

• 临床研究 •

汉族人群中与特发性肺动脉高压相关的 *KCNA5* 基因变异

张颖 何建国 浦介麟 张建强 柳志红 熊长明 倪新海

【摘要】 目的 探讨中国汉族人群中与特发性肺动脉高压(IPAH)发病和进展有关的 *KCNA5* 基因变异。方法 将86例特发性肺动脉高压患者作为病例组,250例正常人作为对照组。所有参与者抽取5ml外周静脉血,提取基因组DNA。通过对 *KCNA5* 基因序列测序寻找在病例组和对照组中基因位点频率具有显著性差异的基因变异。所有患者进行右心导管检查记录肺血流动力学数据,然后按照有无基因变异将患者分成两组,比较两组患者肺血流动力学指标。结果 位于编码区的 *KCNA5* C-862G 频率在患者和对照组之间有显著性差异。具有该位点变异的患者平均肺动脉压、肺血管阻力显著升高。结论 *KCNA5* 基因编码区单核苷酸多态位点 g. 862C>G 可能会影响 Kv1.5 通道的表达和功能,从而与特发性肺动脉高压发病和进展相关联。

【关键词】 高血压,肺性;*KCNA5* 基因;肌细胞,平滑肌

Genetic variants of *KCNA5* in patients of Chinese Han nationality with idiopathic pulmonary arterial hypertension

ZHANG Ying, HE Jianguo, PU Jielin, et al

Pathology and Physiology Research Center, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To investigate the relevance of genetic alterations in the Kv1.5 channel gene (*KCNA5*) to the development of idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) in Chinese Han nationality. Methods IPAH patients ($n=86$) were recruited from Chinese Han nationality. Randomized control samples ($n=250$) were obtained from the same population. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of all samples. The coding, the noncoding regions and the enhancer region of the *KCNA5* gene were amplified by using primers sets with optimal annealing temperature. All amplicants were directly sequenced. Hemodynamic data were compared between patients with and without *KCNA5* gene variants. Results The frequency of the variant *KCNA5* C-862G was found statistically different between the patients and the control samples. Moreover, there was marked difference between the patients with and without the variant. Conclusion Genetic variant *KCNA5* C-862G may alter the expression and/or function of Kv1.5 channel, which may be associated with IPAH of phenotype.

【Key words】 pulmonary hypertension; *KCNA5*; smooth muscle cells

特发性肺动脉高压(idiopathic pulmonary arterial hypertension, IPAH)是一种罕见但却致命的疾病,其特征为进行性肺动脉高压和肺小动脉壁持续性增厚,最终导致右心衰竭^[1~3]。IPAH的自然发病率为百万分之一到二。目前本病的确切病因还不明确,一般认为是和肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)的异常增生和(或)凋亡抑制有关。IPAH最常见的病理改变是刺激肺血管收缩

的中层肥厚,而 PSMCs 肥厚和异常增生引起的平滑肌牵张是肺血管收缩的触发因素^[4]。PSMCs 胞浆内游离 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的增加是触发血管收缩的主要因素,也是刺激平滑肌肥厚的重要因素。膜电位通过控制肌膜上电压依赖性钙离子通道(voltage-dependent calcium channels, VDCC)对于调节 PSMCs $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及肺动脉张力起主要决定作用。PSMCs 的静息膜电位、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度和肺动

收稿日期:2009-04-17

基金项目:国家973重点基础研究项目(2007CB512008)和国家“十一五”科技支撑项目(2006BAI01A07)

作者单位:100037北京市,北京协和医学院,中国医学科学院,阜外心血管病医院病理与生理实验中心

通讯作者:浦介麟, Tel:010-88398618, E-mail: jielinpu@yahoo.com

脉平滑肌的兴奋-收缩偶联都受电压依赖性钾离子通道(voltage-gated K^+ channel, K_v)介导的钾离子电流的调节^[5,6]。PASMCs中 K_v 通道受到抑制后会引引起胞膜去极化,使VDCC开放、 Ca^{2+} 内流增加、 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,从而使肺血管收缩。另外 K_v 通道功能受抑制引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高还会刺激PASMCs的增殖并且抑制PASMCs的凋亡^[7]。 $K_v1.5$ 是一种重要的成孔 α 亚单位,它组成了PASMCs和其他类型平滑肌细胞上功能性 K_v 通道^[8~10]。人PASMCs中 $K_v1.5$ 通道基因KCNA5的过度表达会引起细胞膜超极化,加快细胞凋亡,加速凋亡细胞的收缩。某些能阻断 $K_v1.5$ 通道的药物[如培高利特(pergolide)等]会刺激PASMCs收缩和增生,同时抑制其凋亡^[8,11]。与正常人和继发性肺动脉高压患者相比,IPAH患者的PASMCs中 $K_v1.5$ 通道表达降低,同时功能也受到抑制^[12,13]。因此, $K_v1.5$ 通道的功能失活和表达降低可能是引起IPAH患者肺血管收缩和肺动脉平滑肌增生肥厚的因素之一^[14]。基于KCNA5基因变异可能会影响 $K_v1.5$ 通道的表达和功能,从而与IPAH的发病与进展有关联,本研究通过基因测序的方法寻找汉族人群中与IPAH发病和进展相关的KCNA5基因变异。

1 对象与方法

1.1 研究人群 本研究收集从2006年5月至2008年11月在北京阜外心血管病医院住院的86例无亲缘关系的IPAH患者,所有患者均为汉族人。IPAH的诊断依据2003年肺动脉高压世界论

坛制订的肺动脉高压诊断分类标准^[15],并通过以下方法确认:(1)静息状态下右心导管检查,平均肺动脉压 >25 mmHg,同时肺毛细血管楔压(pulmonary capillary wedge pressure, PCWP)不高于15 mmHg;(2)排除其他可能导致肺动脉高压的疾病,例如①先天性心脏病、门静脉高压、结缔组织病或者是艾滋病(获得性免疫缺陷综合征)导致的肺动脉高压;②慢性栓塞性肺动脉高压;③其他慢性呼吸系统疾病。另外从社区挑选250例正常人作为对照组。对照组正常人在年龄、性别、民族、身高、体重等方面与病例组患者无显著性差异。本研究得到阜外心血管病医院伦理委员会的批准。所有病例组和对照组人员都签署了书面知情同意书。

1.2 KCNA5基因测序 所有病例组和对照组人员抽取5ml外周静脉血,采用天根(北京)生化科技公司的血液基因组DNA提取试剂盒(DP319)从外周血中提取基因组DNA。使用天根(北京)生化科技公司 $2\times$ Taq PCR MasterMix试剂盒通过PCR反应从基因组DNA中扩增KCNA5基因编码区和非编码区以及上、下游侧翼序列的基因序列。PCR反应所用的引物序列^[14]见表1。扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳分离,然后使用天根(北京)生化科技公司的普通DNA产物纯化试剂盒(DP204)进行纯化。采用ABI 3730XL基因测序仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)对所有扩增产物进行双向测序并与GenBank提供的野生型KCNA5基因序列(NT_009759.15)进行比对。

表1 扩增KCNA5基因所用引物

扩增产物	上游引物	下游引物
1	5-GGAACAATCTCCAGAAAGC-3	5-ATCCAAAGGGTGTGATTGG-3
2	5-CCCAAGTTTGTGTGTCTATGC-3	5-CAGGTGGAACTGATGATGC-3
3	5-ATGTTGGAGTGAGGGAGTGC-3	5-CATGCCCTAGCCTGTTTCC-3
4	5-CTGGGTTGAGACCAGACAGC-3	5-GTGGCAGCGGTGTCTCC-3
5	5-CATCTCCCCACTCTTCC-3	5-GAGTCCGCTCTCTGTC-3
6	5-AGGCCACAGGGGAGAGC-3	5-GGATACTCGAAGATAAGCCACACC-3
7	5-CGGACGAGATACGCTTCTACC-3	5-CTTGAAGATGCGGAACACC-3
8	5-CATCTTCCCTACTTCATCACC-3	5-GGCACTGTCTGCATTCTCC-3
9	5-AGAGGAGTCCAGCGGAAGG-3	5-AAGCAAATTTGGAACACATGG-3
10	5-TCTCTATACCCAGCAGAGG-3	5-CCTCTAACCCAGTCAATGC-3

1.3 统计分析 采用统计学软件包 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version13. 0; SPSS;Chicago,IL,USA)进行数据分析。基线数据用 $\bar{x} \pm s$ 或具体数值来表示。所有检验均为双向检验, $P < 0. 05$ 被认为差异具有统计学意义。研究中观察到的每种基因型的数量均与预期值比较验证是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。对于基因测序发现的 KCNA5 基因多态位点通过 χ^2 检验比较该位点在病例组和对照组之间频率的差异。为了评估 KCNA5 基因多态位点对 IPAH 发病与进展的可能影响,将患者根据有无该位点基因变异分为两组。两组患者的临床基线数据和肺血流动力学数据采用 χ^2 检验和 t 检验进行比较。

2 结果

2.1 临床数据 86 名 IPAH 患者中男 27 名,女 59 名。年龄为(30.2±9.3)岁(最小年龄 12 岁,最大年

龄 60 岁)。病例组患者和对照组正常人在年龄、性别、民族组成方面没有显著差异(表 2)。按照美国纽约心脏协会(New York Heart Association,NYHA)心功能分类标准,86 名患者中有 8 例(9%)为心功能Ⅱ级,74 例(86%)为心功能Ⅲ级,4 例(5%)为心功能Ⅳ级。具有 KCNA5 基因变异的 IPAH 患者与没有该位点变异的患者在年龄、性别、身高、体重、NYHA 心功能分级以及从发病到首次就诊的间隔时间等方面没有显著性差异(表 3)。

表 2 病例组和对照组基线数据

组别	年龄 (岁)	性别 (男/女)	身高 (cm)	体重 (kg)	基因型
					KCNA5-862C/G [n(%)]
病例组	30.2±9.3	27/59	164.1±7.3	60.2±9.6	36(42%)
对照组	29.8±7.4	71/179	165.5±6.1	61.5±8.8	16(6%)
P 值	0.778	0.598	0.217	0.379	<0.001

表 3 对有无 KCNA5 基因变异的 IPAH 患者临床和肺血流动力学指标的比较

患者	年龄 (岁)	性别 (男/女)	身高 (cm)	体重 (kg)	发病至首次就诊间隔时间(月)	NYHA 心功能分级 n (%)		
						Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
所有患者 (n=86)	29.8±8.9	27/59	163.9±7.0	60.5±9.2	30.9±14.9	8 (9)	74 (86)	4 (5)
有 KCNA5 基因变异患者(n=36)	29.9±7.5	11/25	163.0±7.2	59.7±8.7	29.3±13.3	3 (8)	31 (86)	2 (6)
无 KCNA5 基因变异患者(n=50)	29.7±9.9	16/34	164.6±6.8	61.1±9.5	32.1±16.0	5 (10)	43 (86)	2 (4)
P 值	0.924	0.887	0.320	0.480	0.387	0.715*	1.000*	1.000*

患者	右心导管数据					
	平均肺动脉压 (mmHg)	平均右房压 (mmHg)	肺毛细血管楔压 (mmHg)	心输出量 (L/min)	心指数 (L·min ⁻¹ ·m ⁻²)	肺血管阻力 (WU·m ²)
所有患者 (n=86)	62.6±10.7	11.4±3.1	9.1±2.2	3.8±0.7	2.1±0.2	24.8±5.7
有 KCNA5 基因变异患者(n=36)	66.2±9.0	12.3±3.3	9.0±2.1	3.6±0.5	2.1±0.2	27.7±4.1
无 KCNA5 基因变异患者(n=50)	60.0±11.1	10.9±2.9	9.2±2.3	3.9±0.7	2.2±0.3	22.7±5.7
P 值	0.006	0.041	0.616	0.053	0.025	<0.001

注:百分比采用双向 Fisher 精确检验

2.2 基因型数据 通过使用表1中所列的引物,将 *KCNA5* 基因全序列 7 000bp 和上、下游各 2 000bp 长度的侧翼序列从基因组 DNA 中扩增出来,然后经过测序发现 21 个单核苷酸多态位点(SNPs),均在 NCBI SNP 数据库中已有报道。这些 SNP 位点中只有 1 个位于编码区,即 *KCNA5* G862C (rs35853292)。*KCNA5* G862C 的基因型频率在病例组患者中分别是 CC 79.1%、CG 20.9%、GG 0%,在对照组正常人中是 CC 96.8%、CG 3.2%、GG 0%。*KCNA5*-862G 的等位基因频率在病例组患者中是 10.5%,显著高于其在对照组正常人中的频率(1.6%, $P<0.05$)。对照组 *KCNA5* 862C/G 基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=0.797$)。带有 *KCNA5* C-862G 基因变异的个人患 IPAH 的风险显著增加(比值比 8.01,95%可信区间 3.72~17.18)。测序发现的其他 SNPs 在病例组和对照组之间均无显著差异。

2.3 肺血流动力学数据 所有 IPAH 患者在入院后都进行右心导管检查。笔者将有无 *KCNA5*-862G 基因变异患者的肺血流动力学指标进行了比较(表3)。具有 *KCNA5*-862G 基因变异患者的平均肺动脉压、肺血管阻力和平均右房压显著高于不带有该基因变异的患者。另一方面,具有 *KCNA5*-862G 基因变异的患者的心指数显著低于不带有该基因变异的患者。两组患者在心输出量和肺毛细血管楔压两个指标上无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

已有报道,位于 *KCNA5* 基因编码区的 SNP 位点变异可能会影响 Kv1.5 通道的功能和表达^[14]。本研究的结果表明,*KCNA5*-862G 可能是中国人群中惟一与 IPAH 发病和进展有关的 *KCNA5* 基因 SNP 位点。这是至今为止中国关于 *KCNA5* 基因变异与 IPAH 之间关联性的首次报道。病例组和对照组之间 *KCNA5*-862C/G 基因型频率的显著差异表明该位点基因变异与 IPAH 的发病有关联。另外,由于本研究中具有 *KCNA5*-862G 基因变异的患者的平均肺动脉压、平均右房压和肺血管阻力都显著高于没有该位点基因变异的患者,因此 *KCNA5*-862G 也可能影响 IPAH 的病情进展。

位于基因编码区的 SNPs 可能会影响基因表达的调节,从而改变个体对某种疾病的易感性以及患病后的病程进展。*KCNA5* C-862G 改变了编码氨基酸的表达,使该位点所在的三联体密码编码的氨

基酸由天冬氨酸变为谷氨酸。由于 Kv1.5 通道可以调节 PSMCs 增殖和凋亡,而且 IPAH 患者 PSMCs 中 Kv1.5 通道表达降低^[12,13],同时笔者通过测序比对发现的其他位于 *KCNA5* 基因编码区和上下游侧翼序列的 SNPs 变异频率在病例组和对照组没有显著差异,因此笔者认为 *KCNA5* C-862G 多态位点变异会降低 *KCNA5* 表达,使 PSMCs 过度增殖和凋亡减少,从而与 IPAH 相关联。本研究中患者的基因型数据表明杂合型 CG 使 IPAH 发病风险显著上升(比值比 8.01,95%可信区间 3.72~17.18, $P<0.05$)。

IPAH 最显著的临床特征就是肺动脉压和肺血管阻力持续升高,其原因主要是 PSMCs 过度增殖、肺血管内皮细胞增生、肺血管持续性收缩引起的肺血管重构造成的^[16,17]。本研究中的右心导管数据显示具有 *KCNA5*-862G 基因变异的患者的平均肺动脉压、肺血管阻力显著高于没有此基因位点变异的患者,这表明 *KCNA5*-862G 基因变异会促进 PSMCs 的增殖并抑制其凋亡。

虽然根据是否有 *KCNA5*-862G 基因变异分成两组的患者在年龄、性别、病程(从发病到首次就诊间隔时间)等方面没有差异,但是具有 *KCNA5*-862G 基因变异的患者平均右房压显著增高而心指数显著降低,这些患者更易于发生右心衰竭。因此。*KCNA5*-862G 可能会加速 IPAH 患者的病情进展。

近年来对 IPAH 遗传学背景的研究,增进了笔者对该病发病机制分子遗传水平的了解。过去的研究认为 IPAH 的发病与骨形态发生蛋白受体 2 基因(bone morphogenetic protein receptor-2 gene, BMPR2)的突变有关^[18,19]。在至少 50% 的家族性肺动脉高压患者中发现 BMPR2 基因突变^[20~22]。然而只有 10% 的 IPAH 患者有 BMPR2 基因突变,而且这些患者没有共同的突变位点^[19]。因此,很多研究者认为特发性肺动脉高压是一种多种遗传因素和环境因素共同作用引发的疾病^[23,24]。本研究中,对照组正常人也有 *KCNA5*-862G,而患者中有半数以上没有 *KCNA5*-862G。这一结果符合表明 *KCNA5*-862G 为引起 IPAH 的多种因素之一。

通过本研究,笔者认为位于 *KCNA5* 基因编码区的 SNPs 变异 *KCNA5* C-862G 与 IPAH 的发病和病程进展有关。*KCNA5* C-862G 可能会下调 *KCNA5* 的表达,使 Kv1.5 通道功能降低,从而 PSMCs 过度增殖、凋亡减少。肺血流动力学数据表明,*KCNA5* C-862G 会使 IPAH 患者病程进展加

速,更易于发生右心衰竭。因此,KCNA5 C-862G在汉族人群中对IPAH的发病起重要作用。

参考文献

- [1] Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2004,351:1655-1665.
- [2] Newman JH, Fanburg BL, Archer SL, et al. Pulmonary arterial hypertension: future directions; report of a National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases Workshop. *Circulation*, 2004, 109: 2947-2952.
- [3] Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 2003,361: 1533-1544.
- [4] Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*,2004, 351: 1425-1436.
- [5] Smirnov SV, Robertson TP, Ward JPT, et al. Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K⁺ current in rat pulmonary artery muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,1994, 266: H365-H370.
- [6] Yuan XJ. Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res*,1995, 77: 370-378.
- [7] Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, et al. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*,2000, 279: C1540-C1549.
- [8] Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, et al. Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv1.2, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest*,1998, 101: 2319-2330.
- [9] Kerr PM, Clément-Chomienne O, Thorneioe KS, et al. Heteromultimeric Kv1.2-Kv1.5 channels underlie 4-aminopyridine-sensitive delayed rectifier K⁺ current of rabbit vascular myocytes. *Circ Res*,2001, 89: 1038-1044.
- [10] Overturf KE, Russell SN, Carl A, et al. Cloning and characterization of a Kv1.5 delayed rectifier K⁺ channel from vascular and visceral smooth muscles. *Am J Physiol Cell Physiol*,1994, 267: C1231-C1238.
- [11] Brevnova EE, Platoshyn O, Zhang S, et al. Overexpression of human KCNA5 increases IK(V) and enhances apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*,2004, 287: C715-C722.
- [12] Yuan XJ, Aldinger AM, Juhaszova M, et al. Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*, 1998, 98: 1400-1406.
- [13] Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, et al. Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet*,1998, 351: 726-727.
- [14] Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, et al. Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007,292:C1837-C1853.
- [15] Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2004,43: 5S-12S.
- [16] Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, et al. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2002, 20:1559-1572.
- [17] McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2006,114:1417-1431.
- [18] Atkinson C, Stewart S, Upton PD, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation*, 2002,105: 1672-1678.
- [19] Newman JH, Trembath RC, Morse JA, et al. Genetic basis of pulmonary arterial hypertension; current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol*, 2004,43:33S-39S.
- [20] Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*, 2000,67:737-744.
- [21] Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, et al. BMPR2 haploin sufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet*, 2001,68:92-102.
- [22] Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*, 2000,26:81-84.
- [23] Machado RD, James V, Southwood M, et al. Investigation of second genetic hits at the BMPR2 locus as a modulator of disease progression in familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2005, 111: 607-613.
- [24] Yuan JX, Rubin LJ. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits. *Circulation*, 2005,111:534-538.