

# 血栓素 A<sub>2</sub>受体 rs768963基因多态性与血小板聚集功能的关系

傅毅<sup>1</sup>, 孙家兰<sup>2</sup>, 赵静<sup>3</sup>, 徐鸣明<sup>1</sup>, 倪培华<sup>4</sup>, 陈生弟<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科, 上海市 200025; 2. 上海市公利医院神经内科, 上海市 200135; 3. 上海闵行区中心医院神经内科, 上海市 201100; 4. 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验系, 上海市 200025)

[关键词] 血栓素 A<sub>2</sub>受体; 基因多态性; 血小板聚集功能

[摘要] 目的 探讨上海地区汉族人群血栓素 A<sub>2</sub>受体 rs768963基因多态性与血小板聚集功能的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性检测 59例脑梗死患者和 40名对照者的血栓素 A<sub>2</sub>受体 rs768963基因多态性基因型, 并且测定血小板聚集率。结果 脑梗死组甘油三酯浓度和血压水平明显高于对照组, 高密度脂蛋白胆固醇浓度明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。对照组 rs768963基因突变型 (CT型 + CC型) 与野生型 (TT型) 比较, 血小板 1' 聚集率明显升高; 脑梗死组 rs768963基因突变型与野生型比较, 血小板 1' 聚集率和最大聚集率均明显升高。并且全部研究对象的突变型与野生型比较, 血小板 1' 聚集率和最大聚集率也明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论 血栓素 A<sub>2</sub>受体 rs768963基因突变型的小血小板聚集率比野生型明显升高, 容易引起血栓形成相关疾病。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Relationship Between rs768963 Gene Polymorphism of Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor and Platelet Aggregation

FU Yi<sup>1</sup>, SUN Jia-Lan<sup>2</sup>, ZHAO Jing<sup>3</sup>, XU Ming-Ming<sup>1</sup>, NI Pei-Hua<sup>4</sup>, and CHEN Sheng-Di<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; 2. Department of Neurology, Gongli Hospital, Shanghai 200135, China; 3. Department of Neurology, Shanghai Minhang District Central Hospital, Shanghai 201100, China; 4. Department of Inspection, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[KEY WORDS] Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor; Gene Polymorphism; Platelet Aggregation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between the thromboxane A<sub>2</sub> receptor (TXA<sub>2</sub>R) gene polymorphism (rs768963) and platelet aggregation in Han people in Shanghai. **Methods** TXA<sub>2</sub>R gene types tested by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), as well as platelet aggregation of 59 cerebral infarction patients and 40 health controls were detected. **Results** Triglyceride (TG) and blood pressure of cerebral infarction group were significantly higher when high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was lower than that of health control ( $P < 0.05$ ). Mutant of TXA<sub>2</sub>R (CT and CC) improves the platelet aggregation (1') in health control group and platelet aggregation (1' and max) in cerebral infarction group compared with wild type (TT). Studied as a whole group, mutant of TXA<sub>2</sub>R also had more significant impact on the platelet aggregation (1' and max) than wild type. **Conclusion** Compared with wild type, mutant of TXA<sub>2</sub>R (rs768963) improves the platelet aggregation, which may increase the incidence of thrombosis.

血栓素 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 是体内的生物活性物质, 通过激活特异性细胞膜受体血栓素 A<sub>2</sub> 受体 (TXA<sub>2</sub>R) 强烈诱导血小板聚集, 使平滑肌收缩和增生, 在多种疾病的发生中起主要作用<sup>[1]</sup>; 而 TXA<sub>2</sub>R 的基因多

态性可能也与多种疾病有关系<sup>[2-5]</sup>。另外, 血小板在血栓形成的病理过程中扮演着重要的角色, 并且血小板聚集是一个放大过程<sup>[6]</sup>。为了明确 TXA<sub>2</sub>R 的基因突变是否能够影响血小板聚集, 本研究选择

[收稿日期] 2011-02-15

[作者简介] 傅毅, 博士研究生, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病临床及发病机制, Email为 fuyik@sjrh.com.cn。孙家兰, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为脑血管病发病机制及其干预, Email为 sjhned@yahoo.com.cn。倪培华, 博士研究生, 研究方向为分子生物学, Email为 nipeihua@126.com。通讯作者陈生弟, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为帕金森病和阿尔茨海默病的临床与基础, Email为 chen\_sd@medmail.com.cn。

人类 TXA<sub>2</sub>R 基因的一个单核苷酸多态性 rs768963, 应用 PCR-RFLP 技术对 99 例入选者进行 TXA<sub>2</sub>R 的基因突变分析以及血小板聚集率测定。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

选取 2008 年 4 月至 2009 年 12 月上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科住院患者以及门诊健康体检者。脑梗死组 59 例, 其中男 37 例, 女 22 例, 年龄 50~80 岁, 平均  $61.9 \pm 9.0$  岁, 符合 1995 年第四届全国脑血管病学术会议修订的急性脑梗死的诊断标准<sup>[7]</sup>, 无短暂性脑缺血发作, 并经头颅 CT 和 (或) MRI 检查确诊。对照组 40 名, 其中男 17 名, 女 23 名, 年龄 50~80 岁, 平均  $64.3 \pm 9.1$  岁, 无脑梗死、心脏病等病史, 并经头颅 MRI 检查确诊。入选者均为我国上海地区汉族人, 彼此无血缘关系, 均排除心脏病和肾脏病等疾病, 无阳性家族史。所有入选对象至少 1 个月内未使用抗血小板药物及降脂药物。两组年龄差异无统计学意义。

### 1.2 主要仪器与试剂

美国 Bio-rad S1000 PCR 扩增仪、上海天能科技垂直电泳槽、电泳仪和凝胶成像系统以及美国 Chromo-log 全血血小板聚集仪。Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司; Hpy99 I 限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒和引物购自上海生物工程科技服务公司。

### 1.3 实验方法

所有被检者均禁食 12~14 h, 采空腹静脉血 5 mL。其中, 2 mL 用作 DNA 提取; 另 3 mL 静脉血分离血清测定甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和血糖。血小板聚集率测定采用比浊法, 分别测定血小板 1' 聚集率、5' 聚集率和最大聚集率。

### 1.4 基因型测定

严格按 UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒说明书提取基因组 DNA。引物序列: 上游 5'-CCA CCC CGC TGG GTC TGG CCT CAC GTC-3', 下游 5'-GAA GGG ATG TTC TCA CTG AGC ATG GAG-3'。PCR 扩增循环参数: 94℃ 预变性 5 min, 然后按 94℃ 40 s 58℃ 40 s 72℃ 90 s 共 35 个循环, 最后 72℃ 延长至 10 min。PCR 产物经 Hpy99 I 限制性内切酶酶切后, 再经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及 AgNO<sub>3</sub> 染色后观察结果。为验证 PCR-RFLP 结果, 随机选取野生型、杂合子、纯合子的 PCR 产物,

由上海生物工程科技服务公司进行序列分析。

### 1.5 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料的组间比较采用独立样本 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增产物的酶切情况

rs768963 的 PCR 扩增产物经 Hpy99 I 限制性内切酶酶切可产生 3 种基因型: 野生型 (TT 型) 有 175 bp 一个片段, 杂合子突变型 (CT 型) 有 175 bp、147 bp 及 28 bp 三个片段, 纯合子突变型 (CC 型) 有 147 bp、28 bp 两个片段 (图 1)。

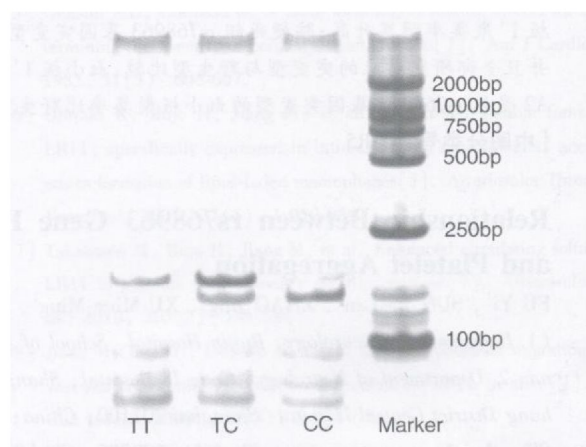


图 1. rs768963 基因型 Marker 为 DL2000 DNA Ladder, rs768963 中的 28 bp 片段太小, 一般无法观察到。

Figure 1. rs768963 genotype

### 2.2 rs768963 多态性序列分析

对 TT、CT 和 CC 型产物作序列分析, 图 2 见 T 等位基因测序峰, 图 3 见 C 等位基因测序峰与 T 等位基因测序峰重叠, 图 4 见 C 等位基因测序峰 (红色箭头所指处为突变位点)。

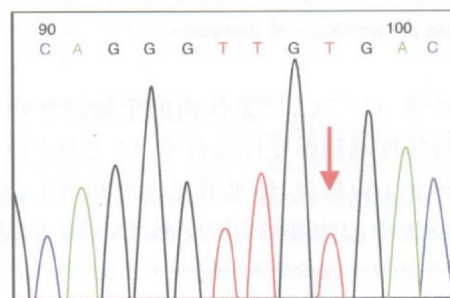


图 2. rs768963 的 TT 型多态性序列

Figure 2. The polymorphic sequence of rs768963 TT genotype

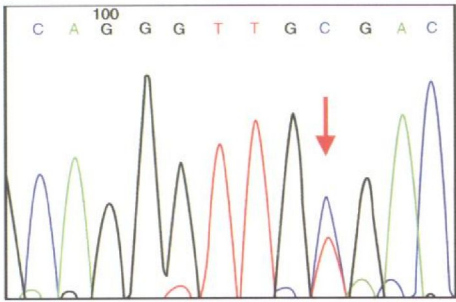


图 3. rs768963 的 CT 型多态性序列  
Figure 3. The polymorphic sequence of rs768963 CT genotype

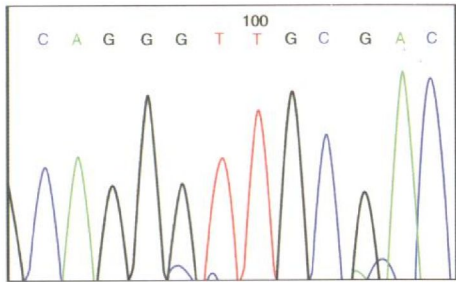


图 4. rs768963 的 CC 型多态性序列  
Figure 4. The polymorphic sequence of rs768963 CC genotype

表 2 两组 rs768963 突变型与野生型血小板聚集率比较

血小板聚集率	对照组		脑梗死组	
	TT (n = 6)	CT + CC (n = 34)	TT (n = 11)	CT + CC (n = 48)
1'	13.67% ±1.21%	28.99% ±13.60% <sup>a</sup>	24.51% ±13.84%	37.26% ±12.10% <sup>a</sup>
5'	18.57% ±7.18%	25.31% ±16.51%	24.28% ±19.57%	33.46% ±12.81%
最大	26.43% ±8.28%	36.27% ±16.53%	33.18% ±17.72%	45.76% ±14.83% <sup>a</sup>

a为  $P < 0.05$  同组 rs768963 突变型与野生型比较。

2.5 全部研究对象 rs768963 基因突变型与野生型血小板聚集率比较

全部研究对象 rs768963 基因突变型与野生型比较,血小板 1'聚集率和最大聚集率均明显升高 ( $P < 0.05$ ),而血小板 5'聚集率呈升高倾向,但没有统计学意义 ( $P > 0.05$ ,表 3)。

表 3. 全部研究对象 rs768963 突变型与野生型血小板聚集率比较

血小板聚集率	TT (n = 17)	CT + CC (n = 82)	P 值
1'	20.68% ±12.19%	33.83% ±13.31%	0.000
5'	22.26% ±16.23%	30.08% ±14.92%	0.056
最大	30.80% ±15.12%	41.83% ±16.17%	0.011

2.3 脑梗死组与对照组一般项目比较

脑梗死组 TG 浓度和血压水平明显高于对照组, HDLC 浓度明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ),但脑梗死组与对照组之间的其余指标无明显统计学差异 ( $P > 0.05$ ,表 1)。

表 1. 脑梗死组与对照组一般项目比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1. Comparison of general project between cerebral infarction group and control group

项 目	对照组 (n = 40)	脑梗死组 (n = 59)	P 值
TG (mmol/L)	1.58 ±0.75	2.08 ±1.16	0.010
TC (mmol/L)	4.61 ±0.93	4.99 ±1.07	0.069
HDLC (mmol/L)	1.29 ±0.31	1.15 ±0.29	0.017
LDLC (mmol/L)	2.67 ±0.75	2.95 ±0.95	0.117
收缩压 (mmHg)	135.43 ±13.01	149.46 ±23.48	0.000
舒张压 (mmHg)	81.65 ±7.59	88.25 ±11.87	0.001
血糖 (mmol/L)	5.63 ±1.05	6.10 ±2.31	0.173

2.4 两组 rs768963 基因突变型与野生型血小板聚集率比较

对照组 rs768963 基因突变型 (CT 型 + CC 型) 与野生型 (TT 型) 比较,血小板 1'聚集率明显升高;脑梗死组突变型与野生型比较,血小板 1'聚集率和最大聚集率均明显升高 (表 2)。

3 讨 论

血小板的主要生理功能是参与止血和血栓形成,而 TXA2 是由环氧化前列腺素代谢生成花生四烯酸、再通过血栓合成酶生成的。研究表明具有强效诱导血小板聚集及血管收缩作用的 TXA2 和具有抑制血小板聚集和血管扩张作用的前列环素 (PGI2) 对于血管的调节有着重要的作用。生理状态下两者处于动态平衡,而病理状况下 TXA2 居主导作用。除了血小板合成的 TXA2 有强烈的血小板聚集、血管收缩和促使平滑肌细胞迁移的作用,单核和血管平滑肌细胞也可产生 TXA2 并且促发上述病理变化<sup>[8]</sup>。

TXA2 的生物活性作用是通过 TXA2R 介导的,



而 TXA<sub>2</sub>R 为 G 蛋白偶联受体。当 TXA<sub>2</sub>R 与配体特异结合后,与受体偶联的 G 蛋白变构,从而触发细胞内一系列信号传递系统的变化。然而血小板黏附到血管壁的初始阶段,在很大程度上不是依靠 G 蛋白介导的信号通路,可随后大量血小板的聚集却需要通过 G 蛋白偶联受体的作用<sup>[9]</sup>。另外,人胎盘 DNA 克隆的人 TXA<sub>2</sub>R 基因定位于染色体 19P13.3<sup>[10]</sup>,为长约 15 kb 的单拷贝序列,含有 E1、E2、E3 三个外显子,被 I1 和 I2 二个内含子分开。

血小板聚集是指血小板与血小板之间互相黏附形成血小板团的功能。有学者认为动脉内膜损伤后,血小板活化因子增多,血小板在血管内膜黏附继而聚集,随后发生纤维蛋白沉积,形成微血栓。动脉血栓可导致心脏病和脑梗死的发作,已成为目前发达国家死亡最常见的原因<sup>[6]</sup>。其中在脑梗死的发病过程中,血小板聚集起了重要作用,对血栓形成意义重大<sup>[11]</sup>。

本研究通过对脑梗死组与对照组血脂、血压、血糖的比较,发现脑梗死组 TG 浓度和血压水平明显高于对照组,HDLC 浓度明显低于对照组,但脑梗死组与对照组之间的其余指标无明显统计学差异,同国外文献类似<sup>[12-13]</sup>,说明血脂、血糖和血压与脑梗死的发生都有关,这符合脑梗死发病的一般规律。同时,对照组 rs768963 基因突变型与野生型比较,血小板 1' 聚集率明显升高;脑梗死组突变型与野生型比较,血小板 1' 聚集率和最大聚集率均明显升高。并且全部研究对象的 rs768963 基因突变型与野生型比较,血小板 1' 聚集率和最大聚集率也明显升高,而血小板 5' 聚集率呈升高倾向,但没有统计学意义。说明 rs768963 基因突变型的血小板聚集率比野生型明显升高,反映血小板聚集功能增强,可见于高凝状态和(或)血栓前状态以及血栓性疾病等。因此探求中国上海汉族人群 TXA<sub>2</sub>R 基因多态性与血小板聚集功能的相关性,可为进一步丰富血栓形成发病机制的功能研究提供重要线索和依据。

总之,血小板聚集功能在血栓形成、动脉粥样硬化中起着重要作用<sup>[14]</sup>,高危人群定期测定血小板聚集率,对指导治疗和预防心脑血管病具有一定意义;TXA<sub>2</sub>R 能够通过与其配体 TXA<sub>2</sub> 结合后能够使血小板活化,促使血小板黏附和聚集,并且 TXA<sub>2</sub>R 的基因多态性可能引起 TXA<sub>2</sub>R 的功能改变,进而影响 TXA<sub>2</sub>R 与其配体的结合,导致改变信号传递途径,最终影响血小板聚集功能和血栓形成的发生。因此目

前 TXA<sub>2</sub>R 基因多态性的相关性研究应该继续寻求探索,有必要在今后的工作中扩大样本量、增加相关基因多个单核苷酸多态性位点的检测以及进一步开展 TXA<sub>2</sub>R 基因的功能研究,来为脑梗死等血栓形成相关疾病的预防和治疗奠定必要的实验理论基础。

#### [参考文献]

- [1] 诸葛欣,张蕴,曹肇慧. 血栓素受体在动脉粥样硬化中的作用[J]. 国外医学·老年医学分册, 2008, 29(1): 9-11.
- [2] Unoki M, Funata S, Onouchi Y, et al. Association studies of 33 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 29 candidate genes for bronchial asthma: positive association a T924C polymorphism in the thromboxane A<sub>2</sub> receptor gene[J]. Hum Genet, 2000, 106(4): 440-446.
- [3] Palikhe NS, Kim SH, Lee HY, et al. Association of thromboxane A<sub>2</sub> receptor (TBXA<sub>2</sub>R) gene polymorphism in patients with aspirin-intolerant acute urticaria[J]. Clin Exp Allergy, 2011, 41(2): 179-185.
- [4] Kaneko Y, Nakayama T, Saito K, et al. Relationship between the thromboxane A<sub>2</sub> receptor gene and susceptibility to cerebral infarction[J]. Hypertens Res, 2006, 29(9): 665-671.
- [5] 赵静,郑岚,傅毅,等. 血栓素 A<sub>2</sub> 受体基因多态性与脑梗死的相关性研究[J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(12): 1228-230.
- [6] 何继强,秦彦文. 血小板与动脉粥样血栓[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3): 286-324.
- [7] 中华神经科学会、中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29: 379-380.
- [8] Dogné JM, de Leval X, Hanson J, et al. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators part I: thromboxane modulators[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(10): 1223-241.
- [9] Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors[J]. Circ Res, 2006, 99(12): 1293-304.
- [10] Narsing RM, Hirata M, Kakizuka A, et al. Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor gene[J]. J Biol Chem, 1993, 268(33): 25253-25259.
- [11] 丁俊丽,银广悦,檀培芳,等. 血小板功能与脑梗死[J]. 中国现代医药杂志, 2007, 9(3): 144-145.
- [12] Yonemura K, Kimura K, Hasegawa Y, et al. Analysis of ischemic stroke in patients aged up to 50 years[J]. Rinsho Shinkeigaku, 2000, 40(9): 881-886.
- [13] Carrera E, Maeder-Ingvar M, Rossetti AO, et al. Trends in risk factors: patterns and causes in hospitalized strokes over 25 years. The Lausanne Stroke Registry[J]. Cerebrovasc Dis, 2007, 24(1): 97-103.
- [14] Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, et al. Course of platelet activation markers after ischemic stroke[J]. Stroke, 2002, 33(11): 2570-2574.

(此文编辑 文玉珊)