

[文章编号] 1007-3949(2007)15-06-0445-03

•临床研究•

# 华南汉族脑出血患者凝血因子 R353Q 基因型的检测

黄志军, 王水云, 甘美连, 黄璐璐, 柏承文, 黄晓勇

(深圳市人民医院 暨南大学第二临床医学院, 广东省深圳市 518020)

[关键词] 神经病学; 脑出血; 凝血因子; 基因多态性; 基因型; 等位基因分布频率

[摘要] 目的 观察凝血因子 R353Q 基因多态性在华南汉族人群中的分布及其与脑出血的关系。方法 应用聚合酶链反应和限制性内切酶片长多态性技术检测了 36 例脑出血患者和按年龄、性别、体重、职业、吸烟史、胆固醇、甘油三酯和血糖等因素与脑出血患者配对的 36 例正常对照者的凝血因子 R353Q 基因型, 探讨脑出血的发生与因子 R353Q 基因型的关系。结果 凝血因子 R353Q 基因型有 RR、RQ 和 QQ 三种, 这三种基因型在对照组的分布频率分别是 80.5%、16.7% 和 2.8%; 在脑出血组为 80.5% 和 19.5%, 未检测到 QQ 基因型。等位基因 R 和 Q 基因频率在对照组为 88.9% 和 11.1%, 在脑出血组为 90.3% 和 9.7%。基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。R353Q 基因型频率和等位基因频率在脑出血组 and 对照组之间比较差异均无显著性。结论 没有发现凝血因子 R353Q 基因多态性与华南汉族脑出血的发生有明显关系。

[中图分类号] R74

[文献标识码] A

## Association of Coagulation Factor Gene Polymorphisms with Brain Bleeding Patients of Han Chinese in South of China

HUANG Zhi Jun, WANG Shui Yun, GAN Mei Lian, HUANG Luo Luo, BAI Cheng Wen, and HUANG Xiao Yong

(Department of Emergency, Shenzhen People's Hospital, the Second clinical medical college, Jinan University, Shenzhen 518020, China)

[KEY WORDS] Brain Bleeding; Coagulation Factor; R353Q Gene Polymorphism; Han Chinese of Southern China

[ABSTRACT] Aim To study the distribution of coagulation factor gene polymorphisms in Chinese Han population and the association of the polymorphisms with brain bleeding. Methods Genotypes of coagulation factor were typed in 36 brain bleeding patients and 36 controls by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Results Coagulation factor allelic frequencies of R, Q were 90.3%, 9.7% and 88.9%, 11.1% in brain bleeding group and control group respectively. Genotype distribution was in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. There was no significant difference in frequencies of allele and genotype in R353Q polymorphisms between brain bleeding group and control group. Conclusion The R353Q polymorphisms of the coagulation factor gene may not have a relationship with brain bleeding patients of Han Chinese in southern of China.

脑出血是多基因疾病, 随着人类基因组计划的迅速发展, 脑出血相关基因的定位和识别已成为研究的热点。近年来, 一些研究显示凝血因子基因多态性与脑出血有密切关系, 且这种相关性与种族有关。我们应用聚合酶链反应-限制片长多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 核苷酸分型技术, 研究了凝血因子 (coagulation factor) 基因 R353Q 突变在华南汉族脑出血患者和正常人中的发生率, 探讨华南汉族人群中其与脑出血的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

所有研究对象均来自深圳地区祖籍广东的汉族人群, 无血缘关系。36 例脑出血患者, 其中男性 19 例, 女性 17 例, 年龄  $61.0 \pm 9.4$  岁。均符合 1979 年 WHO 关于脑出血的诊断标准, 并全部经头部 CT 证实。正常对照组系健康体检正常的深圳地区祖籍广东的汉族人群, 按年龄、性别、体重、职业、吸烟史、甘油三酯、胆固醇、血糖等因素与脑出血患者配对, 选出 36 名, 其中男性 19 名, 女性 17 名, 年龄  $61.8 \pm 10.1$  岁。

### 1.2 血清分离及 DNA 提取

清晨空腹取外周静脉血 5 mL, 枸橼酸钠抗凝; 用  $1.5 \text{ kr/min}$  离心 8 min, 收集上清液置  $4^\circ\text{C}$  保存备用。采用低渗溶血法获得白细胞, 以常规酚-氯仿抽提法提取 DNA, TE 溶解  $4^\circ\text{C}$  保存备用。

[收稿日期] 2007-05-18 [修回日期] 2007-06-08

[基金项目] 深圳市科技局(200405020)资助

[作者简介] 黄志军, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事急诊急救及心脑血管病与凝血因子基因多态性关系研究, 联系电话 0755-25533018-2965, E-mail 为 szhuangzhijun@163.com。王水云, 男, 主任医师, 主要从事心脑血管病研究, 联系电话 0755-25533018-3170。甘美连, 女, 副主任护师, 从事急诊急救的护理, 联系电话 0755-25533018-2905, E-mail 为 Gml3318@yahoo.com。

1.3 聚合酶链反应扩增

参照文献[1],上游引物为 5'-GGG AGA CTC CCA AAT ATC AG-3',下游引物为 5'-ACG CAG CCT TGG TTT CTC C-3',均为上海生工公司合成。采用 PCR 技术扩增凝血因子 基因外显子 8 含 R353Q 的特异性 DNA 片段。反应体系为上、下游引物各 1.5 μL,10 倍缓冲液 2.5 μL,dNTP 1μL,Taq 酶 1.5 U,模板 DNA 2 μL,灭菌双蒸水补足致总体积 50 μL。反应条件为 94℃预变性 5 min 后;94℃变性 1 min → 56℃退火 1 min → 72℃延伸 1 min,共 35 个循环;72℃再延伸 5 min(Gene Ampsystem 2400)。

1.4 凝血因子 R353Q 基因分型

取纯化 PCR 产物 20 μL 用限制性内切酶 Msp (Promega 公司)酶切,37℃水浴 4 h,消化片段在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色后通过 UV 凝胶成像系统判定结果。

1.5 血脂、血糖和其他指标的检测

取上清液在全自动生物化学分析仪上检测尿素氮,氧化酶法测空腹血糖,酶法测总胆固醇和甘油三酯。并常规检测血压,称体重。

1.6 统计学处理

基因型和等位频率采用计数法统计。研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、基因型和等位基因频率的组间比较采用  $\chi^2$  检验,对样本数小于 40 的计数资料用四格表确切概率法,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,并用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著性,SPSS11.5 软件处理。

2 结果

2.1 两组的临床资料特征比较

两组的临床资料如表 1 所示,可见两组间性别构成比、年龄、血糖、甘油三酯、肝肾功能方面差异无显著性。

2.2 基因型分析

凝血因子 R353Q 基因经 PCR 扩增片长为 312 bp,Msp 酶切发现基因型有 3 种,分别是 RR(片长为 206 bp、67 bp 和 39 bp)、RQ(片长为 273 bp、206 bp、67 bp 和 39 bp)和 QQ(片长为 273 bp 和 39 bp);三种基因型的分布频率见表 2。

2.3 两组基因多态性分布比较

凝血因子 R353Q 基因型在两组人群中分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡(R353Q:  $\chi^2=0.238, P > 0.05$ )。凝血因子 等位基因 R 与 Q 频率在脑出血组和对照组分别为 90.3% 与 9.7% 和 88.9% 与

11.1%。经检验基因型 RR、RQ 和 QQ 在两组中的分布差异无显著性统计学意义;等位基因 R 与 Q 在两组中的分布差异亦无显著性统计学意义(表 2)。

表 1. 两组的临床特征比较

参 数	对照组	脑出血组
<i>n</i>	36	36
男性比	0.528	0.528
体重 (kg)	67.3±8.3	68.8±7.2
收缩压 (mmHg)	125.5±16.8	135.2±18.7
舒张压 (mmHg)	78.6±8.2	80.6±9.2
总胆固醇 (mmol/L)	4.8±1.1	5.0±1.2
甘油三酯 (mmol/L)	1.5±0.6	1.6±0.8
空腹血糖 (mmol/L)	5.3±0.5	5.5±1.2
尿素氮 (mmol/L)	4.6±0.6	4.3±1.3

表 2. R353Q 基因型和等位基因在两组的分布

分 组	基因型			等位基因频率	
	RR	RQ	QQ	R	Q
对照组	29(80.5%)	6(16.7%)	1(2.8%)	64(88.9%)	8(11.1%)
脑出血组	29(80.6%)	7(19.4%)		65(90.3%)	7(9.7%)

3 讨论

遗传因素在脑出血的发生和发展中起着重要作用,早期筛选和识别脑出血高危人群是当今医疗研究的重点。文献[1]报道,载脂蛋白 E 基因多态性、血管紧张素转化酶基因多态性、雌激素受体基因多态性,以及屏氧酶 1(paraoxonase1)基因 192 位 Gln-Arg 多态性(PON1Q/R192)等都与脑出血发生有一定关系。

高血压脑出血与脑梗死一样,机体处于高凝状态,杜贻萌等<sup>[2]</sup>发现血浆活化凝血因子 水平增高是高血压合并脑梗死的重要危险因素,两者均为血管内皮细胞、血小板、凝血和抗凝等多种因素导致的病理状态,脑出血后继续出血也与凝血因子有一定的关系。凝血因子基因多态性与脑出血的发生也有关系。凝血因子 ③ ④是凝血途径最后一步的关键酶,在正常凝血过程中起着交联纤维蛋白的重要作用,其基因 2 号外显子上的 34 号密码子 G-T 突变,对出血性脑卒中可能是一种危险因素<sup>[3]</sup>。此外凝血因子 ⑦(Leiden)也可能减少自发性脑出血的发生率。

凝血因子 是肝脏合成的一种维生素 K 依赖性的单链糖蛋白,由 406 个氨基酸残基组成,分子质

量约 50 kDa。单链的凝血因子 Ⅲ 并无活性, 转变为双链形式后即形成有酶活性的凝血因子 Ⅲa。在血浆中凝血因子 Ⅲ 主要以酶原形式存在, 而活性形式的凝血因子 Ⅲa 含量仅占约 1%, 血浆浓度仅 0.5~2 mg/L, 其半衰期为 6~8 h。其基因含 9 个外显子, 全长 12.8 kb, 染色体定位在 13p34。凝血因子 Ⅲ 在外源性凝血途径中起关键作用。组织损伤时, 血浆中低水平的凝血因子 Ⅲa 作为外源性凝血途径的始发因子, 在  $\text{Ca}^{2+}$  存在的条件下, 与暴露的血管内膜下组织释放的组织因子组合为复合物凝血因子 Ⅲa-组织因子后, 激活凝血因子 X 成为凝血因子 Xa, 启动外源性凝血。同时无活性的凝血因子 Ⅲ 也以同等的亲和力与 TF 组成凝血因子 Ⅲ 复合物, 凝血因子 Xa 可反馈性激活该复合物, 与凝血因子 Ⅲ 的自我激活作用(凝血因子 Ⅲa 激活凝血因子 Ⅲ)一起放大了凝血作用<sup>[4]</sup>。此外凝血因子 Ⅲa-TF 还可激活凝血因子 Ⅲ, 启动内源性凝血。

由于血液中凝血因子 Ⅲ 活性的测定易受饮食、运动和药物治疗等因素的影响, 因此凝血因子 Ⅲ 基因多态是预测疾病发生的较好指标<sup>[5]</sup>。日前发现凝血因子 Ⅲ 基因有 4 种多态性: 启动区 323 处 10 bp 插入-缺失多态性(A1/A2)、多功能区 353R/Q(位于 8 号外显子)、启动子区 400G/A 及可变区 32bp 重复序列 7(H7/H6/H5)。其中凝血因子 Ⅲ R353Q 基因多态中 Q 等位基因可能是对抗心肌梗死的遗传保护因子, 其原因是凝血因子 Ⅲ R353Q 基因型影响了凝血因子 Ⅲ 的活性<sup>[6,7]</sup>。

鉴于凝血因子 Ⅲ 在凝血系统中的重要性及脑出血与凝血系统的可能联系, 本文探讨凝血因子 Ⅲ R353Q 多态与脑出血的关系。应用聚合酶链反应和

限制性内切酶片段长度多态性技术检测了 36 例脑出血患者和正常对照者的凝血因子 Ⅲ R353Q 基因型, 探讨两者的关系。结果凝血因子 Ⅲ 等位基因 R 与 Q 基因频率在脑出血组和对照组分别为 90.3% 与 9.7% 和 88.9% 与 11.1%。基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。R353Q 基因型频率和等位基因频率在脑出血组和对照组之间比较差异均无显著性统计学意义。这表明, 此组资料未显示凝血因子 Ⅲ R353Q 基因多态性与华南汉族脑出血的发生有明显关系。表明凝血因子 Ⅲ 基因 R353Q 多态位点可能不是此组人群脑出血遗传机制和遗传标志。此文所选病例较少, 今后有必要增加病例检测以印证此文的结果。

#### [参考文献]

- [1] 黄赛玉, 谭利明, 肖志杰, 蒋波, 吴军, 卢伟. 载脂蛋白 E 基因多态性与不同性别老年脑出血患者的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2006, 8(4): 252-254.
  - [2] 杜贻萌, 路方红, 王克志, 吴凡, 田奇, 孙慧, 等. 凝血因子 Ⅲ 及其基因 MspI 多态性与高血压合并脑梗死的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(6): 691-694.
  - [3] 张玉蓉, 李正仪. 凝血因子 Ⅲ @Val34Leu 多态性与心脑血管疾病[J]. 国外医学·脑血管疾病分册, 2003, 11(5): 384-386.
  - [4] Girelli D, Russo C, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Friso S, et al. Polymorphisms in the factor gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(11): 774-780.
  - [5] Mrozikiewicz PM, Cascorbi I, Ziemer S, Laule M, Meisel C, Stangl V, et al. Reduced procedural risk for coronary catheter interventions in carriers of the coagulation factor -Gln353 gene [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(5): 1520-1525.
  - [6] Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular disease [J]. *Am J Cardiol*, 2001, 87(12): 1361-1366.
  - [7] Cai QJ, Chen JL, Ma HL, Song J, Xu MF. Association of coagulation factor with the risk of myocardial infarction in the Chinese [J]. *Chin Med J*, 2000, 113(12): 1059-1063.
- (此文编辑 胡必利)