

## 纤维蛋白原及其相关基因 $\beta 148$ 和 $\beta 854$ 多态性与冠心病发病的相关性

马会利, 葛均波, 王颖<sup>1</sup>, 黄薇<sup>1</sup>, 孙爱军, 牛玉宏, 方业明<sup>2</sup>, 马永莉<sup>3</sup>, 冯军<sup>4</sup>, 赵洁<sup>5</sup>, 王克强

(复旦大学附属中山医院心内科, 上海市 200032; 1. 国家人类基因组南方研究中心, 上海市 201203;

2. 中国中医研究院广安门医院心电图室, 北京市 100053; 3. 承德市卫生监督所,

4. 承德市中心医院检验科, 5. 承德医学院附属医院心内科, 河北省承德市 067000)

[关键词] 内科学; 纤维蛋白原及其  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  基因多态性和冠心病; TaqMan MGB 荧光探针和聚合酶链反应; 纤维蛋白原; 基因多态性; 冠心病

[摘要] 目的 探讨纤维蛋白原及其相关基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性与冠心病的关系。方法 1 254 例冠状动脉造影检查者, 按造影结果随机分组, 冠状动脉管腔狭窄  $\geq 50\%$  者为冠心病组, 共 836 例; 冠状动脉管腔狭窄  $< 50\%$  者确定为对照组, 共 418 例。取静脉血检查血脂(标准酶法)、血浆纤维蛋白原(凝血酶法)水平和肝、肾功能等。纤维蛋白原基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性位点检测采用 TaqMan MGB 探针荧光标记聚合酶链反应方法, 扩增目的基因片段, 然后利用荧光发光特点, 经 7900HT 基因分析仪进行多态位点分析。结果 在 1 254 例研究对象中, 纤维蛋白原基因  $\beta 148$  多态性位点检测成功 1 219 例(97.2%),  $\beta 854$  多态性位点检测成功 1 225 例(97.7%)。与对照组比较, 冠心病组年龄偏大, 以男性多见, 吸烟、高血压、糖尿病例次增多, 甘油三酯、脂蛋白(a)和血浆纤维蛋白原均明显增高, 高密度脂蛋白胆固醇明显降低( $P < 0.01$ ), 但总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇及纤维蛋白原  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  基因型及等位基因频率分布均无显著性差异( $P > 0.05$ )。Spearman's 相关分析发现, 冠心病与纤维蛋白原  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  基因型之间无相关性( $P > 0.05$ ), 而与年龄、性别、吸烟、高血压、糖尿病、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、脂蛋白(a)和血浆纤维蛋白原之间存在显著相关性( $P < 0.01$ )。血浆纤维蛋白原与其基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性之间无相关性( $r = 0.31$ ,  $P > 0.05$ )。结论 除高血压、糖尿病等冠心病传统危险因素外, 血浆纤维蛋白原与冠心病发病有明显关系, 但不受其相关基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性的影响。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Association of Fibrinogen and Its Gene $\beta 148$ and $\beta 854$ Polymorphisms with Coronary Heart Disease

MA Hui-Li, GE Jun-Bo, WANG Ying<sup>1</sup>, HUANG Wei<sup>1</sup>, SUN Ai-Jun, NIU Yu-Hong, FANG Ye-Ming<sup>2</sup>, MA Yong-Li<sup>3</sup>, FENG Jun<sup>4</sup>, ZHAO Jie<sup>5</sup>, and WANG Ke-Qiang

(Department of Cardiology, Affiliated Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China; 1. Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China; 2. Department of Electrocardiogram, Guang Anmen Hospital, The China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China; 3. Epidemic Prevention Brigade of Chengde City, 4. Clinical Laboratory, Centre Hospital of Chengde City, 5. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[KEY WORDS] Fibrinogen; Gene Polymorphisms; Coronary Heart Disease; Total Cholesterol; Triglyceride; High Density Lipoprotein Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To understand the association of fibrinogen and its gene  $\beta 148$ ,  $\beta 854$  polymorphism with coronary heart disease. **Methods** 1 254 subjects were divided into coronary heart disease group (coronary artery narrow  $\geq 50\%$ ,  $n = 836$ ) and control group (coronary artery narrow  $< 50\%$ ,  $n = 418$ ) according to coronary angiographic results. TaqMan MGB probes (FAMTM and VICR dye-labeled) polymerase chain reaction (PCR) was performed to screen the fibrinogen gene  $\beta 148$ ,  $\beta 854$  polymorphism in the appropriate Sequence Detection System Instruments (7900HT). Plasma fibrinogen levels and blood lipids were simultaneously measured in the patients with coronary heart disease and controls. Plasma fibrinogen concentrations were assayed by thrombin method. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) levels were assayed by standard enzyme method. **Results** Age, sex, smoking, hypertension, diabete mellitus, blood lipids and fibrinogen levels in coronary heart disease group were very different from that of control group ( $P < 0.01$ ). No significant difference was found in the frequencies of fibrinogen  $\beta 148$ ,  $\beta 854$  alleles gene and genotype between the controls and the patients with coronary heart disease ( $P > 0.05$ ). There was no significant association between fibrinogen  $\beta 148$ ,  $\beta 854$  genotypes and fibrinogen and

[收稿日期] 2004-08-22

[修回日期] 2005-01-17

[作者简介] 马会利, 博士后, 主任医师, 教授, 主要研究方向为冠心病发病机制及其防治, E-mail 为 mhliz@sina.com。通讯作者葛均波, 主任医师, 教授, 博士后导师。王颖, 硕士研究生。

the patients with coronary heart disease ( $P > 0.05$ ), but age, sex, smoking, hypertension, diabete mellitus, TG, and HDLC, lipoprotein (a) and fibrinogen levels were closely associated with coronary heart disease ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Fibrinogen levels were closely associated with coronary heart disease, but not with fibrinogen  $\beta 148$ ,  $\beta 854$  genotypes.

冠心病是一种多因素综合作用导致的一种常见病,随着对冠心病病因学研究的不断深入,目前已发现有百余种危险因素与冠心病发病有关,而且表现有家族聚集现象,提示冠心病不仅受不良环境因素的影响,也明显受遗传因素的影响,尤其是过早发病者家族聚集现象更显突出。以往对这方面研究尚有报道,但都样本数偏小,所得结论说服力不强。为了探讨纤维蛋白原及其相关基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性与冠心病之间的关系,我们对此进行了较大样本研究分析。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

1 254 例冠状动脉造影检查者,按造影结果随机进行分组,冠状动脉管腔狭窄  $\geq 50\%$  者定为冠心病组,入选 836 例,男 673 例,女 163 例,年龄 25~86 岁,平均  $64.2 \pm 10.2$ ; 冠状动脉管腔狭窄  $< 50\%$  者确定为对照组,入选 418 例,男 257 例,女 161 例,年龄 16~82 岁,平均  $59.7 \pm 11.1$ 。入院后详细记录病史,体格检查,于次日晨空腹取静脉血检查血脂(标准酶法)、血浆纤维蛋白原(凝血酶法)水平和肝、肾功能等。高血压、糖尿病入选标准为既往有明确高血压、糖尿病,本次入院确诊者。每日吸烟 1 支以上,超过 1 年定为吸烟者。

### 1.2 方法

从外周静脉血分离白细胞,采用酚/氯仿抽提法提取人基因组 DNA。纤维蛋白原基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性位点检测采用 TaqMan MGB 探针荧光标记一次性聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法,  $\beta 854$  上游引物 CACACAAGTGAACAGACAAGAGAGA, 下游引物 CTCACAGACTAAATGAGGCCCATTT。  $\beta 148$  上游引物 AACTAGACCAACAAAGAATAATAGTTGTATGACAA, 下游引物 CACITGTTGGCTGAACCATTTTATCA。标有 FAM 荧光探针序列  $\beta 854$  TTGTGGGAAATGAA,  $\beta 148$  CCAGCAAACTTATTT, 标有 VIC 荧光探针序列  $\beta 854$  CTTGTGGAATGAA,  $\beta 148$  CCAGCAAAGCTTATTT。PCR 循环参数:  $95^\circ\text{C}$  预变性 10 min, 继之进入 40 轮循环,  $92^\circ\text{C}$  变性 15 s, 退火和延伸均为  $60^\circ\text{C}$ 、1 min; 所扩增的目的基因片段标记呈不同的荧光,然后利用荧光发光特点,通过 7900HT 基因分析仪检测不同的荧光进行多态位点分析。在 1 254 例研究对象中,纤维蛋白原基因

$\beta 148$  多态性位点检测成功 1 219 例 (97.2%),  $\beta 854$  多态性位点检测成功 1 225 例 (97.7%)。

### 1.3 统计学处理

所有数据均输入计算机,采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验。计数资料或百分比的比较采用  $\chi^2$  检验。相关分析采用 Spearman's 相关分析方法。 $P < 0.05$  认为统计学有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 两组危险因素比较

与对照组比较,冠心病组年龄偏大,以男性居多,吸烟、高血压、糖尿病例次增多,甘油三酯 (triglyceride, TG)、脂蛋白(a)和血浆纤维蛋白原水平均明显增高,高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 水平无明显差异 ( $P > 0.05$ ; 表 1, Table 1)。

表 1. 对照组与冠心病危险因素比较

Table 1. Comparison of risk factors between coronary heart disease group and control group

指 标	对照组 ( $n = 418$ )	冠心病组 ( $n = 836$ )
男/女 (例)	257/161	673/163 <sup>c</sup>
年龄 (岁)	$59.7 \pm 11.1$	$64.2 \pm 10.2^c$
吸烟 (例)	71	279 <sup>b</sup>
高血压 (例)	100	313 <sup>b</sup>
糖尿病 (例)	28	128 <sup>b</sup>
总胆固醇 (mmol/L)	$4.57 \pm 0.90$	$5.11 \pm 12.55$
甘油三酯 (mmol/L)	$1.68 \pm 0.82$	$1.88 \pm 1.39^a$
LDLC (mmol/L)	$2.72 \pm 2.33$	$2.81 \pm 3.54$
HDLC (mmol/L)	$1.21 \pm 0.31$	$1.11 \pm 0.30^a$
脂蛋白 (a)	$159 \pm 119$	$205 \pm 90^b$
纤维蛋白原 (mg/dL)	$311 \pm 68$	$343 \pm 203^c$

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , c:  $P < 0.001$ , 与对照组相比。

### 2.2 纤维蛋白原基因 $\beta 148$ 、 $\beta 854$ 基因型及等位基因频率分布

冠心病组与对照组纤维蛋白原基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  基因型及等位基因频率分布均无明显差异 ( $P >$

0.05; 表 2, Table 2)。

2.3 Spearman's 相关性分析

相关分析显示冠心病与纤维蛋白原  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  基因型之间无相关性 ( $P > 0.05$ ), 与年龄、性别、吸

烟、高血压、糖尿病、TG、HDLc、脂蛋白(a)和血浆纤维蛋白原之间存在显著相关性 ( $P < 0.05$ ; 表 3, Table 3)。血浆纤维蛋白原与其基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性之间无相关性 ( $r = 0.31, P > 0.05$ )。

表 2. 冠心病组与对照组纤维蛋白原  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  基因型及等位基因频率分布

Table 2. Comparison of fibrinogen  $\beta 148$ ,  $\beta 854$  genotypes and allele frequencies between control group and coronary heart disease group

	对照组					冠心病组				
	基因型			等位基因频率		基因型			等位基因频率	
	G/G	G/A	A/A	G	A	G/G	G/A	A/A	G	A
$\beta 148$ (n = 1 219)	249	134	24	77.63%	22.37%	515	266	31	79.80%	20.20%
$\beta 854$ (n = 1 225)	370	40	0	95.12%	4.88%	748	65	2	95.95%	4.05%

表 3. Spearman's 相关分析

Table 3. Spearman's analysis

指 标	相关系数 (r 值)	P 值
男/女 (例)	-0.20	< 0.01
年龄 (岁)	0.19	< 0.01
吸烟 (例)	0.17	< 0.01
高血压 (例)	0.14	< 0.01
糖尿病 (例)	0.11	< 0.01
总胆固醇 (mmol/L)	0.02	> 0.05
甘油三酯 (mmol/L)	0.07	< 0.05
LDLC (mmol/L)	0.01	> 0.05
HDLc (mmol/L)	-0.14	< 0.01
纤维蛋白原 (mg/dL)	0.16	< 0.01
脂蛋白(a)	0.11	< 0.01
$\beta 148$ 基因型	-0.04	> 0.05
$\beta 854$ 基因型	-0.03	> 0.05

3 讨 论

冠心病发病机制复杂,是多种因素作用于不同环节的结果。归纳起来主要是遗传因素(某些基因位点变化)和环境因素(吸烟、炎症和感染等)对冠心病发病的影响。大量临床和流行病学资料显示,除已公认的冠心病传统危险因素高血压、糖尿病、高血脂及吸烟外,纤维蛋白原与冠心病的发生发展也密切相关<sup>[1-12]</sup>。有报道认为血浆纤维蛋白原增高是冠心病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<sup>[13]</sup>。本研究结果发现,冠心病组血浆纤维蛋白原水平明显高于对照组,说明血浆纤维蛋白原对冠心病发生确实产生明

显影响,与文献[1, 5, 6, 9, 10]报道结果一致。目前认为血浆纤维蛋白原水平增高导致冠心病发病增加的机制<sup>[7, 8]</sup>是: 由于纤维蛋白原水平增高,血液处于一种高凝状态,易于血管内血栓形成。④在冠心病的发展过程中,纤维蛋白原通过其本身的血栓和止血功能,以及血液流变学改变等而发挥作用;纤维蛋白原升高可以直接导致血液粘稠度增加,并直接诱导血液中红细胞聚集,从而明显降低血液的流动性,这种血液流变学改变还能明显影响对血管壁的切流速度,进一步加速动脉粥样硬化损伤及血栓形成;④同时亦提出纤维蛋白原及其降解产物在早期动脉粥样硬化形成过程中能刺激血管平滑肌细胞增殖、迁移的病理机制<sup>[9]</sup>。在心血管疾病发生发展过程中,血浆纤维蛋白原主要参与血管内梗阻性血栓形成,并在动脉血栓形成的最后阶段起增强作用<sup>[11]</sup>。已经证明大部分心肌梗死、心脏缺血性猝死以及不稳定型心绞痛患者冠状动脉内均发现有梗阻性血栓形成,认为血管内血栓形成是造成这些动脉粥样硬化并发症的主要发病机制<sup>[9]</sup>。

相关分析显示纤维蛋白原基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性变化与血浆纤维蛋白原水平和冠心病发病不相关,与文献[1, 4-12]报道结果不尽一致。有关纤维蛋白原基因  $\beta 148$ 、 $\beta 854$  多态性研究目前报道不多,有人认为纤维蛋白原基因  $\beta 148$  多态性变化与冠心病发病无关<sup>[1, 4, 8]</sup>。有人采用单链构象多态性分析法发现  $\beta$  纤维蛋白原基因有十种多态性位点,采用逐步回归分析方法证明  $\beta$  Hae ④ ( $P < 0.0003$ )、 $\beta 854$  ( $P < 0.01$ ) 多态性与血浆纤维蛋白原水平存在独立相关性<sup>[11]</sup>。我们认为基因多态性变化对血浆纤维蛋白原水平和冠心病发病的影响不同主要与种族差异和研究样本大小和条件有关;我们所检测的样本

中,  $\beta 554$  较少的等位基因频率(A/A) 仅占 0.19%, 而且早发冠心病(发病平均年龄  $64.21 \pm 10.23$  岁) 人数偏少, 这些因素均会影响所观察的结果, 我们认为还需扩大样本观察才能得出更有说服力的结论。

尸检所见在动脉粥样硬化斑块内除有 LDLC 沉积外, 也有纤维蛋白原及其纤维蛋白降解产物的沉积, 提示在动脉粥样硬化形成过程中存在脂凝间共同作用机制<sup>[1,2]</sup>。还发现血浆纤维蛋白原及其降解产物能刺激平滑肌细胞增殖、迁移, 提示在动脉粥样硬化斑块最早期形成阶段就有纤维蛋白原参与<sup>[2,4]</sup>。多变量回归分析显示血浆纤维蛋白原水平与动脉粥样硬化存在与否及严重程度均有着独立相关性<sup>[5]</sup>; 表现血浆纤维蛋白原水平越高, 动脉粥样斑块的检出率越高(OR 值为 1.6, 95% CI 为 1.4~1.8), 动脉粥样斑块程度亦越严重(OR 值为 1.4, 95% CI 为 1.2~1.7)。调整了其他心血管危险因素以后, 血浆纤维蛋白原水平与动脉粥样硬化之间仍存在显著相关性。我们研究结果显示血浆纤维蛋白原、TG、HDL-C 和脂蛋白(a) 参与冠心病的发生, 而 TC 和 LDL-C 对冠心病的发生无明显影响, 也与文献报道结果不尽一致, 解释原因可能是患者服用某种降脂药对 TC 和 LDL-C 的影响。

我们相信随着对冠心病发病机理研究的不断深入, 必将能够在冠心病的预防、早期诊断和治疗以及将来能够实施的基因治疗等方面有所突破, 大大降低冠心病的发病率。

**[致谢]** 中山医院实验室王时俊实验员、心内科王箴医师对基因库建立所做贡献。研究生胡海峰医师、实习生王芳和付晗医师在资料收集方面给予的帮助。

#### [参考文献]

- [1] Michela Vischetti, Francesco Zito, Maria Benedetta Donati, Licia Iacoviello. Analysis of gene environment interaction in coronary heart disease: fibrinogen polymorphisms as an example. *Ital Heart J*, 2002, **3**: 18-23
- [2] Jaime Levenson, Philippe Giral, Jean Louis Megnien, Jerome Gariepy, Marie Christine Plainfosse, Alain Simon. Fibrinogen and its relations to subclinical extracoronary and coronary atherosclerosis in hypercholesterolemic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 45-50
- [3] Jousilahti P, Salomaa V, Rasi V, Vahtera E, Palosuo T. Association of markers of systemic inflammation, C reactive protein, serum amyloid A, and fibrinogen, with socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health*. 2003, **57**: 730-733
- [4] Gerald Luc, Jear-Marie Bard, Irene Juhan-Vague, Jean Ferrieres, Alun Evans, Philippe Amouyel, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 1255-261
- [5] Youngman LD, Keavney BD, Palmer A. Plasma fibrinogen and fibrinogen genotypes in 4685 cases of myocardial infarction and in 6002 controls: test of causality by mendelian randomization? *Circulation*, 2000, **102** (Suppl II): 31-32
- [6] George Davey Smith, Shah Ebrahim. Mendelian randomization: can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol*, 2003, **32**: 1-22
- [7] Meade T. The epidemiology of haemostatic and other variables in coronary artery disease. In: Vestraete M, Vermylen J, Lijnen H, Arnout J, eds. *Thrombosis and Hemostasis*. Leuven, Belgium: International Society of Thrombosis and Hemostasis and Leuven University Press, 1987; 37-59
- [8] Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as cardiovascular risk factor: A meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med*. 1993, **118**: 956-963
- [9] Humphries SE. The genetic contribution to the risk of thrombosis and cardiovascular disease. *Trans Cardiovasc Med*, 1994, **4**: 8-17
- [10] Humphries SE, Luong LA, Montgomery HE, Day IN, Mohamed-Ali V, Yudkin JS. Gene-environment interaction in the determination of levels of plasma fibrinogen. *Thromb Haemost*, 1999, **82**: 818-825
- [11] Isabelle Behague, Odette Poirier, Viviane Nicaud, Alun Evans, Dominique Arveiler, Gerald Luc, et al. fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction the ECTIM study. *Circulation*, 1996, **93**: 440-449
- [12] Blake GJ, Schmitz C, Lindpaintner K, Ridker PM. Mutation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene and the risk of future myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Eur Heart J*, 2001, **22** (24): 2262-266
- [13] Keenig W. Recent progress in the clinical agents of fibrinogen. *Eur Heart J*, 1995, **16**: 54-49

(此文编辑 文玉珊)