

- 2010,8(2):171-177.
- [29] 李娟,张磊,费丹,等. ATRA 诱导胶质瘤 C6 细胞凋亡过程中 Bcl-2 和 Caspase-3 表达的研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2010,9(1):23-26.
- [30] 张德芳,赵洪国. ATRA 与 As₂O₃ 并化疗药物治疗急性早幼粒细胞白血病病人的效果[J]. 康复与疗养杂志,2010(1):18-20.
- [31] 刘欣,刘宝文,王萍,等. 中药辅助 As₂O₃ + ATRA 双诱导治疗急性早幼粒细胞白血病 4 周的疗效观察[J]. 辽宁中医杂志,2010(12):2402-2404.
- [32] 薛军,林茂芳,蔡真. 血液肿瘤细胞株细胞 survivin 基因表达以及 ATRA 对 NB4 细胞株 survivin 基因表达的调节[J]. 中国病理生理杂志,2004,20(2):234-237.
- (收稿日期:2014-05-11)
- 综 述 •

驱动蛋白 6 基因多态性与心血管疾病相关性研究进展

陈 娟 综述,施建丰[△] 审校

(江苏省中西医结合医院检验科,江苏南京 210028)

关键词:驱动蛋白 6; 基因多态性; 冠心病; 心肌梗死

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.040 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)19-2663-03

驱动蛋白 6 是驱动蛋白超家族中一类参与胞内转运的特殊蛋白质。近年来,研究发现驱动蛋白 6 基因 rs20455 位点(Trp719Arg)单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)可能与心血管疾病(cardiovascular diseases)易感性密切相关,且强化他汀类药物治疗可使驱动蛋白 6 基因变异者显著获益。本文就驱动蛋白 6 基因多态性与心血管疾病易感性关系的研究现状进行综述。

1 驱动蛋白与驱动蛋白 6

1.1 驱动蛋白的分子生物学特性 驱动蛋白(kinesin)是由 Vale 等^[1]于 1985 年从鱿鱼和哺乳动物中分离发现,存在于所有的真核生物细胞中,具有三磷酸腺苷(adenosine tri-phosphate,ATP)酶活性和运动特性的微管马达蛋白质。它在细胞生命活动过程中提供动力,包括细胞器的转运、有丝分裂、信号转导、mRNA 和蛋白质的输运等。驱动蛋白是由两条重链和两条轻链组成,包括 4 个部分^[2-3]:(1)2 个完全相同的球状头部(N-末端),每条重链的 N-末端大约由 345 个氨基酸分子折叠而成,每个头部含有连接微管和结合、催化 ATP 的位点;(2)颈部为连接头部和茎的结构域;(3)茎是由两股肽链缠绕而成的二聚体,且尾部连接托住“货物”的轻链;(4)扇形尾部(C-末端)是“货物”的分子结合部位,由轻链构成^[4]。驱动蛋白是发现最早,研究最为充分的一类马达蛋白质。

1.2 驱动蛋白 6 的分子生物学特性及多态性 驱动蛋白 6 是新近发现的驱动蛋白家族成员^[5]。人类驱动蛋白 6 基因位于染色体 6p21.2 上,约含有 503 394 个碱基对,含 23 个外显子和 22 个内含子,编码 3 972 bp mRNA,翻译成约含 814 个氨基酸残基的蛋白质^[6-7]。驱动蛋白 6 与微管是反向平行结合,参与生命过程,运输膜细胞器、蛋白质和 mRNA 等,尤其在细胞有丝分裂过程中起着至关重要的作用^[8]。驱动蛋白 6 主要在大脑、结缔组织、结肠、眼、咽、皮肤和睾丸等多种组织中表达^[9]。目前文献中报道驱动蛋白 6 基因存在 3 个 SNP 位点,只有 Trp719Arg 被认为是冠心病(coronary heart disease,CHD)的易感基因^[10]。驱动蛋白 6 基因 Trp719Arg 多态性是由于外显子 19 中第 2 155 位点密码子发生错义突变,胸腺嘧啶核苷酸(T)突变为胞嘧啶核苷酸(C),氨基酸序列 719 位点由精氨酸(W)取代色氨酸(R),改变了所编码的蛋白质。这一突变发生在分子尾部的结构域内,影响驱动蛋白 6 分子运输胞

内细胞器、脂蛋白、mRNA 等功能^[11-12]。因此,驱动蛋白 6 分子“尾部”与“货物”结合的部位可能是研究驱动蛋白 6 分子在动脉粥样硬化形成、发展各个阶段发挥作用的重点。

2 驱动蛋白 6 基因在心血管疾病中的作用机制

驱动蛋白 6 与驱动蛋白 9 基因同源性最近,驱动蛋白 9 基因与小鸟苷三磷酸酶家族相互作用,促进内皮细胞萌芽及细胞骨架再生,因此驱动蛋白 6 基因可能在内皮细胞生长中有类似的作用^[13-14]。Davani 等^[15]发现急性心肌梗死患者(Trp719Arg 等位基因纯合子)外周血中不太可能有内皮集落细胞形成,并认为 Trp719Arg 基因多态性与晚期内皮祖细胞的存在有关。Rosenfeld 等^[16]研究动脉粥样硬化病变过程中驱动蛋白 6 的作用机制,发现载脂蛋白 E 基因缺乏的小鼠和人颈动脉粥样硬化病变前期及斑块形成前期,巨噬细胞和软骨细胞样细胞均表达驱动蛋白 6,脂多糖刺激巨噬细胞可诱导驱动蛋白 6 基因的表达,从而认为炎症和动脉粥样硬化病变过程中,驱动蛋白 6 基因有潜在的作用。最后,驱动蛋白基因家族的某些成员在纺锤体的形成和染色体有丝分裂过程中起作用^[17]。

3 驱动蛋白 6 基因多态性与心血管疾病的相关性

心血管疾病是一种复杂的遗传性疾病,新近有研究指出驱动蛋白 6 的基因 Trp719Arg 可能是心血管疾病的易感基因,基因组相关性研究(genome-wide association studies,GWAS)已经确定了驱动蛋白 6 基因 SNPs 与心血管疾病有潜在相关性^[18]。

3.1 驱动蛋白 6 Trp719Arg 基因 SNP 与 CHD 的相关性 CHD 是一类受环境影响较大的多基因疾病,其相关易感基因的筛查研究一直是国内外热点问题^[19-22]。国外大规模前瞻性研究显示,与非 Trp719Arg 等位基因携带者相比,驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者的 CHD 风险增加。在胆固醇递归事件(cholesterol and recurrent event,CARE)研究和西苏格兰 CHD 预防研究(west of scotland coronary prevention study,WOSCOPS)中,Iakoubova 等^[20]发现心血管疾病易感的 35 个候选基因中,驱动蛋白 6 Trp719Arg 基因与 CHD 密切相关(CARE:HR=1.50;WOSCOPS:OR=1.55,P<0.05),该研究对象主要为中年男性二级 CHD 预防患者。Shiffman 等^[18]进行女性健康研究(women's health study,WHs),对 25 283 例年龄在 45 岁或以上的健康高加索人种女性进行基因分析。结

果显示:在 12 年的随访观察期间,有 953 例女性首发 CHD 事件。与 TT 基因型携带者相比,C 等位基因驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者 CHD 风险增加了 24%。同年,Shiffman 等^[21]分析 4 522 例年龄大于 65 岁的非裔白种美国人,发现以往研究中提及的 35 个基因的多态性仅有 8 个 SNP 位点与 CHD 易感性相关。在排除吸烟及其他心血管危险因素后,驱动蛋白 6 Trp719Arg 基因仍是 CHD 的独立危险因素。Peng 等^[22]对中国汉族的 289 例 CHD 患者,193 例非 CHD 患者和 329 例无血缘相关性的健康者进行病例对照研究,结果显示,女性 CHD 患者与健康者 Trp719Arg 等位基因频率差异有统计学意义($P=0.04$, $OR=1.979$, $95\%CI=1.023\sim3.828$)。

3.2 驱动蛋白 6 Trp719Arg 基因 SNP 与心肌梗死的相关性

心肌梗死是心肌缺血性坏死,在冠状动脉病变的基础上,冠状动脉的血流急剧减少或中断,使相应的心肌出现严重而持久的急性缺血,最终导致心肌缺血性坏死。Iakoubova 等^[20]在 CARE 研究中,矫正危险因素后,发现驱动蛋白 6 Trp719Arg 基因与再发心肌梗死有密切相关性(CARE: $HR=1.50$, $P<0.05$),同时在驱动蛋白 6 基因区域内无论是单个 SNP 位点还是构建的单体型对于再发心肌梗死的意义均小于独立的驱动蛋白 6 Trp719Arg 基因 SNP 位点。有研究显示,与 TT 基因型携带者相比,C 等位基因驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者心肌梗死风险显著增加^[18]。非裔白种美国人驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者心肌梗死的风险增加($HR=1.29$, $90\%CI:1.10\sim1.52$)^[21]。Wu 等^[23]研究中国北方人群,结果显示心肌梗死组与非心肌梗死组的基因型和等位基因频率差异有统计学意义($P<0.05$),且驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者非致命性心肌梗死的风险显著高于非携带者。

3.3 驱动蛋白 6 Trp719Arg 基因 SNP 与他汀类药物降脂治疗的相关性 他汀类药物(statins)为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,能降低总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和三酰甘油(triglyceride, TG)水平,升高高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平,使冠状动脉事件的发病率明显下降^[24]。几项大规模临床回顾性研究发现,他汀类药物明显降低驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者心血管疾病发病率^[20,25-27]。Iakoubova 等^[20]研究发现,普伐他汀使驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者发生心血管疾病的绝对风险降低了 4.89% ($95\%CI:1.81\sim7.97$)和 5.49% ($95\%CI:3.52\sim7.46$)。Iakoubova 等^[25]还分析了 1 778 例急性冠脉综合征(ACS)患者的基因型,发现与他汀类药物常规治疗相比,应用他汀类药物强化治疗,使驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者发生心血管疾病的绝对风险降低了 10.0% ($95\%CI:0.45\sim0.77$, $P<0.01$),非携带者仅降低 0.8% ($95\%CI:0.70\sim1.27$, $P=0.70$)。在治疗期间,驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者与非携带者在 LDL-C、TG 或 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

总之,以上研究表明,驱动蛋白 6 基因多态性是他汀类药物减少心血管疾病的预报器,且其机制不依赖于血液中的 LDL-C 水平的下降。Iakoubova 等^[26]采用随机、双盲、安慰剂对照研究,对 5 752 例年龄大于 70 岁的老年人使用他汀类药物并随访观察 3.2 年,发现患有原发性心血管疾病的驱动蛋白 6 Trp719Arg 等位基因携带者 CHD 的风险明显降低

($HR=0.66$, $95\%CI:0.52\sim0.86$),对照组无明显变化($HR=0.94$, $95\%CI:0.69\sim1.28$)。

4 小 结

综上所述,目前驱动蛋白 6 基因的主要研究方向为其基因多态性与心血管疾病及他汀类药物治疗的关系。由于心血管疾病为多基因、复杂性疾病,受环境因素影响较大,且驱动蛋白 6 基因多态性与心血管疾病关系的研究才刚刚起步,因此深入研究驱动蛋白 6 基因多态性与心血管疾病的相关性及其机制对于防治心血管疾病的发生、发展具有重要意义^[27]。

参考文献

- [1] Vale RT, Sheetz MR. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility[J]. Cell, 1985, 42(1): 39-50.
- [2] Kaan HY, Hackney DD, Kozielski F. The structure of the kinesin-1 motor-tail complex reveals the mechanism of autoinhibition[J]. Science, 2011, 333(644): 883-885.
- [3] Vale RD, Milligan RA. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins[J]. Science, 2000, 288(5463): 88-95.
- [4] Asbury CL. Kinesin: world's tiniest biped[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(1): 89-97.
- [5] Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function[J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(9): 467-476.
- [6] Mungall AS. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6[J]. Nature, 2003, 425(6960): 805-811.
- [7] Topol EJ, Damani SB. The KIF6 collapse[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(19): 1564-1566.
- [8] Miki HOY, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function[J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(9): 467-476.
- [9] Su AI, Cooke MP, Ching KA, et al. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(7): 4465-4470.
- [10] Bechtel S, Rosenfelder H, Duda A, et al. The full-ORF clone resource of the German cDNA consortium[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 399.
- [11] Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, et al. Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis[J]. J Cell Biol, 2003, 162(5): 863-875.
- [12] Li Y, Iakoubova OA, Shiffman D, et al. KIF6 polymorphism as a predictor of risk of coronary events and of clinical event reduction by statin therapy[J]. Am J Cardiol, 2010, 106(7): 994-998.
- [13] Nislow C, Lombillo VA, Kuriyama R, et al. A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles[J]. Nature, 1992, 359(6395): 543-547.
- [14] Piddini E, Schmid JA, de Martin R, et al. The Ras-like GTPase Gem is involved in cell shape remodelling and interacts with the novel kinesin-like protein KIF9[J]. EMBO J, 2001, 20(15): 4076-4087.
- [15] Davani S, Gzalo C, Gambert S, et al. The polymorphism Trp719Arg in the kinesin-like protein 6 is associated with the presence of late outgrowth endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction[J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1): 48-50.
- [16] Rosenfeld ME, Preusch M, Shiffman D, et al. KIF6, an emerging coronary heart disease risk marker expressed by macrophages in

atherosclerotic lesions in humans and mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(11): E312-E313.

[17] Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21, 243 full-length human cDNAs [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1): 40-45.

[18] Shiffman D, Chasman DI, Zee RY, et al. A kinesin family member 6 variant is associated with coronary heart disease in the Women's Health Study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(4): 444-448.

[19] 陈娟. 载脂蛋白 A5 基因多态性与脂类代谢疾病相关性研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(5): 554-556.

[20] Iakoubova OA, Tong CH, Rowland CM, et al. Association of the Trp719Arg polymorphism in kinesin-like protein 6 with myocardial infarction and coronary heart disease in 2 prospective trials: the CARE and WOSCOPS trials [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(4): 435-443.

[21] Shiffman D, O'meara ES, Bare LA, et al. Association of gene variants with incident myocardial infarction in the Cardiovascular Health Study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(1): 173-179.

[22] Peng P, Lian J, Huang RS, et al. Meta-analyses of KIF6 Trp719Arg in coronary heart disease and statin therapeutic effect [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50126.

[23] Wu G, Li GB, Dai B. Association of KIF6 variant with lipid level and angiographic coronary artery disease events risk in the Han Chinese population [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 11269-11280.

[24] 刘冰, 柯永胜. 他汀类药物强化调脂改善冠状动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2013, 21(3): 6-8.

[25] Iakoubova OA, Sabatine MS, Rowland CM, et al. Polymorphism in KIF6 gene and benefit from statins after acute coronary syndromes: results from the PROVE IT-TIMI 22 study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(4): 449-455.

[26] Iakoubova OA, Robertson M, Tong CH, et al. KIF6 Trp719Arg polymorphism and the effect of statin therapy in elderly patients: results from the PROSPER study [J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2010, 17(4): 455-461.

[27] Ference BA, Yoo W, Flack JM, et al. A common KIF6 polymorphism increases vulnerability to low-density lipoprotein cholesterol: two meta-analyses and a meta-regression analysis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28834.

(收稿日期: 2014-04-26)

• 综 述 •

骨髓活检组织检查中应用的分子诊断技术*

傅 强, 杨山虹 综述, 张秀明[△] 审校

(中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528400)

关键词: 骨髓活检组织; 聚合酶链反应; 荧光原位杂交技术
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 19. 041 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2014)19-2665-03

骨髓活检组织检查对恶性和非恶性造血系统疾病的诊断和分期至关重要^[1]。目前临床多采用细胞形态学和组织化学的方法(如苏木素-伊红染色、吉姆萨染色、铁染色等)对骨髓活检组织进行分析以达到诊断疾病的目的。此外, 流式细胞免疫表型分析和细胞遗传学分析也是骨髓活检组织检查常用的技术方法^[2]。近年来随着分子技术的发展, 分子诊断技术也作为骨髓活检组织检查的辅助诊断方法。尽管细胞形态学仍是诊断造血系统疾病最基本的方法, 然而分子诊断技术可以提高诊断的准确性, 进行疾病亚类的鉴别和提高微小残留病灶诊断的敏感性, 在造血系统紊乱的诊断中不可或缺^[3]。骨髓环钻活检和抽吸活检均是获得骨髓标本常用的方法, 嘱患者侧卧位从髂后上棘经活体组织穿刺针而得到。因为骨髓抽吸活检会破坏骨髓中各成分的分布、细胞的结构、造血成分和肿瘤细胞浸润的分布, 以及骨髓的内部结构, 所以在应用分子诊断技术对疾病进行辅助诊断时主要选用骨髓环钻活检的方法^[4]。骨髓环钻活检组织经甲醛固定、酸化、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙、石蜡包埋后即获得形态学完整的骨髓活检标本。本综述概述了分子诊断技术在骨髓环钻活检法制备的活检组织中的应用, 主要包括以 DNA 为基础的技术、以 mRNA 为基础的技术、DNA 和 mRNA 定量分析技术和荧光原位杂交技术。

1 普通聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

1.1 普通 PCR 的技术操作 从石蜡包埋组织中提取的 DNA 因受到组织固定、脱钙和包被的影响而被降解, 所提取的 DNA 片段长度大多低于 500 bp。提取 DNA 时要用适量蛋白酶 K (25~200 L) 在 55 ℃ 的条件下过夜消化, 这种粗提的 DNA 可直接作为模板应用于 PCR, 也可过柱后提纯 DNA (适用于已被严重降解的 DNA)^[5-6]。DNA 的质量对 PCR 扩增的影响不大, 在实际操作中, 多用两个不同的 DNA 模板浓度(如 1~2 L 未稀释模板和 1:10 稀释后的模板)同步进行 2 个 PCR 扩增, 循环数为 40 个。因标准定性的 PCR 扩增, 其扩增产物为 200~250 bp, 因此标准定性 PCR 能在骨髓活检组织中获得最佳的扩增效率^[5-6]。此外, 在骨髓活检组织中也可应用巢氏 PCR。巢氏 PCR 是一种改进的 PCR, 使用 2 对 PCR 引物扩增完整的片段。第 1 对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似。第 2 对引物称为巢式引物, 结合在第 1 次 PCR 产物内部, 使得第 2 次 PCR 扩增片段短于第 1 次扩增的片段。巢式 PCR 的好处在于, 如果第 1 次扩增产生了错误片断, 则第 2 次在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此, 巢式 PCR 的扩增非常特异^[7-8]。

1.2 普通 PCR 技术的应用及在诊断中的意义 在实际应用中, 所有以 DNA 为基础的检测技术均可在骨髓活检组织中应

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81401645); 2014 年度广东省科研基金资助项目(B2014447); 2014 年度中山市科技计划项目(2014A1FC098)。 作者简介: 傅强, 男, 主管检验师, 主要从事骨髓细胞形态学研究工作。 [△] 通讯作者, E-mail: zxm0760@163. com。