

## • 论 著 •

# 纤维蛋白原基因多态性位点与血浆纤维蛋白原 $\gamma'$ 水平及缺血性脑卒中的关系研究\*

虞珊珊, 丁媛媛, 宗 明, 张 慧, 王翰琪, 谭 琪, 范列英<sup>△</sup>

(同济大学附属东方医院/上海市东方医院检验科, 上海 200120)

**摘要:**目的 研究纤维蛋白原(Fib) $\gamma$ 基因多态性位点 FGG 9340T>C(rs1049636)与血浆 Fib $\gamma'$ 水平及缺血性脑卒中(IS)易感性的相关性。方法 采用病例-对照研究方法, 患者组选取华东地区 IS 患者 421 例, 男 283 例、女 138 例, 年龄 40~88 岁, 均为汉族, 无亲缘关系; 选取性别、年龄与患者组相匹配的个体 421 例作为对照组; 应用双抗夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)检测两组人群血浆 Fib $\gamma'$ 水平。应用聚合酶链式反应-连接酶检测反应(PCR-LDR)的方法检测 rs1049636 位点基因型。结果 患者组血浆 Fib $\gamma'$ 水平[(159.4±97.4)U/dL]明显高于对照组[(114.2±73.0)U/dL], 差异有统计学意义( $P<0.001$ ); 不论是在患者组还是在对照组, Fib 基因 rs1049636 C 等位基因均与高水平的血浆 Fib $\gamma'$ 相关; 但 rs1049636 各基因型及等位基因的分布在患者组和对照组间比较, 差异均无统计学意义( $P=0.077, 0.106$ )。结论 血浆 Fib $\gamma'$ 可以增加中国人群 IS 的易感性, FGG 基因多态性位点 rs1049636 C 等位基因虽与血浆 Fib $\gamma'$ 水平相关, 但可能与中国人群 IS 的发病无关。

**关键词:**缺血性脑卒中; 纤维蛋白原 $\gamma'$ ; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.20.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)20-2932-03

## Associations of fibrinogen genetic variation rs1049636 with $\gamma'$ fibrinogen level and ischemic stroke<sup>\*</sup>

Yu Shanshan, Ding Yuanyuan, Zong Ming, Zhang Hui, Wang Hanqi, Tan Qi, Fan Lieying<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, East Hospital Affiliated to Tongji University/

Shanghai East Hospital, Shanghai 200120, China)

**Abstract: Objective** To explore the association between fibrinogen gene polymorphism(rs1049636) and serum  $\gamma'$  fibrinogen level and ischemic stroke (IS). **Methods** 421 IS patients and 421 age- and gender- matched healthy controls, including 283 males and 138 females, were recruited in this assay. The plasma  $\gamma'$  fibrinogen concentration was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Fibrinogen gene polymorphism(rs1049636) were genotyped by using PCR-LDR assay. **Results**  $\gamma'$  fibrinogen concentrations in IS patients[(159.4±97.4)U/dL] were significantly higher than that in control group[(114.2±73.0)U/dL] with statistically significant difference( $P<0.001$ ). Single nucleotide polymorphism(SNP) analysis showed that rs1049636 C allele was significantly associated with  $\gamma'$  fibrinogen level, but not associated with increased risk of IS( $P=0.077$ ). **Conclusion** An association between increased  $\gamma'$  fibrinogen level and IS existed in Chinese Han population. However, no association between rs1049636 C allele and IS risk was observed in our study.

**Key words:**ischemic stroke;  $\gamma'$  fibrinogen; single nucleotide polymorphism

缺血性脑卒中(IS)是目前危害人类健康及生活质量的最主要的心脑血管疾病之一, 其发病危险因素越来越受到关注。纤维蛋白原(Fib)即凝血因子I, 是血浆中水平最高的凝血因子, 对血流动力学指标、血管内皮细胞的屏障功能、血管平滑肌细胞的增生或迁移功能都有重要的影响, 该因子的升高是血栓性疾病发病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。正常血浆中 Fib 的水平为 2~4 g/L, 分子由 3 对多肽链组成, 由二硫键连结, 形成对称的二体结构, 通常用(A $\alpha$ 2、B $\beta$ 2、 $\gamma$ 2)表示, 分别由 Fib $\alpha$ (FGA), Fib $\beta$ (FGB)及 Fib $\gamma$ (FGG)基因编码<sup>[2-4]</sup>。由于 mRNA 剪切方式的不同, 其中的  $\gamma$  可以是普通的  $\gamma$ A 链或者  $\gamma'$  链。而与普通的 Fib $\gamma$  相比, Fib $\gamma'$  所参与形成的凝块具有截然不同的空间结构并可阻止纤溶的作用, 或更加不稳定, 易从板块处脱落从而可能在血栓性疾病的发病过程中具有重要作用<sup>[5-7]</sup>, 其编码基因的单核苷酸多态性(SNP)所致 Fib 结构或功能的异常与多种血栓性疾病如心肌梗死、脑卒中等的易感性密切相关<sup>[8-9]</sup>。本

次研究中重点关注 Fib $\gamma$  的编码区基因 SNP 位点 FGG 9340T>C(rs1049636)与血浆 Fib $\gamma'$ 水平的相关性, 并研究其与中国人群 IS 发病的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究纳入的患者选自 2011~2014 年, 就诊于上海市东方医院的 IS 患者, 共 421 例, 其中男 283 例(占 67.2%)、女 138 例(占 32.8%), 年龄 40~88 岁, 所有病例均按中华神经科学会第四届全国脑血管病学术会议修订的《各类脑血管疾病诊断要点(1995)》和《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010》<sup>[10]</sup>作为诊断标准, 并经临床及 CT 或 MRI 确诊, 并排除各类其他疾病如肿瘤、自身免疫病、血液病等引发的继发性脑卒中; 排除严重感染、二线肿瘤、结缔组织病及 Ia 期内的组织损伤疾病(如心肌梗死), 重大外科手术及接受免疫抑制剂治疗者。对照组人群选自本院体检, 按年龄相差小于 5 岁, 性别、民族与患者组匹配, 无心脑血管、血液、肿瘤、肝肾疾病且无

\* 基金项目: 上海市浦东新区卫生和计划生育委员会科技发展专项基金资助项目(PW2013B-5); 国家自然科学基金面上项目(81373203); 国家自然科学基金青年项目(81401303)。 作者简介: 虞珊珊, 女, 检验技师, 主要从事心脑血管疾病与临床检验的研究。 △ 通讯作者, E-mail: lieying@hotmail.com。

血缘关系的个体共 421 例。详细询问对照组人群既往病史,包括吸烟史、高血压、糖尿病史等。本研究获得上海市东方医院医学伦理委员会审核通过,参与者均签署了知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 血样采集** 受检者空腹 12~15 h,于次日早 8:00 抽静脉血 3 mL,枸橼酸钠抗凝,3 000 r/min,离心 10 min,分离血浆及血细胞,分别冻存-80 ℃冰箱待测。

**1.2.2 血浆 Fib $\gamma'$ 水平的检测** 参考 Uitte de Willige 等<sup>[11]</sup>报道的方法,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血浆 Fib $\gamma'$ 的水平。具体方法如下:收集 100 例健康体检者(男女各 50 例,年龄 20~45 岁)血浆标本,将上述标本混合作为标准品,其 Fib $\gamma'$ 水平定为 100 U/dL;用磷酸盐缓冲液(PBS)作 1:1 000 倍稀释后,再作倍比稀释,如下做 ELISA 试验,以获得标准曲线。ELISA:包被一抗,96 孔板中每孔加入 110  $\mu$ L PBS 稀释的鼠源抗人 Fib $\gamma'$ 抗体(Millipore 公司产品,原浓度为 1 mg/mL,使用终浓度 2  $\mu$ g/mL,故抗体作 1:500 稀释),4 ℃孵育过夜。用 PBST 洗板 3 次,每次 3 min。每孔中加入 200  $\mu$ L 封闭液(PBS/1% BSA),37 ℃孵育 1 h。用 PBST 洗板 3 次,每次 3 min。每孔加入 100  $\mu$ L 用稀释液(0.1% PBS,0.1% BSA, Triton X-100)1:1 000 倍稀释后的血浆,37 ℃孵育 1 h。用 PBST 洗板 3 次,每次 3 min。加入 100  $\mu$ L,0.1% PBS,0.1% BSA,Triton X-100 稀释 20 000 倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 Fib 二抗(Abcam 公司产品),37 ℃孵育 1 h。用 PBST 洗板 3 次,每次 3 min。每孔加入 100  $\mu$ L 四甲基联苯胺(TMB)显色液,避光显色 15 min。每孔加入 50  $\mu$ L 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,于 450 nm 波长检测吸光度(A)。

**1.2.3 基因组 DNA 提取** 采用血液基因组 DNA 提取试剂盒及 DNA 提取仪(复兴公司产品),严格按照产品说明书操作。DNA 提取后于-20 ℃保存。

**1.2.4 基因多态性分析** 基因组 DNA 由复兴公司通过聚合酶链式反应-连接酶检测反应(PCR-LDR)方法进行检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件检验患者组与对照组间的差异。连续变量以  $\bar{x} \pm s$  表示,分类变量用具体数值及百分比表示。正态分布的连续变量比较时采用独立样本 *t* 检验,偏态资料变量比较应用非参数检验(Mann-Whitney U 检验)。 $\chi^2$  检验用于患者组与对照组间基因型和等位基因频率的比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

表 2 患者组及对照组 rs1049636 基因型及等位基因频率的分布与比较

组别	n	基因型[n(%)]			P	等位基因频率[n(%)]			P
		TT	TC	CC		T	C		
对照组	421	277(65.8)	125(29.8)	19(4.5)	0.077	679(80.6)	163(19.4)	0.106	
患者组	421	248(58.9)	156(37)	17(4)		652(77.4)	190(22.6)		

## 3 讨 论

本研究发现 Fib 的异构体 Fib $\gamma'$ 水平与 IS 的易感性呈正相关,患者组和对照组人群中携带 rs1049636 C 等位基因者较 TT 纯合子血浆含有更高的 Fib $\gamma'$ 水平,此结果与既往国外的研究报道结果相同。由于种族与地域的差异,在不同种族正常人群中,Fib 基因 SNP 分布也存在差异。目前在不同人群如高加索人群、非洲人群等均有 Fib 基因多态性与血栓性疾病相关性的报道,亚洲人群的报道较少。Mannila 等<sup>[8]</sup>报道 FGG

**2.1 患者组和对照组一般资料的比较** 心血管病的危险因素包括吸烟、高血压和糖尿病,患者组中以上 3 项的阳性率都高于对照组( $P < 0.001$ ),患者组血浆 Fib $\gamma'$ 水平高于对照组( $P < 0.001$ ),见表 1。

表 1 患者组和对照组一般资料比较

指标	患者组(n=421)	对照组(n=421)	P
年龄( $\bar{x} \pm s$ , 年)	65.9 $\pm$ 9.8	65.8 $\pm$ 9.7	1.0
性别(男/女, n/n)	283/138	283/138	1.0
高血压(%)	74.8	36.9	<0.001
糖尿病(%)	25.2	7.7	<0.001
吸烟率(%)	30.2	15.3	<0.001
饮酒率(%)	11.7	11.7	1.0
Fib $\gamma'$ ( $\bar{x} \pm s$ , U/dL)	159.4 $\pm$ 97.4	114.2 $\pm$ 73.0	<0.001

**2.2 rs1049636 基因型与血浆 Fib $\gamma'$ 水平的相关性** 所有研究对象的 rs1049636 在抽样人群中的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P > 0.05$ ),说明所选取的样本具有人群代表性,适合做遗传分析。基因型分析结果显示 rs1049636 基因型与血浆 Fib $\gamma'$ 水平密切相关,见图 1。不论是在对照组还是在患者组,rs1049636 等位基因 TT 型平均血浆 Fib $\gamma'$ 水平最低,TC 型平均血浆 Fib $\gamma'$ 水平居中,而 CC 型血浆 Fib $\gamma'$ 水平最高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

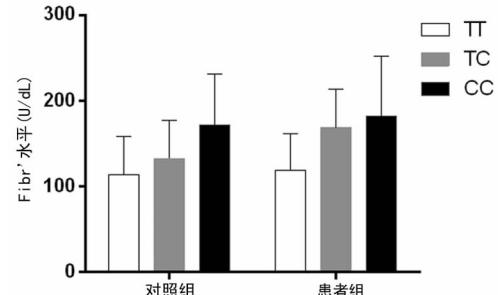


图 1 rs1049636 基因型与 Fib $\gamma'$ 水平的相关性分析

**2.3 两组 rs1049636 基因型与等位基因频率分布** 患者组和对照组的 rs1049636 基因型、等位基因频分布比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。提示 rs1049646 多态性位点的基因型和基因频率可能与中国人群 IS 发病无相关性。

9340T 及 FGA 2224G 等位基因能够增强 Fib $\gamma'$ 在增加心肌梗死易感性中的作用;Uitte de Willige 等<sup>[12]</sup>报道 FGG 9340 C 等位基因与高水平的 Fib $\gamma'$ 相关,并能够降低美国黑人及高加索人种静脉血栓栓塞的发病风险。有意思的是,Lovely 等<sup>[13]</sup>通过全基因组关联研究(GWAS),发现 45 个与 Fib $\gamma'$ 高度相关的 SNP 位点,其中最相关的是 rs7681423 和 rs1049636,但是 45 个 SNP 位点无一与心脑血管疾病相关。而在本研究中也并未发现 rs1049636 基因型与中国人群 IS 的相关(下转第 2936 页)

具有较高的早期诊断价值。此外,本研究对上述4项指标绘制ROC曲线,发现PCT、WBC、N和hs-CRP对重症脑损伤后感染均有较高的预测价值。一般认为AUC<0.5为无诊断价值,AUC:0.5~<0.7为诊断价值较低,AUC:0.7~<0.9为诊断价值较高,AUC≥0.9表示诊断价值最高。本研究中PCT、WBC和hs-CRP的AUC均达到或超过0.8,N的AUC接近0.8,可认为以上指标均具有较高的诊断价值。将以上指标进行组合检验,发现PCT+WBC+hs-CRP的AUC达0.87,在所有组合中诊断价值最高。因此,PCT+WBC+hs-CRP能够很好地预测重症脑损伤患者发生感染,可应用于临床早期诊断脑损伤患者是否会继发感染,对临床预处理具有指示作用。最后,本研究分别以PCT>0.5 ng/mL、WBC>10×10<sup>9</sup>/L、hs-CRP>10 mg/L为标准诊断脑损伤合并感染,计算以上各指标的诊断灵敏度和特异度,发现PCT、WBC和hs-CRP对重症脑损伤合并肺部感染的灵敏度、特异度和阳性预测值均较高,提示PCT、WBC和hs-CRP在脑损伤合并肺部感染早期均有一定的预测价值。其中,PCT的诊断准确性高于WBC和hs-CRP。

PCT对感染性疾病的诊断价值已得到公认。本研究取重症脑损伤患者,将其PCT值与临床目前常用的感染诊断指标WBC、N和hs-CRP进行比较,证明PCT是重症脑损伤合并肺部感染的一个快速、准确的早期诊断参考指标。此外,PCT+WBC+hs-CRP组合的诊断灵敏度、特异度均较单项检测及其他组合更高,预测价值也较高,对临床工作具有一定的实际意义。

## 参考文献

[1] 蔡建勇,孙军,陈茂华,等.颅脑外伤后肺部感染患者病原菌耐药

(上接第2933页)

性( $P>0.05$ )。考虑本研究的样本量不够大,所以在后期研究中需扩大样本量来明确rs1049636位点基因多态性与中国人群IS的相关性。

本研究存在局限性:(1)IS是受多因素影响的复杂疾病,某一基因的多态性与疾病的阳性关联对疾病的发生、发展仅起微弱的作用,可能需要对与疾病可能相关的多个位点多个基因进行联合分析。(2)若要找到一种数目多、分布广泛且相对稳定的与疾病相关的遗传基因,还需大样本的验证。目前这方面的大样本研究尤其是中国人群的大样本研究尚少,有待进一步加强调查,以丰富人类基因库,为研究Fib基因SNP相关的疾病提供基础资料。

## 参考文献

- [1] Ariens RA. Fibrin(ogen) and thrombotic disease[J]. Thromb Haemost, 2013, 11(2):294-305.
- [2] Fish RJ, Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene regulation[J]. Thromb Haemost, 2012, 108(3):419-426.
- [3] Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 936(1):11-30.
- [4] Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(8):1894-1904.
- [5] Farrell DH.  $\gamma'$  fibrinogen as a novel marker of thrombotic disease[J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(11):1903-1909.
- [6] Collet JP, Nagaswami C, Farrell DH, et al. Influence of  $\gamma'$  fibrinogen splice variant on fibrin physical properties and fibrinoly-

性分析[J].中华医院感染学杂志,2010,20(22):3615-3617.

- [2] 中华神经科学会,中华神经外科学会.各类脑血管疾病诊断要点[J].中华神经科杂志,1996,29(6):379-380.
- [3] 谢扬,张志宏,李颖.重症颅脑损伤医院感染因素的研究[J].中华医院感染学杂志,2004,14(3):269-271.
- [4] 战玉喜,李建新,潘筱.血清C反应蛋白测定在诊断小儿疾病中的应用[J].检验医学,2006,21(2):116.
- [5] 廖扬,石玉玲,曾兰兰,等.降钙素原定量检测在鉴别细菌和病毒感染中的诊断意义[J].细胞与分子免疫学杂志,2009,25(12):1169-1170.
- [6] Meisner M, Tschaikowsky K, Schnabel S, et al. Procalcitonin--influence of temperature, storage, anticoagulation and arterial or venous asservation of blood samples on procalcitonin concentrations[J]. Clin Biochem, 1997, 35(8):597-601.
- [7] 汪明丽,刘天路,崔速南,等.病毒感染与细菌感染患儿血清降钙素原水平比较[J].中国当代儿科杂志,2004,6(5):432-434.
- [8] Yo CH, Hsieh PS, Lee SH, et al. Comparison of the test characteristics of procalcitonin to C-reactive protein and leukocytosis for the detection of serious bacterial infections in children presenting with fever without source: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Emerg Med, 2012, 60(5):591-600.
- [9] 汪坚,李亚山,满宝华.感染性疾病联合检测降钙素原和Hs-C反应蛋白的临床意义[J].中国保健营养,2013,23(1):465.

(收稿日期:2015-05-16)

sis rate[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(2):382-386.

- [7] Siebenlist KR, Mosesson MW, Hernandez I, et al. Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing  $\gamma'$  chains[J]. Blood, 2005, 106(8):2730-2736.
- [8] Mannila MN, Lovely RS, Kazmierczak SC, et al. Elevated plasma fibrinogen  $\gamma'$  concentration is associated with myocardial infarction: effects of variation in fibrinogen genes and environmental factors[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(4):766-773.
- [9] Titov BV, Barsova RM, Martynov MIu, et al. Polymorphic variants of genes encoding interleukin-6 and fibrinogen, the risk of ischemic stroke and fibrinogen levels[J]. Mol Biol (Mosk), 2012, 46(1):93-102.
- [10] 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.中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010[J].中国全科医学,2011(35):4013-4017.
- [11] Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Genetic variation in the fibrinogen  $\gamma'$  gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen  $\gamma'$  levels[J]. Blood, 2005, 106(13):4176-4183.
- [12] Uitte de Willige S, Pyle ME, Vos HL, et al. Fibrinogen  $\gamma'$  gene 3'-end polymorphisms and risk of venous thromboembolism in the African-American and Caucasian population[J]. Thromb Haemost, 2009, 101(6):1078-1084.
- [13] Lovely RS, Yang Q, Massaro JM, et al. Assessment of genetic determinants of the association of  $\gamma'$  fibrinogen in relation to cardiovascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(10):2345-2352.

(收稿日期:2015-05-20)