

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-06-0760-03

纤溶酶原激活物抑制剂活性及其 4G/5G 基因多态性与急性冠状动脉综合征发病的关系

曾高峰¹, 刘格修², 王燕³, 刘康桐¹, 丁翠芬¹, 匡希斌¹

(南华大学附属第二医院 1. 心内科, 3. 麻醉科, 湖南省衡阳市 421001;

2. 暨南大学医学院血液病研究所, 广东省广州市 510636)

[关键词] 内科学; 纤溶酶原激活物抑制剂与急性冠状动脉综合征发病的关系; 聚丙烯酰胺凝胶电泳寡核苷酸杂交分析; 纤溶酶原激活物抑制剂 1; 急性冠状动脉综合征; 基因多态性

[摘要] 目的 了解急性冠状动脉综合征患者血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性变化及其启动子 4G/5G 基因多态性特点, 以探讨血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 及其基因多态性在急性冠状动脉综合征发病过程中的作用。方法 对 106 例急性冠状动脉综合征患者、98 例稳定型冠心病患者和 60 例对照者用聚丙烯酰胺凝胶电泳寡核苷酸杂交分析法测定白细胞启动子 4G/5G 多态性位点的基因型, 用酶联免疫吸附法测定血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性。结果 急性冠状动脉综合征组血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性 (18.0 ± 2.9 kAU/L) 较稳定型冠心病组 (16.8 ± 2.7 kAU/L) 和对照组 (16.2 ± 2.8 kAU/L) 增高 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.005$); 急性冠状动脉综合征组中 4G/4G 纯合子个体 (49.1%) 较稳定型冠心病组 (28.6%) 和对照组 (26.7%) 频率高 ($P < 0.05$); 4G/4G 纯合子个体的血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性最高, 5G/5G 个体最少 ($P < 0.05$)。结论 血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性与启动子 4G/5G 基因型有关; 血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性增高是急性冠状动脉综合征发病的危险因素之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Plasminogen Activator Inhibitor-1 Activity and It's 4G/5G Gene Polymorphism in Acute Coronary Syndrome

ZENG Gao-Feng, LIU Ge-Xiu, WANG Yan, LIU Kang-Tong, DING Cui-Fen, and KUANG Xi-Bin

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Plasminogen Activator Inhibitor-1; Acute Coronary Syndrome; Gene Polymorphism; Polyacrylamide gel Electrophoresis; Stable Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether the plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity and gene polymorphism played a pathogenetic role in acute coronary syndrome (ACS). **Methods** 106 patients suffering from acute coronary syndrome (ACS) and 98 subjects, who were suffering from stable coronary heart disease (SCHD), and 60 normal controls were recruited. The 4G/5G allele polymorphism were genotyped by using polymerase chain reaction technique, while plasma activity assayed by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The plasma PAI-1 activity level in the ACS group (18.0 ± 2.9 kAU/L) was significantly higher than that in the SCHD group (16.8 ± 2.7 kAU/L) and in the control group (16.2 ± 2.8 kAU/L; $P < 0.01$ or $P < 0.005$). The frequency of 4G/4G allele homozygous in the ACS group (49.1%) was significantly higher than that in the SCHD group (28.6%) and in the control group (26.7%; $P < 0.05$). The plasma PAI-1 activity level was statistically higher in 4G allele homozygous than those in 4G/5G heterozygous and 5G homozygous ($P < 0.05$). **Conclusions** There may be a link between the plasma PAI-1 activity and it's 4G/5G genotype. Elevated plasma PAI-1 activity and essentially 4G allele homozygous genotype might be the major risk factors of ACS.

急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 发病包含两个环节: 一是不稳定性斑块破裂; 二是继发性血栓形成^[1-3]。纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 增高是血栓

形成的危险因素之一, 在 PAI-1 基因启动子区 -673 位置上的一个鸟嘌呤插入/缺失多态性 (4G/5G) 与 PAI-1 活性有关^[4]。本研究拟探讨 PAI-1 活性及其启动子 4G/5G 多态性在 ACS 发生发展过程中所起的作用。

[收稿日期] 2004-12-27 [修回日期] 2005-11-10

[基金项目] 湖南省卫生厅资助课题 (9959)

[作者简介] 曾高峰, 博士, 副教授, 研究方向为介入心脏病学。通讯作者刘格修, 副教授, 研究方向为血液病学。王燕, 主治医师, 研究方向为心胸外科麻醉。

1 对象与方法

1.1 对象

研究对象为心血管内科住院且行冠状动脉造影

者。ACS 组 106 例,男 64 例,女 42 例,年龄 42~87 岁,其中急性心肌梗死患者 36 例(包括非 ST 段抬高和 ST 段抬高的心肌梗死),典型不稳定型心绞痛 70 例(近 48 h 内发作静息或自发生心绞痛至少一次,同时伴心电图缺血性改变,有冠状动脉狭窄但无心肌坏死的酶学变化)。稳定型冠心病组 98 例,男 60 例,女 38 例,年龄 45~84 岁,其中典型稳定型心绞痛 68 例,陈旧性心肌梗死 18 例,无心肌缺血症状但有心肌缺血的心电图表现且存在冠状动脉病变者 12 例。60 例对照组为来院检查或因不典型胸痛住院但经冠状动脉造影等检查排除器质性疾病者,男 36 例,女 24 例,年龄 45~85 岁,均排除脑血管疾病、血液系统疾病、肾病和其它血栓性疾病。

1.2 DNA 提取和基因多态性测定

取外周静脉血 1 mL,以 2% EDTA 0.2 mL 抗凝。低渗法分离白细胞并经蛋白酶 K 和 SDS 处理后,用酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA。按 Dowson 等^[4]法设计寡核苷酸引物,序列为 AAGCTTTTACCATG-GTAACCCCTGCT 和 GGAGCTGCAGGAATTCAGCTGCTGA。聚合酶链反应特异性扩增 PAF-1 基因启动子区 890 bp 的 DNA 片段。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。PAF-1 启动子区 4G/5G 多态性位点的基因型测定采用聚丙烯酰胺凝胶电泳印迹法。探针由上海生物工程公司合成,上条探针为 CACGTGGGGAGTCA(阳性基因 4G),下条探针为 ACGTGGGGAGTCA(阳性基因 5G)。用 γ -³²PdATP、T₄ 多核苷酸激酶(购自生物工程公司)进行末端标记,42℃预杂交 30 min,杂交 2 h,46℃洗膜 5 min。然后,通过放射自显影鉴定基因型。

1.3 血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性测定

采外周静脉血 1 mL,加 2% 依地酸二钠 0.1 mL 混匀抗凝。3 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。酶联免疫吸附法测定血浆 PAF-1 活性。

1.4 统计学处理

用 SPSS10.0 软件包进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较用方差分析,两两比较用 q 检验。计数资料用频率表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性比较

急性冠状动脉综合征组血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性较稳定型冠心病组和对照组明显增高($P < 0.01$ 和 $P < 0.005$)。见表 1(Table 1)。

表 1. 各组间纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性比较

Table 1. PAF-1 activities of different groups

分 组	例数	PAF-1 活性 (kAU/L)
对照组	60	16.2 ± 2.8
急性冠状动脉综合征组	106	18.0 ± 2.9 ^{ab}
稳定型冠心病组	98	16.8 ± 2.7

a: $P < 0.01$, 与稳定型冠心病组比较; b: $P < 0.005$, 与对照组比较。

2.2 各组间基因型构成

急性冠状动脉综合征组 4G/4G 基因型频率明显高于稳定型冠心病组和对照组($P < 0.05$)。见表 2(Table 2)。

表 2. 各组间基因型构成比较

Table 2. Comparison of frequency of genotype of PAF-1 gene in different groups

分 组	4G/4G	4G/5G	5G/5G
对照组	16 (26.7%)	26 (43.3%)	18 (30.0%)
急性冠状动脉综合征组	52 (49.1%) ^{ab}	42 (39.6%)	12 (11.3%)
稳定型冠心病组	28 (28.6%)	48 (49.0%)	22 (22.4%)

a: $P < 0.05$, 与稳定型冠心病组比较; b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 不同基因型间纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性比较

三组均是 4G/4G 基因型 PAF-1 活性最高,5G/5G 基因型 PAF-1 活性最低(表 3, Table 3)。

表 3. 不同基因型血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性比较

Table 3. Comparison of PAF-1 activities in different genotype groups

基因型	例数	PAF-1 活性 (kAU/L)
对照组		
4G/4G	16	17.7 ± 2.6 ^{ab}
4G/5G	28	15.9 ± 2.6
5G/5G	16	15.5 ± 2.5
急性冠状动脉综合征组		
4G/4G	48	18.8 ± 3.0 ^{ab}
4G/5G	46	17.6 ± 2.8
5G/5G	12	16.9 ± 2.5
稳定型冠心病组		
4G/4G	28	17.9 ± 2.7 ^{ab}
4G/5G	46	16.5 ± 2.3
5G/5G	24	16.3 ± 2.4

a: $P < 0.05$, 与 4G/5G 基因型比较; b: $P < 0.05$, 与 5G/5G 基因型比较。

3 讨论

急性冠状动脉综合征的主要病理生理有二个方面:一是不稳定斑块的破裂;另一方面是继发于斑块破裂基础上的血栓形成。对于斑块破裂机制的研究国内外颇多文献报道,普遍观点认为与炎症及氧化应激反应关系密切,高敏C反应蛋白是一个较为敏感的标志物^[5]。吸烟等高危因素可能也是通过炎症和氧化应激反应导致急性冠状动脉综合征的发生,因为研究发现,戒烟时间可影响稳定型心绞痛患者的高敏C反应蛋白及丙二醛浓度^[6]。本研究旨在探讨急性冠状动脉综合征发生的第二个环节,即分析纤溶酶原激活物抑制剂活性及其4G/5G基因多态性与急性冠状动脉综合征发病的关系。PAI-1是血浆纤溶系统的主要抑制物,它可与纤溶系统的主要激活物组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)和尿激酶结合,抑制其活性,导致纤溶活性降低,冠状动脉内血栓形成,从而导致急性冠状动脉综合征的发生。人PAI-1基因启动子不仅可能含有对激动剂应答的元件,而且决定细胞特异性表达的PAI-1的调控元件也在这个区中^[7]。自从Dowson等^[4]发现PAI-1基因启动子区-673位置上的一个鸟嘌呤插入/缺失多态性以来,国外有数个学者研究认为这一多态性与PAI-1血浆水平及心肌梗死等的发病率相关^[8,9]。本研究亦发现,急性冠状动脉综合征患者血浆PAI-1活性较稳定型冠心病患者和健康人明显增高,且血浆PAI-1活性与其基因型有关,4G/4G基因型的PAI-1活性最高,而急性冠状动脉综合征患者的4G/4G纯合子基因型比例较高。由此说明,PAI-1基因启动子多态性可能与血浆PAI-1活性相关,从而可能在急性冠状动脉综合征的发病过程中起着十分重要的作用。本研究还发现,与健康人相比,稳定型冠心病患者在4G/4G基因型构成比和血浆PAI-1活性

上均表现为增高趋势,但无统计学意义。这一结论与国内外部分学者的研究结果不一致^[10,11],其原因可能是因为冠心病发病是多个因素尤其是高危因素相互作用的结果,本研究可能在其它高危因素方面以及疾病构成比方面与之存在差异。因此,有必要结合其它高危因素进行进一步分析。

[参考文献]

- [1] Burle AP, Farb A, Malcom CT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who die suddenly. *N Engl J Med*, 1997, **336** (18): 1 276-282
- [2] Burle AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek J, Virmani R. Effect of risk factors on the mechanism thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation*, 1998, **97**: 2 103-105
- [3] Ambrose JA, Jansenbaum MA, Llexopoulos D, Hjendahl-Monsen CE, Leavy J, Weiss M, et al. Angiographic progression of coronary artery disease in the development of myocardial infarction. *J AM Coll Cardiol*, 1988, **12** (1): 56-62
- [4] Dowson S, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepC2 cell. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 10 739-745
- [5] 罗玉梅,姜德谦,文丹,杨俭新,李莉英. 急性冠状动脉综合征患者血清白介素6和高敏C反应蛋白浓度变化及辛伐他汀干预治疗. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **1** (6): 553-556
- [6] 曾高峰,周胜华,祁述善. 戒烟时间对稳定型心绞痛患者高敏C反应蛋白及丙二醛浓度的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **3** (2): 203-205
- [7] 楚英杰. 代谢性心血管疾病综合征. *国外医学·心血管疾病分册*, 1995, **22** (6): 333-336
- [8] Mikkelsen J, Perola M, Wartiovaara U, Peltonen L, Palotie A, Penttilä A, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism, coronary thrombosis, and myocardial infarction in middle-aged Finnish men who died suddenly. *Thromb Haemost*, 2000, **84** (1): 78-82
- [9] Iwai N, Shimoike H, Nakamura Y, Tamaki S, Kinoshita M. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor gene is associated with the time course of progression to acute coronary syndromes. *Atherosclerosis*, 1998, **136** (1): 109-114
- [10] Guan L, Ji X, Wang J, Zhang A, Zhang A, Zhang Y, et al. Association of plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism and coronary heart disease in Chinese patients. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2002, **19** (5): 393-396
- [11] Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G/4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost*, 1999, **82** (3): 1 121-126

(此文编辑 文玉珊)