

心肌梗死患者凝血因子 V 基因多态性和 APCR 及 Hcy 的关系

高丽霞¹ 吴克雄¹ 胡军¹ 东传令¹ 王学锋² 丁秋兰² 戴箐² 张学平³ 王云霞⁴

【摘要】 目的:研究心肌梗死患者活化蛋白 C 抵抗(APCR)和凝血因子 V 基因 3 种多态性及高同型半胱氨酸血症(Hcy)的关系。方法:心肌梗死患者和正常对照血浆中 APCR 检测采用 APTT 为基础的凝固法,Hcy 检测采用微循环酶法,并用限制性内切酶片段多态性方法测定 FV G1691-A、G1091-C、A1090-G 等 3 种基因多态性的发生情况。结果:心肌梗死患者 APCR 阳性占 16.25%,Hcy 阳性占 57.12%,1 例维吾尔族患者患者 3 种基因多态性阳性。结论:心肌梗死患者 Hcy 阳性率明显高于正常对照。Hcy 可能是引起心肌梗死患者脑血栓形成的原因之一。心肌梗死患者存在 APCR 现象,维吾尔族人可能和凝血因子 V 基因 3 种多态性有关。

【关键词】 心肌梗死;高同型半胱氨酸血症;活化蛋白 C 抵抗;凝血因子 V;基因多态性

【中图分类号】 R542.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2012)03-0169-03

Analysis the relationship of Factor V,APCR,and Hcy in acute myocardial infarction patients

GAO Lixia¹ WU Kexiong¹ HU Jun¹ DONG Chuanling¹ WANG Xuefeng²
DING Qiulan² DAI Qing² ZHANG Xueping³ WANG Yunxia⁴

(¹Department of Hematology and Oncology, Karamay Central Hospital, Karamay, Xinjiang, 834000, China; ² The Blood Transfusion Affiliated Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University; ³Laboratory Karamay Central Hospital; ⁴Xinjiang Urumqi Center for Disease Control and Prevention)

Corresponding author: GAO Lixia, E-mail: gaolixia2006m@163.com

Abstract Objective: To investigate the relationship of gene polymorphism of coagulation factor V with activated protein C-resistance(APCR)and Hyperhomocysteinemi(Hcy)in acute myocardial infarction patients. **Method:** APCR, Hcy, and FV G1691-A, G1091-C, A1090-G gene polymorphism were assayed in 80 acute myocardial infarction patients and 100 normal subjects. **Result:** Positive rate of APCR and Hcy in patients with acute myocardial infarction was 16.25%, 57.12% respectively. There was one patients having 3 types of FV gene mutation. **Conclusion:** There were especially high positive Hcy rate and Hcy may be one of the important causes of thrombosis in patient with acute myocardial infarction. APCR phenomenon existed in acute myocardial infarction patients of Uyghur, it may have relation with factor V gene mutation.

Key words myocardial infarction; activated protein c-resistance; hyperhomocysteinemi; factor V; genepolymorphism

急性心肌梗死发病率为 42/10 万,而且在逐年递增。该病的发生、发展与凝血系统、抗凝系统的失衡密切相关,最近研究发现高同型半胱氨酸血症(Hcy)和活化蛋白 C 抵抗(APCR)可以引起血栓形成,而 APCR 与凝血因子 V 基因多态性相关。本文拟探讨心肌梗死患者与 Hcy、APCR 及凝血因子 V 基因多态性的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

对照组:我院体检健康者 100 例,年龄 36~75 岁,经体检无血栓性疾病症状和体征,无心、肝、肾病史,无服药史,各项体检指标正常。心肌梗死组:

我院心血管内科住院患者 80 例,年龄 35~81 岁,符合全国第二次心血管病学术会议诊断标准(1986 年),近期(1 个月内)无严重感染史、手术史和外伤史,无服用抗血小板药、抗凝药史。

1.2 标本采集与制备血液标本

用含 3.2%枸橼酸钠的硅化试管采集。枸橼酸钠与血液的比例为 1:9,以 2 500 r/min 离心 15 min 后分别收集乏血小板血浆和血细胞部分,分装后置于一 70℃ 保存备用。同时采取清晨空腹静脉血 5 ml 2 管,30 min 内 4℃ 离心,一 20℃ 保存血清。

1.3 方法

1.3.1 试剂 凝血相关项目的试剂、测定纤维蛋白原及 Hcy、APCR、D 二聚体的测定试剂盒,均购自美国 Strumentation Laboratory 公司,并用 Strumentation Laboratory ACLEITE 型全自动血凝仪

¹克拉玛依市中心医院血液肿瘤科(新疆克拉玛依,834000)

²上海交通大学附属瑞金医院输血科

³新疆克拉玛依市中心医院检验科

⁴新疆乌鲁木齐市疾病预防控制中心

通信作者:高丽霞, E-mail: gaolixia2006m@163.com

进行测定。其中 Hey 的测定采用在美国贝克曼 DXC800 全自动分析仪采用循环没法测定血清中总的 Hcy 水平,正常血清 Hcy 的浓度为 5~12 $\mu\text{mol/L}$,高于此值为高 Hcy 血症。血清叶酸、维生素 B_{12} 浓度的测定采用阴离子捕获技术微粒子酶联免疫分析法。APCR 试剂盒在传统测定的基础上用该公司特制的乏因子 V 血浆来稀释标本后测定,可对抗口服抗凝治疗和肝素的干扰,大大提高了测定的特异性和敏感性对 FV Leiden 的敏感性可达 99%,并可区别杂合子和纯合子。

1.3.2 凝血因子 V G1691-A、G1091-C、A1090-G 3 种基因突变筛选 DNA 提取和 PCR 反应从各组标本的外周血提取基因组 DNA,所用试剂为上海生工的微柱法 DNA 提取试剂盒。PCR 反应所用引物由上海生工合成。酶切反应所用内切酶购自上海生工。对于 FV G1691-A(Arg 506-Glll),PCR 引物:上游 5'-CATGAGAGACATCGCCTC-TG-3',下游 5'-GACCTAACATGAGGCAGG3',产物 326 bp,为包含 Arg506 的 FV 第 10 外显子片段;对于 FV G1091-C(Arg 306Thr)、A1090-G(Arg306Gin),PCR 引物:上游 5' TGTCTITCT-GTCCTAAC3',下游 5' TCGAACCCA3',产物 228 bp,为包含 Arg 306 的 FV 第 7 外显子片段。以上 PCR 反应体系均为:模板 DNA 0.5 g,dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$,引物 250 $\mu\text{mol/L}$,HS. Taq 酶 1.25 U,反应缓冲液为 10 mmol/L Tris, HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl_2 , pH 8.3。扩增条件:95℃变性 5 min,然后 95℃ 50 s,57℃ 60 s 72℃ 70 s;循环 35 次,最后 72℃ 保温 10 min。使用的扩增仪为 Hema 480。酶切反应及多态性判断:①FV G1691-A。取 PCR 产物 20 L,加入 MnlI 及酶切缓冲液,37℃ 水浴 16 h,上 2% 琼脂糖凝胶 2 V/cm 电

泳 3~4 h 后紫外灯下观察,正常应出现 121、205 bp 2 条带。②FV G1091-C 和 A1090-G。取 PCR 产物 LOL 先加入 BstN I 及酶切缓冲液,37% 水浴 16 h 后,上 2% 琼脂糖凝胶电泳,无突变者存在两个酶切位点,经酶切后形成 3 个片段长度 37、101、248 bp 的产物,则说明无 FV G1091-C 或 A1090-G 存在;纯和突变者:其中 1 个酶切位点消失,只存在 1 个酶切位点,经酶切后形成 126 和 274 bp 的 2 个片段;若发生杂合突变者,经酶切后可形成 37、101、138 和 248 bp 4 个片段。

1.4 统计学处理

应用 SPSS1 1.5 软件包进行统计学处理。计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,率的比较用配对 χ^2 检验,2 组间均数比较用配对 t 检验,脑梗死组与对照组的血清 Hcy 水平比较用配对 t 检验,多危险因素用 Logistic 回归分析。以双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组的基本情况与传统危险因素与脑梗死的关系

2 组患者共 180 例,其中心肌梗死组有冠心病 34 例(42.5%),高于对照组的 12 例(12.0%)($P < 0.01$),而高血压、糖尿病、BMI、吸烟及饮酒 2 组比较均差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。本研究为 1:1 配对的病例对照研究,2 组男女比例相同(男性占 53.8%,女性占 46.2%);梗死组平均年龄(62±8)岁,对照组平均年龄(59±7)岁。

2.2 2 组各项指标测定

2 组各项指标测定结果见表 2。

2.3 基因突变

筛检 80 例患者及 100 例支持对照 FV Leiden 位点的基因突变,1 例检出阳性结果,见图 1、2。

表 1 心肌梗死组和正常对照组临床资料比较

组别	例数	冠心病/例(%)	糖尿病/例(%)	高血压/例(%)	饮酒/例(%)	吸烟/例(%)	BMI/($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)
心肌梗死组	80	34(42.5) ¹⁾	16(20.0)	12(15.0)	8(17.8)	14(31.1)	23.76±3.83
正常对照组	100	12(12.0)	19(23.8)	13(13.0)	6(10.9)	13(23.6)	21.18±3.68

与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 心肌梗死组和正常对照组各项指标测定结果

组别	Fg/(g · L ⁻¹)	D 二聚体	Ⅶ / %	Ⅷ / %	Ⅹ / %	vWF / %
心肌梗死组	3.99±1.24 ¹⁾	1589.18±3432.21 ²⁾	153.35±41.45 ¹⁾	158.32±34.13 ¹⁾	129.32±38.54 ¹⁾	169.73±63.65 ¹⁾
对照组	3.11±0.51	262.18±121.02	102.21±21.13	110.95±24.23	109.52±21.82	108.31±45.18

组别	APCR	阳性率 / %	Hcy/(μmol · L ⁻¹)	阳性率 / %	FV Leiden 阳性率 / %
心肌梗死组	2.01±0.21 ¹⁾	13(16.25)	15.02±3.89 ¹⁾	45 (57.12)	1(1.25)
对照组	2.45±0.35	6(6.0)	8.96±3.62	6 (6.08)	0(0)

与正常对照比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;Hcy 值 > 12 提示 Hcy 阳性;APCR 比值 < 2.0 提示 APCR 阳性。

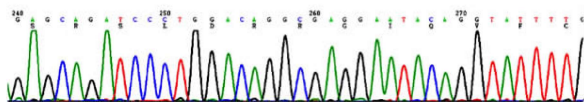


图1 正常对照

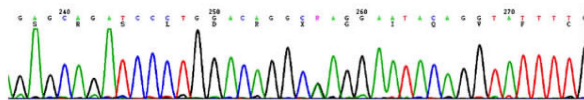


图2 阳性患者测序图

3 讨论

目前血栓性疾病发病率高,病死率亦高。APCR现象是欧美等国导致血栓形成的重要原因,血栓病患者中高达40%^[1-2],认为在脑卒中和心肌梗死患者APCR发生率分别可达20%和9%。而在正常人群中仅为5%,新疆健康人群中APCR发生率(6.28%)。我们研究表明在正常对照组及心肌梗死患者中APCR阳性率分别为6.00%和11.25%,且发现在APCR阳性者有1例FV Leiden突变。这和欧美国家所报道的APCR阳性患者中有90%系FV Leiden所致的报道显然不同,与国内大多数实验室以及亚洲国家的报道相似。引起APCR的原因有待进一步研究。血浆APCR活性检测对患者的诊断、估计预后和疗效观察有一定的临床参考价值。

APCR是近年来发现的发生率较高的一种遗传性血栓风险因素,蛋白C是抗凝系统的主要调节因子,APC能降解Ⅷ和V因子,具有显著的抗血栓功能。发生于凝血因子V(FV)基因的第1691位核苷酸的点突变(G→A)可以导致APCR现象,该突变被称作FV Leiden突变。由于这个位点的核苷酸由G变为A,导致FV的第506位氨基酸由精氨酸(Arg)变成谷氨酰胺(Gln),而Arg506正是APC的切割位点之一,突变后的FV a保留了FV a的促凝血性,但被APC降解的速度大大降低,从而表现出APCR现象。Middendorf等^[3]研究表明:心肌梗死患者中FV Leiden患病率8.7%,明显高于对照,有这种基因突变的心肌梗死患者存在着遗传缺陷。我们在80例心肌梗死患者中(汉族42例,维吾尔族38例),发现1例APCR阳性者且FV Leiden突变者为新疆维吾尔族女性,年龄44岁,可见新疆维吾尔族APCR现象可能与FV Lei-

den突变有一定的关联。新疆维吾尔自治区是多民族居住区,地理位置上处于亚欧交界地带,今后最好做较大规模的多民族间的研究,以明确少数民族人群血栓形成的因素。

近年的大量研究表明,Hcy血清浓度增高与心血管疾病的发生有十分密切的关系,近来又有研究发现血清同型半胱氨酸升高与外周动脉疾病及静脉栓塞等血管疾病相关,被认为心血管疾病的独立危险因素之一^[4]。高Hcy血症近年来几乎被公认为是致动脉粥样硬化发生、发展的新的危险因素,与心肌梗死、脑卒中发病有关,并与疾病的预后相关,血浆Hcy水平越高,远期生存率越低^[5]。本研究表明,心肌梗死组血浆Hcy水平高于对照组,血浆Hcy水平随着冠状动脉病变程度的增加显著增高,且与冠心病的发病密切相关,是冠心病发病的危险因素,但心肌梗死Hcy水平与发生凝血因子V(FV)突变无相关性。

参考文献

- [1] BERTINA R M, KOELENLAN B P, KOSTER T, et al. Mutation in blood coagulation factor associated with resistance to activated protein C[J]. *Nature*, 1994, 369: 64-67.
 - [2] COOPER D N, CHEN J M, BALL E V, et al. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics[J]. *Hum Mutat*, 2010, 31: 631-55.
 - [3] MIDDENDORF K, GOHRING P, HUEHNS T Y, et al. Prevalence of resistance against activated protein C resulting from factor V Leiden is significantly increased in myocardial infarction: investigation of 507 patients with myocardial infarction[J]. *Med Clin I*, 2004, 147: 897-904.
 - [4] OZKAN Y, OZKAN E, SIMSEK B. Plasma total homocysteine and cysteine levels cardiovascular risk factors in coronary heart disease[J]. *Int Cardiol*, 2002, 82: 267-277.
 - [5] TWATARGIL A, SADAN G, KARASU E. Homocysteine-induced changes in vascular reactivity of guinea-pig pulmonary arteries role of the oxidative stress and poly(ADP ribose) polymerase activation[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2007, 20: 265-272.
- (收稿日期:2011-04-26 修回日期:2011-10-17)