

## 急性冠状动脉综合征患者组织因子途径抑制物基因 V264M 的多态性

王 君, 朱铁兵, 杨志健, 曹克将, 马文珠

(南京医科大学附属第一医院心脏科, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 内科学; 组织因子途径抑制物基因多态性; 聚合酶链反应; 急性冠状动脉综合征; 组织因子途径抑制物基因 V264M; 基因多态性

[摘要] 目的 探讨在中国人群中组织因子途径抑制物基因第 9 外显子 874G $\rightarrow$ A(V264M)多态性与急性冠状动脉综合征的关系,以及各基因型对血浆游离组织因子途径抑制物水平和冠状动脉病变严重程度的影响。方法 选取经冠状动脉造影检查的 136 例急性冠状动脉综合征患者和 106 例健康对照者,用聚合酶链反应和限制片长多态性方法分析组织因子途径抑制物(V264M)基因型。利用酶联免疫吸附试验检测部分患者血浆游离组织因子途径抑制物水平。结果 急性冠状动脉综合征组血浆游离组织因子途径抑制物水平明显高于正常组( $P < 0.05$ ),两组的 V264M 基因型和等位基因的分布趋势相同,差异无显著性( $P > 0.05$ )。A 等位基因携带者的游离组织因子途径抑制物水平低于 GG 基因型者( $6.9 \pm 5.1$  比  $14.3 \pm 9.5$ ),而冠状动脉病变程度不受 V264M 基因多态性的影响( $\chi^2 = 0.413$ ,  $P > 0.05$ )。结论 中国人群中存在 V264M 多态性,它对血浆游离组织因子途径抑制物水平可能有影响,但未发现 V264M 多态性与急性冠状动脉综合征发病存在相关性。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

### Free Tissue Factor Pathway Inhibitor Gene(V264M) Polymorphisms in Patients with acute Coronary Syndrome

WANG Jun, ZHU Tie-Bing, SUN Ping<sup>1</sup>, YANG Zhi-jian, CAO Ke-Jiang, and MA Wen-Zhu

(Department of cardiology of the first affiliated Nanjing Medical University, Atherosclerotic Research Center of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Acute Coronary Syndrome; Tissue Factor; Inhibitor, Tissue Factor Pathway; Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate TFPI V264M polymorphism in Chinese and its effect on plasma levels of free tissue factor pathway inhibitor (fTFPI) and severity of acute coronary syndrome (ACS). **Methods** The genotypes of V264M were detected by PCR and PCR-RFLP in 136 ACS patients and 106 controls undergoing coronary angiography, then the serum fTFPI level in 57 cases was inspected by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The allele and genotype frequencies were consistent with that predicted by Hardy weinberg equilibrium in the present study population ( $\chi^2 = 0.437$ ,  $P > 0.05$ ). Plasma fTFPI level was significantly lower among carriers of A allele as compared with non carriers (GG genotype) [ $6.9 \pm 5.1$ ] vs [ $14.3 \pm 9.5$ ]. ACS group showed significantly higher plasma level of fTFPI than control group ( $P < 0.05$ ). No meaningful correlation was found between ACS group and control group for V264M polymorphism ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The V264M polymorphism do have an effect on the serum fTFPI level but have no relationship with the occurrence and the severity of ACS.

血栓形成参与急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)发病的各个环节,目前认为,外源性凝血途径是启动环节,占主导地位,而内源性凝血途径主要起维持作用,组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)作为一种内源性的抗凝物质,主要调节组织因子(tissue factor, TF)介导的外源性凝血途径,在血栓的形成中起到了重要作用<sup>[1]</sup>。本研究初步探讨了中国人群 TFPI 第 9 外显

子 874G $\rightarrow$ A(V264M)多态性与 ACS 的关系,以及各基因型对血浆游离 TFPI 水平和冠状动脉病变严重程度的影响。

### 1 对象与方法

#### 1.1 临床资料

选择 2003 年 10 月~2004 年 5 月住院患者 242 例,其中男性 158 例,女性 84 例,平均  $61 \pm 10$  岁,均行冠状动脉造影。根据病史、临床症状和冠状动脉造影结果将患者分为 2 组:正常组 106 例,无症状或有胸痛症状,但心电图、运动平板、酶学及冠状动脉造影均未见明显异常;④急性冠状动脉综合征组

[收稿日期] 2004-08-28

[修回日期] 2005-11-01

[作者简介] 王君,硕士,从事心血管病临床和基础研究,联系电话为 13151565204, E-mail 为 junwanghy@163.com。朱铁兵,副教授,硕士研究生导师,主要从事冠心病临床及基础研究及介入治疗。杨志健,博士研究生导师,主要从事冠心病基础及临床研究。

136 例, 包括不稳定型心绞痛 85 例和急性心肌梗死 51 例, 有典型胸痛症状, 经心电图、酶学改变和冠状动脉造影证实; 所有病例诊断标准符合 ACC/AHA (1998) 诊断治疗指南标准。所有患者记录体质指数、吸烟史、高血压、糖尿病及冠心病家族史, 两组在年龄、体质指数、胆固醇和甘油三酯水平等方面差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。冠状动脉造影用 Judkins 法, 造影结果由 2~3 名经验丰富的专科医生阅读判定。

## 1.2 模板 DNA 的制备

患者入院 24 h 内采集空腹静脉血 3 mL, 置于 0.138 mol/L 枸橼酸钠抗凝管中 (9:1), 2 500 r/min 分离上层血浆后, 吸取 300  $\mu$ L 血液采用 DNA 快速抽提试剂盒提取 DNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存, 上层血浆  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存待检。

## 1.3 引物合成

采用 Primer 软件设计合成 1 对引物, 并利用 Oligo 软件分析修改。上游引物为 5'-CAC ACA TTA ATT TAT TCC TCT TC-3', 下游引物为 5'-GAA GAA AAA TAG AAA ATC ATA GG-3', 上述引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成。

## 1.4 聚合酶链反应

聚合酶链反应扩增在 25  $\mu$ L 反应体系中进行, 包括基因组 DNA 0.15  $\mu$ g、10 mmol/L dNTP 约 0.5  $\mu$ L、EX Taq<sup>TM</sup> 0.125  $\mu$ L、100  $\mu$ mol/L 引物各 10  $\mu$ L 和缓冲液 2.5  $\mu$ L, 其余用灭菌双蒸水补足。扩增循环参数为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min  $\rightarrow 95^{\circ}\text{C}$  30 s  $\rightarrow 55^{\circ}\text{C}$  30 s  $\rightarrow 72^{\circ}\text{C}$  30 s, 进行 35 个循环, 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。以上反应试剂均购自大连宝生物工程有限公司, PCR 反应在 9600 型扩增仪上进行。

## 1.5 电泳分型

聚合酶链反应扩增产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳—溴化乙锭染色法进行检测, DNA 标准物为 DL2000 (大连宝生物工程有限公司合成)。V264M 的扩增产物用限制性内切酶 Mae Ⅲ消化后采用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳—溴化乙锭染色法进行检测。上述电泳结果均采用 UVP 自动凝胶成像及分析系统进行成像和分析。

## 1.6 血浆游离组织因子途径抑制物水平检测

从以上患者中选取 57 例 (正常组 18 例、ACS 组 39 例), 于患者起病 24 h 内且尚未使用抗凝抗栓类制剂的状态下采其清晨空腹外周静脉血, 并按新鲜全血抗凝液 9:1 的比例置于 0.138 mol/L 枸橼酸钠抗凝液中, 2 h 内 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血浆, 利用酶联免疫吸附试剂盒行双抗夹心法检测血浆中游离 TFPI 含量, 根据标准曲线确定样本中游离

TFPI 水平。试剂盒购自美国 ADI 公司, 严格按照说明书操作, 在 Clinbio128 酶标仪上检测读取数值。

## 1.7 统计学处理

病例组与对照组间各等位基因及基因型频率的比较用  $\chi^2$  检验; 血浆游离 TFPI 水平以  $\bar{x} \pm s$  表示, 不同基因型间 TFPI 水平的比较采用两样本 t 检验, 均以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组组织因子途径抑制物水平的比较

急性冠状动脉综合征组血浆游离 TFPI 水平明显高于正常对照组 ( $14.3 \pm 10.1 \mu\text{g/L}$  比  $8.9 \pm 5.6 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 组织因子途径抑制物 V264M 多态性电泳结果

经聚合酶链反应扩增片段大小为 217 bp, 经限制性内切酶 Mae Ⅲ酶切后, 表现为 GG 基因型 (153 bp 和 64 bp) 和 GA 基因型 (217 bp、153 bp 和 64 bp)。

### 2.3 两组组织因子途径抑制物 V264M 基因型和等位基因的分布

两组 V264M 基因型的分布均以 G/G 型最为常见, 未见 A/A 型, 少见 G/A 型。V264M 等位基因的分布以 G 最常见。在 242 例研究对象中, 基因型和等位基因分布频率均符合 Hardy-Winberg 平衡, 两组间基因型和等位基因分布频率差异均无显著性 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

表 1. 两组游离组织因子途径抑制物 V264M 多态性分布的比较

分 组	n	基因型频率 <sup>a</sup>		等位基因频率 <sup>b</sup>	
		G/G	G/A	G	A
ACS 组	136	120 (88.2%)	16 (11.8%)	256 (94.1%)	16 (5.9%)
对照组	106	92 (86.8%)	14 (13.2%)	198 (93.4%)	14 (6.6%)

a:  $\chi^2 = 0.444$ ,  $P = 0.505$ ; b:  $\chi^2 = 0.429$ ,  $P = 0.512$ , 均符合 Hardy-Winberg 平衡 ( $df = 1$ )。

### 2.4 V264M 基因型分布对组织因子途径抑制物水平和冠状动脉严重程度的影响

GA 基因型携带者血浆游离 TFPI 水平明显低于 GG 基因型携带者 ( $P < 0.05$ , 表 2); 而冠状动脉病变严重程度不受 V264M 基因多态性的影响 ( $\chi^2 = 1.198$ ,  $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

急性局部血栓形成伴随动脉粥样斑块破裂是急性冠状动脉综合征的发病基础<sup>[2]</sup>, 斑块破裂导致斑

表 2. V264M 基因多态性与组织因子途径抑制物和冠状动脉病变严重程度的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

指 标	GG 基因型组	GA 基因型组
TFPI( $\mu\text{g/L}$ )	14.3 $\pm$ 9.5	6.9 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>
冠状动脉病变严重程度		
正常冠状动脉	92	14
1 支病变	99	11
2 支病变	5	3
3 支病变	16	2

a:  $P < 0.05$ , 与 GG 基因型组比较。

块中单核细胞和巨噬细胞释放 TF, 启动外源性凝血途径形成局部血栓, 而 TFPI 能通过与 Xa 结合并抑制 TF- $\alpha$  活性, 从而抑制了血栓形成<sup>[3]</sup>。体内的 TFPI 主要分为 t-TFPI 和游离 TFPI 两种存在形式, t-TFPI 主要结合于内皮细胞, 在内皮细胞受损或受到某种因素的刺激下动员入血, 大多与脂蛋白结合, 成为游离 TFPI。游离 TFPI 含有 TFPI 发挥其抗凝活性必需的羧基, 因而最具有生物活性。

组织因子途径抑制因子基因位于 2q31-2q32, 基因全长 70 kb, 包括 9 个外显子和 8 个内含子。目前发现 TFPI 基因的多态性主要集中在外显子 ⑤ 874G $\rightarrow$ A(V264M)、内含子 - 33T $\rightarrow$ C 及启动子 T-287C 几个区域。国外研究报导 V264M 多态性在种族间存在差异<sup>[4]</sup>, 我们运用聚合酶链反应和限制片段多态性技术检测了 242 例研究对象的 V264M 基因多态性, 发现中国汉族人中存在 TFPI 的 V264M 多态性, 与 Moatti 等<sup>[5]</sup> 研究结果相似, 均未发现 AA 基因型, 但中国人群中 TFPI 基因 V264M 多态性 GA 基因型分布频率在 ACS 组及正常组均高于欧洲人群<sup>[6]</sup> (12.5 比 9.2, 12.3 比 4.9), 其 A 等位基因的频率为 6.2%, 说明在中国人群中 TFPI 基因外显子 ⑤ 874G $\rightarrow$ A 突变较广泛, 具有一定的研究价值。

我们研究发现 ACS 组和正常组 TFPI 基因 V264M 位点的 GA 基因型分布频率(12.5 比 12.3) 与 A 等位基因分布频率(6.2 比 6.1) 差异无显著性, GG 与 GA 基因型患者冠状动脉病变严重程度差异无显著性( $P > 0.05$ ), 研究未发现 V264M 基因多态性与冠心病的发生和冠状动脉病变的严重程度有相关性, 这与 Moatti 等<sup>[5]</sup> 的研究结果一致, TFPI 对 ACS 发

生及发展的作用可能依赖于其它部位的突变。

组织因子途径抑制物外显子 ⑤ 编码 C 末端和 3' 非翻译区, 其第 874 位碱基由 G 突变为 A 导致蛋白中第 264 位氨基酸由缬氨酸突变为丝氨酸, 缬氨酸是 TFPI 与与肝素竞争结合内皮细胞的主要功能区。我们抽取 57 例患者(18 例正常人群, 39 例 ACS 患者) 测定其血浆游离 TFPI 浓度, 发现 GA 突变型患者血浆游离 TFPI 水平明显低于 GG 野生型患者, 提示 A 等位基因与游离 TFPI 水平降低相关, 我们推测可能由于氨基酸的改变导致 TFPI 与内皮细胞结合更为紧密, 游离 TFPI 血浆浓度减少。最近研究证明游离 TFPI 具有高度抗凝特性, 其血浆水平可作为 ACS 患者发生心血管不良事件的预测指标<sup>[6]</sup>。由于 V264M 多态性与游离 TFPI 水平有相关性, 故我们可以通过测定患者 TFPI 基因型来预测其发生不良事件的可能性。

已有研究证实, TFPI 在 ACS 的发生发展中起到了重要作用, 是评价内皮细胞功能的重要指标, 对 PTCA 后支架内再狭窄也有一定的预测价值<sup>[7]</sup>, 受到国内外学者的广泛重视, 但对其生理作用与遗传背景多态性的相关问题有待于进一步研究。由于样本量较小, 本研究未能证明 V264M 基因型突变与 ACS 发病间存在相关性, 有待于大样本量的证实。

#### [参考文献]

- [1] Novotny WF. Tissue factor pathway inhibitor[J]. *Semin Thromb Hemost*, 1994, 20: 101-108
- [2] 纪求尚, 张运, 杨晓静, 张梅, 王荣, 李贵双. 炎性因子在急性冠状动脉综合征预后中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(7): 635-638
- [3] 吴红军, 曾秋棠. 组织因子与冠状动脉疾病[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(5): 481-483
- [4] Ravindra SA. Allele frequencies of tissue factor pathway inhibitor polymorphisms in african, hispanic and caucasian populations[J]. *Thromb Haemost*, 2002, 88: 875-877
- [5] Moatti D, Seknadji P, Galand C. Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene in patients with acute coronary syndromes and in healthy subjects: impact of the V264M substitution on plasma levels of TFPI[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(4): 862-869
- [6] Morange PE, Remucci JF. Plasma levels of free and total TFPI, relationship with cardiovascular risk factors and endothelial cell markers[J]. *Thromb Haemost*, 2001, 85(6): 999-1003
- [7] Oltrona L, Speidel CM, Recchia D, Wickline SA. Inhibition of tissue factor mediated coagulation markedly attenuates stenosis after balloon induced arterial injury in minipigs[J]. *Circulation*, 1997, 96: 646-652

(此文编辑 朱雯霞)