

凝血因子Ⅶ5'F7 基因多态性与冠心病的相关性研究

魏 涛¹ 孙雪荣² 陈艳萍^{2Δ}

(1 青岛市市立医院 山东 青岛 266012 2 青岛市妇女儿童医疗保健中心 山东 青岛 266012)

摘要 目的 探讨凝血因子Ⅶ基因 5'F7 多态性与中国汉族人冠心病的关系。方法 利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法测定 43 例健康人(正常对照组)和 116 例冠心病患者 5'F7 多态性,确定其基因型 统计分析其与冠心病的关系及与冠状动脉狭窄程度的相关性。结果 CHD 组与对照组之间 5'F7 多态性的基因型 P0P0 与 (P0P10+P10P10) 频率分布差异总体比较有统计学意义 ($X^2=2.416, P<0.05$), P0、P10 等位基因在两组间的频率分布总体差异有统计学意义 ($X^2=2.302, P<0.05$)。结论 Ⅶ基因 5'F7 多态性中 P10 等位基因可能是 CHD 的遗传保护因子,但与其病变支数无关。

关键词 冠状动脉 凝血因子Ⅶ 基因多态性

中图分类号 R711.75 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 20-3916-03

Relationship between 5'F7 gene Polymorphism of Coagulation Factor Ⅶ and Coronary Heart Disease

WEI Tao¹, SUN Xue-rong¹, CHEN Yan-ping^{2Δ}

(1 Qingdao municipal hospital, Qingdao, 266012, China; 2 Clinical laboratory, Qingdao Women and Children Medical Healthcare Centre, Qingdao, 266012, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between polymorphism of Coagulation Factor Ⅶ and coronary artery disease. **Methods:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was adopted to study the 5'F7 polymorphism of Coagulation Factor Ⅶ of controls (43) and patients (116); the correlation between the CHD and 5'F7 polymorphism. **Results:** There was a significant difference in the frequency distribution of P0P0 and (P0P10+P10P10) of 5'F7 polymorphism between the cases of control group and CHD patients ($X^2=2.416, P<0.05$); There was a statistical significance in the frequencies distributional difference in the allelomorph gene P0 and P10 between the two groups ($X^2=2.302, P<0.05$). **Conclusion:** The allelomorph gene P10 of 5'F7 polymorphism is possible geno-protective factor of CHD, but it is not related with number of pathological changed coronary artery.

Key words: Coronary; Coagulation Factor Ⅶ; Gene polymorphism

Chinese Library Classification: R711.75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 20-3916-03

前言

Ⅶ是一种维生素 K 依赖性的单链糖蛋白,是组织因子(TF)介导的凝血激活途径的启动酶^[1],与许多血栓性疾病,如冠心病,脑梗死等有密切关系,是目前的研究热点。5'F7 多态性是 Ⅶ基因 5' 端启动子区域 -323 处的 10bp(CCTATATCCT)缺失(P0)/插入(P10)多态性。目前,国内外多项研究证实,该基因多态性与动脉粥样硬化的发生相关^[2,3]。本研究拟通过两组对照研究,明确在汉族人群中,此基因多态性与冠心病的关系。

对象与方法

1.1 研究对象

青岛市市立医院 2009 年 12 月至 2010 年 10 月行冠状动脉造影 159 例,根据冠状动脉造影结果分为冠状动脉造影阳性组与冠状动脉造影阴性组。狭窄程度由俩人以上共同阅片决定。

1.1.1 冠状动脉造影阳性组 冠状动脉有 $\geq 50\%$ 狭窄者,不论临床症状程度及冠状动脉病变程度均纳入该组,共 116 例。其中男 80 例,女 36 例,年龄 37~83 岁,平均(61 ± 11)岁。严重程度分为单支病变,双支病变,三支病变。其中,单支病变 27 人,双支病变 21 人,三支及以上病变 68 人。

1.1.2 冠状动脉造影阴性组 冠状动脉正常和冠状动脉有 $< 50\%$ 狭窄,并且无临床症状者纳入该组,共 43 例。其中男 27 例,女 16 例,年龄 32~85 岁,平均(58 ± 12)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本的收集 上述所有研究对象均抽取清晨空腹外周静脉血 5ml,分两管。① 2 毫升用 1%EDTA-K2 抗凝,充分混匀后置 2-8℃冰箱保存,用来检测凝血因子Ⅶ基因多态性。② 3 毫升置于普通试管中,离心后分离血清,置 -20℃冰箱保存备用,用来检测其它生化指标。

1.2.2 提取基因组 DNA 将血样解冻,用试剂盒在全血中提取基因组 DNA,并用 0.8%琼脂糖电泳检测。

1.2.3 PCR 扩增目的基因片段 Ⅶ5'F7 多态性:引物参照 Marchetti 等^[2]设计,forward: 5'-GAG CGG ACG GTT TTG TTG CCA GCG-3' ;reverse: 5'-GGC CTG GTC TGG AGG CTC TCT TC-3'。扩增体系反应总体积 25 μ l,模板 DNA 2 μ l,上游引物

作者简介 魏涛(1973),男,硕士研究生,主管检验师,主要研究方向 临床免疫

Δ通讯作者 陈艳萍,电话 0532-82857542, E-mail chenyanping-shuo@126.com

(收稿日期 2011-03-15 接受日期 2011-04-10)

(10 μ mol/l) 1 μ l,下游引物(10 μ mol/l) 1 μ l,Taq 酶 0.4 μ l10*buffer (Mg²⁺) 2.5 μ l,DNTP 2.5 μ l,PCR 专用水 15.6 μ l。PCR 反应条件如下:94℃预变性 5min,94℃变性 55s,55℃复性 45s,72℃延伸 1min,(35 个 cycles) 72℃ 延伸 5min。扩增片断为 214~224bp。PCR 结束后用 2.5%琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.2.4 酶切取 PCR 产物 10 μ l,加入相应的酶于 37℃恒温孵育。酶切体系如下:PCR 产物 10 μ l,0.1%BSA 2 μ l,10 $\times$ T Buffer 2 μ l,Sty I 酶 1 μ l,去离子水 5 μ l,37℃孵育 4 小时。目标片段:P0P0 基因型:214bp P0P10 基因型 214bp 136bp 88bp;P10P10 基因型:136bp 88bp。

1.2.5 统计分析 应用统计分析软件包 (Statistical Packages for Social Sciences,SPSS11.0) 和 EXCEL 建立数据库,采用四格表

和 R $\times$ C 列表 2 检验方法分析病例组与对照中等位基因和基因型的频数分布差异。多组间差异性比较用方差分析,计数资料组间率的比较采用 X² 检验,相关分析采用 Spearman 相关分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的临床特征

CHD 组和对照组基本资料见表 1,可见在 CHD 组和对照组之间,年龄、性别差异无统计学意义 (P>0.05),两组间具有可比性。而 CHD 的传统危险因素,如血压、血糖、血脂 (TC、LDL、TG) 在两组间有统计学意义 (P<0.05)。CHD 组明显高于对照组。

表 1 CHD 组与对照组临床资料

Table 1 Clinic information of CHD group and control group				
	Control group(n=43)	CHD group(n=116)	Statistics data	P
Age (Year)	58 $\pm$ 12	61 $\pm$ 11	t=1.23	P>0.05
Sex (Male/ Female)	27/16	80/36	X ² =2.721	P>0.05
BMI(kg/m ²)	24.5 $\pm$ 3.8	25.4 $\pm$ 3.3	t=1.13	P>0.05
Systolic pressure (mmHg)	123.09 $\pm$ 10.8	137.1 $\pm$ 20.9	t=12.538	P<0.05
Diastolic pressure (mmHg)	77.1 $\pm$ 5.8	78.6.1 $\pm$ 11.1	t=2.263	P>0.05
Blood glucose (mmol/L)	5.4 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 1.8	t=8.675	P<0.05
TC(mmol/L)	4.33 $\pm$ 0.96	4.78 $\pm$ 1.28	t=5.820	P<0.05
LDL(mmol/L)	1.80 $\pm$ 0.88	2.73 $\pm$ 1.02	t=7.12	P<0.05
TG(mmol/L)	1.2 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 1.0	t=7.219	P<0.05

2.2 FVII基因 5'F7 多态性 PCR 扩增产物

FVII 基因 5'F7 多态性 PCR 扩增产物长度为 214bp 和

224bp,琼脂糖凝胶电泳后肉眼很难区分 10bp 片段长度的不同 (见图 1)。

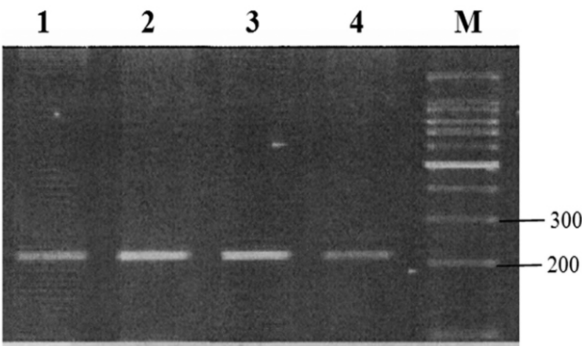


图 1 5'F7 多态性 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoregram of 5'F7 polymorphism products by PCR amplification

Strip 1 and 3 was the PCR amplification product of control group; Strip 2 and 4 was the PCR amplification product of CHD group; Strip M was 100bp DNA Marker

当基因型为野生型 (P0P0 基因型) 时,目的片断不被酶切,产物长度为 214bp;当基因型为突变纯合子型 (P10P10 基因型) 时,目的片段被酶切为 136bp,88bp2 个片段。当基因型为突变杂合子型 (P0P10) 时,目的片段被酶切为 214bp、136bp、88bp3 个片段。由于 88bp 片段比较小,在琼脂糖凝胶电泳时不可见,

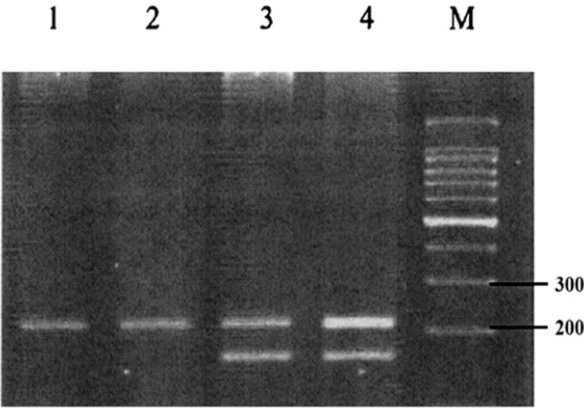


图 2 5'F7 多态性酶切产物电泳图谱

Fig. 2 Electrophoregram of 5'F7 polymorphism products by enzyme cutting

Strip 1 and 2 was P0P0 genotype; Strip 3 and 4 was P0P10 genotype; Strip M was 100bp DNA Marker

故 3 种基因型的电泳条带为 P0P0 基因型 214bp P0P10 基因型 214bp,136bp P10P10 基因型 136bp

2.3 CHD 组凝血因子VII5'F7 基因型多态性和冠状动脉病变支数的关系

结果见表 2。单支病变,双支病变,三支及以上病变组,其

表 2 CHD 组 5'F7 基因多态性和冠状动脉病变支数的关系

Table 2 The relationship between polymorphism of 5'F7 gene and number of pathological changed coronary artery in CHD group

Group	n	Frequency of genotype	
		P0P0	P0P10+P10P10
Single	27	26 (96%)	1 (4%)
Duplexing	21	20 (95%)	1 (5%)
Ternary or more	68	62 (92%)	6 (8%)

P0P0 和 (P0P10 + P10 P10) 两种基因型频率无统计学意义 ($X^2=1.716, P>0.05$) , 提示该基因多态性与冠状动脉病变支数无相关性。

3 讨论

CHD 作为影响人类健康的常见病多发病, 日益引起人们的重视。现有的研究一致认为冠心病的形成是由外界环境因素和内在的多基因调控异常共同作用的结果。近年来, 临床及基础研究发现, 在 CHD 的发生、发展中脂质代谢紊乱, 纤溶系统异常以及局部和全身的炎症起着重要的作用^[4]。国内外研究证实, 在长期高脂血症的情况下, 特别是在低密度脂蛋白和胆固醇的作用下, 动脉内膜造成功能性损伤, 促使动脉壁炎症的发生, 一方面炎症反应造成血管内膜损伤及粥样斑块的不稳定、破裂、血管壁暴露, 组织因子迅速激活血浆中的凝血因子, 从而启动凝血级联反应, 形成血栓病变化; 另一方面因炎症过程中产生的炎症因子可以趋化单核巨噬细胞的粘附、迁移和聚集, 加重炎症反应, 促使早期 AS 的形成^[5]。一些前瞻性研究表明, F VII 作为外源性凝血途径的唯一启动因子, 在血栓形成过程中起关键作用, 其血浆活化因子(FVIIa)及活性(FVIIc)增高是缺血性疾病的危险因素^[6,7]。其中, FVII 基因多态性与 FVII 血浆浓度的增加或活性的增强有非常密切的关系^[8,9]。

Marchetti^[10] 等于 FVII 基因启动子区 -323 发现 10bp(CC-TATATCCT)的插入(P10)/ 缺(P0)多态性, 简称 5'F7 多态性, 亦称为 -3230/10bp 多态性。Marchetti 等发现该基因突变可显著降低血浆 FVIIc 水平, Gireili 等^[11]研究也证实了该基因突变可降低血浆 FVII 水平。该基因多态性影响 FVIIc 水平的可能机制是, 该多态性可以使得 FVII 基因启动子活性显著下降, 从而影响 F VII 转录水平及蛋白质的合成^[12] Gireili 等认为具有 -323 处 P10 等位基因的动脉粥样硬化患者发生心梗的危险性最低, P10 等位基因对心肌梗死有保护性作用。Di castelnuovo 等^[13]发现在家族性心肌梗死患者组中 P10 等位基因发生频率比正常对照组低。Shimokata 等^[14]的研究结果也表明了 P10 等位基因是防止 CHD 发生的保护因子。但是, REGRESS 研究小组^[15]对 511 例男性 CHD 患者研究却未发现这种缺失 / 插入多态性与 CHD 的发展具有相关性。因此, 该多态性与 CHD 之间是否存在相关性并无定论。

本研究结果表明, 在山东地区存在 FVII 基因的 5'F7 多态性, 在 CHD 组中携带 P10 等位基因的个体均明显低于对照组, 提示 FVII 5'F7 基因多态性与 CHD 的发生相关。我们推测携带 P10 等位基因能够降低 CHD 的发生, 对 CHD 可能具有保护作用。但是, 根据研究发现, FVII 5'F7 基因多态性与 CHD 病变范围及严重程度无关。

近年来, 复合性基因多态性的联合作用导致血栓形成的过程日益受到人们的重视。从临床观察出发, 把握基因多态性研究与临床应用的结合点和正确的研究策略将使 CHD 的诊断、治疗和预防提高到一个新的水平, 对血栓高危人群的监测也将起到积极的作用。

参考文献(References)

[1] Fair DS.Quantitation of factor VII in the plasma of normal and warfarintreated individuals by radioimmunoassay [J].Blood,1983,62: 784

[2] Mead TW, Mellows S , Brozovic M, et al . Haemostatic function andischaemic heart disease : principal result of the Northwick Park Heart Study[J].Lancet , 1986 , ii :533-535

[3] 康文英,王鸿利,熊立凡,等.冠心病患者血浆凝血因子VII水平及其基因多态性研究[J].中华血液学杂志,2002,23(9):457-459

Kang Wen-ying, Wang Hong-li; Xiong Li-fan,et al. Study on plasma coagulation factor VII (FVII) levels and polymorphisms of FVII gene in patients with coronary heart disease [J]. Chinese Journal of Hematology, 2002,23(9):457-459

[4] 杨中苏, 刘以林, 王士雯. 冠状动脉粥样硬化斑块的稳定性研究进展[J]. 国外医学老年医学分册, 2001, 22: 97-99

Yang Zhong-su; Liu Yi-lin; Wang Shi-wen. Progression of stability study on coronary atherosclerosis plaque. Foreign Medical Sciences [J] .Geriatrics, 2001, 22: 97-99

[5] 俞坚武,屈百鸣, 吴立萱,等.冠心病患者 C 反应蛋白和凝血因子VII 活性的改变及临床意义[J].心脑血管病防治,2002,2 (1) 20-22

Yu Jian-wu, Qu Bai-ming, Wu Li-xuan,et al. Changes of C-Reactive Protein and coagulation Factor 11 in patients with coronary heart disease and its clinical significance [J]. Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Vascular Disease, 2002,2 (1) 20-22

[6] 刘敏涓,周立红,刘世明,等.血浆凝血因子VII测定在冠心病中的临床意义[J].临床心血管病杂志 2000,16 (10) 443-444

LIU Min-juan ;ZHOU Li-hong; LIU Shi-ming; et al. Detection of plasma coagulation factor VII in patients with coronary heart diseases and its clinical significance [J]. JOURNAL OF CLINICAL CARDIOLOGY, 2000, 16 (10) : 443-444

[7] Junker R , Heinweh J , Schite H , et al . Coagulation factor VII and the risk of coronary heart disease in healthy men[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol ,1997,17: 1539

[8] Marchetti G,PatracchiniP,PaPacehini M,et al.A polymorphism in the 5'region of coagulation factor VII gene (F7) caused by an inserted decanucleotide[J]. Hum Genet,1993, 90(7): 525-576

[9] Green F, Kelleher C, Wilke S, et al. A common genetic polymor phism associated with lower coagulation factor levels in healthy individuals [J]. Arterioscler Thromb,1991, 11: 540-546

(下转第 3896 页)

予磷酸肌酸治疗的患儿血清 S-100B 蛋白和 NSE 含量均明显下降,行为神经评分明显改善,与常规治疗组相比差异具有显著性,说明给予外源性磷酸肌酸能够减轻神经系统损伤,减少 S-100B 蛋白和 NSE 的释放,改善行为神经功能,降低新生儿病死率和致残率,且临床未见明显副作用,更适宜新生儿应用和临床大范围推广。

参考文献(References)

- [1] 杨于嘉,姚裕家等.新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准 [J] 中华儿科杂志.2005,43(8) 584
Yang Yu-jia, Yao Yu-jia, et al. diagnostic code of hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE.[J] China J Pediatric, 2005,43 (8) 584
- [2] 范学政.S-100B 蛋白与颅脑损伤的研究现状[J].国外医学神经病学与神经外科学分册.2004,31(3): 248-251
Fan Xue-zheng. S-100B protein and brain damage [J] Foreign Medical Sciences Section on Neurology & Neurosurgery, 2004, 31 (3): 248-251
- [3] 薛静玉,王世民,刘心武. S100b 蛋白与神经系统疾病[J].中国全科医学,2003,6(12):1053-1054
Xu Jing-yu, Wang Shi-min, Liu Xin-wu. S-100B protein and nervous system disease.[J].Chinese General Practice,2003,6(12):1053-1054
- [4] Ekmektzoglu KA, Xanthos T, Papadimitriou LI Biochemical markers (NSE,S-100B,IL-8) as predictors of neurological outcome in patients after cardiac arrest and return of spontaneous circulation [J] Resuscitation,2007,75(2): 219
- [5] 张颖,蒋玉凤,刘智勤等.丹酚酸 B 对小鼠脑缺血不同时间脑能量代谢及脑水肿的作用[J] 药理学报.2007,42(12):1250-1253
Zhang Ying, Jiang Yu-feng, Liu Zhi-qin, et al. Effect of salvianolic acid B on brain energy metabolism and hydrocephalus of cerebral ischemia in mice at different time.[J] Acta Pharmaceutica Sinica, 2007,42(12):1250-1253
- [6] 秦历杰.外源性磷酸肌酸治疗急性脑梗死的疗效观察[J].中国实用神经疾病杂志,2007,10(3):31-32.
Qin Li-jie. Clinical observation of the effects of exogenous hosphocreatine on acute cerebral infarction.[J]
Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2007,10(3):31-32
- [7] 郭丽,陈海丽,赵宗茂,宋学琴.外源性磷酸肌酸对急性中型脑梗死的疗效评价 [J]临床荟萃,2008,23(14):1016-1018
Guo Li, Chen Hai-li, Zhao Zong-yue, Song Xue-qin, et al. Clinical observation of effects of exogenous phosphocreatine on acute mid-ranged cerebral infarction [J] Clinical Focus, 2008, 23 (14): 1016-1018
- [8] Fodak PW, Paraerine effects of cell transplantation: modifying ventricular remodeling in the failing heart [J]. Semin Thorac Cardiovasc surg,2008;20(2):87-93
- [9] Bottomley PA, Wu KC, Gerstenblith G, et al. Reduced myocardial creatine kinase flux in human myocardial infarction:an in vivo phosphorusmagnetic resonance spectroscopy study [J].Circulation, 2009,119(14):1918-1924
- [10] Parodi M, Robaudo R, Perassos L, et al. Effects of exogenous enmtine pupolation spike amplitude and on postanoxic hyperexcitability in brain slices [J].Brain Research,2003,963 (1/2): 197-202
- [11] Balestrino M, Lensman M, Parodi M, et al. Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage[J]. Amino Acids,2002,23(1/3):221-229
- [12] Ganga Prabhakar, Lida Vona-Davis, David Murray, et al. Phosphocreatine regetoes high energy phosphates in ischemic myocardium: implication for off-pump cardiac revascularization. [J]. J Am Coll Surg,2003, 197(5):786-791

(上接第 3918 页)

- [10] Marchetti G, Patraechini P, PaPacehini M, et al. A polymorphism in the 5' region of coagulation factor VII gene (F7) caused by an inserted decanucleotide[J]. Hum Genet, 1993, 90(7): 525-576
- [11] Girelli D, Russo C, Ferraresi P, et al. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in Patients with coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2000, 343(9): 774-780
- [12] Sabater-Lleal M, Chillon M, Howard TE, et al. Functional analysis of the genetic variability in the F7 gene Promoter[J]. Atherosclerosis, 2007, 5 (2): 189-195
- [13] Sabater-Lleal M, Chillon M, Howard TE, et al. Functional analysis of the genetic variability in the F7 gene Promoter[J]. Atherosclerosis, 2007, 5(2): 189-195
- [14] Shimokata K, Kondo T, Ohno M, et al. Effects of coagulation factor VII Polymorphism on the coronary disease in Japanese Factor VII polymorphism and coronary disease [J]. Thromb Res, 2002, 105 (6): 493-498
- [15] Lievers KJ, Mennen LI, Rattink AP, et al. The-323Ins10 polymorphism for factor VII is not associated with coronary atherosclerosis in symptomatic men [J]. Thromb Res, 2000, 97 (5): 275-280