

GPVI与湖北地区汉族人群冠状动脉 疾病发生风险的关联研究*

吴莹莹¹ 唐亮¹ 邓君¹ 刘敬迪¹ 汪清云¹ 程志鹏¹ 胡蓓¹ 杨焰¹ 秦铀² 胡豫¹

[摘要] 目的:冠状动脉疾病(CAD)是威胁人类健康的主要疾病之一。血小板的活化及其与细胞外基质的粘附在CAD的发生、发展中发挥重要的作用。GPVI基因编码的GP α 2 β 1是一种血小板膜蛋白,通过Ca²⁺离子通道传导信号引起血小板聚集而形成血栓。湖北地区汉族人群中关于CAD易感基因的分子特征尚不明确。因此,我们开展了编码GP α 2 β 1血小板膜蛋白的GPVI基因与CAD易感性的相关研究。**方法:**将102例CAD患者GPVI基因的启动子区、外显子区、剪切区及非翻译区进行重测序,查找引起CAD的致病突变;采用病例-对照研究评价c.940C>G(p.Pro314Ala)突变对CAD发生风险的优势比;并用生物信息学工具评价c.430G>A(p.Ala144Thr),c.655C>T(p.Pro219Ser),c.940C>G(p.Pro314Ala)突变的危害性。**结果:**本研究发现,GPVI c.940C>G(p.Pro314Ala)与CAD不存在明显的相关性(OR=0.984,95%CI 0.746-1.298,P=0.90894)。**结论:**本研究发现存在于湖北地区汉族人群中GPVI基因突变体c.940C>G(p.Pro314Ala)可能不是导致CAD患病风险增加的遗传学因素。

[关键词] 冠状动脉疾病;GPVI;基因突变

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.03.006

[中图分类号] R543.3 **[文献标志码]** A

Research on the genetic relationship between GPVI and coronary artery disease in Hubei Han population

WU Yingying¹ TANG Liang¹ DENG Jun¹ LIU Jingdi¹ WANG Qingyun¹
CHENG Zhipeng¹ HU Bei¹ YANG Yan¹ QIN You² HU Yu¹

(¹Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Cancer Centre, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: HU Yu, E-mail: dr_huyu@126.com

Abstract Objective: Coronary artery disease (CAD) is one of the major diseases that threaten human health. Platelet activation and extracellular matrix adhesion play a significant role in the occurrence and progress of CAD. GP α 2 β 1 coded by GPVI leads to thrombosis through platelet aggregation and Ca²⁺ signaling. Molecular character of susceptibility of CAD in Hubei Han population is unknown. Therefore, we carried out a susceptibility research on the association between the gene GPVI encoding GP α 2 β 1 platelet membrane protein and CAD. **Method:** Genetic mutation was identified by direct genomic DNA sequencing in un-translated regions, promoter regions, eight exons and flanking intronic regions of GPVI in 102 CAD patients. The odds ratio of c.940C>G (p.Pro314Ala) for CAD was measured in a case (CAD patients)-control study. The possible impact of amino acid substitutions c.430G>A (p.Ala144Thr), c.655C>T (p.Pro219Ser), c.940C>G (p.Pro314Ala) on the structure and function of the GP α 2 β 1 platelet membrane protein were assessed through three bioinformatics tools. **Result:** GPVI c.940C>G (p.Pro314Ala) was not associated with CAD (OR=0.984,95%CI 0.746 to 1.298, P=0.90894). **Conclusion:** GPVI c.940C>G (p.Pro314Ala) is not a genetic determinant of an increased risk of CAD in Hubei Han population.

Key words coronary artery disease; GPVI; gene mutation

近年来冠状动脉疾病(CAD)发病率逐年上升,已成为威胁人类健康的主要疾病之一。CAD的发生和发展是在环境因素和遗传因素的基础上,多重危险因素共同作用导致的。急性冠脉综合症的病

理基础是粥样斑块破裂进而血栓形成,与内皮细胞的功能和血小板的活化密切相关。血小板在血栓形成和血管内皮活化进程中发挥重要的作用^[1]。动脉粥样硬化的血管内皮细胞暴露于血液后,内皮细胞表面的血栓素受体与血小板产生的血栓素结合后激活单核细胞、巨核细胞及平滑肌细胞等,氧化应激相关的因子也参与到整个过程中,产生炎症反应,加速细胞因子的释放,启动凝血途径。血小

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81370622,81400099,81202962)

¹华中科技大学附属协和医院血研所(武汉,430022)

²华中科技大学附属协和医院肿瘤中心

通信作者:胡豫,E-mail:dr_huyu@126.com

板膜糖蛋白是一种存在于血小板质膜的糖蛋白,对血小板的聚集和粘附有重要作用。国外开展了大量关于血小板膜糖蛋白基因多态性和 CAD 的关联研究,但是在湖北地区汉族人群中的研究却不多。国外有文献报道,位于血小板内皮聚合受体-1 (PEAR1)上的基因多态性(rs12041331)引起 CAD 发生风险增加 2.62 倍(95% CI 0.96-7.10)^[2]。血小板膜蛋白 GPVI 是新发现的胶原受体之一,在介导血小板与胶原粘附,快速信号转导,血小板活化及促凝活性表达等复杂过程中处于中心位置。因此,我们分析湖北地区汉族人群 GPVI 基因与 CAD 发生风险的关联。

1 资料与方法

1.1 资料

研究人群为 2013-09-2015-09 在湖北省血栓与止血临床医学研究中心诊治的 414 例非选择性 CAD 患者及 474 例无 CAD 史及家族史的健康人。CAD 的诊断依赖于症状、体征及血管造影的客观依据(至少有一支冠状动脉或主要分支管腔狭窄>50%)^[3]。

1.2 GP6 基因测序

利用上述随机挑选的 102 例 CAD 患者的 DNA 进行 GPVI 基因的重测序,查找引起 CAD 的致病突变。设计 8 对特异性引物扩增 GPVI 基因的启动子、编码区、剪切区及非翻译区。PCR 产物纯化后测序,结果与 NCBI 参考序列 NM_000506.3 比对查找存在的基因变异。

1.3 GPVI 基因 p. P314A 基因分型

对发现的 GPVI 基因 c. 940C>G (p. Pro314Ala)应用直接测序法(Sanger 末端终止法)进行病例-对照研究。

1.4 生物信息学分析

测序所发现的错义突变用生物信息学软件 mutation taster, PolyPhen-2, SIFT 预测其可能产生的蛋白功能和结构的改变。

1.5 统计学处理

基因型采用基因直接计数法,组间基因型比较采用 χ^2 检验,并以 OR 及 95% CI 表示相对风险度。

2 结果

2.1 GP6 基因测序

选择的 102 例 CAD 患者中,男 46 例,女 56 例,中位年龄 55 岁,7 例有 CAD 家族史,26 例有吸烟史,17 例有饮酒史,33 例有高血压史,29 例有 2 型糖尿病史,总胆固醇为(3.91±1.06) mmol/L,总甘油三酯为(1.52±1.05) mmol/L,高密度脂蛋白为(1.21±0.28) mmol/L,低密度脂蛋白为(2.05±0.86) mmol/L。

对 102 例患者 GP6 基因的启动子、编码区、剪切区域及非翻译区重测序发现了 2 种基因多态性和 1 种罕见的错义突变(表 1)。1 例 65 岁的男性患者发生了 c. 430G>A(p. Ala144Thr)突变,病变主要位于前降支,左室射血分数降低(45%),患者合并有高血压和二尖瓣关闭不全。生物信息学软件 mutation taster 预测该突变是多态性, PolyPhen-2 预测值为 0.000(良性)及 SIFT 预测值为 0.25(大于 3.25 认为是有危害的),不影响蛋白的结构和功能。2 种基因多态性生物信息学软件预测都是没有危害的,mutation taster 预测其是多态性, PolyPhen-2 预测 c. 655C>T(p. Pro219Ser), c. 940C>G (p. Pro314Ala)危害性均为 0.000, SIFT 预测值分别为 0.86 和 0.32。

表 1 102 例 CAD 患者中发现的 GPVI 突变基因

dbSNP ID [△]	HGVS 命名	基因区域	CAD 患者中的例数(杂合/纯合)
NA	c. 430G>A(p. Ala144Thr)	Exon4	1(1/0)
rs1613662	c. 655C>T(p. Pro219Ser)	Exon5	102(0/102)
rs2304166	c. 940C>G(p. Pro314Ala)	Exon8	52(44/8)

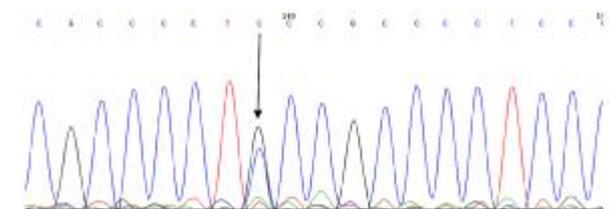
[△]dbSNP: 国家生物技术信息中心单核苷酸多态性数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>)。

2.2 p. Pro314Ala 基因分型

在 414 例 CAD 患者中,杂合子 142 例,纯合子 48 例,野生型 224 例;在 474 例对照组中,杂合子 228 例,纯合子 189 例,野生型 57 例(图 1)。经 Hardy-Weinberg 平衡统计发现,该突变经对 CAD 的发病没有影响(OR=0.984, 95% CI 0.746-1.298, P=0.90894)。

3 讨论

冠状动脉血栓对于 CAD 的发生和发展起着重要的作用,其中冠状动脉内血栓形成是 CAD 的病



箭头所指为 GPVI 基因编码区第 940 位 C 突变为 G。

图 1 突变 c. 940C>G(p. Pro314Ala)测序图

理基础。大量研究表明,血小板活化引起的小板

粘附、聚集、释放反应是血栓形成的重要机制之一。已有学者证实,CAD患者血液中的血小板显著活化且血小板的活化程度在病程中出现动态变化。我们首次在湖北地区汉族人群CAD患者中进行GPVI基因的重测序,来寻找GPVI基因的新突变,发现引起血小板活化增强的因素;并且通过对CAD患者进行基因分型,寻找是否存在c.940C>G(p.Pro314Ala)与CAD的关联。本研究对102例CAD患者进行GPVI基因的重测序,发现1例新突变,但是3种生物信息学软件对其预测均是没有危害的,对蛋白质的结构和功能也是没有影响的。另外已经报道过的突变p.Pro219Ser在中国人群全部为T,考虑T为中国人群的野生型。国外有文献报道p.Pro219Ser在LETS和MEGA-1人群中对静脉血栓形成的风险分别是1.36和1.21^[4]。虽然动脉血栓和静脉血栓有着相似的凝血途径,但他们的发病机制、病理特征及危险因素截然不同。在中国人群中,p.Pro219Ser并不是其CAD发病的危险因素。

国内有学者发现GPIa C807T可能是急性冠脉综合征的危险因素。在急性冠脉综合征患者中,携带T等位基因与携带C等位基因的患者相比血小板聚集功能是增强的。CC基因型患者较CT基因型,特别是TT基因型患者,对双抗治疗更为敏感^[5]。人血小板抗原1b(HPA-1b/PIA2),以及整合素 $\alpha 2\beta 1$ 的 $\alpha 2807TT$ 的基因型与冠状动脉粥样硬化及心肌梗死的关联长期存在争议^[6]。有文献报道,HPA-1b和 $\alpha 2807TT$ 并不影响动脉粥样硬化,然而这些基因的改变在一些诱发动脉粥样硬化的因素下是增加血小板促凝风险的危险因素^[7]。国外有研究表明GPVI的Fc受体 γ 链是胶原蛋白引起血小板活化的主要受体。GPVI与纤维相互作用导致血栓的形成,并且促进血栓的稳定^[8]。然

而,我们的研究并没有发现GPVI有引起血栓形成风险的突变。突变的GPVI引起CAD的机制有待进一步研究,体内和体外实验有待进一步证实。

参考文献

- [1] Wallace EL, Smyth SS. Targeting platelet thrombin receptor signaling to prevent thrombosis[J]. *Pharmaceuticals*, 2013, 6: 915-928.
- [2] Lewis JP, Ryan K, O'Connell JR, et al. Genetic variation in PEAR1 is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013, 6: 184-192.
- [3] Cesar LA, Ferreira JF, Armaganijan D, et al. Guideline for stable coronary artery disease[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2014, 103: 1-56.
- [4] Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis [J]. *JAMA*, 2008, 299: 1306-1314.
- [5] Zhang Q, Jin Y, Shi D, et al. Glycoprotein Ia C807T: polymorphisms and their association with platelet function in patients with the acute coronary syndrome [J]. *Cardiology*, 2015, 132: 213-220.
- [6] Zotz RB, Winkelmann BR, Muller C, et al. Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction[J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3: 1522-1529.
- [7] Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, et al. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease[J]. *Thromb Haemost*, 1998, 79: 731-735.
- [8] Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets [J]. *Blood*, 2015, 126: 1601-1608.

(收稿日期:2015-11-11)