

214 例脑梗死患者与 HPA-1~5、15 基因多态性关系的检测与分析*

尹红^{1△} 曾小菁¹ 杨芳¹ 钟娜娜¹ 周永梅¹

【摘要】 目的:探讨老年易感病脑梗死与 HPA-1~5、15 基因多态性的相关性。**方法:**采用 PCR-SSP 技术对 214 例 60 岁以上脑梗死病例组和 220 例健康体检者对照组进行 HPA-1~5、15 系统基因分型,并应用统计学方法对两组进行 χ^2 检验和 Logistic 回归分析。**结果:**① HPA-2 抗原系统多态性病例与对照组比较差异有统计学意义。脑梗死组基因频率($a=0.915\ 9, b=0.048\ 1$)与对照组基因频率($a=0.977\ 3, b=0.022\ 7$)相比较 $P<0.01$;脑梗死组基因型频率($aa=0.831\ 8, ab=0.168\ 2, bb=0$)与对照组基因型($aa=0.9545, ab=0.0455, bb=0$)相比较 $P<0.01$ 。② HPA-2 回归分析:脑梗死 HPA-2b 基因和 HPA-2ab 基因型均显著高于对照组,以 HPA-2aa 为指示符进行 Logistic 回归分析并以年龄调整后,HPA-2ab 的 OR 值=4.123(95% CI=1.981~8.581)。**结论:** HPA-2 抗原系统基因多态性可能是本地区老年人群脑梗死发病的遗传易感因素,HPA-2b 可能是其易感基因,HPA-2ab 可能是其易感基因型。

【关键词】 老年易感病;人类血小板抗原;基因多态性;脑梗死

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.04.004

【中图分类号】 R743 **【文献标志码】** A

Research of correlation between HPA 1-5, 15 gene polymorphism and cerebral infarction in Han population in Guizhou Province

YIN Hong ZENG Xiaojing YANG Fang ZHONG Nana ZHOU Yongmei

(Guiyang Medical College, Guiyang, 550004, China)

Corresponding author: ZENG Xiaojing, E-mail: gyshuxueke@126.com

Abstract Objective: To investigate the correlation between the elderly susceptible disease, cerebral infarction and HPA-1~5, 15 gene polymorphisms. **Method:** The HPA-1-5, 15 system genotyping of 214 cerebral infarction cases and 220 cases of healthy people as the controls were detected by PCR-SSP, and the results were analyzed by chi-square test and Logistic regression analysis. **Result:** ① Polymorphisms in HPA-2 antigen system showed significant difference in experimental cases and controls, when comparing the gene frequency of cerebral infarction group ($a=0.915\ 9, b=0.048\ 1$) and control group gene frequency ($a=0.977\ 3, b=0.0227$) ($P<0.01$), the genotypic frequency of the cerebral infarction group ($aa=0.831\ 8, ab=0.168\ 2, bb=0$) and the control group ($aa=0.9545, ab=0.0455, bb=0$) ($P<0.01$). ② The HPA-2 regression analysis demonstrated that the rates of cerebral infarction due to HPA-2b gene and HPA-2ab genotype were significantly higher than those in the control group, using HPA-2aa as the indicator and logistic regression analysis with adjustment for age. The OR value of HPA-2ab = 4.123(95% CI=1.981 to 8.581). **Conclusion:** Gene polymorphism in HPA-2 antigen system may enhance genetic susceptibility to elderly cerebral infarction in this region. HPA-2b may cause genetic susceptibility to the disease, while HPA-2ab may be likely to be the susceptible genotype.

Key words elderly susceptible; human platelet antigen; gene polymorphism; cerebral infarction

在中国,脑梗死发病率 110/10 万人口,占全部脑卒中的 60%~80%,是老年易感病和造成老年人死亡与致残的重要疾病之一。随着我国人口结构的不断老龄化,老年人的比例在不断增加,脑梗死的防治工作也日趋重要。本研究从人类血小板抗原(human platelet antigen, HPA)多态性的角度探讨其与脑梗死的相关性。HPA 是血小板的重要活性组成,参与凝血启动、血管痉挛和血栓形成的各个环节。

脑梗死是多因素疾病,国际和国内的许多研究表明,脑梗死受遗传、疾病及环境等影响,HPA 变化也存在遗传、人种和地域差异,这种差异也直接影响脑梗死的发病^[1-3]。本研究采用序列特异性引物-多聚酶链反应(sequence-specific primers-polymerase chain reaction, PCR-SSP)技术,对 214 例 60 岁以上脑梗死患者 HPA-1~5、15 基因多态性进行分析,探讨其与脑梗死相关性。

1 对象与方法

1.1 病例组

2010-12—2012-06 在我学院附属医院住院初

* 基金项目:贵州省科委资助基金(No:E2009-17)

¹ 贵阳医学院(贵阳,550004)

[△] 作者现在贵州省息烽小寨坝镇卫生院

通信作者:曾小菁, E-mail: gyshuxueke@126.com

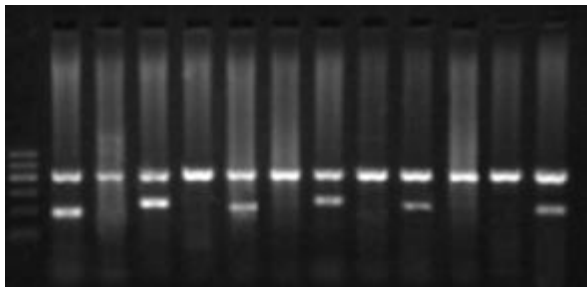
治的脑梗死患者 214 例,男 139 例,女 75 例;年龄 60~88 岁,平均(72.19±7.04)岁;经头部 CT 或 MRI 确诊,符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010》诊断标准^[4],排除脑梗死以外出、凝血性疾病。

1.2 对照组

选择同期在我学院附属医院健康体检者 220 例,男 127 例,女 93 例;年龄 60~92 岁,平均(69.97±7.53)岁;排除脑血管疾病、心肌梗死及出血性血管疾病。脑梗死传统危险因素(吸烟、饮酒、高血脂、高血压和糖尿病)配置比例与病例组接近。

1.3 PCR-SSP 操作技术

DNA 提取与及 PCR 扩增:取血样 3 ml,采用酚/氯仿法提取基因组 DNA, -20℃ 保存备用。PCR 扩增按上海捷瑞公司试剂盒说明书操作。扩增产物电泳及结果判读:取 PCR 扩增产物 10 μl,在 2%琼脂糖凝胶(含 0.5 μg /ml 溴化乙锭),0.5×TBE 缓冲液电泳槽中,恒压 100 V 的电压下电泳 30 min,置凝胶成像系统观察结果,并保留电泳图。引物条带碱基大小分别为:12 个内参条带均为 429 bp,特异性条带 HPA-1a 和 b 为 196 bp、HPA-2a 和 b 为 241 bp、HPA-3a 和 b 为 230 bp、HPA-4a 和 b 为 252 bp、HPA-5a 和 b 为 249 bp 及 HPA-15a 和 b 为 225 bp。判读:以相应泳道出现内参条带时认为扩增成功,对应碱基 Marker 观察相应泳道 HPA 碱基大小位置,出现特异条带判为阳性,未出现则判为阴性,见图 1。



最左则为 Marker,由上至下分别为 600 bp ,400 bp, 300 bp,200 bp 和 100 bp。泳道由左向右分别为 1a, 1b,2a,2b,3a,3b,4a,4b,5a,5b,15a,15b。位于 400 bp 附近的条带为内参条带,之下为目标条带。图中检测结果为 1aa 2aa 3aa 4aa 5aa 15bb。

图 1 PCR 扩增产物电泳图

1.4 结果验证

为检验实验可靠性,随机从脑梗死组和对照组 PCR 扩增产物中按 6 个 HPA 抗原系统的 12 个体系中各随机抽 1 份进行电泳,并拍照和保留(图 1)。同时将这 12 份产物送大连宝生物公司实验室进行基因测序分型,结果显示 PCR-SSP 分型与基因测

序相一致。

1.5 统计学分析

基因频率按群体遗传计数法计算并验证是否符合 Hardy-Weinberg(H-W)平衡法则。病例组与对照组比较采用 χ^2 检验。多因素分析采用 Logistic 回归模型计算比值比(OR)及 95%置信区间(CI)。所有统计采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 性别、年龄、传统危险因素比较与 H-W 平衡

脑梗死组与对照组间性别和传统危险因素比较差异无统计学意义($P>0.05$)。年龄 t 检验 $F=0.562$, $P=0.454$, $t=-3.157$ 方差具有齐性,则 2 组比较的 $P=0.002$ 有效,2 组间年龄差异有统计学意义。分别对脑梗死组和对照组 HPA-1~5、15 系统的观察值与期望值进行比较,其 P 值均 >0.05 ,2 组均符合 H-W 群体遗传平衡法则,具有群体代表性。

2.2 HPA-1~5、15 系统基因多态性比较

HPA-1~5、15 基因多态性实验结果与比较列于表 1。从表 1 中可见,脑梗死与对照组 HPA-1、3、4、5 和 15 基因和基因型比较,各系统均差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。HPA-2 系统:脑梗死组 aa 基因型 178 例(频率 0.8318), ab 基因型 36 例(频率 0.168 2), a 基因 392(频率 0.915 9), b 基因 36(频率 0.084 1);对照组 aa 基因型 210 例(频率 0.954 5), ab 基因型 10 例(频率 0.045 5), a 基因=430(频率 0.977 3), b 基因=10(频率 0.022 7);2 组均未检出 bb 基因型;基因型比较 $\chi^2=17.255$, $P<0.01$, 基因比较 $\chi^2=16.290$, $P<0.01$, 基因及基因型均差异有统计学意义。

2.3 HPA-2 Logistic 回归分析

从前述的单因素分析中得知年龄和 HPA-2 系统与脑梗死的发病具有相关性,进一步对 HPA-2 系统进行 Logistic 回归分析,并以年龄调整 OR 值(表 2)。在以 HPA-2aa 基因型为指示符并以年龄调整后,HPA-2ab 基因型的 OR 值=4.123(95% CI 1.981~8.581)。

3 讨论

脑梗死的病理机制主要是动脉栓塞,栓塞动脉的栓子绝大部分是由血栓所致。在血栓形成过程中,血小板有着重要作用,HPA 携带于血小板的膜糖蛋白(GP)上,共同组成血小板的抗原-抗体功能。国内外许多的研究证实,HPA 在人类中的遗传有着人群和地域的差异,这种差异也造成了血小板功能的差异,而影响血栓形成,并发生与脑梗死的关联性^[5-7]。

表 1 HPA-1~5、15 基因多态性

HPA	分组	基因型(频率)				P	基因(频率)				P
		aa	ab	bb	χ^2		a	b	χ^2		
1	脑梗死组	214(1)	0	0			428(1)	0			
	对照组	219(0.995 5)	1(0.004 5)	0	1.361	0.243	439(0.997 7)	1(0.002 3)	1.360	0.244	
2	脑梗死组	178(0.831 8)	36(0.168 2)	0			392(0.915 9)	36(0.084 1)			
	对照组	210(0.954 5)	10(0.045 5)	0	17.255	0.000	430(0.977 3)	10(0.022 7)	16.290	0.000	
3	脑梗死组	93(0.434 6)	94(0.439 3)	27(0.126 1)			280(0.654 2)	148(0.345 8)			
	对照组	91(0.413 6)	94(0.427 3)	35(0.159 1)	0.971	0.615	276(0.627 3)	164(0.372 7)	0.684	0.408	
4	脑梗死组	212(0.990 7)	2(0.009 3)	0			426(0.995 3)	2(0.004 7)			
	对照组	220(1)	0	0	2.838	0.092	440(1)	0	2.833	0.092	
5	脑梗死组	208(0.972 0)	6(0.028 0)	0			422(0.986)	6(0.014 0)			
	对照组	205(0.931 8)	15(0.068 2)	0	3.797	0.051	425(0.965 9)	15(0.034 1)	3.703	0.054	
15	脑梗死组	36(0.168 2)	110(0.514)	68(0.317 8)			182(0.425 2)	246(0.574 8)			
	对照组	54(0.245 5)	108(0.490 9)	58(0.263 6)	4.330	0.115	216(0.490 9)	224(0.509 1)	3.769	0.052	

表 2 HPA2 基因型 Logistic 回归分析与 OR 值调整

	B	S. E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95%CI for EXP(B)	
							Lower	Upper
HPA-2aa			14.353	1	0.000			
HPA-2ab	1.417	0.374	14.353	1	0.000	4.123	1.981	8.581
年龄	0.040	0.014	8.606	1	0.003	1.040	1.013	1.068
常量	-2.984	0.967	9.521	1	0.002	0.051		

本病例与对照的研究显示,HPA-2 系统的基因和基因型均存在显著差异,脑梗死组 HPA-2b 基因频率(0.084 1)和 HPA-2ab 基因型频率(0.168 2)较对照组 HPA-2b=0.022 7 和 HPA-2ab=0.045 5 显著增多($\chi^2=16.290$, $P<0.01$ 和 $\chi^2=17.255$, $P<0.01$)。在以 HPA-2aa 为参照 1 并以年龄调整后 HPA-2ab 的 OR 值=4.123(95%CI 1.981~8.581),说明 HPA-2ab 基因型仍是发病的危险因素。

HPA-2 存在于 GP I b 上,血小板 GP I b/IX/V 相互结合形成复合体,该复合体是血小板的重要黏附受体,其主要功能是作为血管性血友病因子(von Willebrand factor,vWF)受体,与内皮基质中或血浆中 vWF 结合激发血小板聚集,还与其他许多黏附受体,如中性粒细胞的 Mac- I 结合,激活血小板或内皮细胞的 P 选择素,GP I b 复合物通过在血液高切变应力条件下激发血小板聚集而在血栓形成中起着重要的作用^[8-9]。

本项目组的研究结果认为,HPA-2 系统多态性与脑梗死发病具有相关性,HPA-2ab 可能是本地区脑梗死发病的易感基因型。在老年性疾病的防治中应给予必要关注。

参考文献

[1] X Xu,Y Liu,Y Ying,et al, Human platelet antigen allele frequencies and new mutations on platelet glyco-protein genes in the Chinese Han population[J]. Transfusion medicine (Oxford, England), 2011, 21: 330-337.

[2] David L, Allen Sofia, Abrahamsson Michael F,et al. Human platelet antigen 1a epitopes are dependent on the cation-regulated conformation of integrin α (IIb) β (3) (GPIIb/IIIa) [J]. J Immunol Methods, 2012, 375:166-75.

[3] Lievens D, von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis[J]. Thromb Haemost, 2011,106:827-38.

[4] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 146-153.

[5] 候亮,刘雪平,袁树华,等. 血小板膜糖蛋白 I a 和 I ba 基因多态性与脑梗死的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2010, 12(2): 132-135.

[6] 辛晓敏,蒋丽鑫,王瑶,等. 中国北方地区汉族人群血小板膜糖蛋白 I ba VNTR 多态性的分布与脑梗死患者 CC 基因型与阿司匹林敏感相关性分析[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(3): 481-483.

[7] 杨兰,梁秀云,曾江辉. 广西地区壮族、瑶族人群人类血小板抗原基因的多态性分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 20(20): 2644-2645, 2647.

[8] 陈赞,杨芳,罗福敏,等. 人类血小板抗原 1 基因多态性与急性心肌梗死的相关性[J]. 临床心血管病杂志, 2013, 28(2): 112-114.

[9] 徐福平,李湘青. 血小板膜糖蛋白 I ba 基因多态性与复发性脑梗死的分析研究[J]. 医学综述, 2014, 20(19): 3595-3597.

(收稿日期:2015-07-16)