

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0691-04

•临床研究•

凝血因子 及其基因 MspI 多态性与高血压合并脑梗死的相关性

杜贻萌, 路方红, 王克志, 吴 凡, 田 奇, 孙 慧, 商 清

(山东省医学科学院基础医学研究所心血管研究室, 山东省济南市 250062)

[关键词] 内科学; 活化凝血因子 与高血压并发症的关系; 方法, 病例对照研究; 基因多态性, 凝血因子 ; 患者, 高血压合并脑梗死; 危险因素

[摘要] 探讨血浆活化凝血因子 及其基因 MspI 多态性与中国汉族人高血压合并脑梗死的关系。采用候选基因及病例一对照的方法, 以聚合酶链反应及限制性内切酶片段长度多态性分析技术, 对高血压组、高血压合并脑梗死组及正常对照组进行凝血因子 基因 MspI 多态性分析并确定基因型, 同时采用重组可溶性组织因子法测定血浆活化凝血因子 水平。结果发现, 与高血压组比较, 脑梗死组血浆活化凝血因子 水平显著增高 (2.78 ± 0.59 比 $2.53 \pm 0.62 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$); 高血压组与正常对照组比较差异无显著性 (2.53 ± 0.62 比 $2.41 \pm 0.61 \mu\text{g/L}$, $P > 0.05$); Logistic 回归分析显示, 血浆活化凝血因子 水平增高是高血压合并脑梗死的重要危险因素 ($\text{OR} = 1.134$, $P < 0.05$); 凝血因子 基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 基因型及等位基因频率分布在各组间差异均无显著性 ($P > 0.05$); 各组血浆活化凝血因子 水平均与凝血因子 基因多态性显著相关, M_1M_1 纯合子血浆活化凝血因子 水平显著高于 M_2 等位基因携带者 ($P < 0.05$)。以上提示, 血浆活化凝血因子 水平增高是高血压合并脑梗死的重要危险因素, 并受其基因 MspI 多态性的影响。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship between Activated Coagulation Factor or Its Gene MspI Polymorphism and Cerebral Infarction with Hypertension

DU Yi-Meng, LU Fang-Hong, WANG Ke-Zhi, WU Fan, TIAN Qi, SUN Hui, and SHANG Qing

(Cardiovascular Department, Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

[KEY WORDS] Activated Coagulation Factor ; Hypertensive Ischemic Complications; Case-Control Study; Genes; Polymorphism; Cerebral Infarction; Risk Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association of activated coagulation factor (F a) and its gene MspI polymorphism for cerebral infarction with hypertension in Chinese. **Methods** This study was performed with the method of candidate gene and case-control study. F genotypes were identified with polymerase chain reaction amplified genomic deoxyribonucleic acid (DNA) and MspI restriction fragment length polymorphism analysis, and plasma F a levels were detected with recombinant tissue factor method in 149 hypertensive patients, 132 hypertensive patients with ischemic stroke (stroke group) and 148 normotensive sex- and age- matched control subjects. **Results** Plasma F a levels were significantly higher in patients with ischemic stroke than those of patients with hypertension (2.78 ± 0.59 v. $2.53 \pm 0.62 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$). F a is a risk factor for ischemic stroke with hypertension on Logistic regression analysis. ($\text{OR} = 1.134$, $P < 0.05$). The allelic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. The results suggested that the distribution of genotype and allelic frequencies in every group had no significant difference, also no difference in subgroups of ischemic stroke ($P > 0.05$). F a levels were significantly higher in Arg homozygotes than in Gln allele carriers (2.72 ± 0.60 v. $1.98 \pm 0.59 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$) and associated with F gene polymorphism. **Conclusions** Plasma F a levels may be an important risk factor of cerebral infarction with hypertension and the levels are influenced by MspI polymorphism of the F gene.

凝血因子 (coagulation factor, F) 主要有两种活性形式, 即凝血因子 促凝活性 (factor co-

agulation activator, F c) 及活化凝血因子 (activated coagulation factor, F a)。凝血因子 作为外源性凝血途径的唯一始动因子在血栓形成过程中起关键作用。由于 F c 受遗传与环境等因素的显著影响, 而活化凝血因子 非常稳定, 有人认为活化凝血因子 水平增高作为缺血性心脑血管病的危险因素更为恰当。本研究旨在探讨血浆活化凝血因子 及其基因 MspI 多态性与高血压合并脑梗死的关系。

[收稿日期] 2003-05-25 [修回日期] 2004-09-30

[作者简介] 杜贻萌, 硕士, 副主任医师, 主要从事高血压及其缺血性并发症的流行病学研究及冠心病介入治疗, 现在山东大学第二医院心内科工作, 联系电话为 0531-5875465。路方红, 硕士, 研究员, 主要从事高血压及其缺血性并发症的临床及分子流行病学研究, 系通讯作者, 联系电话为 0531-2919937, E-mail 为 Lufanghongming@163.net。王克志, 硕士, 副主任医师, 主要从事高血压及其缺血性并发症的流行病学研究及冠心病防治, 联系电话为 0531-2919937。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

高血压共 149 例,其中男 89 例,女 60 例,年龄 50~79 岁,平均 65 ± 7 岁,高血压病史 10~20 年不等,平均 11.5 年,均符合 1999 年 WHO/ISH 制定的高血压诊断标准。高血压合并脑梗死组(简称脑梗死组):以往有高血压病史或正在接受抗高血压治疗的高血压脑梗死病人 132 例,男 75 例,女 57 例,年龄 50~80 岁,平均 67 ± 6 岁;其中腔隙性脑梗死 79 例,大动脉血栓形成性脑梗死 53 例。诊断均经 CT 及/或 MRI 证实,并同时符合 1995 年第五届全国脑血管学术会议制定的诊断标准及 1999 年 WHO/ISH 制定的高血压诊断标准。排除标准:各种原因引起的脑栓塞、非高血压动脉硬化引起的脑梗死及脑出血病人不得入选。正常对照组 148 例,男 85 例,女 63 例,年龄 50~78 岁,平均 65 ± 7 岁,经常规检查均无高血压、冠心病及脑卒中等心脑血管病史,休息时心电图正常、体力活动时无心肌缺血症状。研究对象均为济南地区长期(5 年以上)居住的汉族人,有糖尿病、血液系统疾病或正应用抗凝剂者除外。各组间年龄、性别构成、吸烟比例、体重指数、总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇等项指标差异无显著性($P > 0.05$)。

1.2 血浆活化凝血因子 测定

采用重组可溶性组织因子子法(rSTF₂₂₁₉)^[1],取空腹肘静脉血 2 mL,与 0.13 mol/L 柠檬酸钠 0.4 mL 混合后制备血浆(3 000 r/min × 10 min),试剂盒为法国 Digwostica STAGO 公司产品。

1.3 血脂检测

采用酶标法,严格按试剂盒说明书进行。

1.4 凝血因子 基因 MspI 多态性分析

以酚-氯仿法从外周血白细胞中抽提 DNA,溶于 TE 中。根据 Green 等提出的引物,由上海生物工程公司合成,序列如下:正义链:5'-GGG AGA CTC CCC AAA TAT CAG-3',反义链:5'-ACG CAG CCT TGG CTT TCT CTC-3',采用聚合酶链反应技术扩增 F 基因含 MspI 多态性位点的特异性 DNA 片段。聚合酶链反应条件:先 95℃ 变性 2 min;循环周期为 94℃ 1 min → 62℃ 1 min → 72℃ 1 min,30 个循环周期后 72℃ 再延伸 7 min。扩增片段大小为 312 bp。取 15 μL 聚合酶链反应产物,加入 1 μL MspI (10 u/μL) 及 2 μL 10× buffer,短暂离心后 37℃ 恒温水浴箱内过液消化 14 h,消化产物在 1.5% 琼脂糖

凝胶上电泳,溴化乙锭染色后经凝胶图像分析仪观察电泳结果,鉴定基因型。

1.5 统计学处理

用 SPSS 10.0 软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,主要检测指标均进行正态性检验,对于偏态分布的资料经对数转换为近似正态分布再进行 t 检验;计数资料如基因型分布比较采用 χ^2 检验;多因素相关分析采用 Logistic 回归模型, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组患者血浆活化凝血因子 水平的比较

脑梗死组 F a 水平($2.78 \pm 0.59 \mu\text{g/L}$)显著高于对照组($2.41 \pm 0.61 \mu\text{g/L}$)($P < 0.05$),高血压组 F a 水平($2.53 \pm 0.62 \mu\text{g/L}$)略高于对照组,但差异无显著性($P > 0.05$)。以年龄、性别、吸烟、体重指数、血浆 F a 和血脂指标为自变量与高血压组作对照行 Logistic 回归分析发现,仅 F a 与脑梗死的危险性独立相关($OR = 1.134$, $P < 0.05$)。

2.2 各组凝血因子 的基因型及等位基因频率的比较

血浆凝血因子 共 3 种基因型,即两种常见的 M_1M_1 、 M_1M_2 及少见的 M_2M_2 基因型,正常纯合子为 M_1M_1 基因型,被酶切为 205 bp、67 bp 和 40 bp 3 种片段;紫外灯下突变纯合子为 M_2M_2 基因型,因失去一个酶切位点被酶切为 272 bp 和 40 bp 两种片段,杂合子为 M_1M_2 基因型,被酶切为 272 bp、205 bp、67 bp 和 40 bp 4 种片段(图 1, Figure 1)。F 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,具有人群代表性。F 基因 MspI 多态性在各组人群中的分布均以 M_1M_1 基因型多见, M_1M_2 次之, M_2M_2 少见;脑梗死组 M_2 等位基因频率略低于正常对照组及高血压组,但差异无显著性($P > 0.05$)(表 1, Table 1)。

表 1. 各组凝血因子 基因型及等位基因频率分布

Table 1. The distribution of genotype and allelic frequencies in every group

分 组	基因型 (%)			等位基因频率 (%)	
	M_1M_1	M_1M_2	M_2M_2	M_1	M_2
对照组	129(87.2)	17(11.5)	2(1.35)	92.9	7.1
高血压组	130(87.2)	18(13.2)	1(0.67)	93.3	6.7
脑梗死组	116(87.9)	15(11.4)	1(0.76)	93.6	6.4

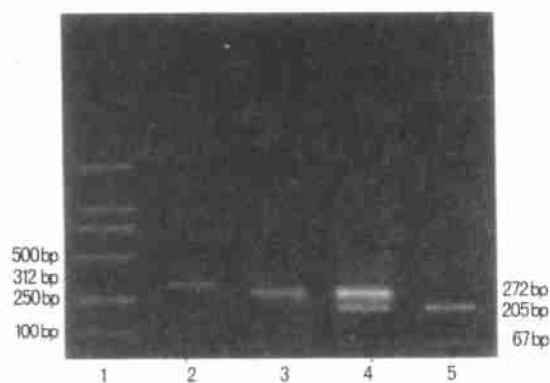


图 1. 凝血因子 基因聚合酶链反应及限制性内切酶片段长度多态性分析电泳图 1 为 DNA 标志物, 2 为聚合酶链反应扩增产物(312 bp), 3 为突变纯合子(M_2M_2 基因型), 4 为杂合子(M_1M_2 基因型), 5 为野生型纯合子(M_1M_1 基因型)。

Figure 1. Electrophoretogram of F gene polymerase chain reaction amplified genomic deoxyribonucleic acid (DNA) and restriction fragment length polymorphism analysis

2.3 凝血因子 基因 MspI 多态性与活化凝血因子水平的关系

由于突变纯合子 M_2M_2 基因型很少, 故将 M_1M_2 基因型与 M_2M_2 基因型(即 M_2 等位基因携带者)合并分析。如表 2(Table 2) 所示, M_1M_1 纯合子 F a 水平在各组均显著高于 M_2 等位基因携带者($P < 0.05$), M_2 等位基因携带者 F a 水平大约降低 27%; 无论 M_1M_1 纯合子还是 M_2 等位基因携带者, 脑梗死组 F a 水平均明显高于正常对照组及高血压组($P < 0.05$), 高血压组高于正常对照组, 但差异无显著性($P > 0.05$)。

表 2. 凝血因子 基因多态性与血浆活化凝血因子 水平的关系($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

Table 2. The relationship of F gene MspI polymorphism and plasma F a levels

分 组	M_1M_1 基因型		$M_1M_2 + M_2M_2$ 基因型	
	n	F a	n	F a
对照组	124	2.53 ± 0.58^a	24	1.77 ± 0.58
高血压组	125	2.64 ± 0.60^a	24	1.91 ± 0.61
脑梗死组	122	2.85 ± 0.59^{ab}	10	2.03 ± 0.57^a

a: $P < 0.05$, 与 M_2 等位基因携带者($M_1M_2 + M_2M_2$) 比较, b: $P < 0.05$, 与对照组及高血压组比较。

2.4 脉压与血浆活化凝血因子 水平的关系

将高血压组按脉压分为宽脉压组($\geq 60 \text{ mm Hg}$)与窄脉压组($< 60 \text{ mm Hg}$), 比较两组 F a 水平(2.

63 ± 0.64 比 $2.38 \pm 0.62 \mu\text{g/L}$), 差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

高血压性动脉硬化血管内皮广泛损伤而致组织因子过度表达, 位于细胞膜上的组织因子迅速与血浆中 F 受体结合并改变其构象, 形成有活性的组织因子/F a 复合物, 并进而激活 F a 从而启动凝血级联反应, 最终形成稳固的纤维蛋白性血栓, F

a 血浆水平是决定血栓形成速度、大小和稳定性的重要因素, 血栓形成又促进缺血性心脑血管病的发生发展^[2]。缺血性脑卒中患者, 高凝状态和组织因子的表达增加与 F a 活化密切相关^[3]。早在 20 世纪 90 年代初, Takano 等^[1]即发现缺血性脑血管病患者在症状出现前即有部分因 F a 升高而呈高凝状态。Kario 等^[4]研究发现血浆 F a 水平与心脑血管疾病的关系较 F c 和 F Ag 更密切, 可作为脑血管病的独立危险因素。刘敏涓等^[5]研究发现, F a 增高存在于缺血性心脑血管病的各类型之中, 能反映高凝状态的实际情况, 作为高凝状态及危险因素似乎比 F a 更为可靠。国内外研究结果表明^[5,6], 缺血性心脑血管病患者 F 在急性期降低, 而稳定期升高, 提示由 F 的慢性激活而导致的高凝状态可能是缺血事件发生的危险因素。但爱丁堡动脉研究结果未能证实 F 是卒中的独立危险因素^[7]。本研究发现, 恢复期缺血性脑卒中患者血浆 F a 水平均明显高于健康人及高血压组。支持由 F a 显著升高导致的高凝状态可能是中国汉族人高血压合并脑梗死的危险因素之一。

Green 等^[8]首次发现了 Arg353Gln 多态性, 即 F 基因第 8 外显子 DNA 链核苷酸 10976 处一个碱基突变, 使第 353 位氨基酸密码子第 2 位的鸟嘌呤(G) 变异为腺嘌呤(A), 引起相应的编码产物第 353 位氨基酸由精氨酸(Arg) 变成谷氨酰胺(Gln), 该碱基突变改变了限制性内切酶的切割位点, 便称为 Msp I 多态性。Gln353 等位基因在不同种族间分布频率不同(0.03~ 0.09), 约 20% 的欧洲人携带编码氨基酸(Q353 蛋白) 的等位基因^[9]。本研究发现中国汉族健康人 Gln353 等位基因频率为 0.071, 远低于欧洲白人(0.20) 和印度人(0.29), 而高于日本的 0.034^[9] 和国内报道的 0.063~ 0.064, 亦未发现 Arg353Gln 基因型及等位基因频率与高血压性脑梗死具有相关性, 与文献[10] 报道一致。这可能由于不同人种和不同群体间的差异, 也可能是取样因素的影响。

Feng 等^[11]发现, F₁ 水平在 3 种基因型显著不同, 认为 MspI 多态性是 F₁ 最强的单一预测因子, 且 M₂ 等位基因对血浆 F₁ 水平的影响存在一种基因量效关系。Bernardi 等^[12]研究发现 F₁ Arg353 Gln 多态性的致 F₁ a 总变异高于 F₁ c 及 F₁ Ag, 是 F₁ a 的主要预测因子。本研究发现, M₁M₁ 基因型与高 F₁ a 水平相关, M₁M₂ 和 M₂M₂ 基因型与低 F₁ a 水平相关。但无论是 M₁M₁ 还是 M₂ 等位基因携带者, 脑梗死患者血浆 F₁ a 水平均明显高于健康者, 说明 F₁ 基因型不是其唯一决定因素。

高血压是脑卒中发病和死亡的重要危险因素。近年来, 有不少研究指出, 在中老年正常血压和高血压患者中, 脉压是心脑血管疾病的发生和死亡的独立危险因素, 其预测作用甚至大于收缩压和舒张压。缺血性卒中的发病频率也随着血压增加, PP 也在增加^[13]。它反映了中老年人动脉粥样硬化的程度。本研究发现高血压组 F₁ a 水平较对照组为高, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), 进一步分析表明, 脉压大于 60 mm Hg 的高血压患者较脉压小于 60 mm Hg 的高血压患者及健康人 F₁ a 水平明显增高 ($P < 0.05$), 且 PP 与 F₁ a 呈正相关。这可能与 PP 增加动脉壁所受的牵拉增大, 管壁弹性成分容易疲劳和断裂, 易使内膜损伤而导致动脉粥样硬化和血栓事件。这可能是高血压容易出现缺血性脑血管病的原因之一。

本研究结果显示, 血浆 F₁ a 水平增高可能是中国汉族人高血压性脑梗死的重要危险因素, 并受基因 MspI 多态性的影响。由于血浆 F₁ a 测定可能更好地预测脑梗死的发病危险度, 因此尚需进一步大规模临床研究证实, 并从多个候选基因的相互作用方面, 探讨多基因在高血压性脑梗死发病机制中的作用。

[参考文献]

- [1] Takano K, Yamaguchi T, Okada Y, Uchida K, Kisiel W, Kato H. Hypercoagulability in acute ischaemic stroke: analysis of the extrinsic coagulation reactions in plasma by a highly sensitive automated method. *Thromb Res*, 1990, **58**: 481-491
- [2] Kato K, Ali Elayed Y, Namoto M, Nakagawa K, Sueishi K. Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res*, 1996, **82** (4): 335-347
- [3] Pankow JS, Folsom AR, Shahar E, Tsai MY, Jeffery RW, Wing RR. Weight-loss induced changes in plasma factor coagulant activity and relation to the factor Arg/Gln 353 polymorphism in moderately obese adults. *Thromb Haemost*, 1998, **78**: 784-789
- [4] Kario K, Miyata T, Sakata T, Yamada T, Nakamura S, Kato H. Fluorogenic assay of activated factor . Plasma factor a levels in relation to arterial cardiovascular diseases in Japanese. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (2): 265-269
- [5] 刘敏涓, 周高红, 董临江, 刘泽霖. 血浆凝血因子 测定在缺血性心脑血管病中的临床意义. *中华血液学杂志*, 2000, **21** (3): 152-153
- [6] Heywood DM, Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Polymorphisms of the factor gene and circulating F₁ c levels in relation to acute cerebrovascular disease and post stroke mortality. *Stroke*, 1997, **28**: 816-827
- [7] Smith FB, Lee AJ, Fowkes FGR, Price JF, Rumley A, Lowe GD. Hemostatic factor as predictors of ischaemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 3 321-325
- [8] Green F, Kelleher C, Wilke S, Temple A, Meade T, Humphries S. A common genetic Polymorphism associated with lower coagulation factor levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 540-546
- [9] Lane A, Green F, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Humphries S, et al. Factor Arg/Gln353 polymorphism determines factor coagulant activity in patients with myocardial infarction (MI) and control subjects in Belfast and in France but is not a strong indicator of MI risk in the ECTIM study. *Atherosclerosis*, 1996, **119** (1): 119-127
- [10] Nishiuma S, Kario K, Nakanishi K, Yakushijin K, Kageyama G, Matsunaka T, et al. Factor R353Q polymorphism and lacunar stroke in Japanese hypertensive patients and normotensive controls. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1997, **8** (8): 525-530
- [11] Feng D, Toffler GH, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, et al. Factor gene polymorphism, factor levels, and prevalent cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 593-600
- [12] Bernardi F, Marchetti G, Pinotti M, Ferraresi P, Olivieri O, Friso S, et al. Factor gene polymorphisms contribute about one third of the factor level variation in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (1): 72-78
- [13] Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease? The Framingham heart study. *Circulation*, 1999, **27** (4): 354-360

(此文编辑 朱雯霞)

• 征稿征订 •

欢迎向中华现代医院管理杂志投稿

《中华现代医院管理杂志》是由中华临床医药学会主办的国际性医院管理专业期刊, 具有 ISSN/CN 标准刊号, 被收入中华首席医学网等国内多种学术期刊网, 得到国内 1000 多家权威医院及 2000 多位管理专家的支持。

本刊积极倡导职业化医院管理理念, 探讨有中国特色的医院发展之路。为医院院长、医院职业管理人员及从事医院管理的教学者提供一个学习、交流和展示成果的平台。栏目设有: 医院管理论坛、经营管理、人力资源管理、信息管理、质量管理、医疗设备管理、护理管理、病案管理、医技科室管理、药事管理、门诊管理、医院文化、后勤管理、专题研究、医事法规、医疗事故与纠纷管理、危机管理、服务管理、国外医院管理、文献综述、学术讲座、医院介绍等。

关于本刊的详细介绍请登录 www.shouxi.net 免费查询。

投稿邮箱: 北京 100035-47 信箱 医院管理编辑部 收, 邮编: 100035。

电话: 010-62250990, 010-62252523; E-mail: hospital@chinamed.cn。

网站: www.shouxi.net, 网络实名: 医学杂志、中华首席医学网。