

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

孙川^{1,3,4}, 梁亮^{1,3}, 李巍景⁵, 肖锋^{1,3}, 苏雨江⁷, 姚震⁵, 陈晓丹⁶, 邢波⁷, 陈莫水⁷, 刘国勋³, 蔡望伟^{1,2}
(海南医学院 1. 生物化学教研室, 2. 分子生物学重点实验室, 海南省海口市 571101; 3. 广东医学院附属医院血液研究室, 广东省湛江市 524001; 4. 温州医学院附属第二医院血液内科, 浙江省温州市 325027; 海南医学院附属医院 5. 心内科, 6. 检验科, 海南省海口市 570102; 7. 海口市人民医院心内科, 海口市 570208)

[关键词] 分子生物学; 纤维蛋白原; 核苷酸多态性; 冠心病; 单体型

[摘要] 目的 研究 α 纤维蛋白原基因 TaqI 多态性和 β 纤维蛋白原基因 -455G/A、-249C/T、-148C/T、+1689T/G、448G/A、BsmAI、BclI/G/A、HinfI/A/C 单核苷酸多态性及其单体型与冠心病的关系。方法 采用聚合酶链反应限制片长多态性法确定基因型, 采用比浊法测定血浆纤维蛋白原水平, 采用 EH+ 程序分析核苷酸多态性的单体型, 采用卡方检验分析病例组和对照组的等位基因频率、基因型频率及单体型频率的差异。结果 β 纤维蛋白原基因 -455A、-148T 和 448A 的等位基因频率在冠心病组分别为 0.343、0.351 和 0.326, 在对照组分别为 0.254、0.254 和 0.242, 冠心病组 β 纤维蛋白原基因 -455A、-148T 和 448A 的等位基因频率明显高于对照组 ($P < 0.05$), β 纤维蛋白原基因 -455A、-148T 和 448A 携带者患冠心病的相对危险度比非携带者分别大 1.53 倍、1.59 倍和 1.51 倍; 其他位点的等位基因频率在两组间无统计学差异。 β 纤维蛋白原基因 -455G、-249C、-148C、+1689T、448G、BclI/G、HinfI/A 和 α 纤维蛋白原基因 TaqI T2 位点构成的单体型 H16 在病例组中的频率比对照组低 ($P < 0.05$)。以启动子区 3 个位点构建的单体型中, 由 -455G、-249C 和 -148C 构成的单体型 h1 在病例组中的频率低于对照组 ($P < 0.01$), 由 -455A、-249C、-148C 构成的单体型 h5 和由 -455A、-249C、-148T 构成的单体型 h6 在病例组中的频率高于对照组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。结论 β 纤维蛋白原基因 -455G/A、-148C/T 和 448G/A 单核苷酸多态性与冠心病关联, β 纤维蛋白原基因 -455A、-148T 和 448A 可能是与冠心病相关的遗传危险因素。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes in α - and β -Fibrinogen Genes and Their Relationship to Coronary Heart Disease

SUN Chuan^{1,3,4}, LIANG Liang^{1,3}, LI WeiJing⁵, XIAO Feng^{1,3}, SU YuJiang⁶, YAO Zhen⁵, CHEN XiaoDan⁷, XING Bo⁶, CHEN MoShui⁶, LIU GuoXun³, and CAI WangWei^{1,2}

(1. Department of Biochemistry, 2. Laboratory of Molecular Biology, Hainan Medical College, Haikou 571101, China; 3. Laboratory of Hematology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China; 4. Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China; 5. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570102, China; 6. Department of Cardiology, the Haikou Municipal Hospital, Haikou 570208, China; 7. Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

[KEY WORDS] Fibrinogen; Nucleotide Polymorphism; Coronary Heart Disease; Haplotype; Genotype; Allelic Frequency

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the polymorphisms and haplotypes in α -fibrinogen and β -fibrinogen gene and their relationship to coronary heart disease (CHD). **Methods** Plasma fibrinogen level was measured by turbidimetric assay. The TaqI polymorphism in α -fibrinogen gene and the single nucleotide polymorphisms -455G/A, -249C/T, -148C/T, +1689T/G, BsmAIG/C, 448G/A, BclIG/A and HinfIA/C in β -fibrinogen gene were characterized by PCR-RFLP in one hundred and twenty one cases of CHD and one hundred and thirty healthy individuals from Hainan Han population. Haplotypes were estimated by the EH+ program. The statistical differences of allelic, genotype and haplotype frequencies between the case group and the control were estimated by Chi square test. **Results** The allelic frequencies of the polymorphisms -455A, -148T, 448A were 0.343, 0.351 and 0.326 in CHD group, whereas the allelic frequencies of the polymorphisms -455A, -148T, 448A were 0.254, 0.254 and 0.242 in the control. The allelic frequencies of -455A, -148T, 448A were higher in the CHD group than in the control ($P < 0.05$). The allelic frequencies of the other six polymorphisms were not significantly different between the

[收稿日期] 2007-02-08

[修回日期] 2007-08-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30060037); 教育部科学技术研究重点项目(03147); 海南医学院重点学科项目(2005-1)

[作者简介] 孙川, 硕士, 医师, 研究方向为出凝血疾病, E-mail 为 sunchuanr112@163.com。梁亮, 硕士, 医师, 研究方向为出凝血疾病。通讯作者蔡望伟, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为基因多态性与疾病, E-mail 为 caiww@hainmc.edu.cn。

CHD group and the control ($P > 0.05$). The odds ratios (OR) with the rare alleles of A⁻⁴⁵⁵、T⁻¹⁴⁸ and A⁴⁴⁸ were 1.53, 1.59 and 1.51 respectively. Haplotypes constructed from the nine polymorphisms showed that the frequency haplotype H16 with β -455G, β -249C, β -148C, β +1689T, β BsmAI G, β 448G, β BclI G, β HinfI A and dTaqI T2 were lower in the CHD group than in the control. Among the haplotypes constructed from polymorphisms including -455G/A, -249C/T, -148C/T in the promoter region of β fibrinogen gene, haplotype h1 with -455G, -249C and -148C alleles appeared more frequently in control group ($P < 0.01$), whereas haplotype h5 with -455A, -249C and -148C and haplotype h6 with -455A, -249C and -148T occurred more frequently in the CHD group ($P < 0.01$). **Conclusions** The results of multi-allele and haplotype analysis indicated that the polymorphisms -455G/A, -148C/T and 448G/A in beta fibrinogen gene were associated with CHD in Hainan Han population. The allele with -455A, -148T and 448A may represents a genetic risk factor for CHD.

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的发病密切相关。研究表明,纤维蛋白原基因核苷酸多态性是影响血浆纤维蛋白原水平的重要遗传因素^[1-5]。但是,纤维蛋白原核苷酸多态性与冠心病的关系并不完全一致。我们通过病例对照研究,分析 β 纤维蛋白原-455G/A、-249C/T、-148C/T,内含子1 β BsmAIG/C和内含子2 β +1689T/G、编码区的 β 448G/A、3'末端的 β HinfIA/C、 β BclIG/A及 α 纤维蛋白原基因TaqI多态性及其单体型与冠心病的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

冠心病患者121例,男性75例,女性46例,年龄 63.0 ± 10.4 岁,其中心肌梗死71例。对照组130例,男性69例,女性61例,年龄 60.5 ± 10.5 岁,排除心脑血管病和肝、肾、甲状腺疾病以及糖尿病。

1.2 血浆纤维蛋白原水平测定

空腹12~14h,取周围静脉血2mL,枸橼酸钠抗凝,室温下离心分离血浆及血细胞成分。用比浊法测定纤维蛋白原浓度。其中,冠心病患者纤维蛋白原浓度为发病第一天的测量值。

1.3 基因组DNA提取

按Lahiri等^[6]的方法从血细胞中抽提基因组DNA。

1.4 基因多态性分析

引物、聚合酶链反应扩增及限制性内切酶分析条件按梁亮等^[5]的方法进行。

1.5 统计学分析

采用SAS 6.12统计软件进行统计分析。血浆纤维蛋白原水平比较采用 t 检验,应用基因计数法计算相对等位基因频率,应用EH程序^[7]推算单体型,基因型Hardy-Weinberg平衡吻合度,等位基因、基因型和单体型频率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料比较

两组平均年龄、性别比例、总胆固醇、甘油三酯及血糖水平差异无统计学意义,而收缩压、舒张压及血浆纤维蛋白原浓度差异显著($P < 0.01$;表1)。

2.2 纤维蛋白原基因单核苷酸多态性基因型和等位基因频率的分布

对冠心病组和对对照组9个纤维蛋白原基因多态性进行Hardy-Weinberg平衡检验,除 β BsmAI外,其余多态性位点均达到遗传平衡。冠心病组-455A、-148T、448A等位基因频率明显高于对照组($P < 0.05$),患病比值比分别为1.53(95%CI为1.04~2.25)、1.59(95%CI为1.08~2.33)及1.51(95%CI为1.02~2.23); β 纤维蛋白原-249、BsmAIG/C、+1689T/G、HinfIA/C、BclIG/A及dTaqI等位基因频率在两组间差异无统计学意义(表2)。

2.3 单体型分析

由 β 纤维蛋白原基因启动子区构建的单体型中,冠心病组单体型h1的频率低于对照组,单体型h5和h6的频率高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;表3)。由9个核苷酸多态性构建的单体型中,冠心病组和对对照组分别存在18种和19种单体型,单体型H16在两组中的分布存在显著性差异(表4)。

表1. 临床资料比较

指 标	对照组 ($n = 130$)	冠心病组 ($n = 121$)
男/女(例)	69/61	75/46
年龄(岁)	60.48 ± 10.46	63.04 ± 10.40
甘油三酯(mmol/L)	1.65 ± 1.22	1.59 ± 1.42
总胆固醇(mmol/L)	5.80 ± 1.06	5.49 ± 1.64
收缩压(mmHg)	116.5 ± 17.6	132.4 ± 23.0^a
舒张压(mmHg)	73.8 ± 10.1	79.1 ± 13.5^a
血糖(mmol/L)	5.16 ± 1.35	5.52 ± 1.73
纤维蛋白原(mg/L)	3.093 ± 0.797	658 ± 1.415^a

a为 $P < 0.01$,与对照组比较。

表 2. β 纤维蛋白原基因型频率和等位基因频率分布

分 组	例数	基因型			等位基因		OR 值	95% 可信区间
β - 455		GG	GA	AA	G	A		
冠心病组	121	48 (39.7%)	63 (52.1%)	10 (8.2%)	0.657	0.343 ^a	1.53	1.04~ 2.25
对照组	130	72 (55.4%)	50 (38.5%)	8 (6.1%)	0.746	0.254		
β - 249		CC	CT	TT	C	T		
冠心病组	121	21 (17.4%)	69 (57.0%)	31 (25.6%)	0.459	0.541	1.38	0.79~ 1.96
对照组	130	43 (33.1%)	54 (41.5%)	33 (25.3%)	0.539	0.462		
β - 148		CC	CT	TT	C	T		
冠心病组	121	47 (38.8%)	63 (52.0%)	11 (9.1%)	0.649	0.351 ^a	1.59	1.08~ 2.33
对照组	130	71 (54.6%)	52 (40.0%)	7 (5.3%)	0.746	0.254		
β + 1689		TT	TG+ GG	T	G			
冠心病组	121	58 (47.9%)	53 (43.8%)	10 (8.2%)	0.698	0.302	1.30	0.88~ 1.92
对照组	130	72 (55.4%)	51 (39.2%)	7 (5.3%)	0.75	0.25		
β BsmAI		GG	GC	CC	G	C		
冠心病组	121	40 (33.7%)	72 (59.5%)	9 (7.4%)	0.628	0.372	1.43	0.98~ 2.08
对照组	130	57 (43.8%)	70 (53.8%)	3 (2.3%)	0.708	0.292		
β 448		GG	GA	AA	G	A		
冠心病组	121	51 (42.1%)	61 (50.4%)	9 (7.4%)	0.674	0.326 ^a	1.51	1.02~ 2.23
对照组	130	73 (56.1%)	51 (39.2%)	6 (4.6%)	0.756	0.242		
β HinfI		AA	AC	CC	A	C		
冠心病组	121	91 (75.2%)	29 (23.9%)	1 (0.8%)	0.872	0.128	1.05	0.62~ 1.78
对照组	130	98 (75.4%)	32 (24.6%)	0 (0)	0.878	0.123		
β BclI		GG	GA	AA	G	A		
冠心病组	121	65 (53.7%)	47 (38.8%)	9 (7.4%)	0.731	0.269	1.22	0.81~ 1.83
对照组	130	76 (58.5%)	48 (36.9%)	6 (4.6%)	0.76	0.231		
dTaqI		T1T1	T1T2	T2T2	T1	T2		
冠心病组	121	42 (34.7%)	62 (51.2%)	17 (14.1%)	0.603	0.397	0.86	0.60~ 1.23
对照组	130	43 (33.1%)	61 (46.9%)	26 (20.0%)	0.565	0.435		

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 3. 对照组和冠心病组启动子区三个位点的单体型比较

单体型	冠心病组 (n= 242)	对照组 (n= 260)
h1 1-1-1	0.322 ^b	0.514
h2 1-1-2	0.030	0.007
H3 1-2-1	0.297	0.225
h4 1-2-2	0.000	0.001
h5 2-1-1	0.029 ^a	0.004
h6 2-1-2	0.077 ^b	0.014
h7 2-2-1	0.001	0.000
H8 2-2-2	0.236	0.232

多态性位点的排列顺序为 β - 148、 β - 249 和 β - 455。1 代表野生型位点, 2 代表突变位点。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

冠心病的发生与环境因素和遗传因素密切相关。临床和流行病学资料表明, 纤维蛋白原与冠心病的发生发展密切相关, 血浆纤维蛋白原水平升高是冠心病的独立危险因素^[8], 纤维蛋白原基因多态性是影响血浆纤维蛋白原水平的重要遗传因素之

一。到目前为止, 在纤维蛋白原肽链 A α 、B β 和 γ 基因发现的核苷酸多态性有 20 多种。但是, 纤维蛋白原基因多态性是否与冠心病相关, 目前的研究结果并不完全一致。有些研究发现某些多态性与冠心病的发生、严重程度及发展相关^[2, 9-11], 而有些研究未发现纤维蛋白原基因多态性与冠心病有直接相关性^[12-14]。

我们通过病例对照研究分析了海南汉族人群 β 纤维蛋白原基因 - 455G/A、- 249C/T、- 148C/T、+ 1689T/G、 β 448 G/A、 β BclIG/A、 β HinfIA/C 及 α 纤维蛋白原基因 Taq I 核苷酸多态性与冠心病的关系, 结果发现在上述 9 个核苷酸多态性中, β 纤维蛋白原 - 455G/A、- 148C/T、448G/A 与冠心病关联, 冠心病组 β 纤维蛋白原 - 455A、- 148T、448A 的等位基因频率比对照组高, β 纤维蛋白原 - 455A、- 148T、448A 携带者比非携带者患冠心病的相对危险度为 1.5 左右, 而 β + 1689T/G、BsmAI、BclIG/A、HinfIA/C 及 dTaq I 单核苷酸多态性的等位基因频率在两组间比较均无统计学差异, 表明 β 纤维蛋白原基因 - 455A、- 148T、448A 三个位点与冠心病关联, 可能与冠心病的发生相关。国内孙慧和马会利等^[10, 11] 的研

表 4. 9 个多态性位点的单体型比较

	单体型	冠心病组	对照组
		(n = 242)	(n = 260)
H1	1-1-1-1-1-1-1-1	0.053	0.073
H2	1-1-1-1-1-1-2-1	0.150	0.132
H3	1-1-1-1-2-1-1-1	0.000	0.017
H4	1-1-1-1-2-1-2-1	0.011	0.000
H5	1-1-1-2-1-1-1-1	0.000	0.012
H6	1-1-1-2-2-2-2-1-2	0.012	0.000
H7	1-1-2-1-1-1-1-2-1	0.065	0.055
H8	1-1-2-1-2-1-1-1-1	0.015	0.000
H9	1-1-2-1-2-1-1-2-1	0.000	0.020
H10	1-2-1-1-1-2-2-2-2	0.000	0.012
H11	1-2-1-1-2-2-2-2-2	0.000	0.021
H12	1-2-1-2-1-2-2-2-2	0.040	0.026
H13	1-2-1-2-2-2-2-1-2	0.031	0.006
H14	1-2-1-2-2-2-2-2-2	0.148	0.143
H15	1-2-2-2-2-2-2-2-2	0.003	0.004
H16	2-1-1-1-1-1-1-1-1	0.223	0.323 ^a
H17	2-1-1-1-1-1-1-1-2	0.010	0.000
H18	2-1-1-1-1-1-1-2-1	0.021	0.012
H19	2-1-1-1-2-1-1-1-1	0.039	0.053
H20	2-1-1-1-2-1-2-1-1	0.012	0.000
H21	2-1-1-2-1-1-1-1-1	0.000	0.011
H22	2-1-1-2-1-2-2-2-2	0.010	0.000
H23	2-1-2-1-2-1-1-2-1	0.012	0.000
H24	2-2-1-2-1-2-2-2-2	0.011	0.002
H25	2-2-1-2-2-2-2-2-2	0.017	0.007

多态性位点的排列顺序为 dTaqI、 β BclII、 β HinfI、 β CC448、 β BsmAI、 β +1689、 β -148、 β -249 及 β -455。1 代表野生型位点，2 代表突变位点。a 为 $P < 0.05$ ，与对照组比较。

究发现 β 纤维蛋白原基因 -455G/A 与冠心病和年轻人心肌梗死的发生相关，但金玮等^[13, 14]未发现 β 纤维蛋白原基因 -455G/A、-148C/T 与冠心病相关，而发现 -249C/T 多态性与其冠心病相关。本研究结果与国内的结果并不完全一致，原因可能与人群的区域分布或样本的大小有关。

单体型分析是一种将多个核苷酸多态性进行组合分析的方法，可以更有效地发现与疾病易感性相关的核苷酸多态性^[15, 16]。为了了解纤维蛋白原基因单体型与冠心病的关系，我们构建 9 个核苷酸多态性的单体型和启动子区的单体型。结果发现 9 个构建的单体型中，单体型 H16 在对照组中的频率比病例组高，在启动子区的单体型中，单体型 h1 在对照组中的频率高于病例组，单体型 h5 和 h6 在病例组中的频率高于对照组。提示单体型 H16 和 h1 可能与降低冠心病的风险相关，单体型 h5 和 h6 可能

与冠心病的发生相关。从单体型的核苷酸多态性组成推测，纤维蛋白基因的核苷酸多态性之间可能存在协同作用，启动子区的核苷酸多态性可能影响纤维蛋白原基因的转录活性，改变血浆纤维蛋白原的水平，从而影响冠心病的发生。

[参考文献]

- [1] Scarabin PY, Bara L, Ricard S, Poirier O, Cambou JP, Arveiler D, et al. Genetic variation at the β -fibrinogen locus in relation to plasma fibrinogen concentrations and risk of myocardial infarction: the ECTIM study [J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13** (6): 886-891.
- [2] Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction The ECTIM Study [J]. *Circulation*, 1996, **93** (3): 440-449.
- [3] Green F, Hamsten A, Blomback M, Humphries S. The role of beta-fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden [J]. *Thromb Haemost*, 1993, **70** (6): 915-920.
- [4] 马会利, 陈纪林. 冠心病与健康者男女 β Hae 多态性与血浆纤维蛋白原浓度比较[J]. *临床心血管病杂志*, 2000, **16** (1): 32-34.
- [5] 杨志刚, 李凤芹, 刘国勋, 蔡望伟, 凌光鑫. 纤维蛋白原 β -455G/A、-148C/T、448G/A 单核苷酸多态性与血浆纤维蛋白原水平的关系[J]. *中华血液学杂志*, 2000, **21** (9): 463-465.
- [6] 梁亮, 孙川, 肖锋, 汤小兰, 陈晓丹, 周代锋, 等. 海南籍汉族人群九个纤维蛋白原基因多态性及其与血浆纤维蛋白原水平的关系[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2005, **22** (4): 457-461.
- [7] Lahiri DK, Schuabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of $MgCl_2$, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality [J]. *Biochem Genet*, 1993, **32** (7-8): 321-328.
- [8] Zhao JH, Sham PC. Faster haplotype frequency estimation using unrelated subjects [J]. *Hum Hered*, 2002, **53** (1): 36-41.
- [9] Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 1984, **311** (8): 501-505.
- [10] de Maat MP, Kastelein JJ, Jukema JW, Zwindeman AH, Jansen H, Groenermeier B, et al. 455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (2): 265-271.
- [11] 孙慧, 张薇, 路方红, 温培娥, 田奇. 纤维蛋白原 β -455G/A 基因多态性与高血压和冠心病的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 199-202.
- [12] 马会利, 陈纪林, 冯军, 李明花, 马永莉, 陈在嘉. 年轻心肌梗死患者纤维蛋白原基因 β G-455-A 多态性研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2002, **30** (2): 74-76.
- [13] Folsom AR, Aleksic N, Ahn C, Boerwinkle E, Wu KK. Beta-fibrinogen gene -455G/A polymorphism and coronary heart disease incidence: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study [J]. *Ann Epidemiology*, 2001, **11** (3): 1662-170.
- [14] 马会利, 葛均波, 王颖, 黄薇, 孙爱军, 牛玉宏, 等. 纤维蛋白原及其相关基因 β 148 和 β 854 多态性与冠心病发病的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 351-354.
- [15] 金玮, 刘艳, 姜正文, 张奎星, 袁文涛, 盛海晖, 等. 中国人群 β 纤维蛋白原基因启动子区域单核苷酸多态性与冠心病的关系[J]. *诊断学理论与实践*, 2002, **1** (4): 224-228.
- [16] Huang Q, Fu Y, Boerwinkle E. Comparison of strategies for selecting single nucleotide polymorphisms for case/control association studies [J]. *Hum Genet*, 2003, **113** (3): 253-257.

(此文编辑 文玉珊)