

·临床研究·

[文章编号] 1007-3949(2006)14-05-0422-04

急性心肌梗死患者血小板反应素 1 单核苷酸多态性

戴 健¹, 杨志健¹, 马继政², 杨 笛¹, 张寄南¹

(1. 南京医科大学附属第一医院心血管病研究所, 2. 南京医科大学药理学教研室, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 急性心肌梗死; 血小板反应素 1; 基因突变; 单核苷酸多态性; 冠心病

[摘要] 目的 探讨血小板反应素 1 基因第 13 外显子单核苷酸多态性致血小板反应素 1 蛋白第 700 位氨基酸丝氨酸转换为天冬氨酸与中国汉人急性心肌梗死的相关性。方法 应用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性技术筛查了汉族 172 例急性心肌梗死患者和 270 例对照者血小板反应素 1 基因第 13 外显子钙结合活性片段 8831A[→]G, 对筛查到含有突变的片段进行序列测定, 并与正常序列进行对照分析, 探讨两者之间的关系。结果 血小板反应素 1 基因 8831A[→]G 不是中国汉人急性心肌梗死发生的独立危险因素(GA 比 AA: 相对危险度为 3.19, 95% 可信区间为 0.578~17.61, $P=0.160$)。结论 血小板反应素 1 基因 8831A[→]G 在汉人中发生频率低, 与汉人急性心肌梗死发生无相关性, 补充了血小板反应素 1 基因单核苷酸多态性的数据库信息。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

A Preliminary Study of Single Nucleotide Polymorphisms of Thrombospondin-1 Gene in Acute Myocardial Infarction

DAI Jian, YANG Zhi-Jian, MA Ji-Zheng, YANG Di, and ZHANG Ji-Nan

(Institute of Cardiovascular Disease, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Acute Myocardial Infarction; Thrombospondin 1; Gene Mutation; Single Nucleotide Polymorphisms; Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To inquire into the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNP) of thrombospondin-1 gene (TSP-1) and acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Fragment of Exon thirteen in TSP-1 gene from 172 cases of AMI and 270 subjects without coronary heart disease were analysed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism, and sequence analysis for confirmation. **Results** Of the 442 subjects participating in the study, only 6 of the heterozygotes and none of the homozygotes were detected for the 700S allele. No association of the N700S polymorphism with an altered risk of AMI was found in our study (GA vs AA: OR= 3.19, 95% CI 0.578~17.61, $P=0.160$). **Conclusion** Our study suggested that the TSP-1 N700S polymorphism was rare and unrelated to AMI in the Chinese Han population. This study accumulated additional data on SNP in TSP-1 gene.

血小板反应素 1 (thrombospondin-1, TSP-1) 是一种主要由激活的血小板 α 颗粒合成和分泌的基质糖蛋白, 也可以由内皮细胞、单核细胞、纤维原细胞和平滑肌细胞等分泌^[1], 它与多种基质蛋白结合调节细胞功能, 调控血小板的黏附和聚集、血栓的形成、粥样斑块的形成、血管新生、平滑肌细胞增殖、细胞—细胞及细胞—基质间相互作用^[1,2]。Topol 等^[3,4] GeneQuest 研究表明, TSP-1 基因第 13 外显子编码钙结合域的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 即 A8831G, 使其编码的第 700 位氨基酸丝氨酸转换为天冬氨酸 (N700S), 在冠状动脉粥样

硬化斑块不稳定中起关键作用, 可以用来预测急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 发生, 被 AHA 评为 2001 年十大研究进展。有学者进一步研究表明 TSP-1 蛋白 N700S 置换导致其钙结合域对钙离子亲和力降低, 增加了 TSP-1 致血小板的聚集和释放功能, 并使斑块趋向不稳定为其引起 AMI 的可能机制^[5,6]。但是, 最近关于荷兰、日本和中国北方人群的 TSP-1 基因 SNP 研究均没能重复 GeneQuest 研究结果^[7-9]。本文以 AMI 患者为研究对象, 旨在研究中国华东人群 TSP-1 基因 SNP 与 AMI 的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

急性心肌梗死组: AMI 患者 172 例, 男 144 例, 女 28 例, 平均年龄 63.6 ± 11.3 岁, 选自 2003 年 11 月至 2005 年 9 月本院冠状动脉中心患者。病例均

[收稿日期] 2005-11-10 [修回日期] 2006-05-06

[基金项目] 江苏省 135 重点实验室 (SK200205), 江苏省高新技术研究 (BG2003033) 诊断心脏疾病的生物芯片研究与应用

[作者简介] 戴健, 博士研究生, 主要从事冠心病的基础和临床研究, E-mail 为 daijian1969@sina.com。杨志健, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的介入治疗。通讯作者张寄南, 留美博士后, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 Jinanzh506@yahoo.com。

符合 2002 年 AHA/ACC 关于 AMI 诊断指南的诊断标准^[10], 排除合并有先天性心脏病、心肌病、心脏瓣膜病、肾脏和肝脏疾病患者。对照组: 270 例, 男 175 例, 女 95 例, 平均年龄 62.9 ± 11.8 岁, 选自本院心内科患者, 经相关检查排除冠状动脉疾病 (coronary artery disease, CAD), 部分经冠状动脉造影证实冠状动脉主支不超过 50% 狭窄。所有入选对象均为中国华东地区汉族人, 且无血缘关系, 详细调查吸烟史, 同时检测血压、血脂和空腹血糖等指标。

1.2 主要仪器和试剂

AU2700 全自动生化分析仪 (OLYMPUS); PTC-150 MiniCyclerTM 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪 (PERKIN ELMER, MJ research); UVI 自动凝胶成像分析系统 (Bio-Rad, Quantity one)。Taq DNA 聚合酶、dNTP 均购自大连宝生物公司, BseNI 内切酶为 Fermentas MBI 公司产品 (酶切位点 5'-ACTGGN-3', N 代表 A、G、C 或 T), PCR 产物测序由大连宝生物公司完成。

1.3 聚合酶链反应—限制性片段长度筛查

1.3.1 DNA 模板的制备 所有研究对象均禁食 12~14 h 后, 于次日清晨肘静脉采血, 柠檬酸钠抗凝, 分离血浆和白细胞, 血浆 -20°C 冻存, 白细胞层提取基因组 DNA, 提取采用酚—氯仿法。

1.3.2 引物设计和合成 根据 NCBI Sequence Viewer 公布的 TSP-1 正常序列 (GeneID: 7057), 设计引物 P1 和 P2, P1 为 5'-AAG AAC GCC AAG TGC AAC TAG-3'; P2 为 5'-AGA GCT AGC CCT GTT CAT GTT -3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3.3 聚合酶链反应 反应体积 50 μ L, 包括 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, Taq 酶 2.5 u, 20 pmol/L 上下游引物各 0.5 μ L, 人基因组 DNA 100 ng。反应条件为 94°C 预变性 5 min \rightarrow 94°C 变性 60 s \rightarrow 58°C 退火 60 s \rightarrow 72°C 延伸 40 s, 32 个循环, 最后 72°C 延伸 8 min。反应结束后, 取 PCR 产物 10 μ L 经 1% 琼脂糖电泳凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像分析系统观察扩增结果, 结合 DNA 分子量标准判断是否为目的片断, 扩增产物应约为 360 bp。

1.3.4 扩增产物的限制性酶切、电泳及测序 酶切反应体系 20 μ L, 其中 PCR 产物 10 μ L, BseNI 内切酶 5 u, Buffer B 2 μ L, 65°C 反应 16 h。反应终止后, 酶切产物经 2% 琼脂糖电泳凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统观察酶切结果; 电泳提示变异型则进一步测序鉴定。

1.4 血脂、血糖等测定

均在本院检验科生化室 OLYMPUS 全自动生化

分析仪上进行检测。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 用 Hardy-Weinberg 平衡确认其群体代表性, 两组频数比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性心肌梗死组和对照组临床资料比较

两组年龄、血压水平等比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。AMI 组男性构成比及高血压、吸烟、糖尿病发生率明显高于对照组, 两组间甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 差异无显著性, 但 AMI 组患者高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 明显低于对照组 ($P < 0.001$, 表 1)。

表 1. 两组患者临床资料的比较

临床资料	对照组 (n=270)	AMI 组 (n=172)	P
男性 (例)	175 (64.8%)	144 (83.7%)	< 0.001
年龄 (岁)	62.9 \pm 11.8	63.6 \pm 11.3	> 0.05
吸烟 (例)	104 (38.5%)	90 (52.3%)	< 0.01
糖尿病 (例)	8 (3.0%)	13 (7.6%)	< 0.05
高血压 (例)	96 (35.6%)	91 (52.9%)	< 0.05
TG (mmol/L)	1.66 \pm 1.11	1.82 \pm 0.73	> 0.05
HDLC (mmol/L)	1.14 \pm 0.33	0.88 \pm 0.34	< 0.001
LDLC (mmol/L)	2.74 \pm 0.74	2.64 \pm 0.72	> 0.05
血糖 (mmol/L)	4.94 \pm 1.92	5.41 \pm 1.96	< 0.01
收缩压 (mmHg)	134 \pm 16	133 \pm 18	> 0.05
舒张压 (mmHg)	79 \pm 9	79 \pm 9	> 0.05

2.2 血小板反应素 1 基因第 13 外显子不同基因型电泳图谱

AA 野生型不被 BseNI 内切酶酶切, 电泳结果为 360 bp 的单一一条带, AG 杂合型被酶切成 360、250、110 bp 三条带, GG 突变型酶切后应为 250、110 bp 两条带 (图 1)。被酶切的 PCR 产物进一步测序证实, 野生型 TSP-1 第 8831 位点示单一碱基 A 峰, 杂合型第 8831 位点示碱基 A、G 双峰 (图 2)。

2.3 对照组和急性心肌梗死组血小板反应素 1 基因多态性分布特点

在所有被检测的 442 例对象中, 两组均以 AA 型为主, 仅检测出 AG 杂合型 6 例, 未检测到 1 例 GG

变异型,在两组中 AG 杂合型所占比例差异无显著性,AG 杂合型与 AMI 的发生无相关性(GA 比 AA: OR= 3.19, 95% 可信区间为 0.578~ 17.61, $P=0.160$) (测序结果见图 2)。同时,两组 G 碱基所占比例差异无显著性(0.4% 比 1.2%, $P>0.05$) (表 2)。

表 2. 不同研究对象血小板反应素 1 基因型和基因频率比较

组别	基因型(例)			基因碱基频率(例)	
	AA	AG	GG	A	G
对照组	268(99.3%)	2(0.7%)	0	538(99.6%)	2(0.4%)
AMI 组	168(97.7%)	4(2.3%)	0	340(98.8%)	4(1.2%)

注:OR= 3.19, 95% 可信区间为 0.578~ 17.61。

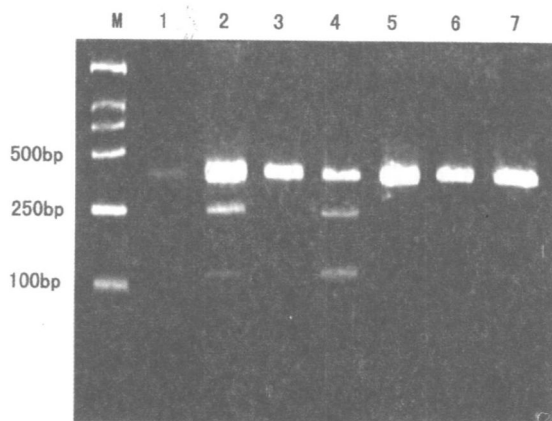


图 1. 血小板反应素 1 不同基因型聚合酶链反应产物酶切电泳图谱 M 为 DNA 相对分子质量 Marker, 1、3、5、6、7 为 AA 野生型, 2、4 为 AG 杂合型。

3 讨论

冠状动脉疾病(CAD)及其严重的并发症在我国是引起死亡和致残的主要病因,尤其是 AMI 病死率更高。虽然已经明确高血压、糖尿病、高胆固醇血症、早发心血管病家族史、肥胖等多种危险因素可以预测 CAD 的发生^[10,11],但并不是所有 CAD 患者都发生 AMI,提示一定有某些因素促使稳定的粥样硬化斑块发生破裂、溃疡、血栓形成等。目前已认为,多基因性状和复杂的环境因素交互作用是 AMI 的主要致病基础。

近年,研究推测一些基因变异可以用来预测 CAD 和 AMI,但所得结果很少可以被重复^[12-14]。Topol 等^[3]进行的 GeneQuest 研究,入选了 352 例 CAD 患者(其中 AMI 190 例)和 418 例对照者,结果发现 TSP-1 基因的 8831A \rightarrow G 使其编码的丝氨酸被天冬氨酸替代(N700S),则早发 AMI 的危险性是正常人的 9 倍,当校正其它心血管危险因素后,早发 AMI 的危险性则是正常人的 11 倍。这个结果在对

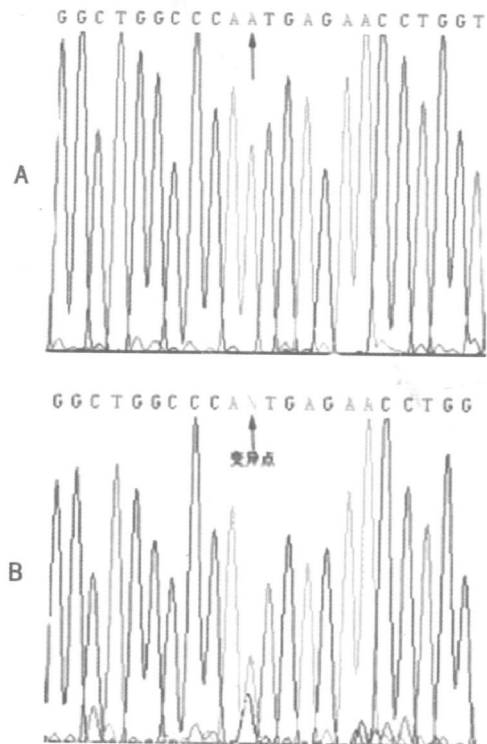


图 2. 血小板反应素 1 不同基因型聚合酶链反应产物测序图谱 A 为野生型,箭头指示点为碱基 A 单峰; B 为杂合型,箭头指示点为碱基 A、G 双峰。

荷兰、日本、中国汉族人等相关研究中均没被重复^[7-9]。

我们发现 AMI 组和对照组之间的 TG、LDLC 等血脂水平比较差异无显著性,可能和 AMI 患者已积极进行调脂治疗有关;但 AMI 组患者的 HDLC 水平明显低于对照组,推测可能和使用调脂药剂量偏小或调脂药难以升高 HDLC 有关。

本文结果发现 TSP-1 基因 SNP(8831A \rightarrow G)与中国华东地区汉人 AMI 发生无相关性,与荷兰、日本、中国北部人群调查报道的结果一致^[7-9]。本文结果发现 700S 在中国人群所占频率明显低于西方人群^[3],揭示 TSP-1 基因 8831G 不是中国人群常见的 SNP 位点,这与 Zhou 等^[9]研究一致。

我们的结果同 GeneQuest 不一致,可能与以下因素有关:首先,由于种族差异导致遗传差异,虽然一些关于 CAD/AMI 的基因连锁分析在不同研究得到很好的重复^[10,11],但在不同人群中的作用和意义仍有争议,越来越多的研究表明有必要建立一个关于 CAD 或 AMI 不同人种的基因多态性论坛^[4,6]:由于 TSP-1 基因 SNP 在中国汉人分布频率极低,也使得很难重复 GeneQuest 的结果;其次,TSP-1 基因变异对 AMI 的作用可能与环境因素和其他基因的交互

作用有关。总之,虽然越来越多的研究揭示 TSP-1 在调控血小板的黏附和聚集、血栓的形成、斑块的形成、血管新生、平滑肌细胞增殖等起重要作用,但 TSP-1 基因多态性使 CAD 患者斑块不稳定的机制尚不清楚。

本研究设计和方法亦有一些局限性。首先,没有检测到 TSP-1 基因的多态性与 AMI 相关,可能和样本量有限有关。其次,对照组没有进行冠状动脉造影检查者,以无胸痛和心电图正常等作为排除 CAD 的标准,致使其中可能有无症状性 CAD 患者;造影者则以冠状动脉造影主支没发现超过 50% 狭窄为入选标准,造影主支小于 50% 狭窄者将来则可能会进展为 CAD。本研究入选者的平均年龄也较 GeneQuest 稍大,没有同时检测 AMI 患者的 TSP-1 血浆水平。

总之,目前的多个研究揭示 TSP-1 基因 8831A → G 在不同人群和人种分布频率相差很大,本文首次报道中国华东地区汉人 TSP-1 基因 SNP 与 AMI 发生无相关性。以后尚需从多个不同的大规模人群进行研究,以揭示 TSP-1 基因 SNP 与 AMI 的内在联系。

[参考文献]

- [1] Lawler J. The functions of thrombospondin 1 and 2 [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, **12** (5): 634-640
- [2] McKusick - Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University, and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. Online Mendelian in Man, OMIM [EB/OL]. 2002-08-01. <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>, 2000.
- [3] Topol EJ, McCarthy JJ, Gabriel S, David J, Moliterno, William J, et al. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin gene may be associated with familial premature myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2001, **104** (22): 2 641-644
- [4] McCarthy JJ, Parker A, Salem R, Moliterno DJ, Wang Q, Plow EF, et al. Large-scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes [J]. *J Med Genet*, 2004, **41** (5): 334-341
- [5] Natalya V, Narizhneva J, Byers-Ward MJ, Quinn J, Zidar F, Topol EJ, et al. Molecular and functional differences induced in thrombospondin 1 by the single nucleotide polymorphism associated with the risk of premature, familial myocardial infarction [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (20): 21 651-657
- [6] Blue-leaf A, Hannah M, Misenheimer S, Annis F, Mosher. A polymorphism in thrombospondin 1 associated with familial premature coronary artery disease alter Ca²⁺ binding [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (11): 8 929-934
- [7] Boekholdt SM, Mieke T, Ron JP, Marc E, Jolanda B, Edith F, et al. Thrombospondin 2 polymorphism is associated with a reduced risk of premature myocardial infarction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (12): e24-27
- [8] Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes [J]. *N Engl J Med*, 2002, **347** (24): 1 916-923
- [9] Zhou X, Huang J, Chen J, Zhao J, Ge D, Yang W, et al. Genetic association analysis of myocardial infarction with thrombospondin 1 N700S variant in a Chinese population [J]. *Thromb Res*, 2004, **113** (3-4): 181-186
- [10] ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina and NonrST-Segment Elevation Myocardial Infarction. For a copy of the summary article [J]. *Circulation*, 2002, **106** (14): 1 893-900
- [11] National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report [J]. *Circulation*, 2002, **106** (25): 3 143-421
- [12] Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, Holmer S, Martin LJ, Comuzzie AG, et al. A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors [J]. *Nature Genetics*, 2002, **30** (2): 210-214
- [13] Harrap S, Zammit K, Wong Z, Williams F, Bahlo M, Tonkin A, et al. Genome-wide linkage analysis of the acute coronary syndrome suggests a locus on chromosome -2 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 874-878
- [14] Francke S, Manraj M, Lacquemant C, Lecoer C, Leprêtre F, Passa P, et al. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27 [J]. *Human Molecular Genetics*, 2001, **10** (24): 2 751-765

(此文编辑 许雪梅)