

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0120-05

急性冠状动脉综合征患者血小板内皮细胞粘附分子1基因多态性分析

全锦花¹, 张新超¹, 蔡剑平³, 何青², 许锋¹, 戴大鹏³

(卫生部北京医院 1. 急诊科, 2. 心内科, 北京市 100730; 3. 卫生部临床检验中心, 北京市 100730)

[关键词] 内科学; 血小板内皮细胞粘附分子1; 基因多态性; 急性冠状动脉综合征

[摘要] 目的 为观察血小板内皮细胞粘附分子1基因多态性与急性冠状动脉综合征的关系。方法 117例急性冠状动脉综合征患者作为病例组, 根据年龄和性别进行1:1匹配, 经冠状动脉造影证实完全正常冠状动脉的患者作为对照组。利用多聚酶链反应-限制性内切酶法分析基因型, 部分样本基因型经基因测序核实。结果 血小板内皮细胞粘附分子1的125Leu和563Ser等位基因频率在病例组中显著升高(病例组: 对照组分别为51.7%: 39.7%和54.3%: 42.3%, 均 $P < 0.05$); 基因型125Leu/Leu+ 125Leu/Val和563Ser/Ser+ 563Ser/Asn病例组较对照组高($P < 0.05$), 回归分析后发现Leu125Leu+ Leu125Val基因型与急性冠状动脉综合征有相关($P < 0.05$); 两个等位基因有紧密连锁($D' = 0.896$); 冠状动脉病变数目与基因多态性无相关性($P > 0.05$); 急性心肌梗死和不稳定型心绞痛患者基因分布无显著相关性($P > 0.05$)。结论 第3外显子基因多态性可能与急性冠状动脉综合征发病过程中不稳定斑块有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Analysis of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Gene Polymorphism in the Patients of Acute Coronary Syndrome

QUAN Jir Hua¹, ZHANG Xin Chao¹, CAI Jian Ping³, HE Qing², XU Feng¹, and DAI Da Peng³

(1. Department of Emergency, 2. Department of Cardiology, Beijing Hospital, Beijing 100730; 3. National Center for Clinical Laboratory, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1; Gene Polymorphism; Acute Coronary Syndrome

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with acute coronary syndrome. **Methods** We analyzed two single nucleotide polymorphisms of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 gene Leu125Val and Ser563Asn in 117 angiographically documented patients with acute coronary syndrome and 117 age- and sex-matched controls in the Chinese population, using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism strategy. Some samples were verified by direct sequencing. **Results** we found that two polymorphisms were in linkage disequilibrium with each other ($D' = 0.896$) and that frequencies of 125Leu1 and 563Ser alleles were significantly increased in patients compared with controls (51.7% vs 39.7%, $P < 0.05$; 54.3% vs 42.3%, $P < 0.05$, respectively). The frequencies of genotypes for 125Leu/Leu+ 125Leu/Val and 563Ser/Ser+ 563Ser/Asn were also significantly increased in the patients ($P < 0.05$). In addition, there were no significant difference in patients among different vessel disease and between acute myocardial infarction and unstable angina. **Conclusion** platelet endothelial cell adhesion molecule 1 gene polymorphism may be a genetic risk factor for acute coronary syndrome.

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是以冠状动脉粥样斑块破裂或侵蚀、继发完全或不完全闭塞性血栓形成为病理基础的一组综合

征。已知的冠心病(coronary artery disease, CAD)危险因素有年龄和性别、高血压、脂质代谢异常、吸烟、糖尿病与胰岛素抵抗、肥胖和运动不足、长期精神紧张、高半胱氨酸血症、炎症和感染等^[1]。近几年有不少研究试图从分子和基因水平探讨CAD或动脉粥样硬化的成因并取得一些初步成果, 其中血小板内皮细胞粘附分子1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)基因多态性与冠心病之间的研究提示, CAD的不同病理过程、传统危险因素的有无、研究对象的种族、性别、年龄的差异均可能对PECAM-1基因多态性与CAD的关联产生影响。PE-

[收稿日期] 2006-06-16 [修回日期] 2007-02-03

[作者简介] 全锦花, 硕士研究生, 研究方向为冠心病基础与临床, 急诊医学, 联系电话 010-85133531, 13146253683, E-mail 为 gnmazy@yahoo.com.cn。通讯作者张新超, 医学博士, 主任医师, 教授, 现从事急诊医学专业, 主要研究方向为高脂血症、冠心病、心力衰竭基础与临床以及多普勒超声评估房、室间隔缺损的肺、体循环血流动力学, 联系电话 010-85133504, E-mail 为 xinchaoz@public3.bta.net.cn。蔡剑平, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 卫生部临床检验中心分子生物学实验室主任, 主要从事临床分子生物学和临床分子诊断学研究, 联系电话 010-58115053, E-mail 为 caijp61@vip.sina.com。

CAM-1 有三个单核苷酸基因多态性, 本研究试图通过测定病例组和对照组第 3 外显子和第 8 外显子上的基因多态性, 研究分析 ACS 患者 PECAM-1 基因多态性, 从基因遗传学方面探索 ACS 的可能内在成因。

1 对象和方法

1.1 对象

病例组与对照组各 117 名, 均来自于 2003 年 7 月至 2005 年 12 月疑似 ACS 入住北京医院心内科并行冠状动脉造影的患者, 根据年龄和性别进行 1:1 匹配(男性 67 名, 女性 50 名)。病例组为确诊 ACS 的患者, 包括不稳定型心绞痛和急性心肌梗死(ST 段抬高型心肌梗死和非 ST 段抬高型心肌梗死)患者, 其中前者 78 人, 后者 39 人, 年龄 56.5 ± 10.6 岁, 均经冠状动脉造影证实至少有一支冠状动脉狭窄 ($\geq 75\%$), 诊断标准: 有胸痛等症状, 心电图有 ST-T 改变, 心肌梗死患者心肌酶升高且有动态演变。对照组年龄 56.6 ± 10.7 岁, 均接受冠状动脉造影, 证实完全正常。采集的相关临床资料有: 高血压病史、糖尿病病史、吸烟史、冠心病家族史, 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 及体质指数 (body mass index, BMI)。

1.2 基因组 DNA 提取

采取 3~5 mL 外周血, 用树脂型 TM 基因组 DNA 提纯试剂盒(赛百盛基因技术有限公司)提取 DNA, 贮存于 -20°C 冰箱备用。

1.3 引物的合成

根据 NCBI 基因库提供的 PECAM-1 基因序列, 用 Oligo 6.65 Demo 软件设计引物, 上海生工生物工程技术服务有限公司合成。外显子 3 Leu125Val 位点的上游序列 3F 为 5'-GCA CCA CCT CTC ACG TCA AG-3', 下游序列 3R 为 5'-AAT GCC AGG CAG ATG AAT GA-3', 外显子 8 Ser563Asn 位点的上游序列 8F 为 5'-TAT CCT GTC AAG TAA GGT GGT G-3', 下游序列 8R 为 5'-GCG TGG TTG GCT CTG TTG-3'。

1.4 目的基因的扩增

外显子 3 和外显子 8 的 PCR 反应体系均 20 μL : 上下引物各 (25 $\mu\text{mol/L}$) 0.3 μL , rTaq 酶 0.15 μL , DNA 模版 2 μL 。扩增条件: 94°C 预变性 5 min 后进入循环, 94°C 变性 30 s $\rightarrow$ 64°C (第 8 外显子为 62°C) 退火

30 s $\rightarrow$ 72°C 延伸 15 s。循环 30 个周期后, 最后 72°C 延伸 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查。

1.5 基因型的检测

外显子 3 的限制性内切酶为 Pvu II (15 Mu/L), 外显子 8 的限制性内切酶为 Nhe I (10 Mu/L), 两种酶均由 TAKARA 公司提供。酶切体系 20 μL , 第 3 外显子: Pvu II 0.4 μL , 10 mmol/L 缓冲液 2 μL , PCR 扩增产物 5 μL ; 外显子 8: Nhe I 0.5 μL , 10 mmol/L 缓冲液 2 μL , PCR 扩增产物 10 μL 。两者反应条件 37°C 3 h, 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳 (150 V) 30 min, 紫外线灯下观察电泳带并照相。部分样本基因型用基因测序核实。

1.6 统计学分析

两组所有连续性变量采用 $\bar{x} \pm s$ 描述; 连锁不平衡和单倍型分析用 SHE sis 软件进行分析; PECAM-1 等位基因、基因型分布用 χ^2 检验, 最后进行 logistic 回归分析。所有检验选择 $P < 0.05$ 为显著差异, 统计软件采用 SPSS (12.0 版)。

2 结果

2.1 临床特征比较

高血压、糖尿病、TG、LDL-C、HDL-C 在两族间分布有显著差异 ($P < 0.05$), 吸烟史、冠心病家族史、甘油三酯、体重指数两族间分布无显著差异 ($P > 0.05$) (表 1)。另外通过统计学分析发现, 各个危险因素与 PECAM-1 基因多态性均无相关性 ($P > 0.05$)。

表 1. 研究对象基本临床特征

参 数	对照组 ($n=117$)	病例组 ($n=117$)	P 值
年龄 (岁)	56.6 ± 10.7	56.5 ± 10.6	> 0.05
性别 (男/女)	67/50	67/50	> 0.05
高血压病	54	79	< 0.05
糖尿病	13	32	< 0.05
有吸烟史	47	60	> 0.05
TC (mg/dl)	183.0 ± 34.4	191.4 ± 43.6	> 0.05
TG (mg/dl)	162.4 ± 90.5	189.7 ± 100.9	< 0.05
LDL-C (mg/dl)	105.5 ± 24.7	118.0 ± 33.8	< 0.05
HDL-C (mg/dl)	43.7 ± 10.2	37.1 ± 7.2	< 0.05
体质指数	25.9 ± 3.1	25.6 ± 3.7	> 0.05
冠心病家族史	21	24	> 0.05

2.2 内皮细胞粘附分子 1 基因多态性检测结果

2.2.1 外显子 3 基因多态性 用 PCR-RFLP 法检测 PECAM-1 外显子 3 发现, 外显子 3 有 125Leu 和 125Val 两个多态性等位基因, 这两个基因的分布频率为: 在病例组为 51.7% 和 48.3%, 在对照组为 39.7% 和 60.3%; 与对照组相比较, 病例组基因 125Leu 表达频率升高(51.7% 比 39.7%) 而基因 125Val 表

达频率降低(48.3% 比 60.3%) ($P < 0.05$)。这两个等位基因产生了 3 种基因型: CC、CG 和 GG (即 125Leu/Leu、125Leu/Val 和 125Val/Val) (图 1)。三种基因型的分布见表 2, 可见三种基因型之间的分布有显著性差异 ($P < 0.05$), OR 为 1.987(95% CI, 1.129-3.495)。测序结果见图 2。

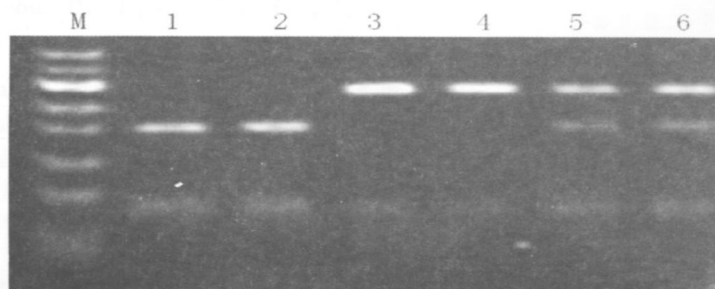


图 1. 基因 Leu125Val 位点多态性的电泳图 M 为 50 bp DNA Ladder, 1 和 2 为 Leu125Leu 基因型(188+ 68+ 78= bp), 3 和 4 为 Val125Val 基因型(266+ 68= bp); 5 和 6 为 Leu125Val 基因型(266+ 188+ 68+ 78= bp)。

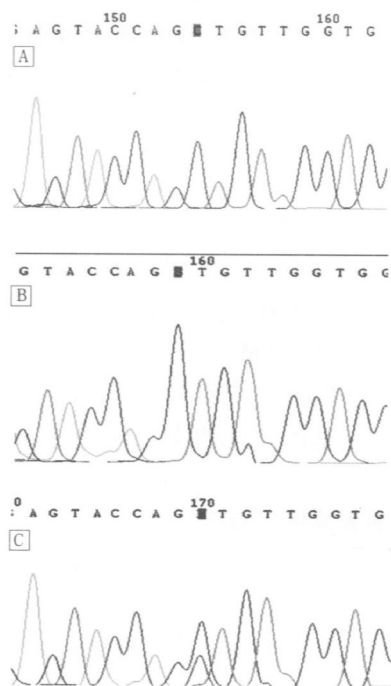


图 2. 外显子 3 的基因型测序图 A 为 Leu125Leu 基因型, B 为 Val125Val 基因型, C 为 Leu125Val 基因型。

2.2.2 外显子 8 基因多态性 用 PCR-RFLP 法检测 PECAM-1 外显子 8 发现, 外显子 8 有 563Ser 和 563Asn 两个多态性等位基因, 这两个基因的分布频率为: 在病例组为 54.3% 和 45.7%, 在对照组为 42.3% 和 57.7%; 与对照组相比较, 病例组基因 563Ser 表达频率升高(54.3% 比 42.3%) 而基因 563Asn 表达频率降低(45.7% 比 57.7%) ($P < 0.05$)。这两个等位基因产生 3 种基因型: GG、GA 和 AA (即 563Ser/

Ser、563Ser/Asn、563Asn/Asn) (图 3)。三种基因型的分布见表 3, 其基因型的分布有显著差异 ($P < 0.05$), OR 为 2.123(95% CI, 1.171-3.849)。测序结果见图 4。

表 2. 外显子 3 基因型分布频率

基因型	ACS 组 (n= 117)	对照组 (n= 117)
125Leu/Leu	32 (27.4%)	21 (17.9%)
125Leu/Val	57 (48.7%)	51 (43.6%)
125Val/Val	28 (23.9%)	45 (38.5%)

表 3. 外显子 8 基因型分布频率

基因型	ACS 组 (n= 117)	对照组 (n= 117)
563Ser/Ser	33 (28.2%)	22 (18.8%)
563Ser/Asn	61 (52.1%)	55 (47.0%)
563Asn/Asn	23 (19.7%)	40 (34.2%)

2.3 logistic 回归分析结果

对所有两组间有差异的因素用逐步前进筛选变量法进行 Logistic 回归分析, 结果发现, 与 ACS 相关的因素有高血压、LDLC、HDLc、Leu125Leu 和 Leu125Val 基因型 ($P < 0.05$)。连锁不平衡分析发现两个等位基因有连锁不平衡现象, D' 值为 0.896, 即这两个等位基因紧密连锁; 单倍型分析发现 Leu125 与 Ser563、Val125 与 Asn563 发生紧密连锁。

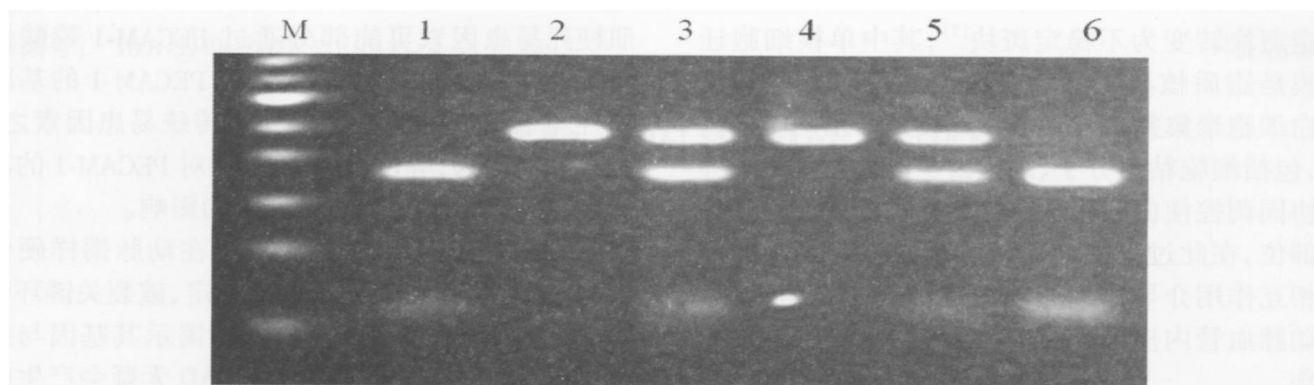


图 3. 基因 Ser563Asn 位点多态性的电泳图 M 为 50 bp DNA Ladder; 1 和 6 为 Ser563Ser 基因型(167+ 58 bp); 3 和 5 为 Ser563Asn 基因型(225+ 167+ 58 bp) 2 和 4 为 Asn563Asn 基因型(225 bp)。

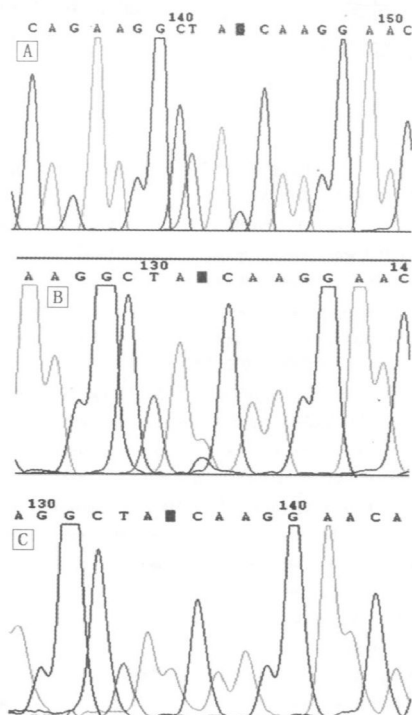


图 4. 外显子 8 的基因型测序图 A 为 Ser563Ser 基因型, B 为 Ser563Asn 基因型, C 为 Asn563Asn 基因型

2.4 病变程度与基因多态性的关系

病例组中, 冠状动脉单支病变患者有 37 人, 2 支病变患者 42 人, 3 支病变患者 38 人。外显子 3 和 8 等位基因和基因型分布无显著差异($P > 0.05$)。

病例组中, 急性心肌梗死患者有 39 人, 不稳定型心绞痛患者 78 人, 外显子 3 和 8 等位基因和基因型分布无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

研究发现, PECAM-1 主要分布在单核细胞、中性粒细胞、以及某些 T 细胞亚群, 且发现培养的内皮细胞连接区表达甚高。PECAM-1 是分子质量为 130 kDa 的跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白 (immune globulin)

lin, Ig) 超家族成员, 胞外区有 6 个 Ig 样同源功能区, 跨膜区和胞浆区都比较短小^[2]。PECAM-1 基因位于染色体 17q23, 该基因含有 16 个外显子, 胞外区分别由外显子 3~8 编码, 125 位氨基酸位于免疫球蛋白细胞外区的第 1 个环上, 参与同性分子间的相互作用^[3], 563 位氨基酸位于免疫球蛋白第 6 环区, 可能参与异性配体间的相互作用^[4]。

迄今为止, PECAM-1 基因多态性在 CAD 患者中的研究, 根据研究对象的不同大体上可分为两类: 一类是不具体分冠心病类型, 以冠心病或冠状动脉狭窄为对象进行, 另一类则特定心肌梗死为研究对象, 本研究是以具有类似病理和病理生理特点的 ACS 为对象。Sasaoka 等^[5]的研究对象是患心肌梗死的日本人群, 其病例选择上与本研究有相似的病理基础, 均与不稳定斑块的存在有关。虽然两个研究的种族不同, 但等位基因分布类似, 125Leu 和 563Ser 等位基因在病例组中出现频率增加。本文认为 125Leu 和 Ser563 这两个等位基因在部分东方人群、冠状动脉存在不稳定斑块的 ACS 患者中的频率可能较高。

Sasaoka 等^[5]的研究中提出, Ser563Ser 基因型频率在心肌梗死患者中升高, 但 125 位基因型分布无显著性差异, 认为 Ser563Asn 基因多态性与心肌梗死有关, 而 125Leu 等位基因与 MI 的相关性可能与 563 位和 670 位基因连锁有关。这个结果与我们的研究结果不一致, 复习文献认为, 研究对象的选择标准和匹配与否是两个实验的不同之处。

冠状动脉粥样硬化性斑块的破裂和继发血栓形成是 ACS 的直接原因, 其中斑块的破裂是 ACS 发生中最重要的一环。一般脂质坏死核心较大 (占斑块体积的 40% 以上), 质地软, 纤维帽薄的偏心性斑块多不稳定, 容易破裂, 其中可见大量炎性细胞 (包括巨噬细胞) 浸润^[6]。炎症反应可通过多种机制

使稳定斑块转变为不稳定斑块^[7],其中单核细胞迁入内膜是脂质核心扩大和斑块炎症反应发生的扳机。白细胞聚集并游走到炎症部位是一系列的连续过程,包括细胞粘附分子、细胞因子以及趋化因子等相互协同调控使白细胞从血管腔穿过内皮细胞到达炎症部位,在此过程中 PECAM-1 通过参与复杂的配体间相互作用介导白细胞与内皮细胞间粘附,导致冠状动脉血管内皮损伤,加重冠状动脉缺血及再灌注损伤。

文献[8]报道,可溶性 PECAM-1 分子胞浆外 Ig 样功能 1 区能阻断白细胞的跨内皮细胞转移。提示这个区域是 PECAM-1 的粘附功能的决定区域。此区域氨基酸的不同可影响同型分子间的粘附,从而改变单核细胞和内皮细胞间的相互作用。我们的研究结果提示,第 3 外显子 125Leu 频率在 ACS 组中明显增多,提示 PECAM-1 的第 125 位为亮氨酸时 PECAM-1 分子可能具有更强的粘附功能或促进粘附后信号转导过程,从而增强单核细胞的跨内皮功能。我们的研究还发现,Leu125Leu 和 Leu125Val 基因型在 ACS 组中出现频率高,Leu125 为野生型,Val125 为变异型,125 位发生突变后减弱了其表达,即在杂合子中可能 C 基因(Leu125)比 G 基因(Val125)优先表达。

563 位氨基酸位于免疫球蛋白第 6 环内,可能在整合素的连接方面起到重要作用。我们的研究发现,ACS 组中 Ser563 的频率明显增高,但经 logistic 回归分析后这种关联消失。外显子 3 的 Leu125 与外显子 8 上的 Ser563 有明显的连锁不平衡,考虑 Ser563 与 ACS 相关性可能是通过与 Leu125 连锁不平衡而实现。

有研究提出,传统的冠心病易患因素如吸烟能增加 PECAM-1 在单核细胞上的表达与磷酸化,增加葡萄糖引起的 PECAM-1 磷酸化后的单核细胞迁移^[9],而低氧可导致 PECAM-1 磷酸化及增强单核细胞穿过血管内皮细胞^[10]。这些研究提示传统的心

肌梗死易患因素可能部分通过 PECAM-1 磷酸化而呈现功能改变。但本实验发现,PECAM-1 的基因多态性与 ACS 间的关系是独立于传统易患因素之外,因此我们认为,等位基因 125Leu 对 PECAM-1 的功能影响可能超出了传统易患因素的影响。

粘附分子家族的 PECAM-1 在动脉粥样硬化发生与发展,尤其在粥样斑块不稳定、破裂关键环节上可能都有十分重要的作用,如能揭示其基因与疾病的关联,对于早期预防和治疗 CAD 无疑会产生极有意义的促进作用。通过本实验,我们推测 PECAM-1 基因多态性与 ACS 有相关性,且发现出独立于其它传统危险因素而存在,但是其确切的发病机制和影响因素还有待于进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 牧野百合子. 急性冠状动脉综合征的危险因子及其预防[J]. 日本医学介绍, 1999, 5 (20): 202-204.
- [2] Edmead CE, Crosby DA, Southcott M, Poole AW. Thrombin induced association of SHP-2 with multiple tyrosine phosphorylated proteins in human platelets [J]. *FEBS Lett*, 1999, 459 (1): 27-32.
- [3] Newton JP, Buckley CD, Jones EY, Simmons DL. Residues on both faces of first immunoglobulin fold contribute to homophilic binding sites of PECAM-1/CD31 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (33): 20 555-563.
- [4] Wong CW, Wiedle G, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Etteldorf S, Bruckner M, et al. PECAM-1/CD31 transmonophilic binding at the intercellular junction is independent of its cytoplasmic domain; evidence for heterophilic interaction with integrin $\alpha v \beta 3$ in cis [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11 (9): 3 109-121.
- [5] Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T. Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene Asn563Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 947 (12): 259-269.
- [6] Davies MJ. Pathophysiology of acute coronary syndromes [J]. *Heart*, 2000, 83 (4): 361-366.
- [7] 周志斌, 郭毅. 不稳定性动脉粥样硬化斑块的特点及主要形成机制 [J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2004, 2 (12): 137-140.
- [8] Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270 (5): H624-633.
- [9] Rattan V, Shen Y, Sultana C, Kumar D, Kalra VK. Glucose-induced transmigration of monocytes is linked to phosphorylation of PECAM-1 in cultured endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271 (4): E711-717.
- [10] Kalra VK, Shen Y, Sultana C, Rattan V. Hypoxia induces PECAM-1 phosphorylation and transendothelial migration of monocytes [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271 (5): H2 025-034.

(此文编辑 胡必利)