

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0985-04

· 临床研究 ·

## 湖南汉族人纤维蛋白原 $\beta$ 148C/T 基因多态性与 脑梗死和血浆纤维蛋白原水平的相关性

陈英<sup>1,2</sup>, 许宏伟<sup>1</sup>, 王依宁<sup>1</sup>, 李华翔<sup>1</sup>, 杨期东<sup>1</sup>, 刘运海<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南长沙市 410008 2 湖南省祁阳县中医院神经内科, 湖南省祁阳县 426100)

[关键词] 纤维蛋白原; 基因多态性; 脑梗死

**[摘要]** 目的 观察湖南汉族人群纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性与血浆纤维蛋白原水平和脑梗死的相关性。方法 用聚合酶链反应限制片段多态性分析湖南汉族 150 例脑梗死患者及 111 例对照者纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性频率分布, 并用 Clauss 法测定血浆纤维蛋白原水平。结果 脑梗死组 T 等位基因频率明显高于对照组 (0.325 比 0.200,  $P < 0.05$ )。Logistic 回归分析显示, 纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 多态性位点 TT 基因型是脑梗死的独立危险因素 (OR = 2.040, 95% CI 为 1.283 ~ 3.243,  $P = 0.003$ )。脑梗死各基因型组血浆纤维蛋白原水平平均高于对照组, 脑梗死组和对照组 TT 基因型者血浆纤维蛋白原水平明显高于 CC 基因型者和 CT 基因型者 ( $P < 0.05$ )。结论 在湖南汉族人群中, 纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性可能与脑梗死易感性有关, TT 基因型个体脑梗死发病风险可能增高。纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 位点多态性可能与血浆纤维蛋白原水平有关, TT 基因型个体血浆纤维蛋白原水平较高。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Association of Fibrinogen $\beta$ 148C/T Gene Polymorphism with Cerebral Infarction and Plasma Fibrinogen Levels in Hunan Han Population

CHEN Ying XU Hongwei WANG Yining LI Hua-Xiang YANG Qidong and LIU Yunhai

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Fibrinogen; Gene Polymorphism; Cerebral Infarction

**[ABSTRACT]** **Aim** To observe the association of fibrinogen  $\beta$ 148C/T gene polymorphism with plasma fibrinogen levels and cerebral infarction (CI) in Hunan Han population. **Methods** 150 subjects with CI and 111 controls were enrolled in the study. The beta fibrinogen site C148T was genotyped by using restriction fragment length polymorphism method. The level of plasma fibrinogen was measured by the Clauss method. **Results** The frequencies of T allele was 0.325 in CI group and 0.200 in control group, frequency of T allele was significantly higher in CI group than that in control group ( $P = 0.041$ ). Furthermore, the results of Logistic regression analysis showed that the genotype of TT was an independent risk factor for CI (OR = 2.040, 95% CI was 1.283 ~ 3.243,  $P = 0.003$ ). Plasma fibrinogen levels were higher in CI subtypes than those in control subtypes. In both CI group and control group, plasma fibrinogen levels in TT genotype were higher than those in CC and CT genotype. **Conclusion** Fibrinogen  $\beta$ 148C/T polymorphism may be associated with susceptibility to CI in Hunan Han population. TT genotype increased risk to CI. Fibrinogen  $\beta$ 148C/T gene polymorphism may have association with plasma fibrinogen level. Carriers of TT genotype at fibrinogen  $\beta$ 148C/T gene polymorphism have higher levels of plasma fibrinogen.

研究认为, 血浆纤维蛋白原水平增高是脑梗死的独立危险因素之一<sup>[1]</sup>。纤维蛋白原受许多因素, 如年龄、性别、感染、吸烟、糖尿病和遗传的影响。研究认为血浆纤维蛋白原浓度增高与纤维蛋白原基因改变有关<sup>[2]</sup>。但有关纤维蛋白原基因多态性与血浆纤维蛋白原浓度和脑梗死的相关性研究结果不一

致。本研究采用聚合酶链反应限制片段多态性 (PCR-RFLP) 分析脑梗死患者和对照者纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性, 同时检测血浆纤维蛋白原水平, 以探讨湖南汉族人群纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性与脑梗死和血浆纤维蛋白原水平的关系。

### 1 对象和方法

#### 1.1 研究对象

脑梗死患者 150 例, 男 99 例, 女 51 例, 年龄 40 ~ 80 岁, 平均  $58.98 \pm 10.94$  岁, 符合第四届全国脑血管病学术会议诊断标准, 不包括心源性、动脉炎、

[收稿日期] 2010-10-31 [修回日期] 2010-12-03

[作者简介] 陈英, 硕士研究生, 主治医师, E-mail 为 thj20@163.com。通讯作者许宏伟, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病研究, E-mail 为 xhw\_xiangya@sina.com。王依宁, 硕士, 医师, 现在宜昌市第一人民医院工作。

外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤等引起的脑梗死,排除梗死后出血。对照组 111例,男 67例,女 44例,年龄 40~80岁,平均 56.33±11.82岁,为同期在湖南省人民医院行健康体检者(经该单位相关科室书面同意),经 CT或 MRI证实无脑卒中史、无冠心病。两组均为多代定居湖南的土居汉族人、无血缘关系、排除患有严重肝肾功疾病及自身免疫性疾病、妊娠者、甲状腺疾病,近期内无感染病史。近期内均未使用影响凝血和纤溶等方面的药物,所有研究对象均已签知情同意书。

1.2 血液标本采集

受试者禁食 12 h后,于次日清晨 7时采周围静脉血 5 mL, EDTA 抗凝,用于 DNA 制备。

1.3 临床指标采集

询问受试者年龄,测量身高、体重,并计算体质指数 (BMI),采用全自动生化分析仪测定血糖、血脂。采用 Clauss法检测血浆纤维蛋白原水平。

1.4 人基因组 DNA 的制备

采用常规酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.5 聚合酶链反应

引物序列<sup>[3]</sup>上游为 5'-CCT AAC TTC CCA TCA TTT TGTC-3',下游为 5'-ATG GTT TTA AGT TTG TGG AAG C-3',扩增片段长度为 300 bp 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增体系及反应条件: 2×TaqPCR MasteMix 12.5 μL, 上、下引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25 μL; 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 55℃复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 35个循环, 72℃充分延伸 7 min, 最后置于 4℃终止反应保存。取 ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 10×buffer 2 μL, PCR 扩增产物 10 μL, 限制性内切酶 H ind Ⅲ(10 Mu/L) 1 μL 上述混合物混匀后,放入恒温水浴箱 37℃孵育 3 h。用 2%~3% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 mg/L 溴化乙锭),取 5 μL 酶切产物加样,电泳缓冲液 0.5×TBE 溶液,电压设计 110 V,时间 50 min。电泳结束后,将凝胶放入紫外分析装置中,经凝胶图像分析系统照像分析。

1.6 统计学方法

直接计数法对等位基因和基因型频率进行计算,研究人群基因型实际频数与理论频数的卡方检验检验 Hardy-Weinberg 平衡。计数资料用卡方检验,计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  描述,两组间均数的比较采用 t 检验,多组间比较采用 S-N-K 法。应用非条件 Logistic 回归分析分析基因型与脑梗死的关联关系,  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  多态性与血浆纤维蛋白原水平及脑梗

死的相关性采用 Partial 相关性分析。

2 结果

2.1 纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因分型

PCR 扩增后产物片段长度为 300 bp(图 1)。用限制性内切酶 H ind Ⅲ酶切后,可见三种基因型: 300 bp 一条带为突变纯合子 TT 基因型, 300 bp, 202 bp, 98 bp 三条带为突变杂合子 CT 基因型, 202 bp, 98 bp 两条带为野生纯合子 CC 基因型(图 2)。

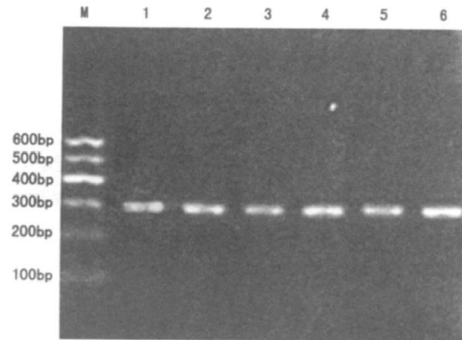


图 1. 纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  PCR 扩增产物电泳图

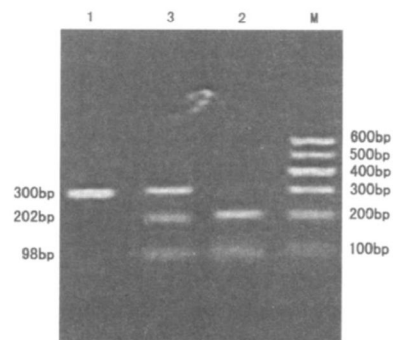


图 2. 纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  酶切产物电泳图 M 为 Marker, 1 为突变纯合子 TT 基因型, 2 为野生纯合子 CC 基因型, 3 为突变杂合子 CT 基因型。

2.2 纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因型频率和等位基因频率比较

脑梗死组与对照组纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因型分布具有显著性差异 ( $P = 0.004$ ), 脑梗死组与对照组 T 等位基因频率分布也具有显著性差异 ( $P = 0.041$ ; 表 1)。

表 1. 纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因型和等位基因频率分布

分 组	n	基因型(例)			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
脑梗死组	150	66(44.0%)	71(47.3%)	13(8.7%)	0.675	0.325
对照组	111	72(64.9%)	33(29.7%)	6(5.4%)	0.800	0.200

### 2.3 非条件 Logistic 回归分析

TT 基因型是脑梗死的独立危险因素 (表 2)。

表 2 脑梗死组非条件 Logistic 回归分析

危险因素	$\beta$	S E	W akl	S ig	OR	95% C I For OR
TT 基因型	0.713	0.237	9.071	0.003 <sup>a</sup>	2.040	1.283~3.243
吸烟史	0.669	0.317	4.461	0.035 <sup>a</sup>	1.952	1.049~3.631
饮酒史	0.178	0.372	0.228	0.633	1.194	0.576~2.476
高血压史	1.412	0.297	22.679	0.000 <sup>a</sup>	4.104	2.295~7.338
糖尿病史	0.713	0.349	4.176	0.041 <sup>a</sup>	2.041	1.030~4.044
高脂血症	0.590	0.296	3.962	0.047 <sup>a</sup>	1.804	1.009~3.223
Constant	-2.152	0.45	22.522	0.000	0.116	

a 为  $P < 0.05$

### 2.4 血浆纤维蛋白原水平

脑梗死组血浆纤维蛋白原水平显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。对照组和脑梗死组纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因型与血浆纤维蛋白原水平显著相关, TT 基因型者血浆纤维蛋白原水平显著高于 CC 基因型者和 CT 基因型者 ( $P < 0.01$ ; 表 3)。偏相关分析校正混杂因素后, 脑梗死组 TT 基因型与血浆纤维蛋白原水平相关 ( $r = 0.194$ ,  $P = 0.021$ ), 对照组 TT 基因型与血浆纤维蛋白原水平相关 ( $r = 0.282$ ,  $P = 0.004$ ), 血浆纤维蛋白原水平与脑梗死发病显著相关 ( $r = 0.3143$ ,  $P = 0.000$ ), TT 基因型与脑梗死显著相关 ( $r = 0.183$ ,  $P = 0.004$ )。

表 3 血浆纤维蛋白原水平 (g/L)

分 组	脑梗死组	对照组
CC 基因型	4.06 ± 1.37 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.54
CT 基因型	4.05 ± 1.02 <sup>a</sup>	3.38 ± 0.63
TT 基因型	5.50 ± 1.32 <sup>a</sup>	3.82 ± 0.72
CC + CT + TT 基因型	4.18 ± 1.28 <sup>a</sup>	3.26 ± 0.6

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

## 3 讨论

研究表明, 血浆中高纤维蛋白原水平可导致高凝状态, 是动脉粥样硬化和血栓栓塞并发症的独立危险因素。本研究中, 脑梗死组患者血浆纤维蛋白原水平明显高于对照组。但国内外对于纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因多态性与脑梗死的发病是否相关报道不尽相同。研究表明, 纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因多态性与颈动脉粥样硬化严重程度有关, 是脑梗死发生的重要危险因素<sup>[4]</sup>, 由启动子区  $\beta 148C/T$  基因多态性决定的纤维蛋白原浓度变化在颈动脉粥样硬

化病程中起一定的致病作用<sup>[5]</sup>。然而, Fox 等<sup>[6]</sup>研究表明纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因多态性与颈动脉狭窄患者颈动脉内膜中膜厚度无相关性。YANG 等<sup>[7]</sup>对 751 例健康人进行 8 年随访也未发现  $\beta 148T$  等位基因携带者脑血管病发生率增高。

本研究中, 我们观察了湖南汉族人群中的 150 例脑梗死患者和 111 例对照者, 经统计学分析, 脑梗死组基因型分布频率与对照组比较有明显差异, T 等位基因频率在脑梗死组和对照组之间有统计学差异, Logistic 回归分析结果显示 TT 基因型是脑梗死的独立危险因素, 提示在湖南汉族人群中纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因多态性与脑梗死发病相关。但纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因多态性与脑梗死发病相关的机制目前尚不明确。近年来有学者认为, 纤维蛋白原  $\beta 148C/T$  基因多态性单独或与环境因素作用使循环中血浆纤维蛋白原水平升高造成或加速了动脉粥样硬化<sup>[8,9]</sup>。Schmidt 等<sup>[4]</sup>调查没有神经系统疾病史且神经系统检查正常的中欧白种人, 结果发现 TT 基因型和纤维蛋白原水平是颈动脉粥样硬化独立的危险因素。Miezecki 等<sup>[10]</sup>研究表明, TT 基因型与严重的颈动脉粥样硬化密切相关, 纯合子 T/T 基因型增加颈动脉粥样硬化的风险, 远远超过了 C/C 型和 C/T 型。目前较普遍认为, 多种危险因素如吸烟、饮酒、老年、高血压、糖尿病、高脂血症、心脏病、等通过多种病理机制和途径促进了脑梗死的发生, 而这些危险因素又通过调节纤维蛋白原基因转录, 与纤维蛋白原基因多态性协同作用使血浆纤维蛋白原水平显著增高, 从而增加了脑梗死的易感性<sup>[11]</sup>。

纤维蛋白原水平受遗传和环境因素的共同影响, 主要与遗传、肥胖、血脂、吸烟和感染等因素相关。许多研究提示纤维蛋白原水平受遗传基因的调控, 纤维蛋白原含量变异约半数以上可能来源于基因因素<sup>[12]</sup>。研究发现, 无论是否存在其他危险因素或环境因素,  $\beta 148T$  等位基因携带者均表达更高的纤维蛋白原水平<sup>[13]</sup>。霍红梅等<sup>[14]</sup>发现, 健康人群中 TT 基因型纤维蛋白原水平较 CC 型及 CT 型均明显增高。本研究中, 脑梗死组血浆纤维蛋白原水平明显高于对照组, 病例组均为发病 3 天内的急性期脑梗死患者, 纤维蛋白原水平是否与急性应激有关? 但无论在脑梗死组中还是在对照组中, TT 基因型血浆纤维蛋白原水平较 CC 基因型及 CT 基因型均明显升高, CC 基因型和 CT 基因型血浆纤维蛋白原水平之间无显著差异。在纠正血糖、血脂、高血压等混杂因素后, TT 基因型和血浆纤维蛋白原水平相关,

即纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 位点 TT 基因型携带者个体的血浆纤维蛋白原水平较高,因而我们推测在脑梗死组患者中,纤维蛋白原水平的上调可能是纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性与急性脑组织损伤和其他环境因素等共同作用的结果,由此可知,纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性不仅与脑梗死的发生发展存在直接关联,还可能通过提高血浆纤维蛋白原水平而促进脑梗死的发生发展。

纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性与血浆纤维蛋白原水平增高有关,但其影响血浆纤维蛋白原水平的机制目前尚不清楚,有人认为可能是纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性变化影响了纤维蛋白原  $\beta$  基因的转录<sup>[15]</sup>。纤维蛋白原是一种急性时相蛋白,当机体处于损伤、炎症等应激状态时其合成会反应性增高。纤维蛋白原合成主要受肝细胞刺激因子和糖皮质激素调控,其中白细胞介素 6( IL-6)是影响纤维蛋白原合成速度的肝细胞刺激因子之一<sup>[16]</sup>。研究证实<sup>[17]</sup>,在纤维蛋白原  $\beta$  链基因 5' 端上游存在 3 个与 IL-6 调控有关的位点, IL-6 与肝细胞膜 IL-6 受体结合,可使酪氨酸蛋白激酶活性增加,进而启动细胞内的一系列放大效应,使核转录因子经快速化学修饰作用后与 IL-6 受体作用元件结合增强,提高了纤维蛋白原  $\beta$  基因的转录效率。在目前发现的 20 多个纤维蛋白原基因多态性位点中,只有纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 位点靠近 IL-6 调控纤维蛋白原  $\beta$  基因表达的受体作用元件,由此推测纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 位点有可能是影响血浆纤维蛋白原水平的重要位点,纤维蛋白原  $\beta$ 148C/T 基因多态性的改变可能进一步提高了 IL-6 与 IL-6 受体的亲和力,从而更加增强了纤维蛋白原  $\beta$  基因的转录<sup>[1]</sup>。

综上所述,脑梗死是一类与多种遗传因素和环境因素有关的疾病。在湖南汉族人群中,纤维蛋白原基因  $\beta$ 148C/T 位点多态性可能与脑梗死发病有关,TT 基因型可能是脑梗死的独立危险因素。纤维蛋白原基因  $\beta$ 148C/T 位点多态性可能通过改变血浆纤维蛋白原水平而促进脑梗死的发生发展,但其机制目前还不清楚,有待进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] Mazoyer E, Drouot L, Soria C, et al Risk factors and outcomes for atherothrombotic disease in French patients: the RVAGE study [J]. *Thromb Res* 1999 **95**: 163-176
- [2] Montgomery HE, Clarkson P, Nwose OM, et al The acute rise in plasma fibrinogen concentration with exercise is influenced by the G-453-A polymorphism of the  $\beta$ -fibrinogen gene [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 **6** (3): 386-396
- [3] 马爱军, 潘旭东, 张成森, 等. 纤维蛋白原  $\beta$  基因 148C/T 多态性与脑梗死的关系 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2006 **23** (2): 202-204
- [4] Schmilt H, Schmilt R, Niederkorn K, et al  $\beta$ -fibrinogen gene polymorphism (C148T) is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian stroke prevention study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 **18** (3): 487-492
- [5] Humphries SE, Luong LA, Montgomery HE, et al Gene-environment interaction in the determination of levels of plasma fibrinogen [J]. *Thromb Haemost* 1999 **82** (2): 818-825
- [6] Fox CS, Larson MG, Corey D, et al Absence of association between polymorphisms in the hemostatic factor pathway genes and carotid intimal medial thickness: the Framingham Heart Study [J]. *Stroke* 2004 **35** (3): e65-e67
- [7] Yang Z, Li F, Liu G, et al The study of beta-fibrinogen gene - 455G/A, - 148C/T, - 448G/A polymorphisms and their association with plasma fibrinogen levels [J]. *Chin J Hematol* 2000 **21** (9): 463-465
- [8] Smith EB Lipids and plasma fibrinogen: early and late composition of the atherosclerotic plaque [J]. *Cardiologia* 1994 **39** (12 Suppl 1): 169-172
- [9] Mauriello A, Sangiorgi G, Palmieri G, et al Hyperfibrinogenemia is associated with specific histocytological composition and complications of atherosclerotic carotid plaques in patients affected by transient ischemic attacks [J]. *Circulation* 2000 **101** (7): 744-750
- [10] Meizeckia A, Bukowska H, Honczarenko K, et al Assessment of metabolic atherosclerosis risk factors in progeny of patients with past ischemic stroke [J]. *Pol Arch Med Wewn* 2005 **113** (2): 119-129
- [11] Iacoviello L, Viscicchi M, Zito F, et al Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk [J]. *Hypertension* 2001 **38**: 199-203
- [12] Vu D, de Moorboose P, Batorova A, et al Hypofibrinogenemia caused by a novel FGG missense mutation (W253C) in the gamma chain globular domain impairing fibrinogen secretion [J]. *J Mol Gene* 2005 **42** (9): e57
- [13] Ma AJ, Pan XD, Zhang CS, et al A linkage between beta-fibrinogen gene-148C/T polymorphism and cerebral infarction [J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006 **23** (2): 202-204
- [14] 霍红梅, 张志琳, 钱建军. 苏州地区健康人群  $\beta$  纤维蛋白原 - 455G/A, - 148C/T 基因多态性频率及与血浆纤维蛋白原水平的关系 [J]. *中国血液流变学杂志*, 2004 **14** (4): 460-462
- [15] Lam KS, Ma OC, Wat NM, et al  $\beta$ -Fibrinogen G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes [J]. *Diabetologia* 1999 **42** (10): 1250-1253
- [16] Justin Sturge, Nessa Carey, Davies AH, et al Fibrin monomer and fibrinopeptide  $\beta$  act additively to increase DNA synthesis in smooth muscle cells cultured from human saphenous vein [J]. *J Vasc Surg* 2001 **33** (4): 847-853
- [17] Thomas AE, Green FR, Kelleher CH, et al Variation in the promoter region of the  $\beta$ -fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen level in smokers and non-smokers [J]. *Thromb Haemost* 1991 **65**: 487-490

(此文编辑 文玉珊)