

# $\beta$ 纤维蛋白原 - 455G/A 基因多态性与冠心病的关系

陈 琪

(宁波市第四医院急诊科, 浙江省宁波市 315700)

[关键词]  $\beta$  纤维蛋白原; 基因多态性; 冠心病

[摘要] **目的** 分析  $\beta$  纤维蛋白原(血浆纤维蛋白原 B) 基因启动子区 -455 bp 位点多态性与冠心病的关系。**方法** 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性分析法检测 240 例冠心病患者和 240 例正常对照者的  $\beta$  纤维蛋白原基因启动子区 -455 bp 位点多态性,并测定血浆纤维蛋白原水平。**结果** (1)冠心病组 GA/AA 基因型及 A 等位基因频率(分别为 45.4% 和 25.2%)均高于对照组(分别为 26.7% 和 15.2%),差异有统计学意义( $P$  均  $<0.05$ ); (2)冠心病组各基因型的血浆纤维蛋白原水平均高于对照组同基因型,两组携带 GA 基因型者的血浆纤维蛋白原水平高于同组携带 GG 基因型者,携带 AA 基因型者血浆纤维蛋白原水平高于同组携带 GA 基因型者,差异有统计学意义( $P$  均  $<0.05$ )。**结论**  $\beta$  纤维蛋白原基因启动子区 -455 bp 位点多态性与冠心病有关,A 等位基因是冠心病的易感危险因素,可能通过影响血浆纤维蛋白原水平与冠心病产生联系。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Association of $\beta$ -fibrinogen -455 G/A Polymorphism with Coronary Heart Disease

CHEN Qi

(Ningbo Fouth Hospital, Ningbo, Zhejiang 315700, China)

[KEY WORDS]  $\beta$ -Fibrinogen; Gene Polymorphism; Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To explore the association of -455G/A polymorphisms of  $\beta$ -fibrinogen gene with coronary heart disease. **Methods** 240 coronary heart disease patients and 240 normal people were involved. -455G/A polymorphisms of  $\beta$ -fibrinogen gene was analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-PFLP), and the plasma fibrinogen was determined. **Results** (1) The frequency of GA/AA genotype and A-allele (45.4% and 25.2%) was significantly higher in coronary heart disease group compared with their controls (26.7% and 15.2%) ( $P < 0.05$ ). (2) The level of fibrinogen of each genotype in coronary heart disease group was significantly higher than the same genotype of the control group; In each group, the level of fibrinogen of patients with GA genotype was significantly higher than those of patients with GG genotype, the level of fibrinogen of patients with AA genotype was significantly higher than those of patients with GA genotype ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**  $\beta$ -fibrinogen gene -455G/A polymorphism may be related to coronary heart disease, the A-allele may be the risk genetic factor for coronary heart disease, and maybe have contact with coronary heart disease by influencing the level of fibrinogen.

血浆纤维蛋白原是一种重要的凝血因子,其功能亢进或血浆水平增高与冠心病(coronary heart disease, CHD)密切相关。近年的研究发现人纤维蛋白原基因多态性与心脑血管疾病发病具有相关性,使纤维蛋白原基因多态性的研究倍受关注。位于  $\beta$  纤维蛋白原基因 5'端启动子区 -455 bp 位点是最早被发现并被广泛研究的多态性位点,该位点突变认为与血浆纤维蛋白原水平及其活性有关,促进动脉粥样硬化形成和缺血性疾病的发生<sup>[1,2]</sup>。本研究

旨在探讨  $\beta$  纤维蛋白原 -455G/A 基因多态性的分布特点及其与冠心病的关系。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

2009 年 6 月至 2012 年 12 月在宁波市第四医院心血管内科住院的无血缘关系的成年人(均居住于象山县地区,且居住 3 年以上,无长期外出史)。(1)冠

心病组 240 例,男 142 例,女 98 例,平均年龄  $56.2 \pm 12.1$  岁;其中合并高血压病 126 例,糖尿病 34 例,血脂异常 87 例,吸烟者 96 例。入选标准:冠状动脉造影证实主要冠状动脉(左前降支、左回旋支、右冠状动脉)中至少有一支内径狭窄 $\geq 50\%$  或左主干有明显动脉粥样硬化病变或住院的急性心肌梗死患者。(2)对照组 240 例,男 144 例,女 96 例,平均年龄  $55.6 \pm 11.3$  岁;其中合并高血压病 130 例,糖尿病 33 例,血脂异常 85 例,吸烟者 99 例。入选标准:冠状动脉造影检查中未发现主要冠状动脉内径狭窄 $\geq 50\%$ ,左主干无明显动脉粥样硬化病变者。排除标准:恶性肿瘤、甲状腺疾病、大动脉炎、血液病、结核、肾脏疾病及严重肝肾功能不全等。

1.2 血样采集

在征得本人同意后,采集每一位研究对象空腹(禁食 12 h 以上)静脉血 6 mL,分装 2 管,一管用 EDTA 抗凝用于 DNA 分析,另一管用于测定血浆纤维蛋白原浓度。

1.3 血浆纤维蛋白原浓度测定

采用兔脑组织凝血活酶法,由美国产的全自动血凝分析仪(Automated Coagulation Laboratory, ACL 200)测定。

1.4 DNA 分析

(1)采用酚-氯仿-异戊醇法提取全血基因组 DNA;(2)采用聚合酶链反应(PCR)特异性扩增含有  $\beta$  纤维蛋白原 -455G/A 多态性位点的片断。引物参考文献[2]设计,由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列为上游 5'-gaa ttg ggg aat gca atc tct gct acc t-3',下游 5'-ctc ctc att gtc gtt gac acc ttg gga c-3'。PCR 扩增反应体系为 50  $\mu$ L,其中 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L(Mg<sup>2+</sup> With),dNTP(2.5 mmol/L)2  $\mu$ L,Primer (forward) (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L,Primer (reverse) (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L,Taq DNA polymerase (5 kU/L) 0.5  $\mu$ L,Template DNA (0.5 g/L) 2  $\mu$ L,dd-H<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,60℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,30 个循环后,72℃ 延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 4  $\mu$ L,在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳,Golden View 染色观察结果。(3)PCR 产物酶切鉴定基因型:取 PCR 扩增产物 10  $\mu$ L,加入 HaeⅢ 内切酶 10 U(10 U/ $\mu$ L)及相应缓冲液及水混匀,总体积 20  $\mu$ L,37℃ 水浴 6 h,反应终止后各取酶切产物 5  $\mu$ L,在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,Golden View 染色后用凝胶图像分析系统拍照判断基因型。PCR 扩增产物为 1301 bp 的片段,在野生型(基因型 GG)存在限制性内切酶 HaeⅢ 的两个识

别位点,酶切后可见 343、383、575 bp 3 个特异性片段;当 -455 bp 位点的 G 等位基因被 A 等位基因取代(基因型 AA)时,则失去 HaeⅢ 的酶切活性,形成 343 bp 和 958 bp 2 个特异性片段;而仅一条染色体突变(基因型 GA)时,则形成 343、383、575 和 958 bp 4 个特异性片段(图 1)。

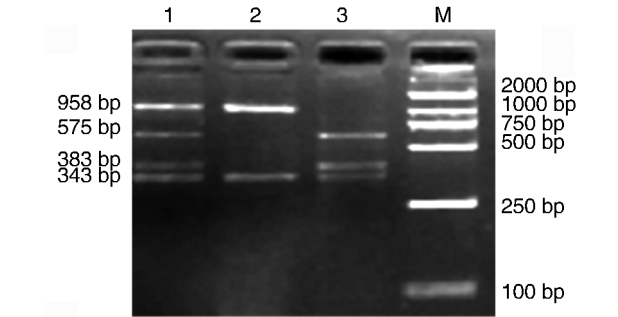


图 1.  $\beta$  纤维蛋白原 -455G/A 多态性位点基因分型电泳图 1 为 GA 基因型,2 为 AA 基因型,3 为 GG 基因型。

Figure 1. Electrophoretic map of  $\beta$ -fibrinogen gene -455G/A polymorphisms

1.5 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件包进行统计学处理,用 Hardy-Weinberg 平衡法检测样本的群体代表性;基因型频率采用直接计数法,计数资料比较用  $\chi^2$  检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,基因多态性与冠心病的相关性分析采用 Logistic 回归,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般项目比较

两组研究对象的性别、年龄、合并症(高血压病、糖尿病、血脂异常)及吸烟率等差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ),具有可比性。经 Hardy-Weinberg 平衡定律检验, $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 位点基因型分布符合遗传平衡定律,具有较好的群体代表性。

2.2  $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 位点基因型分布和等位基因频率

$\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 位点两组的基因型分布均为 GG 型  $>$  GA 型  $>$  AA 型,G 等位基因  $>$  A 等位基因;冠心病组 GA、AA 基因型及 A 等位基因含量均高于对照组,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ ;表 1)。

2.3  $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 基因多态性与血浆纤维蛋白原水平的关系

冠心病组各基因型的血浆纤维蛋白原水平均

高于对照组同种基因型,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );两组携带 GA 基因型者的血浆纤维蛋白原水平高于同组携带 GG 基因型者,携带 AA 基因型者

的血浆纤维蛋白原水平高于同组携带 GA 基因型者,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ ;表 2)。

表 1. 冠心病组和对照组  $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 位点基因型分布和等位基因频率

Table 1. Distribution of  $\beta$ -fibrinogen -455 G/A genotypes and allele frequencies between coronary heart disease group and control group

分 组	基 因 型(例)			等位基因(例)	
	GG	GA	AA	G	A
对照组	176(73.3%)	55(22.9%)	9(3.8%)	407(84.8%)	73(15.2%)
冠心病组	131(54.6%)	97(40.4%)	12(5.0%)	359(74.8%)	110(25.2%)

表 2. 两组不同基因型患者血浆纤维蛋白原水平(g/L)

Table 2. The level of fibrinogen in different genotypes patient of two groups(g/L)

分 组	<i>n</i>	GG	GA	AA
对照组	240	3.38 $\pm$ 1.13	4.66 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	5.85 $\pm$ 1.37 <sup>c</sup>
冠心病组	240	4.26 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	5.72 $\pm$ 1.28 <sup>ab</sup>	6.84 $\pm$ 1.16 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与本组 GG 基因型比较;  
c 为  $P < 0.05$ ,与本组 GA 基因型比较。

2.4 冠心病危险因素的 Logistic 回归分析

对样本进行单因素 Logistic 回归分析,筛选出候选变量有高血压、糖尿病、高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)和  $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 位点 GA/AA 基因型,其中 GA/AA 基因型 OR = 1.946,95% CI 为 1.135 ~ 3.422 ( $P = 0.036$ )。将上述候选变量引入多因素 Logistic 回归模型,结果显示高血压、糖尿病、HDLC 和 LDLC 是冠心病的独立危险因素,而  $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 位点 GA/AA 基因型不是冠心病的独立危险因素 (OR = 1.265,95% CI 为 0.744 ~ 2.729, $P = 0.362$ )。

3 讨 论

血浆纤维蛋白原是由 2 组完全对称的分子构成,每一组分子包含 3 条多肽链: $A\alpha$ 、 $B\beta$  和  $\gamma$ ,并分别被  $\alpha$  纤维蛋白原(血浆纤维蛋白原 A)、 $\beta$  纤维蛋白原(血浆纤维蛋白原 B)和  $\gamma$  纤维蛋白原(血浆纤维蛋白原 G) 3 种独立基因所编码,所有基因都集中位于第 4 号染色体长臂末端(4q23 ~ q32)<sup>[3,4]</sup>。纤维蛋白原  $\beta$  链的合成是血浆纤维蛋白原合成的限速步骤,因此编码  $\beta$  链的基因被认为是影响血浆纤维蛋白原水平的主要基因。国内外研究已经发现的  $\beta$  纤维蛋白原基因多态性达 10 余种, $\beta$  -455 G/A 是  $\beta$  纤维蛋白原基因多态性中发现最早、研究最

多的位点。多数研究发现, $\beta$  纤维蛋白原基因的 -455A 等位基因与血浆纤维蛋白原水平升高相关,认为 A 等位基因与血浆纤维蛋白原升高正相关。流行病学资料亦证实,血浆纤维蛋白原水平升高与缺血性心脑血管疾病的发病相关<sup>[2,5]</sup>。到目前为止,在凝血系统中,血浆纤维蛋白原是唯一被证实与缺血性心脑血管疾病的发病相关的物质。高纤维蛋白原已被认为是冠心病发生发展的独立危险因素之一,而且与冠状动脉狭窄程度有关,国内外的研究<sup>[6-8]</sup>均支持这一观点。

孙川等<sup>[9]</sup>研究发现, $\beta$  纤维蛋白原 -455G/A 基因多态性与冠心病关联,-455A 可能是与冠心病相关的遗传危险因素。余元勋等<sup>[3]</sup>研究认为  $\beta$  纤维蛋白原基因 -455nt A 等位基因可能是急性心肌梗死的遗传危险因素。Maat 等<sup>[10]</sup>研究发现,-455 G/A 位点 AA 基因型冠状动脉粥样硬化患者较 GA、GG 基因型患者病程进展快,推测可能 A 等位基因引起了更强烈的血浆纤维蛋白原急性期反应,导致更高的血浆纤维蛋白原水平,形成病程进展的病理学基础。Lam 等<sup>[11]</sup>也发现在香港人中 AA 基因型在缺血性心脏病患者中更多见,表明  $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 多态性与缺血性心脏病有关。但也有报道认为,虽然等位基因 A -455 与血浆纤维蛋白原浓度升高具有相关性,但其升高程度并不足以引起缺血性心脏病的危险性增高<sup>[12]</sup>。Folsom 等<sup>[13]</sup>也指出  $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病之间无明显相关,虽然不排除可能存在少量影响。这可能与选择对象的偏差有关,也可能因为突变等位基因携带者发病年龄较小、病情较重、死亡率较高而被排除在调查对象之外有关。

本研究发现, $\beta$  纤维蛋白原 -455 G/A 基因的 A 等位基因携带率在对照组为 16%,在冠心病组为 25%,这与其他相关研究结果相近;本研究还表明,

β 纤维蛋白原 - 455 G/A 基因多态性与冠心病有关,携带 GA/AA 基因型及 A 等位基因的个体患冠心病的风险升高,但 GA/AA 基因型不是冠心病的独立危险因素,可能是通过影响血浆纤维蛋白原水平而增加患冠心病的风险。β 纤维蛋白原基因突变在冠心病发病中作用的分子机制尚不清楚,可能通过血浆纤维蛋白原作为媒介。因此,β 纤维蛋白原 - 455G/A 基因多态性可能是中国人冠心病易感性的一个遗传标记。

本文观察的病例数有限,且仅局限于住院患者,还有待于结合人群流行病学调查和增加样本量进一步研究。

[参考文献]

[1] Fuller GM, Zhang Z. Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression [J]. Ann NY Acad Sci, 2011, 936: 469.

[2] 徐建辉, 元小冬, 张楠楠. 血浆纤维蛋白原 BB 链 4 个基因多态性位点单体型与其功能表达和脑梗死的关联性分析[J]. 血栓与止血学, 2011, 17(3): 105-106.

[3] 余元勋, 王爱玲, 陈森, 等. β 纤维蛋白原基因 - 455ntG/A 多态性与急性心肌梗死的关系研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(4): 21-25.

[4] 林威, 陈群. 纤维蛋白原基因多态性研究进展[J]. 心肺血管病杂志, 2009, 28(1): 58-60.

[5] Reseh KL, Ernst E, MatraiA, et al. Fibrinogen and viscosity as risk factor for subsequent cardiovascular events in stroke survivors [J]. Ann Intern Med, 1998, 19: 634-636.

[6] 汪芳, 赵迎, 胡锦章, 等. 冠心病患者脂蛋白(α)和纤

维蛋白原血浓度与冠状动脉狭窄间的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(3): 246-248.

[7] 覃军, 何作云, 冯兵, 等. 冠心病患者冠状动脉不同程度狭窄时血脂、载脂蛋白和纤维蛋白原变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(2): 150-152.

[8] Johanna Q, Moniek PM, Michie LL, et al. Elevated plasma fibrinogen [J]. Arterioscler Thromb Vase Biol, 1998, 18: 621-625.

[9] 孙川, 梁亮, 李巍景, 等. α 和 β 纤维蛋白原基因核苷酸多态性及其单体型与冠心病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(9): 699-702.

[10] de Maat MP, Kastelein JJ, Judema JW, et al. - 455G/A polymorphism of the beta- fibrinogen gene is associated with the progression of fibrinogen. Regress Group [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18: 265-271.

[11] Lam KS, Wat NM, Char LC, et al. Beta-fibrinogen gene G/A - 455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischemic heart disease ischemic patients with type II diabetes [J]. Diabetologia, 1999, 42: 1 250-253.

[12] Tybjaerg HA, Agerholm LB, Humphries SE, et al. A common mutation (G-455-A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9127 individuals based on the Copenhagen city heart study [J]. J Clin Invest, 1997, 99(12): 3 034-039.

[13] Folsom AR, Aleksic N, Ahn C, et al. Beta-fibrinogen gene-455G/A polymorphism and coronary heart disease incidence: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study [J]. Ann Epidemiol, 2001, 11(3): 166-170.

(此文编辑 许雪梅)