

冠心病患者纤维蛋白原 B β 启动区基因多态性

龚五星¹, 蔡月明¹, 彭 健², 彭 澍², 曾志为²

(暨南大学医学院附属第三医院 珠海市人民医院, 1. 分子生物学中心, 2. 心内科; 广东省珠海市 519000)

[主题词] 纤维蛋白原; 基因表达; 多态性, 限制片段长; 冠状动脉疾病

[摘要] 探讨纤维蛋白原 B β 基因启动区的两个多态性位点 B β -148C/T 和 -455G/A 与冠心病的相关关系。用聚合酶链反应—限制片段长多态性方法对冠心病组(148例)和健康对照组(173例)进行了研究,发现 B β -148T 和 -455A 等位基因频率在冠心病组中高于对照组($P < 0.05$), -148CT 及 -455GA 基因型频率在冠心病组高于对照组($P < 0.05$),不同基因型血浆纤维蛋白原水平有差异, -148CC 和 -455GG < -148CT 和 -455GA < -148TT 和 -455AA。冠心病患者组血浆纤维蛋白原水平高于对照组($P < 0.01$),两组人群同一基因型比较,冠心病患者组纤维蛋白原水平均高于健康对照组。表明纤维蛋白原 B β 基因启动区 -148C/T 和 -455G/A 多态性与冠心病的发生相关,并可影响血浆纤维蛋白原水平;在中国南方人群中纤维蛋白原 B β -148C/T 和 B β -455G/A 多态性位点呈完全连锁不平衡关系。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Study on the Promoter Region of B β -Fibrinogen Gene Polymorphism in Patients with Coronary Heart Disease

GONG Wu Xing¹, CAI Yue Ming¹, PENG Jian², PENG Shu², and ZHEN Zi Wei²

(1. Molecular Biology Experimental Center, 2. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Medical College, JINAN University, the People's Hospital of Zhuhai, Zhuhai City, Guangdong Province 519000, China)

[MeSH] Fibrinogen; Gene Expression; Polymorphism, Restriction Fragment Length; Coronary Disease

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between the promoter region of B β -fibrinogen (Fg) gene polymorphism -148C/T, -455G/A and coronary heart disease (CHD). **Methods** By Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)-restriction enzyme digestion methods, the genotypes and allele frequencies of B β -fibrinogen gene polymorphism -148C/T, -455G/A were determined in 148 CHD patients and 173 controls. **Result** Fg B β -148T, -455A allele frequencies are higher in CHD group than that in control group ($P < 0.05$). Both heterozygous genotype frequencies of -148CT and -455GA are higher in CHD group than that in control group. The plasma Fg levels have differences among genotypes: -148CC, -455GG < -148CT, -455GA < -148TT, -455AA respectively. The plasma Fg levels are higher in CHD group than that in control group, when compared the same genotype, CHD group Fg levels also higher than that of in control group. **Conclusion** The promoter region of B β -Fg gene polymorphism -148C/T, -455G/A are associated with the development of CHD, and at same time impact on the plasma Fg concentration. The polymorphism -148C/T and -455G/A are complete linkage disequilibrium in Southern Chinese.

血浆纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)是重要的凝血因子,高Fg血症是血栓性疾病和动脉硬化性疾病发生和发展的独立危险因素之一。Fg的基因多态性被认为是血浆Fg水平差异的遗传决定性因素,可能直接或间接作用于冠心病(coronary heart disease, CHD)的发生和发展。近年来,Fg的基因多态性越来越受到关注,我们运用聚合酶链反应—限制片段长多态性(polymerase chain reaction restriction fragment

length polymorphism, PCR-RFLP)方法,对中国南方汉族人群Fg B β 基因启动区的两个多态性位点-148C/T和-455G/A与冠心病的相关关系进行了研究。

1 对象和方法

1.1 研究对象

148例冠心病患者来源于1998年8月至2000年6月本院门诊和住院病人,男101例,女47例,年龄36~99岁,中位数年龄62岁,根据1979年世界卫生组织(WHO)确定的冠心病诊断标准确诊。正常对照组173例来于同期至我院进行体检的健康人,男92例,女81例,年龄35~81岁,中位数年龄56岁,经病史、体检,两组人群均检查血压、血脂、血糖、ECG,了解病史、吸烟情况,部分病例行心脏ECT、运

[收稿日期] 2001-11-13 [修回日期] 2002-03-11

[基金项目] 珠海市委重点科技攻关项目(199917)资助

[作者简介] 龚五星,男,1960年1月出生,湖南省泸溪县人,硕士,硕士研究生导师,内科主任医师,临床分子生物学中心主任。蔡月明,女,1974年10月出生,昆明市人,内科硕士研究生。彭健,男,1956年11月出生,四川省内江市人,心内科主任医师,教授,硕士研究生导师,珠海市医学会内科学会主任委员,《中国实用内科杂志》常务编委。

动负荷试验, 其中 62 例进行了冠状动脉造影检查确诊; 排除糖尿病、高血压、肝肾功能异常、出凝血等疾病。所研究对象均为广东汉族人群, 两组研究对象基线条件互相匹配, 两组性别、年龄、血压、血糖、血脂等基线条件比较无统计学差异。

1.2 基因组 DNA 提取

采受试对象空腹静脉血 2 mL, EDTA 抗凝, 血浆分离留备 Fg 测定, 白细胞分离, 低渗溶血, 酚/氯仿法提取基因组 DNA, TE 溶解, -20°C 保存待测。

1.3 DNA 聚合酶链反应扩增

DNA 扩增在 PE-2400PCR 仪上进行, 总体积 30 μL , 含 1 μg 基因组 DNA、dNTP 16 $\mu\text{mol/L}$, Taq 酶 2.4 u, Mg Cl_2 121.5 mmol/L, 上下游引物 0.35 $\mu\text{mol/L}$ 。上游引物序列: 5'-GAACATTTTACCTTATGTGAATTAAGG-3', 下游引物序列: 5'-GAAGCTCCAAGAAACCATCC-3', PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 继之 95°C 50 s, 57°C 60 s, 72°C 70 s, 共 35 个循环后, 72°C 终末延伸 5 min 后 -20°C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增产物, PCR 特异性扩增产物为一条 669 bp DNA 片段。

1.4 限制核酸内切酶酶切及凝胶电泳分析

分别取 PCR 产物 10 μL , 分两管, 每管总体积为 20 μL , 分别加限制核酸内切酶 Hae Ⅲ、Hind Ⅲ各 5 u 及相应酶缓冲液 2 μL , 37°C 水浴酶切 12 h, 酶切产物均用 1% 琼脂糖凝胶 80 V 电泳 15 min, 溴乙锭染色, 紫外透射仪下观察结果; Hae Ⅲ酶切观察 Fg B β -455 基因型: Fg B β -455GG 纯合子产生 181 bp 和 488 bp 两个片段, Fg B β -455GA 杂合子产生 669 bp、181 bp 和 488 bp 三个片段, Fg B β -455AA 纯合子不被酶切, 只产生 669 bp 一个片段。PCR 产物经 Hind Ⅲ酶切观察 Fg B β -148 基因型: Fg B β -148CC 纯合子应产生 290 bp、194 bp 和 185bp 三个片段, 但在 1% 琼脂糖凝胶中只呈现 290 bp 和 194 bp(185 bp) 两片段; Fg B β -148CT 杂合子产生 290 bp、194 bp(185 bp) 和 379 bp 三个片段, Fg B β -148TT 纯合子产生 290 bp 和 379 bp 两个片段。

1.5 血浆纤维蛋白原测定

用免疫比浊法测定新鲜血浆 Fg 浓度, 采用上海太阳公司纤维蛋白原定量试剂盒。

1.6 统计学处理

应用 SPSS8.0 统计软件包处理数据。进行 Hardy-Weinberg 平衡检验及等位基因、基因型频率分布采用 χ^2 检验, 两组人群各基因型间 Fg 水平比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异, $P < 0.01$ 表示有显著性统计学差异。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验

对冠心病组和对照组人群 Fg B β -455G/A 和 Fg B β -148C/T 位点基因型 Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示观察值与期望值吻合良好, $P = 0.997$, $P > 0.05$, 没有统计学差异, 说明其表型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡, 也说明本试验对中国南方汉族人群 Fg B β 基因的检测结果具代表性。

2.2 纤维蛋白原 B β -148C/T 和 B β -455G/A 两位点基因频率分布

2.2.1 纤维蛋白原 B β -148C/T 位点基因频率分布

与对照组比较, CHD 组纤维蛋白原 B β -148C/T 位点常见基因型-148CC 的分布频率降低 ($P < 0.01$), 杂合子-148CT 的分布频率升高 ($P < 0.05$), 少见型-148TT 的分布没有差异 ($P > 0.05$), 推测与检出个体少有关。对等位基因频率分析发现, 少见型等位基因 T 在 CHD 组的分布频率为 0.277, 在对照组为 0.197, 两组的差别有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1, Table 1)。

表 1. 纤维蛋白原 B β -148C/T 位点等位基因和基因型频率分布

Table 1. Comparison of genotypes and allele frequencies of B β -fibrinogen gene polymorphism -148C/T between CHD group and control group

Group	Case	CC	CT	TT	C	T
Control	173	112 (64.7%)	54 (31.2%)	7 (4.1%)	0.803	0.197
CHD	148	74 (50%)	66 (44.6%)	8 (5.4%)	0.723	0.277
P value		0.008	0.014	0.565		0.016

2.2.2 纤维蛋白原 B β -455G/A 位点基因频率分布

比较两组发现, 纤维蛋白原 B β -455G/A 位点基因频率分布与纤维蛋白原 B β -148C/T 位点完全相同 (表 2, Table 2)。

表 2. 纤维蛋白原 B β -455G/A 位点等位基因和基因型频率分布

Table 2. Comparison of genotypes and allele frequencies of B β -fibrinogen gene polymorphism -455G/A between CHD group and control group

Group	Case	GG	GA	AA	G	A
Control	173	112 (64.7%)	54 (31.2%)	7 (4.1%)	0.803	0.197
CHD	148	74 (50%)	66 (44.6%)	8 (5.4%)	0.723	0.277
P value		0.008	0.014	0.565		0.016

2.3 纤维蛋白原 B β -148C/T 和 B β -455G/A 连锁不平衡分析

连锁不平衡(linkage disequilibrium)是指不同基因座上的等位基因之间实际观察到的某两个基因出现在同一单体型上的频率与预期值有一定差异。在我们的研究中发现, Fg B β -148C/T 和 Fg B β -455G/A 两位点等位基因并非随机分布。若随机分布, 那么 Fg B β -148C 和 Fg B β -455G 单体型频率应是 $0.723 \times 0.723 = 0.523$, 但实际结果显示在所有 321 例受试对象中, -455G 总是和-148C 成对出现, 说明 Fg B β -148C/T 和 Fg B β -455G/A 多态性间存在完全连锁不平衡(complete linkage disequilibrium), 连锁平衡偏移 $\Delta = 0.477$ 。

2.4 两组不同基因型血浆纤维蛋白原水平比较

表 3. 两组人群纤维蛋白原 B β -455G/A 多态性与纤维蛋白原水平($\bar{x} \pm s$, g/L) 的关系

Table 3. Relationship between B β -fibrinogen gene polymorphism-455G/A and fibrinogen levels in CHD and control groups

Group	Case	-455GG	-455GA	-455AA	-455GA+ AA	total Fg
Control	173	2.91 \pm 0.34	3.18 \pm 0.29	3.56 \pm 0.39	3.22 \pm 0.32	3.04 \pm 0.37
CHD	148	3.06 \pm 0.28	3.56 \pm 0.32	3.84 \pm 0.28	3.59 \pm 0.33	3.32 \pm 0.40
tvalue	3.201	7.411	1.664	7.096	6.830	
Pvalue	0.002	0.000	0.117	0.000	0.000	

3 讨论

冠心病(CHD)是多因素疾病,也是多基因遗传疾病。目前研究观点认为,血浆 Fg 升高,是 CHD 的独立危险因素之一,而且,血浆纤维蛋白原水平与冠状动脉狭窄程度有关^[1,2]。人类纤维蛋白原是一个 340 kDa 的糖蛋白,由 3 种具有高度同源性的多肽链 A α 、B β 、 γ 构成,通过二硫键相连。编码 Fg 的基因簇约 45 kb,位于 4q28。A α 、B β 和 γ 基因分别编码这三种多肽链。B β 链的合成被认为是 Fg 合成的限速步骤,其合成速率可影响另两条多肽链的合成速率。Fg 基因多态性是引起血浆 Fg 升高的重要遗传因素之一,但直至目前, Fg 基因多态性—血浆 Fg 水平—冠心病三者间的关系仍存在较大的争议。

本研究的结果表明,在 CHD 组,少见型等位基因-148T 和-455A 及-148CT 和-455GA 基因型频率要高于正常对照组,-455A 及-148T 等位基因频率在 CHD 组中是 0.277,但健康对照组中仅 0.197。国外一些相关研究文献报道-455A 等位基因及-455GA 和-455AA 基因型频率在 CHD 组高于健康对照^[3-5],但也有少数报道认为-455G/A 多态性频率在 CHD 组与

实验发现,对照组血浆 Fg 为 3.04 ± 0.37 g/L, CHD 组为 3.32 ± 0.40 g/L,两组均数有显著性差异($P < 0.01$)。由于 Fg B β -148C/T 和 Fg B β -455G/A 多态性为完全连锁不平衡,故用 Fg B β -455G/A 多态性与 Fg 水平的关系代表-148C/T 多态性对 Fg 水平的影响。无论在 CHD 组或对照组,血浆 Fg 水平均呈-455GG < -455GA < -455AA 趋势,两组人群的同一基因型比较呈现 CHD 患者-455GG 型、GA 型 Fg 水平分别 > 对照组-455GG 型、GA 型($P < 0.01$), AA 型没有差别($p > 0.05$),可能与检出的 AA 型样本例数太少有关。但将 AA 型与 GA 型合为一组后,仍呈现 CHD-455GA+ AA 组 Fg 水平 > 对照者-455GA+ AA 组(表 3, Table 3)。

对照组并无统计学差异^[6],不增加心肌梗死危险性^[7]。所得出的研究结论不同,可能由于所选取的人群地域、种族、民族的差异,以及各研究方法的不同所致。本研究表明,CHD 组的总 Fg 水平要高于对照组,CHD 患者-455GG 型 Fg 水平 > 对照组-455GG 型; CHD 患者-455GA 型 Fg 水平 > 对照组-455GA 型; AA 型没有差别,可能与检出的 AA 型样本例数太少有关,将 AA 型与 GA 型合为一组后,仍呈现 CHD 组-455GA+ AA Fg 水平 > 对照者-455GA+ AA,表明两组人群的 Fg 水平受 Fg-455G/A 多态性这一遗传因素的影响,-455A 携带者的 Fg 水平高于-455G 携带者。少见型纯合子-455AA、-148TT 的血浆 Fg 水平比常见型纯合子-455GG、-148CC 的血浆 Fg 水平高 10.8% (对照组) ~ 25.5% (CHD 组),而且 CHD 患者血浆 Fg 水平增高,较对照组增高 9.31%,故可以认为 Fg 基因多态性与 Fg 水平及 CHD 的发生均存在相关关系。

国内外研究认为 Fg B β -455G/A 与-148C/T 呈完全连锁不平衡或强连锁不平衡关系,本研究对 321 例受试对象的基因分析发现-455G 与-148C,-455A 与-148T 总是成对出现,为完全连锁不平衡,这与

van't Hooft^[8] 及 Behague^[9] 的结果一致,但也有些研究报道认为-455G 与-148C 呈强连锁不平衡关系^[10],这可能与种族和民族的差异有关。编码 Fg 的三个基因调控区均有 $\text{C}\alpha$ 型 IL-6 反应元件及 TATA 相似性序列。靠近 IL-6 反应序列, $\text{A}\alpha$ 及 $\text{B}\beta$ 有 C/EBP 位点(CAAT 增强子结合蛋白位点),下游有 HNF-1 位点(肝细胞核因子-1 位点), Fg $\text{B}\beta$ -455A 等位基因可使 Fg $\text{B}\beta$ 的转录增加,影响肝细胞核因子与 Fg $\text{B}\beta$ 基因的结合,使肝脏转录分泌成熟的 Fg 增多。另一方面 Fg $\text{B}\beta$ -148C/T 被认为并不影响 Fg $\text{B}\beta$ 链的转录分泌,但其位置与白细胞介素-6 (IL-6) 的一个作用元件(-143~-137 bp) 非常接近,可能是通过与 Fg $\text{B}\beta$ -455G/A 的完全连锁不平衡关系及影响了核蛋白与 IL-6 反应元件的相互作用而间接影响到 Fg 基因的转录,使 Fg 水平升高^[9]。

纤维蛋白原 $\text{B}\beta$ 基因多态性单独或联合作用,并可能与环境因素协同,使循环中 Fg 水平升高,增加了 CHD 的罹患危险性。Fg 的 $\text{A}\alpha$ 、 γ 基因及 $\text{B}\beta$ 的其它位点可能单独或联合影响 CHD 的发生发展,尚需在进一步的研究中阐明。

[参考文献]

- [1] 汪芳,赵迎,胡锦章,等. 冠心病患者脂蛋白(a)和纤维蛋白原血浓度与冠状动脉狭窄间的关系. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5 (3): 246-

248

- [2] 覃军,何作云,冯兵,等. 冠心病患者冠状动脉不同程度狭窄时血脂、载脂蛋白和纤维蛋白原变化. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5 (2): 150-152
- [3] Humphries SE, Ye S, Talmud P, et al. Europe atherosclerosis research study: genotype at the fibrinogen locus (G-455-A beta gene) is associated with differences in plasma fibrinogen levels in young men and women from different regions in Europe. Evidence for gender-genotype-environment interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 (1): 96-104
- [4] Lam KS, Ma OC, Wat NM, et al. Beta fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patient with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 1999, 42 (10): 1250-1253
- [5] Thomas AE, Green FR, Humphries SE, et al. Association of genetic variation at the beta fibrinogen gene locus and plasma fibrinogen levels: interaction between allele frequency of the G/A-455 polymorphism, age and smoking. *Clin Genet*, 1996, 50 (4): 184-190
- [6] Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, et al. A common mutation (G-455 \rightarrow A) in the beta fibrinogen is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Invest*, 1997, 99 (12): 3034-3039
- [7] van der Bom JG, de Maat MP, Bots ML, et al. Elevated plasma fibrinogen: cause or consequence of cardiovascular disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18 (4): 621-625
- [8] van't Hooft FM, von Bahr SJF, Silveira A, et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19 (12): 3063-3070
- [9] Behague I, Poirier O, Nicaud V, et al. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation*, 1996, 93: 440-449
- [10] 杨志刚,李凤芹,刘国勋,等. 纤维蛋白原-455G/A、-148C/T、448G/A 基因多态性与血浆纤维蛋白原水平的关系. 中华血液学杂志, 2000, 21 (9): 463-465

(此文编辑 胡必利)

•读者•作者•编者•

《中国动脉硬化杂志》

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎引用! 欢迎刊登广告!

《中国动脉硬化杂志》为生物医学专业高级学术性期刊,设有多个栏目,主要刊登原始研究论文、经验总结和文献综述等。现为双月刊,单月 30 日出版,A4 开本,内芯 96 页,全铜版纸印刷。每期定价 11.00 元,全年 66.00 元。由湖南省报刊发行局发行,全国各级各地邮局均可订阅。中国动脉硬化杂志编辑部热忱欢迎海内外同仁和社会各届朋友向《中国动脉硬化杂志》投稿,到当地邮局订阅,邮发代号(医药卫生类) 42-165。若错过邮局征订日期,可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。编辑部地址为:湖南省衡阳市南华大学内,中国动脉硬化杂志编辑部,邮政编码: 421001;联系电话: 0734-8281289; E-mail: dmzzbjb@163.net。个人向编辑部订阅,给予 10 元优惠。

《中国动脉硬化杂志》热情欢迎并采取下述措施激励广大同仁引用发表在本刊上的文章:凡在中国科学技术论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊上发表的文章中引用了本刊的文章者,凭当期刊封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年刊物一份。

主编杨永宗和专职副主编胡必利率编辑部全体办刊人员向长期关心、爱护和支持《中国动脉硬化杂志》的海内外同仁和社会各界朋友致以衷心的感谢! 祝愿您健康长寿,万事如意!