之间的相互作用,细胞间隙连接是细胞间信息交换的重要通道^[6-7],在维持内皮细胞功能完整性方面具有十分重要的作用。研究发现间隙连接蛋白 37 (connexin-37, CX-37) 表达定位于冠状动脉内皮细胞, Yeh 等^[9]采用抗 CX-37 抗体进行免疫检测亦证实了 CX-37 存在于冠状动脉内皮细胞上, CX-37 基因-1019C > T 的突变与颈动脉粥样硬化、急性心肌梗死及冠心病的发病有关^[10], 本实验观察 CX-37 及其基因 C1019T 多态性与冠状动脉粥样硬化的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2014 - 2016 年心内科就诊的飞行员或普通人群、行健康体检的飞行员或普通人群,根据平板运动试验、CT 检查或冠脉造影检查分为普通人正常组、普通人 AS 组、飞行员正常组、飞行员 AS 组。普通人正常组和飞行员正常组纳入标准为行平板运动试验结果阴性,或平板运动试验结果可疑,但是 CT 检查或冠脉造影检查为阴性[CT 下无冠状动脉斑块形成或行冠脉造影显示冠状动脉的 4 个主要分支(左主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉)无血管内径狭窄或斑块形成],每次均由 2 名以上的心内科介入医师判断造影结果。AS 组的纳入标准是平板运动试验结果阳性,同时排除假阳性和假阴性结果,CT 下可见冠状动脉斑块形成,行冠脉造影检查显示冠状动脉的 4 个主要分支至少有一支血管内径有狭窄或斑块形成,检查方法同上。排除肝、肺、肾等重要脏器疾、严重影响脂质代谢的相关疾病及自身免疫性疾病,避免其他疾病对本次研究造成干扰。

1.2 方法

1.2.1 血液样本采集 所有受试者空腹 12 h 后抽取肘静脉血 4 mL,加入具有分离胶的真空采血管;标本在 15 ~ 20 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min,取血清,分管置于 Ep 管中, - 80 ℃ 超低温冰箱保存。

1.2.2 生化指标测定 检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FBG)、尿酸(UA),均采用日本日立 - 7600 全自动生化分析仪及原装进口质控品和试剂,由临床检验中心完成。

1.2.3 血清 CX-37 蛋白表达 采用 ELISA 法(试

剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)检测 CX-37 蛋白表达水平,按说明书进行操作。

1.2.4 CX-37 基因 PCR 扩增 吸取采集的全血样本,提取全血基因组 DNA,于 4℃ 冰箱贮存备用。CX-37 基因引物序列: 5'-CTGGACCCACCCCT-CAGAATGGCCAAAGA-3', 5'-AGGAAGCCGTAGT-GCCTGGTGG-3', CX-37 基因的 PCR 扩增反应体系均为 30 μL,其中含灭菌双蒸水 18.8 μL, 10 × Buffer 3 μL, MgCl₂ 1.8 μL, 引物各 1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.4 μL, DNA 模板约 1 μL, Taq 酶 1 U; 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 60 s、60 ℃ 60 s、72 ℃ 90 s, 30 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min。分别取 PCR 扩增产物 17.1 μL,用 DrrdI 限制性内切酶 0.5 μL 酶切 CX-37 基因位点, 37 ℃ 孵育 12 ~ 16 h, 反应终止后, 消化片段在 3% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 凝胶成像分析系统采集图片并判断基因型。

1.3 统计学分析

所有实验数据均采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间数据比较采用单因素方差分析。基因型和等位基因频率采用基因计数法计算, 检测基因型分布与哈迪-温伯格 (Hardy-Weinberg) 平衡符合程度, 组间基因型和等位基因频率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

如表 1 所示,与普通人正常组和飞行员正常组相比,普通人 AS 组和飞行员 AS 组总胆固醇及甘油三酯表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 所有对象均排除了吸烟史的干扰。

2.2 血清中 CX-37 蛋白表达

如表 2 所示,与普通人正常组和飞行员正常组相比,普通人 AS 组和飞行员 AS 组 CX-37 蛋白的表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 但是普通人 AS 组与飞行员 AS 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 CX-37 基因多态性

2.3.1 样本的代表性 如表 3 所示,对 4 组人群 CX-37 基因-1019C > T 基因型分布进行 Hardy-weinberg 平衡检验,结果表明, CX-37 基因-1019C > T 基因型在 4 组人群中分布符合 Hardy-weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$), 表明本研究所选的样本具有群

体代表性。

表 1 4 组被检者一般资料平($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 General clinical indicators of subjects in the 4 groups

指标	普通人正常组	普通人 AS 组	飞行员正常组	飞行员 AS 组
例数	150	210	120	70
年龄(岁)	32.1 ± 8.4	34.7 ± 6.6	31.8 ± 4.6	33.5 ± 6.1
体重指数(kg/m ²)	24.2 ± 3.0	24.6 ± 3.1	24.3 ± 3.0	24.0 ± 2.9
收缩压(mmHg)	118.9 ± 7.4	118.6 ± 7.4	118.3 ± 6.0	116.8 ± 7.8
舒张压(mmHg)	77.3 ± 7.2	74.0 ± 6.7	75.8 ± 6.2	74.8 ± 8.0
血糖(mmoL/L)	4.8 ± 0.4	5.0 ± 0.4	4.9 ± 0.4	4.6 ± 0.5
尿酸(μmoL/l)	383.0 ± 77.6	388.1 ± 75.8	384.0 ± 83.6	378.0 ± 82.7
总胆固醇(mmoL/L)	4.5 ± 0.9	4.8 ± 0.9 ⁽¹⁾	4.6 ± 0.9	4.8 ± 0.7 ⁽¹⁾
甘油三酯(mmoL/L)	1.5 ± 0.7	1.7 ± 1.2 ⁽¹⁾	1.4 ± 0.6	1.7 ± 0.6 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与正常组相比, $P < 0.05$

表 2 4 组被检者血清 CX-37 水平($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Comparison of serum Connexin 37 results
in each groups

分组	<i>n</i>	CX-37(ng/L)
普通人正常组	150	105.25 ± 5.36
普通人 AS 组	210	145.37 ± 6.33 ⁽¹⁾
飞行员正常组	120	108.46 ± 4.26
飞行员 AS 组	70	148.65 ± 8.25 ⁽²⁾

⁽¹⁾与普通人正常组相比, $t = 4.753, P < 0.05$; ⁽²⁾与飞行员正常组相比, $t = 3.285, P < 0.05$

2.3.2 CX-37 基因-1019C > T 位点基因型及等位基因频率分布 如表 4 所示,普通人正常组与飞行员正常组 CX-37 基因-1019C > T 位点 T/C 多态性的分布频率均表现为 CC 最高、CT 次之、TT 最低,与普通人正常组及飞行员正常组相比,普通人 AS 组及飞行员 AS 组 CX-37-1019C > T 位点 T/C 多态性的分布频率表现为 CC 稍微降低、CT 和 TT 稍微增加,但各组间基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组 T、C 等位基因频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 4 组被检查者 CX-37 基因-1019C > T 基因型分布的 Hardy-weinberg 平衡检验
Tab.3 The Hardy-Weinberg testing the genotype distribution of Connexin 37

	普通人正常组(<i>n</i> = 150)			普通人 AS 组(<i>n</i> = 210)			飞行员正常组(<i>n</i> = 120)			飞行员 AS 组(<i>n</i> = 70)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
实际频数	95	46	9	124	66	20	75	37	8	41	22	7
理论频数	92.8	50.35	6.82	117.32	79.25	13.37	72.82	41.3	5.84	39.78	25.97	4.23
χ^2	0.82			1.84			1.29			0.98		
<i>P</i>	$P > 0.05$			$P > 0.05$			$P > 0.05$			$P > 0.05$		

表 4 各组被检者 CX-37 基因-1019C > T 位点的基因型及等位基因频率
Tab.4 Comparison of genotype and allele frequencies between groups

分组	基因型频率(<i>n</i> , %)			等位基因频率(%)	
	CC	CT	TT	T	C
普通人正常组	95(63.33)	46(30.67)	9(6.00)	21.34	78.66
普通人 AS 组	124(59.04)	66(31.43)	20(9.53)	25.25	74.75
飞行员正常组	75(62.50)	37(30.83)	8(6.67)	22.09	77.91
飞行员 AS 组	41(58.57)	22(31.42)	7(10.00)	24.61	75.39

3 讨论

根据上述实验结果表明,各分组样本的体重指数、心脏收缩压及舒张压、血糖、尿酸水平均在正常范围内,各组差异无统计学意义,可能因为筛选样本时已排除其他疾病对本次研究的干扰。普通人冠状 AS 组和飞行员冠状 AS 组的总胆固醇和甘油三酯的含量明显高于普通人正常组和飞行员正常组,差异具有统计学意义。娄轶群^[11]的研究显示,血清中的脂质代谢异常为 AS 的危险因素,即 AS 患者血清中会出现血脂异常,与本次实验的结果符合。

普通人 AS 组与普通人正常组血清 CX-37 水平差异具有统计学意义,飞行员正常组和飞行员 AS 组的血清 CX-37 的水平比较差异也具有统计学意义。根据杜一鹏等^[12]的研究表明,冠状动脉斑块的形成和不稳定性的增加,可能会导致血清中 CX-37 的表达增多。普通人 AS 组和飞行员 AS 组的血清 CX-37 水平比较差异无统计学意义,说明飞行员与普通体检人群对比,发生 AS 的风险并无增加。

4 组 CX-37-1019C > T 位点 CC、CT、TT 基因型分布及等位基因频率比较,差异无统计学意义,而 Yeh 等^[14]对台湾人的研究显示,CX-37 的 C 等位基因频率增高与冠心病的患病率相关,与本次研究结果不符;Collings 和 Lanfear 等^[13-14]对芬兰人 CX-37 基因的研究结果显示 AS 与 CX-37-1019C > T 的多态性无关,同时我国韩雅玲^[15]研究显示,冠心病组中 C 等位基因携带者(CC + CT)冠心病风险是 TT 型的 1.96 倍,CX-37 的 C 等位基因可能是冠心病发病的一个危险因素。以上几篇文献的结果不一致,考虑为多次研究的人群分布不同有关。本研究未限制样本人群的地域,可能会存在误差,导致本次实验结果无统计学意义。

Brain F 等^[16-17]研究显示,冠心病被认为是导致各国飞行员停止飞行的最常见疾病之一。飞行员长期处于正加速度(+Gz)、震动、低氧和噪音等环境中、高能量的饮食、飞行时的心理压力过大及作息不规律等因素均可能导致飞行员冠心病的发病率提高。据不完全统计,美国飞行员在 1995 - 1999 年间的停飞率是 0.18%,其中最主要的原因即为心血管相关疾病^[16-18]。在国内,有研究曾报道,我国飞行员冠心病的初发年龄为 39.8 岁,较普通人要提前 10 年以上^[19-20]。因此,对于飞行员冠

心病发病危险原因的研究已经成为航空医学研究的热点,目前关于 CX-37 对飞行员发生 AS 的影响国外尚无相关研究。

本次研究结果表明,在普通人群中,CX-37 可能是导致 AS 的一个危险因素,而飞行员的飞行因素对 CX-37 表达无影响,且 CX-37 的基因多态性与 AS 发病无关。

4 参考文献

- [1] 李靓,谢巍,姜志胜,等.我国动脉粥样硬化基础研究近三年进展[J].中国动脉硬化杂志,2015(11):1182-1188.
- [2] 刘俊田.动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J].西安交通大学学报(医学版),2015(2):141-152.
- [3] 高扬.CTA 对冠状动脉粥样硬化病变进展的研究[D].北京:北京协和医学院,2012.
- [4] 张天.MMP-9、TIMP-1、CD147 在人粥样硬化冠状动脉中表达的相关性研究[D].大连:大连医科大学,2012.
- [5] 郭素峡.小分子 RNA 干扰 Cx37 对动脉粥样斑块的影响[D].苏州:苏州大学,2014.
- [6] 尹宝英.Cx37 和 Cx43 在小鼠卵泡中的表达研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2010.
- [7] Boerma M, Forsberg L, Van Zeijl L, et al. A genetic polymorphism in connexin 37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development[J]. Intern Med, 1999(2): 211-218.
- [8] Yamada Y, Vawa H, Ichihara S, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes[J]. IV Engl J Med, 2002(24):1916-1923.
- [9] Yeh HI, Chou Y, Liu HF, et al. Connexin 37 gene polymorphism and coronary artery disease in Taiwan[J]. Cardiol, 2001(3):251-255.
- [10] Weber C, Noels H. Atherosclerosis; current pathogenesis and therapeutic options[J]. Nat Med, 2011(11):1410-1422.
- [11] 娄轶群.冠心病的预防[J].中国社区医师(医学专业),2012(13):365-368.
- [12] 杜一鹏,曾昭华,苏子焯,等.小鼠动脉粥样硬化过程中血管壁的连接蛋白表达[J].中华临床医师杂志(电子版),2013(23):1789-1805.
- [13] Collings A, Islam MS, Juonala M, et al. Associations between connexin37 gene polymorphism and markers of subclinical atherosclerosis; the cardiovascular risk in young finns study[J]. Atherosclerosis, 2007(2):379-384.

(下转第 892 页)

death gene) is an ovarian BH3 domain-containing pro-apoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members[J]. *Mol Endocrinol*, 1998(9):1432-1440.

- [13] Willis SN, Fletcher JL, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak[J]. *Science*, 2007(5813):856-859.
- [14] Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, et al. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak[J]. *Genes & Development*, 2001(12):1481-1486.

- [15] Zhang L, Xing D, Chen M. Bim(L) displacing Bcl-x(L) promotes Bax translocation during TNF α -induced apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2008(7):950-958.
- [16] Luo S, Garciaarencibia M, Zhao R, et al. Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules[J]. *Molecular Cell*, 2012(3):359-370.
- [17] Ley R, Ewings KE, Hadfield K, et al. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2005(8):1008-1014.

(2017-06-03 收稿, 2017-07-27 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 乐 萍

(上接第 875 页)

- [14] Lanfear DE, Jones PG, Marsh S, et al. Connexin37(GJA4) genotype predicts survival after an acute coronary syndrome[J]. *Am Heart J*, 2007(3):561-566.
- [15] 韩雅玲, 席素霖, 张效林, 等. 间隙连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性与冠心病易感性的关联研究[J]. *中华医学杂志*, 2007(2):100-104.
- [16] Mccrery BF, Van SD. Permanent flying disqualification of USAF pilots and navigators (1995-1999)[J]. *Aviat Space Environ Med*, 2002(11):1117-1119.
- [17] 那美晶, 罗惠兰, 刘芳芳, 等. 飞行员血浆脂联素 SNP +276G/T、瘦素 SNP-2548G/A 位点基因多态性的研

究[J]. *西北国防医学杂志*, 2016(2):189-195.

- [18] 王青青, 徐达, 陈惠雨, 等. 飞行人员冠心病停飞 71 例长期随访[J]. *中华航空航天医学杂志*, 1998(3):174-175.
- [19] 《航空医学》编委会. *航空医学*[M]. 北京: 人民军医出版社, 1992:707-708.
- [20] 刘芳芳. 飞行员与冠心病患者及健康受试者血清视黄醇结合蛋白 4、内脂素及其基因表型变化的对比研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- (2017-03-16 收稿, 2017-06-13 修回)
- 中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 878 页)

- [11] 王荔, 叶抗, 李光来, 等. 血清 MMP-9 与脑梗死患者及其颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系研究[J]. *卒中与神经疾病*, 2009(2):87-89.
- [12] Thomas AC, Newby AC. Effect of matrix metalloproteinase-9 knock-out on vein graft remodelling in mice[J]. *Vasc Res*, 2010(4):299-308.
- [13] Spinale F G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function[J]. *Physiol Rev*, 2007(4):1285-1342.
- [14] 刘加强, 杨富生. 关于基质金属蛋白酶 9(MMP-9) 的最新进展[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2005(3):168-171.

- [15] 郭毅, 姜昕, 左彦方, 等. 基质金属蛋白酶 9 和转化生长因子 $\beta 1$ 在人冠状动脉斑块的表达及其与粥样斑块稳定性的关系[J]. *中国临床康复*, 2005(3):58-60.
- [16] 刘戮, 李阳, 樊泽元, 等. 冠心病患者血清 MMP-8 和 MMP-9 水平与冠脉易损斑块关系的研究[J]. *心血管康复医学杂志*, 2016(5):483-487.
- [17] 刘芳芳, 罗惠兰, 蒋晓旋, 等. 飞行员血液视黄醇结合蛋白 4 与冠心病危险因素的相关性[J]. *空军医学杂志*, 2015(2):65-68.

(2017-03-10 收稿, 2017-06-15 修回)

中文编辑: 文箴颖; 英文编辑: 周 凌

(上接第 884 页)

- [14] Das S, Anczuków O, Akerman M, et al. Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC[J]. *Cell Reports*, 2012(2):110.
- [15] Comiskey DF, Jacob AG, Singh RK, et al. Splicing factor SRSF1 negatively regulates alternative splicing of MDM2 under damage[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015(8):4202-4218.

- [16] De Miguel FJ, Sharma RD, Pajares MJ, et al. Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer[J]. *Cancer Research*, 2014(4):1105-1115.

(2017-05-27 收稿, 2017-07-16 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 乐 萍