

[文章编号] 1007-3949 (2011) 19-02-0151-04

· 临床研究 ·

P-选择素的基因型及血清水平与急性心肌梗死的相关性

廖驰林, 黄梦照, 刘华勇, 梁 东, 潘国洲

(广西百色市人民医院心内科, 广西百色市 533000)

[关键词] P-选择素; 急性心肌梗死; 单核苷酸多态性; 基因型频率

[摘要] **目的** 研究 P-选择素基因单核苷酸多态性与急性心肌梗死易感性之间的关系; 同时分析 P-选择素基因型及血清水平与急性心肌梗死的相关性。 **方法** 以 150 例急性心肌梗死患者和 160 例健康对照者为研究对象, 应用聚合酶链反应限制片段长多态性和 DNA 测序法对 P-选择素基因 -2123 G/C 单核苷酸多态性进行基因分型, 同时采用酶联免疫吸附法检测血清 P-选择素水平。 **结果** 急性心肌梗死组血清 P-选择素水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), P-选择素基因 -2123 G/C 多态性在急性心肌梗死组和对照组中的分布差异存在显著性 ($P < 0.05$), 对等位基因频率的相对风险分析发现, -2123 C 等位基因携带者患急性心肌梗死的风险是 G 等位基因携带者的 1.625 倍 ($OR = 1.625$, 95% CI 为 1.177 ~ 2.244, $P = 0.003$); 携带 -2123 C 等位基因的急性心肌梗死患者血清 P-选择素水平显著高于不携带者 ($P < 0.05$)。 **结论** P-选择素基因 -2123 G/C 多态性与急性心肌梗死的发病可能具有相关性, 其中 -2123 C 等位基因可能是急性心肌梗死的遗传易感基因, 携带 -2123 C 等位基因的个体可能通过促进 P-选择素的高度表达进而增加急性心肌梗死的发病风险。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association of the Genotype and Serum Level of P-Selectin with Acute Myocardial Infarction

LIAO Chi-Lin, HUANG Meng-Zhao, LIU Hua-Yong, LIANG Dong, and PAN Guo-Zhou

(Department of Cardiology, the Renmin Hospital of Baise City, Baise, Guangxi 533000, China)

[KEY WORDS] P-Selectin; Acute Myocardial Infarction; Single Nucleotide Polymorphism; Genotype Frequency

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association of P-selectin gene single nucleotide polymorphisms (SNP) and susceptibility to acute myocardial infarction (AMI) in a Chinese population, and to analyze association of serum levels and genotypes of P-selectin with AMI. **Methods** P-selectin gene -2123 G/C single nucleotide polymorphism was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing among 150 AMI patients and 160 age and sex matched controls in a Chinese population, and serum level of P-selectin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Serum levels of P-selectin in AMI patients were significantly higher than those of controls ($P < 0.05$), the distributions of P-selectin gene -2123 G/C polymorphism were significantly different between AMI group and control group ($P < 0.05$). The relative risk suffered from AMI of -2123 C allele was 1.625 times of the G allele carriers ($OR = 1.625$, 95% CI was 1.177 ~ 2.244, $P = 0.003$); the serum levels of P-selectin C allele carriers was significantly higher than no carriers ($P < 0.05$). **Conclusions** P-selectin gene -2123 G/C polymorphism was associated with AMI, -2123 C allele is an important genetic susceptibility gene for AMI. In which the P-selectin C allele carriers may increase risk by enhancing the P-selectin expression in the pathogenesis of AMI.

急性心肌梗死(AMI)是由于斑块破裂导致某节段心肌的冠状动脉血流突然减少引起的缺血性心肌坏死。大量研究显示,感染性炎症与细胞因子和黏附分子间的网络调控在动脉粥样硬化的发生、发展

中起着重要作用,炎症反应的激活可能是导致斑块不稳定的主要因素,其具体发病机制尚未完成阐明,多数学者认为与遗传因素密切相关^[1,2]。P-选择素是黏附分子选择素家族重要的成员之一,存在于血

[收稿日期] 2011-01-21

[作者简介] 廖驰林,硕士研究生,主治医师,研究方向为冠心病,E-mail 为 asdfghjkl1202002@yahoo.com.cn。黄梦照,主治医师,研究方向为冠心病的发病机制。刘华勇,副主任医师,研究方向为冠心病的介入治疗。

小板 α 颗粒,作为血小板激活的检测指标^[3]。它可促进白细胞与血小板和内皮细胞的黏附造成内皮损伤及血管内微血栓形成,加剧动脉粥样硬化^[4]。因此,它在血栓形成、炎症和免疫反应中均起着重要作用,并且与心血管疾病存在着密切关系^[5],但P-选择素在AMI中异常表达的分子遗传学机制尚不清楚。本研究采用PCR-RFLP方法研究P-选择素基因多态性与AMI的关系,试图从分子遗传学角度探讨P-选择素基因多态性对血清P-选择素水平的影响,为揭示AMI的发病机制提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

根据1979年WHO对AMI的诊断标准,临床确诊的AMI患者150例,男118例,女32例,年龄38~89岁,平均 62.9 ± 10.8 岁。健康对照者160例选自体检健康人群的随机个体,男性120例,女性40例,年龄34~81岁,平均 60.7 ± 11.2 岁,血常规、血脂及其他生化指标均在参考范围内,心电图检查正常,均排除肝脏、肾脏、内分泌和心脑血管等疾病。研究对象为广西地区非血缘个体。

1.2 基因组DNA提取

取静脉血3 mL,EDTA-K₂抗凝,采用改良碘化钠法提取白细胞基因组DNA, -86℃保存备用。

1.3 PCR扩增

参照Genbank公布的序列(AF542391)设计引物,由上海英俊有限公司合成,用于特异性扩增P-选择素基因包含-2123 G/C位点的一段DNA引物序列,上游引物为5'-GCC AGT AGT GAT GGC ACA CA-3',下游引物为5'-ATG GGG ATG AGG AAG TGT GG-3'。P-选择素的PCR扩增反应体系均为25 mL,其中含10×PCR缓冲液2.5 mL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 mL,上、下游引物各20 pmol,模板DNA 2.0 mL,TaqDNA聚合酶1.25 U,不足体积用灭菌双蒸水补足至25 mL。置热循环仪(Bio-Rad)中94℃预变性5 min;再按下列程序循环35次,即94℃变性30 s,61℃退火45 s,72℃延伸45 s;末次循环后,72℃延伸5 min。

1.4 扩增产物的限制性酶切

取PCR扩增产物3 μ L,分别用2 U限制性内切酶Pst I(英国Biolabs公司)酶切P-选择素基因-2123 G/C位点,37℃孵育3 h,反应终止后,消化片段在8%聚丙烯酰胺凝胶上电泳,EB染色,染色

后通过凝胶成像系统判断结果。

1.5 血清P-选择素水平检测

采用酶联免疫吸附法测定P-选择素血清水平,试剂盒为晶美生物工程有限公司产品。

1.6 统计学方法

基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算,研究对象与Hardy-Weinberg平衡的符合程度及各组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验,并以比值比(OR)及其95%可信区间(CI)表示相对风险度。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验、方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P-选择素基因型分析及测序情况

P-选择素基因-2123 G/C多态性经PCR扩增产物片段大小为192 bp,酶切后有三种基因型:CC基因型(104 bp和88 bp)、GC基因型(192 bp、104 bp和88 bp)、GG基因型(192 bp),见图1(Figure 1)。P-选择素基因-2123G/C多态性PCR产物直接测序结果与Genbank参照序列相一致(图2, Figure 2)。

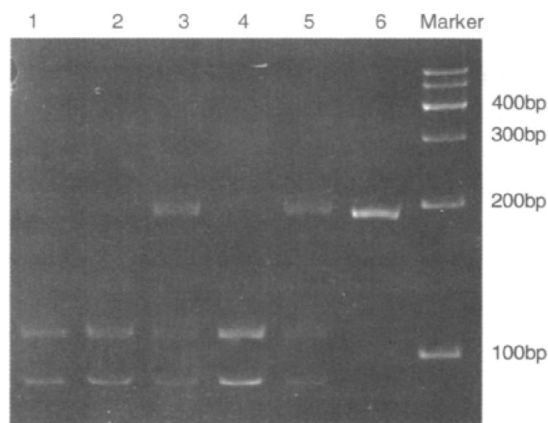


图1. P-选择素基因-2123 G/C多态性电泳结果 1、2和4为CC基因型,3和5为GC基因型,6为GG基因型。

Figure 1. The electrophoresis results of P-selectin gene -2123 G/C polymorphism

2.2 血脂及P-选择素血清水平

两组在性别和年龄上进行了匹配。AMI组总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和P-选择素水平显著高于对照组($P < 0.05$),甘油三酯(TG)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平在两组间比较差异无显著性($P > 0.05$;表1, Table 1)。

表 1. 血脂及 P-选择素血清水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Serum levels of lipids and P-selectin

分组	例数	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	P-选择素 ($\mu\text{g/L}$)
AMI 组	150	5.30 \pm 1.33 ^a	1.41 \pm 0.75	1.29 \pm 0.34	3.40 \pm 0.99 ^a	85.2 \pm 26.5 ^a
对照组	160	4.34 \pm 1.18	1.37 \pm 0.66	1.32 \pm 0.33	2.47 \pm 0.80	35.5 \pm 17.4

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

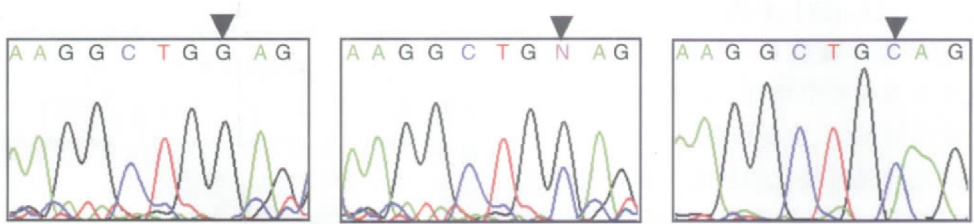


图 2. P-选择素基因 -2123 G/C 测序图 从左至右分别为 GG、GC 和 CC 基因型, 箭头所示为基因突变位点。

Figure 2. Sequencing map of P-selectin gene -2123 G/C polymorphism

2.3 P-选择素基因多态性

P-选择素基因型在两组人群中的分布频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 具有群体代表性。P-选择素基因 -2123 G/C 位点基因型在两组人群中的分布有显著性差异 ($P < 0.05$); 对等位基因频率在两组人群中的分布也存在着显著性差异 ($P < 0.05$); 等位基因频率的相对风险分析发现, -2123 C 等位基因携带者患 AMI 的风险是 G 等位基因携带者的 1.625 倍 (OR = 1.625, 95% CI 为 1.177 ~ 2.244; 表 2, Table 2)。

表 2. P-选择素基因 -2123 G/C 多态性分布频率 (例)

Table 2. Frequency distribution of P-selectin gene -2123 G/C polymorphism

基因多态性	AMI 组 (n = 150)	对照组 (n = 160)	χ^2	P
基因型				
GG	43 (28.7%)	69 (43.1%)	8.500	0.014
GC	74 (49.3%)	70 (43.8%)		
CC	33 (22.0%)	21 (13.1%)		
等位基因				
G	160 (53.3%)	208 (65.0%)	8.736	0.003
C	140 (46.7%)	112 (35.0%)		

2.4 急性心肌梗死组各基因型间血脂及 P-选择素血清水平的比较

AMI 组 P-选择素基因 -2123 G/C 多态性各基因型之间血脂水平比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

P-选择素基因 -2123 G/C 多态性 GC 或 CC 基因型携带者血清 P-选择素水平显著高于 GG 基因型携带者 ($P < 0.05$; 表 3, Table 3)。

表 3. 急性心肌梗死组 P-选择素各基因型间血脂及 P-选择素血清水平的比较

Table 3. Comparison of P-selectin and lipid levels between the genotypes of P-selectin in AMI patients

基因型	例数	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	P-选择素 ($\mu\text{g/L}$)
GG	43	5.33 \pm 1.31	1.38 \pm 0.68	1.30 \pm 0.35	3.49 \pm 0.98	70.6 \pm 29.3
GC	74	5.24 \pm 1.29	1.41 \pm 0.79	1.27 \pm 0.32	3.22 \pm 0.97	90.4 \pm 31.7 ^a
CC	33	5.36 \pm 1.37	1.44 \pm 0.87	1.31 \pm 0.33	3.58 \pm 1.04	92.5 \pm 34.8 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 GG 基因型比较。

3 讨论

动脉粥样硬化是一个炎症性疾病过程, 可溶性 P-选择素是机体炎症反应的标志物之一^[6]。在动脉

粥样硬化斑块处, P-选择素的表达异常增加^[4]; 冠心病患者血清可溶性 P-选择素也有不同程度的升高^[7,8], 表明 P-选择素在冠心病发病机制中可能起重要的作用。AMI 是冠心病最严重的类型, 常并发

心功能衰竭、心律失常、休克等严重并发症,尽早识别这些高危患者,加强监测,对改善 AMI 患者的近期和远期预后意义重大^[9]。目前认为,AMI 风险度的增高来自遗传和环境因素的联合效应。因此,如何识别心肌梗死患病风险度增高的患者,以及如何根据不同的基因类型,从分子心脏病学角度进行早期临床干预具有重要的临床意义。P-选择素位于 1 号染色体长臂上(1q23-q25),P-选择素基因启动子上游 -2123 位点中存在碱基 G→C 的突变,由此可能影响其表达水平及生物学活性。进而可能影响到 P-选择素相关疾病的发生、发展和转归。

炎症反应在动脉粥样硬化的形成中起着关键作用,作为炎症反应的标志物 P-选择素在临床上已被用来探测冠心病的危险性指标^[10]。大量研究表明,冠心病患者可溶性 P-选择素水平显著增高^[11,12]。本研究中,AMI 组血清可溶性 P-选择素水平显著高于对照组,表明 P-选择素可能参与了 AMI 发病过程。出现该情况的可能机制为:P-选择素等黏附分子介导的白细胞黏附促进斑块的不稳定性,削弱斑块处的纤维帽,加速斑块裂隙,最终促进斑块破裂、血栓形成,临床表现为 AMI 的发生。关于 P-选择素基因多态性与 AMI 的关系,文献报道较少。为进一步探讨 P-选择素基因多态性是否与 AMI 的发生及进展相关,我们通过病例-对照的方法对 P-选择素基因型分析,结果发现 AMI 患者 P-选择素基因 -2123 G/C 多态性分布与健康对照者比较差异具有显著性,-2123 C 等位基因携带者患 AMI 的风险是 G 等位基因携带者的 1.625 倍,提示 -2123 C 等位基因可能是 AMI 的遗传易感基因。为了进一步探讨 P-选择素基因多态性与其血清水平的关系,我们检测了 AMI 患者和健康对照者 P-选择素血清水平,结果发现 AMI 患者 P-选择素血清水平显著高于健康对照者,且携带 -2123 C 等位基因的 AMI 患者血清 P-选择素水平显著高于不携带者,故认为在病理条件下,携带 -2123 C 等位基因的个体可能促进 P-选择素的高度表达进而增加 AMI 的发病风险。

综上所述,AMI 是一种多因素参与的常见病,除环境因素影响之外,遗传基因在其中也起着更为重要的作用,通过我们的研究可以发现,P-选择素基因 -2123 G/C 多态性与 AMI 可能具有相关性,其中 -2123 C 等位基因可能是 AMI 的遗传易感基因,携带 -2123 C 等位基因的个体可能促进 P-选择素的高度表达进而增加 AMI 的发病风险。但 P-选择素基因多态性在 AMI 发病中的确切分子机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Williams KJ, Tabas I. Atherosclerosis and inflammation [J]. Science, 2002, 297(5581): 521-522.
- [2] Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2003, 170(2): 191-203.
- [3] 马建忠,陈永华,潘华飞. 血浆 P 选择素水平的性别差异 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(3): 236-237.
- [4] Woollard KJ, Chin-Dusting J. Therapeutic targeting of P-selectin in atherosclerosis [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2007, 6(1): 69-74.
- [5] Lu HH, Sheng ZQ, Wang Y, et al. Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(21): 3 123-126.
- [6] Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease [J]. J Cardiol, 2009, 53(3): 317-333.
- [7] Danzig V, Míková B, Kuchvinka P, et al. Levels of circulating biomarkers at rest and after exercise in coronary artery disease patients [J]. Physiol Res, 2010, 59(3): 385-392.
- [8] Kobusiak-Prokopowicz M, Kuliczowski W, Karolko B, et al. Platelet aggregation and P-selectin levels during exercise treadmill test in patients with ischaemic heart disease [J]. Kardiologia, 2006, 64(10): 1 094-100.
- [9] 许开祖,林丽明,林金秀,等. 红细胞分布宽度与急性心肌梗死患者并发症的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7): 569-573.
- [10] Gidron Y, Kupper N, Kwaijtaal M, et al. Vagus-brain communication in atherosclerosis-related inflammation: a neuroimmunomodulation perspective of CAD [J]. Atherosclerosis, 2007, 195(2): e1-9.
- [11] Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, et al. P-selectin Thr715Pro polymorphism predicts P-selectin levels but not risk of incident coronary heart disease or ischemic stroke in a cohort of 14595 participants: the Atherosclerosis Risk in Communities Study [J]. Atherosclerosis, 2006, 186(1): 74-79.
- [12] Füh R, Dinh W, Nickl W, et al. Soluble P-selectin and matrix metalloproteinase 2 levels are elevated in patients with diastolic dysfunction independent of glucose metabolism disorder or coronary artery disease [J]. Exp Clin Cardiol, 2009, 14(3): e76-79.

(此文编辑 文玉珊)