

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0199-04

·临床研究·

纤维蛋白原 β -455G/A 基因多态性与高血压和冠心病的关系

孙慧¹, 张薇¹, 路方红², 温培娥³, 田奇²

(山东大学齐鲁医院 1. 心内科, 2. 心血管病研究室, 3. 免疫学研究室; 山东省济南市 250062)

[关键词] 内科学; 遗传因素与冠心病发病相关; 聚合酶链反应—限制片段多态性; 纤维蛋白原; 基因多态性; 高血压; 冠心病

[摘要] 为探讨纤维蛋白原 B β 链基因启动子区多态性位点 B β -455G/A 与高血压及其缺血性并发症的关系, 应用聚合酶链反应—限制片段多态性技术对 149 例高血压患者、124 例高血压合并冠心病患者和 148 例年龄、性别相匹配的健康人群进行纤维蛋白原 β -455G/A 基因多态性分析; 比浊法测定血浆纤维蛋白原水平。结果发现, 冠心病组血浆纤维蛋白原水平显著高于高血压组 ($P < 0.05$) 和正常对照组 ($P < 0.01$), 而高血压组与正常对照组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。B β -455G/A 基因多态性分布在各研究组均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。A 等位基因频率在冠心病组 (0.238) 显著高于高血压组 (0.171) 和正常对照组 (0.152; P 均 < 0.05)。各组内 A 等位基因携带者血浆纤维蛋白原水平显著高于 GG 基因型者, 且冠心病组 A 等位基因携带者血浆纤维蛋白原水平更易受年龄等环境因素影响。Logistic 回归分析发现, 存在此突变位点的高血压患者发生冠心病的危险提高了 63.7%。结果提示, 血浆纤维蛋白原水平增高是发生心血管疾病的重要危险因素, 受遗传因素和环境因素共同影响。纤维蛋白原 β -455G/A 基因多态性可能通过改变血浆纤维蛋白原浓度影响冠心病的发生, 说明遗传因素与冠心病发病相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association of Fibrinogen β -455G/A Gene Polymorphism with Hypertension and Coronary Heart Disease

SUN Hui¹, ZHANG Wei¹, LU Fang-Hong², WEN Pei-E³, and TIAN Qi²

(1. Department of Cardiology, Qilu Hospital, Shandong University; 2. Department of Cardiology, 3. Department of Immunity, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

[KEY WORDS] Fibrinogen; Gene Polymorphism; Hypertension; Coronary Heart Disease; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism; Allelic Frequency

[ABSTRACT] **Aim** To explore the association of fibrinogen gene polymorphism with hypertension ischemic complications.

Methods The Fibrinogen β -455G/A gene polymorphism was identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 149 hypertensive cases without complication, 124 hypertension cases with coronary heart disease and 148 matched controls by age and sex. Turbidimetric assays were performed to measure the plasma fibrinogen levels of all cases.

Results The plasma fibrinogen level in coronary heart disease group was significantly higher than that in the controls ($P < 0.01$) and hypertension patients ($P < 0.05$). The A-allele was associated with elevated plasma fibrinogen levels in both patients and controls. In A-allele carriers with coronary heart disease, the older people had significantly higher plasma fibrinogen levels than the younger ($P < 0.05$). The distribution of β -455G/A gene polymorphism was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The A-allelic frequency in the coronary heart disease group was 0.238, significantly higher than that in the control group (0.152) and hypertension group (0.171; $P < 0.01$), but there was no significant difference between the control group and hypertension group ($P > 0.05$). Logistic regression analysis showed that the relative risk to coronary heart disease in the hypertension carrying A-allele (GA+AA genotype) increases 1.637 times.

Conclusions The study demonstrates that fibrinogen is the important risk factor for the cardiovascular diseases. The plasma fibrinogen levels are affected by both genetic and environmental factors. The fibrinogen β -455G/A gene polymorphism may influence the progress of the coronary heart disease by regulating plasma fibrinogen levels. Genetic factor is associated with coronary heart disease.

流行病学资料表明, 纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg)

与缺血性心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVD) 的发生发展密切相关, 它是 CVD 发生的独立危险因素, 同时还增加了包括高血压在内的其他危险因素的危險性^[1]。自从 1987 年国外学者首次报道了纤维蛋白原基因多态性可能影响血浆纤维蛋白原水平以来, 其与 CVD 的关系也越来越受到人们的关注。

[收稿日期] 2003-09-18 [修回日期] 2004-01-30

[作者简介] 孙慧, 博士研究生, 研究方向为心血管病分子生物学研究, E-mail 为 sasa303@163.com。张薇, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病临床研究。路方红, 教授, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病临床研究。

本研究采用聚合酶链反应—限制片长度多态性技术对 149 例高血压患者、124 例高血压合并冠心病患者和 148 例年龄、性别相匹配的健康人群进行纤维蛋白原 β -455G/A 基因多态性分析。

1 对象与方法

1.1 研究对象

高血压患者 149 例,其中男 89 例,女 60 例,年龄 65.3 ± 6.6 岁,高血压病史 10~20 年不等,平均 11.5 年。均符合 1999 年 WHO/ISH 制定的高血压诊断标准^[1],即收缩压 ≥ 140 mm Hg 和(或)舒张压 ≥ 90 mm Hg。继发性高血压、高血压合并脑梗死和/或冠心病者除外。高血压合并冠心病患者(简称冠心病组)124 例,其中男 68 例,女 56 例,年龄 66.8 ± 5.8 岁。均符合 1979 年 WHO 颁布的缺血性心脏病的命名及诊断标准、1980 年我国冠心病诊断标准中的“补充说明”^[2],以及 1999 年 WHO/ISH 制定的高血压诊断标准。正常对照者 148 例,其中男 85 例,女 63 例,年龄 65.3 ± 7.4 岁,经常规检查均无高血压、冠心病及脑卒中等心脑血管病史,休息时心电图正常、体力活动时无心肌缺血症状。全部研究对象均来自山东地区汉族人群。

1.2 临床资料的收集

所有受试者近 1 周末使用抗凝及溶栓药物,取清晨空腹外周静脉血 1 mL 与 0.109 mol/L 枸橼酸钠按 9:1 体积抗凝检测血浆纤维蛋白原浓度;自凝血 2 mL 检测血脂;取外周静脉血 2 mL 与 2% EDTA 0.2 mL 混匀抗凝,置 -20°C 冰箱中储存,成批抽提 DNA。所有观察对象均于采血当日收集病史。

1.3 基因组 DNA 的提取

采用低渗溶血—盐析法抽提全血 DNA,TE 溶解后置 4°C 保存。

1.4 聚合酶链反应

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系 100 μL ,反应条件: 95°C 预变性 5 min; 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min,共 30 个循环; 72°C 延伸 7 min。

1.5 基因型分析

根据 Thomas 等^[3]设计引物,上游引物 5'-AAG AAT TTG GGA ATG CAA TCT CTG CTA CCT-3';下游引物: 5'-CTC CTC ATT GTC GTT GAC ACC TTG GGA C-3'。采用 PCR 技术扩增特异性 DNA 片段。取纯化 PCR 产物 20 μL 用限制性内切酶 Hae III(美国 Promega 公司)酶切, 37°C 水浴 4 h,以 1.5% 琼脂糖凝胶

电泳,溴化乙锭染色后通过 Gel Dos 1000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)判定结果。

1.6 统计学处理

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以基因计数法计算病例组和对照组的基因型和等位基因频率,确认符合 Hardy-Weinberg 平衡后,以 χ^2 检验比较组间基因型频率和等位基因频率分布差异,临床指标比较采用 student *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 临床特点

各组间在性别、年龄、体重指数、吸烟史及血脂之间均无显著性差异。高血压组和冠心病组收缩压和舒张压水平均明显高于正常对照组($P < 0.05$),但两病例组之间无显著性差异。冠心病组纤维蛋白原水平明显高于正常对照组和高血压组($P < 0.001$),而高血压组与正常对照组之间差异无显著性(表 1, Table 1)。

表 1. 各组间一般临床资料比较

Table 1. Comparison of clinical characters in hypertension group, coronary heart disease group and control group ($\bar{x} \pm s$)

分 组	正常对照组 (<i>n</i> = 148)	高血压组 (<i>n</i> = 149)	冠心病组 (<i>n</i> = 124)
性别 (男/女)	85/63	79/70	68/56
年龄 (岁)	65.3 ± 7.4	65.4 ± 8.3	66.8 ± 5.8
体重指数 (kg/m^2)	26.5 ± 2.8	26.9 ± 3.2	26.7 ± 2.9
吸烟 (例)	70	61	58
收缩压 (mm Hg)	126 ± 11	153 ± 16^a	154 ± 18^a
舒张压 (mm Hg)	78 ± 6	88 ± 9^b	89 ± 9^b
总胆固醇 (mmol/L)	5.2 ± 0.9	5.2 ± 1.0	5 ± 1.0
LDLC (mmol/L)	1.22 ± 0.22	1.19 ± 0.27	1.18 ± 0.25
甘油三酯 (mmol/L)	1.7 ± 0.6	1.7 ± 0.7	1.8 ± 0.6
纤维蛋白原 (g/L)	3.0 ± 0.4	3.0 ± 0.5	3.5 ± 0.6^a

a: $P < 0.001$; b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

2.2 基因型分析

在纤维蛋白原 β 基因转录起始点上游 -455 位点存在单个碱基置换,鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)所取代,即 G455A 变异,表现为 455G/G、455- G/A 和 455- A/A 三种基因型。在野生纯合子(基因型 GG)存在限制性内切酶 Hae III 的两个识别位点,PCR 产物在此处被切断,形成 343 bp、383 bp 和 575 bp 三个特异性片段;当 G-455 等位基因被 A-455 等位基因

取代(基因型 AA)时,则失去 Hae Ⅲ 的酶切活性,形成 343 bp 和 958 bp 两个特异性片段;而仅一条染色体突变(基因型 GA)时,则形成 343 bp、383 bp、575 bp 和 958 bp 四个特异性片段(图 1, Figure 1)。

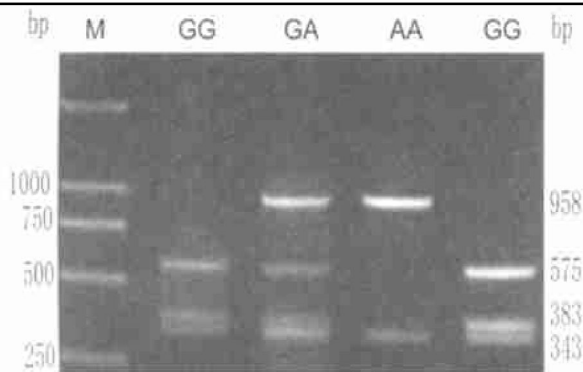


图 1. DNA 产物 Hae Ⅲ 酶切后电泳图谱

Figure 1. Picture of Genotype fragments of fibrinogen gene

表 2. 各组间基因型与等位基因频率比较

Table 2. Comparison of frequency of fibrinogen genotypes and alleles in coronary heart disease group, hypertension group and control group

分 组	n	基因型			等位基因	
		GG	GA	AA	G	A
正常对照组	148	107 (72.3%)	37 (25.0%)	4 (2.7%)	0.848	0.152
高血压组	149	105 (70.5%)	37 (24.8%)	7 (4.7%)	0.829	0.171
冠心病组	124	77 (62.1%)	35 (28.2%)	12 (9.7%)	0.762	0.238 ^a

a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

表 3. 不同基因型间血浆纤维蛋白原水平比较

Table 3. Comparison of plasma fibrinogen levels in three genotypes of coronary heart disease group, hypertension group and control group (g/L)

分 组	GG	GA	AA
正常对照组	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.4 ^a	3.4 ± 0.2 ^b
高血压组	2.9 ± 0.4	3.3 ± 0.3 ^a	3.8 ± 0.6 ^b
冠心病组	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.7 ^a	4.4 ± 0.7 ^b

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与 GG 基因型比较。

3 讨论

越来越多的流行病学资料表明,纤维蛋白原与 CVD 的发生发展密切相关,它是 CVD 发生的独立危险因素,同时还增加了包括高血压在内的其他危险因素的危险性^[4]。高纤维蛋白原已被认为是冠心病发生发展的独立危险因素之一,而且与冠状动脉狭窄程度有关^[5,6]。本研究发现,纤维蛋白原水平在高血压无合并心脑血管并发症人群与正常对照组无显著性差异,而在合并冠心病组则显著升高。Logistic

2.3 基因型分布

纤维蛋白原 β -455G/A 基因多态性在研究人群中的分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡(高血压组 $\chi^2 = 1.175$, $P = 0.556$; 冠心病组 $\chi^2 = 2.734$, $P = 0.255$; 对照组 $\chi^2 = 0.156$, $P = 0.925$),说明本研究组人群具有群体代表性,不存在选择偏倚。冠心病组 A 等位基因频率及 GA 和 AA 基因型频率明显高于高血压组和对照组($P < 0.05$; 表 2, Table 2)。A 等位基因携带者血浆纤维蛋白原水平平均高于同组 GG 基因型者($P < 0.05$; 表 3, Table 3)。在冠心病组中 A 等位基因携带者血浆纤维蛋白原水平随年龄增高有上升趋势($P < 0.05$),而在 GG 基因型中纤维蛋白原水平随年龄变化不明显(表 4, Table 4)。

回归分析发现,纤维蛋白原与冠心病的发病相关,纤维蛋白原水平每升高 0.5 g/L,发生冠心病的风险提高了 3.083 倍,说明纤维蛋白原水平升高在高血压合并心血管并发症的发生发展中起了重要作用。纤维蛋白原在高血压患者靶器官损害中的致病作用可能与纤维蛋白原促进动脉粥样硬化及血栓形成有关,进而认为纤维蛋白原与高血压患者心脑等重要靶器官并发症的发生有关,在保持血压稳定的同时通过降纤治疗可能大幅度降低高血压患者并发症的发生率。

本研究结果发现,冠心病组 A 等位基因频率及 GA、AA 基因型高于高血压组($P < 0.05$),更明显高于对照组($P < 0.01$)。Logistic 回归分析发现,存在此突变位点的高血压患者发生冠心病的危险提高了 63.2%。进一步说明这种依赖纤维蛋白原启动子区基因型的纤维蛋白原浓度的突然增加,在冠状动脉粥样硬化过程中起了一定作用,而基因改变在其中起着主要的决定作用。国外一些相关研究曾提出纤维蛋白原基因 β -455G/A 多态性改变会引起血浆纤

表 4. 各组年龄分组后不同基因型间血浆纤维蛋白原水平比较

Table 4. Comparison of plasma fibrinogen levels at different ages in three genotypes of coronary heart disease group, hypertension group and control group (g/L)

分 组	正常对照组		高血压组		冠心病组	
	GG	GA+ AA	GG	GA+ AA	GG	GA+ AA
< 55 岁	2.79 ± 0.33	3.08 ± 0.17	2.98 ± 0.37	3.06 ± 0.69	3.27 ± 0.39	3.66 ± 0.62
55~ 65 岁	2.82 ± 0.40	3.23 ± 0.42	2.94 ± 0.38	3.37 ± 0.47	3.27 ± 0.36	3.74 ± 0.69
> 65 岁	2.90 ± 0.37	3.30 ± 0.36	2.97 ± 0.41	3.52 ± 0.52	3.38 ± 0.49	4.38 ± 0.94

纤维蛋白原水平升高, 最后导致冠心病发生的危险性增加^[7]。de Maat 等^[8] 在一项冠状动脉粥样硬化患者 (coronary artery disease, CAD) 的研究中发现, 在 -455AA 基因型患者较 -455GA、-455GG 基因型患者 CAD 病程进展快, G/A - 455 多态性与 CAD 的进程有关。推测可能 A - 455 等位基因引起了更强烈的纤维蛋白原急性期反应, 导致更高的血浆纤维蛋白原水平, 形成 CAD 进展的病理学基础。Weng 等^[9] 通过对 135 名加拿大籍 CAD 患者发现红细胞聚集性与 A 等位基因有关, 提示纤维蛋白原 β-455G/A 多态性与早期 CAD 有关。但 Folsom 等^[10] 也指出纤维蛋白原 β-455G/A 多态性与 CAD 之间无明显相关, 虽然不排除可能存在少量影响, 但 -455G/A 并没有显示出对 CAD 的重要遗传决定作用。这可能与选择对象的偏差有关, 也可能因为突变等位基因携带者发病年龄较轻, 病情较重, 死亡率较高而被排除在调查对象之外有关。

本研究按年龄进行分组, 发现冠心病组 A 等位基因携带者 (GA+ AA) 血浆纤维蛋白原水平随年龄增加呈升高趋势, 而且血浆纤维蛋白原水平波动范围也比较大, 其中年龄 > 65 岁者血浆纤维蛋白原水平明显高于 55~ 65 岁者, 更高于 < 55 岁者。说明在 A 等位基因携带者中, 年龄亦是影响纤维蛋白原水平的重要因素。

由上可见, 纤维蛋白原 β-455G/A 基因多态性可能通过影响血浆纤维蛋白原水平成为冠心病发生发展的易感因素, 并可能与年龄等环境因素协同引起纤维蛋白原合成与分泌的变化, 增加冠心病的患病风险。纤维蛋白原 β-455G/A 基因多态性的检测

对于早期发现 CVD 的易感个体并探索其干预治疗具有重要意义。对 CVD 易感人群的早期筛查及早期干预提供了分子遗传学依据。

[参考文献]

- [1] 中国高血压防治指南起草委员会. 中国高血压防治指南(1999年10月). 高血压杂志, 2000, 8(1): 99
- [2] 国际心脏病学会和协会及WHO临床命名标准联合专题组报告. 缺血性心脏病的命名及诊断标准. 中华心血管病杂志, 1981, 9(1): 75
- [3] Thomas AE, Green FR, Kelleher CH, Wilkes HC, Brennan PJ, Meade TW, et al. Variation in the promoter region of the β-fibrinogen gene is associated with plasmas fibrinogen level on smokers and nonsmokers. *Thromb and Haemost*, 1991, 65: 487-190
- [4] Koenig W. Recent progress in the clinical agents of fibrinogen. *Eur Heart J*, 1995, 16: 54-59
- [5] 汪芳, 赵迎, 胡锦涛, 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
- [6] 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
- [7] Humphries SE, Ye S, Talmud P, Bara L, Wilhelmsen L, Tiret L. European Atherosclerosis Research Study: genotype at the fibrinogen locus (G-455A 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: 96-104
- [8] de Maat MP, Kastelein JJ, Jukema JW, Zwindeman AH, Jansen H, Groenermeier B, et al. -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18: 265-271
- [9] Weng X, Cloutier G, Genest J Jr. Contribution of the -455G/A polymorphism at the beta-fibrinogen gene to erythrocyte aggregation in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*, 1999, 82: 1406-411
- [10] Folsom AR, Aleksic N, Ahn C, Boerwinkle E, Wu KK. Beta-fibrinogen gene -455G/A polymorphism and coronary heart disease incidence: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Epidemiology*, 2001, 11: 166-170

(此文编辑 文玉珊)