

• 临床研究 •

纤溶酶原激活物抑制物-1 基因 4G/5G 基因型分布频率
与心肌梗死和脑梗死相关性初步分析

战梅 周玉玲 韩忠朝

【摘要】 目的 研究我国汉族人纤溶酶原激活物抑制物-1 基因启动子区-675 位 4G/5G(单鸟嘌呤核苷酸插入/缺失)基因多态性与心肌梗死和脑梗死的等位基因特异性的相关性。方法 以等位基因特异性聚合酶链反应(AS-PCR)扩增 56 例心肌梗死患者, 54 例脑梗死患者, 83 例无关健康对照个体的基因组 DNA, 鉴定 PAI-1 4G/5G 基因型及分布频率, 常规方法检验研究个体的主要临床和生化指标。结果 PAI-1 基因启动子区 4G/5G 基因多态性在心肌梗死, 脑梗死患者组中的分布频率与对照组明显不同。在心肌梗死组中, 4G/4G 基因型分布频率(71.40%)比对照组(30.12%)显著增加($P < 0.001$), 杂合型 4G/5G 基因型分布频率(25.00%)比对照组(62.65%)明显降低; 而在脑梗死组中, 4G/4G, 4G/5G 基因型分布频率(分别为 20.37%, 55.56%)均比对照组(分别为 30.12%, 62.65%)低, 5G/5G 基因型明显增加(24.07% vs 7.32%, $P < 0.001$)。而且心梗组中血浆 PAI-1 活性水平随着 4G 等位基因的减少而降低; 脑梗死组中, 血浆 PAI-1 活性水平随着 5G 等位基因的升高而增加。心肌梗死、脑梗死患者组中的血浆 PAI-1 活性水平, 甘油三酯水平和血糖水平都比对照组明显升高(分别为 $P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$)。结论 本研究表明, 中国汉族人 PAI-1 基因启动子区 4G/5G 基因多态性可能和心肌梗死、脑梗死发生的危险性相关, 4G/5G 基因多态性可能是一种重要的遗传性血栓性疾病的危险因子。

【关键词】 纤溶酶原激活物抑制物-1; 多态性; 心肌梗死; 脑梗死

4G/5G Polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1
in myocardial and cerebrovascular infarction: a primary study

ZHAN Mei, ZHOU Yuling, HAN Zhongchao

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology,
Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between the 4G/5G gene polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and myocardial and cerebrovascular infarctions. **Methods** The PAI-1 4G/5G genotype was identified with allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) in 56 myocardial infarction patients, 54 cerebrovascular infarction patients and 83 unrelated healthy controls. All subjects' clinical features and plasma PAI-1 activity levels were tested as usual. **Results** The PAI-1 genotype distribution frequency of the single guanine deletion/insertion 4G/5G polymorphism (which was sited at -675bp upstream from the start of transcription) was significantly different between the patients and the healthy controls. In myocardial infarction (MI) group, the 4G/4G-genotype frequency was noticeably increased (71.40% vs 30.12%) while 4G/5G-genotype was decreased (25.00% vs 62.65%) as compared with the control one. In cerebrovascular infarction (CI) group, the frequencies of both 4G/4G- and 4G/5G-genotypes were lower than those in the control one ($P < 0.001$). Moreover, the plasma PAI-1 activity level in MI group lowered with decrease in the 4G allele. In CI group, the 5G/5G frequency was markedly higher than that of the control one ($P < 0.001$). The plasma PAI-1 activity level in CI group was elevated with increase in the 5G allele. **Conclusions** This study indicates that the 4G/5G gene polymorphism of PAI-1 probably associated with the risk of myocardial infarction and cerebrovascular infarction. This deletion/insertion polymorphism is probably an important hereditary risk factor.

【Key Words】 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1); Polymorphism; Myocardial infarction; Brain infarction

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39725014)

作者单位: 300020 天津, 中国医学科学院 中国协和医科大学 血液学研究所

作者简介: 战梅, 女, 在读医学博士研究生

通讯作者: 韩忠朝, 电话: 022-27317276; 传真: 022-27317273; E-mail: tihzchan@public.tpt.tj.cn

纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)是分子量 50ku 的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员^[1-3],主要生理功能是抑制组织型纤溶酶原激活物(t-PA)和尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)^[4,5]。血浆 PAI-1 活性的升高导致纤溶能力降低,纤维蛋白原聚集,易发生血栓性疾病^[6-8]。近年发现,PAI-1 基因在启动子区上游-675 位有一个单核苷酸插入/缺失基因多态性(4G/5G)。一些研究表明,这个插入/缺失基因多态性和 PAI-1 转录活性的改变相关^[9,10],4G/4G 基因型个体似乎有着较高的血浆 PAI-1 水平。但是,针对 4G/5G 基因多态性和主要脏器血栓性疾病,如心肌梗死,脑梗死的相关性的研究,由于各国不同研究机构,不同人群,不同地区,样本例数,人群种族,实验设计以及参比标准的不一致,一直存在着争议^[9-11]。作者的随机病例-对照研究旨在分析中国汉族人人心肌梗死,脑梗死患者及健康对照者 PAI-1 基因启动子区 4G/5G 基因多态性和疾病发生危险性的相关性。

1 方法

1.1 研究对象 心肌梗死组,所有研究对象均为中国汉族人,共 56 例,男 44 例,女 12 例,平均年龄(67±10)岁。所有病例均符合 WHO 诊断标准。脑梗死组,所有研究对象均为天津地区汉族人,共 54 例,男 41 例,女 13 例,平均年龄(62±12)岁。所有病例均符合 WHO 诊断标准。正常对照组:随机选自健康无关个体,无糖尿病、高血压及其他慢性病、遗传病史,共 83 例,男 65 例,女 18 例,平均年龄(64±10)岁。

1.2 采血 心肌梗死,脑梗死患者(发病后,治疗前)以及正常对照组于清晨 8:00~9:00 平卧空腹各取肘正中静脉血 5ml,抗凝处理。血样 4℃ 离心,液氮速冻, -80℃ 保存。低渗溶血法分离白细胞。采用酚抽提法从白细胞中抽提基因组 DNA。

1.3 生化指标分析 PAI-1 活性测定采用发色底物法。常规方法检验研究对象的主要临床和生化指标,包括血浆甘油三酯水平,胆固醇水平,体重指数和血糖水平。

1.4 4G/5G 基因多态性鉴定 等位基因特异性聚合酶链反应(AS-PCR)方法分析 PAI-1 4G/5G 基因多态性。

PCR 引物,设计如参考文献^[1],稍加改进:

PAI-1 4G:5'-GTCTGGACACGTGGGGA-3'(相应于 4G/4G 基因型 PAI-1 启动子上游(-)675bp—

(-)659bp; PAI-1 5G:5'-GTCTGGACACGTGGGGG-3'(相应于 5G/5G 基因型 PAI-1 启动子上游(-)675bp—(-)659bp; PAI-1 2d(共同下游引物):5'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCGAG-3'; β -肌动蛋白(β -actin)作为对照:上游引物:5'-GAGACCT-TCAACACCCCAGCC-3',下游引物:5'-AATGT-CACGCACGATTTC-3',PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min, 65℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环。取 PCR 产物,2% 琼脂糖凝胶,紫外灯下显影,并测序。

1.5 统计学处理 统计数字以平均值±标准差表示。运用 SPSS 软件进行统计学分析,各基因型频率分布的比较采用 χ^2 检验,作为比较判断 4G/5G 基因型是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,以及用来分析 4G/5G 基因型分布频率以及 4G,5G 等位基因分布频率在心肌梗死、脑梗死组和正常对照组之间的分布。

线性回归分析 PAI-1 活性和基因多态性之间的关系。 $P<0.05$ 为显著性差异, $P<0.01$ 为非常显著性差异。

2 结果

AS-PCR 方法分析 PAI-1 4G/5G 基因多态性结果见图 1。

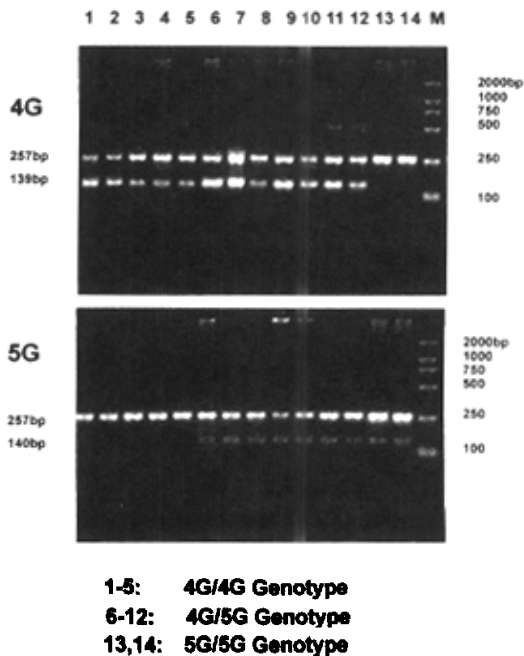


图 1 PAI-1 4G/5G 基因多态性电泳分析图

表 1 心肌梗死、脑梗死组和对照组的主要临床和生化指标

项 目	心肌梗死组	脑梗死组	对照组	P 值	正常 P' 值
性别(男/女)	56 (44/12)	54 (41/13)	83 (65/18)		
年龄(岁)	67.10 ± 10.41	62.22 ± 12.09	64.87 ± 10.13	>0.05	>0.05
甘油三酯(mmol/L)	1.46 ± 0.67	1.56 ± 0.97	1.14 ± 0.45	<0.05	<0.05
胆固醇(mmol/L)	5.07 ± 1.07	4.70 ± 0.80	4.74 ± 0.89	>0.05	>0.05
血糖(mmol/L)	8.39 ± 3.96	6.81 ± 3.21	4.97 ± 0.92	<0.001	<0.001
体重指数(kg/m ²)	24.88 ± 3.88	24.90 ± 3.81	24.17 ± 3.18	>0.05	>0.05
纤溶酶原激活物抑制物-1 (AU/ml)	0.90 ± 0.13	0.99 ± 0.08	0.68 ± 0.08	<0.001	<0.001

心肌梗死组和对照组的主要临床和生化指标见表 1。PAI-1 活性水平在两组中分别为(0.90 ± 0.13)和(0.68 ± 0.08), 两组间有显著性差异($P < 0.001$)。血浆甘油三酯水平和血糖水平在心肌梗死组中比对照组明显升高(分别 $P < 0.05$, $P < 0.001$), 表明其可能和心肌梗死的发生危险性相关。脑梗死组和对照组的主要临床和生化指标显示, 血浆 PAI-1 水平在脑梗死组中为(0.99 ± 0.08), 较健康对照组显著升高($P < 0.001$)。4G/5G 基因型分布频率在心肌梗死组和脑梗死组均比对照组有明显改变, 但是呈现不同相关性。心肌梗死组调查的 56 例患者中, 携带 4G/4G, 4G/5G, 5G/5G 3 种基因型的患者人数分别 40 例, 14 例, 2 例, 其基因型分布频率分别是 71.4%, 25%, 2%。4G/4G 基因型分布频率相对对照组的 30.12% 显著增加($P < 0.001$)。5G/5G 基因型分布频率为最低。但是在调查的 54 例脑梗死患者中 4G/4G, 4G/5G, 5G/5G 3 种基因型的分布频率明显变化, 为 20.37% (11 例), 55.56% (30 例), 24.07% (13 例)。相比对照组的 7.23%, 脑梗死组的 5G/5G 基因型分布频率显著增加($P < 0.001$)。

表 2 结果显示, 心肌梗死组、脑梗死组和对照组的 PAI-1 活性水平在 3 种基因型之间的表现不同, 但趋势相似, 均比对照组升高。而且心肌梗死组中血浆 PAI-1 活性水平随着 4G 等位基因的减少而降低; 脑梗死组中血浆 PAI-1 活性水平随着 5G 等位基因的升高而增加。心肌梗死、脑梗死患者组中的血浆甘油三酯水平和血糖水平都比对照组明显升高(分别 $P < 0.05$, $P < 0.001$)。

3 讨 论

PAI-1 是纤溶酶原激活/纤溶酶链激反应中非

常重要的一种因子, 血浆 PAI-1 水平的升高和心血管疾病、脑血管疾病、深静脉血栓及 2 型糖尿病的发生危险性相关。PAI-1 表达水平受多种因素影响, 包括许多遗传和环境因素, 不同个体间 PAI-1 活性水平的差异对于评估其血栓性疾病的危险性有重要意义。

表 2 心肌梗死组、脑梗死组和对照组的血浆 PAI-1 水平及基因型

基因型	纤溶酶原激活物抑制物-1 (AU/ml)
心肌梗死组	
4G/4G	0.91 ± 0.11
4G/5G	0.89 ± 0.16
5G/5G	0.76 ± 0.17
脑梗死组	
4G/4G	0.96 ± 0.11
4G/5G	0.99 ± 0.07
5G/5G	1.02 ± 0.01
对照组	
4G/4G	0.79 ± 0.12
4G/5G	0.68 ± 0.13
5G/5G	0.66 ± 0.12

PAI-1 基因在启动子区上游-675 位有一个单核苷酸插入/缺失基因多态性(4G/5G), 有研究认为, 4G, 5G 等位基因有一个共有的转录激活子的结合区, 而 5G 等位基因还有一个特有的转录抑制子的结合区, 因此 5G 等位基因转录效应比 4G 等位基因减弱。Dawson 等发现, 在体外细胞实验中, HepG2 细胞在受到 IL-1 刺激后, 由于共有的转录激活子的作用, 4G 等位基因转录的 PAI-1 mRNA 水平比 5G 等位基因高 6 倍。这样看来, PAI-1 4G 等位基因的转录活性比 5G 等位基因是升高的。但是还有一些研究的结论却与之相反, 4G/5G 基因多态性对 PAI-

1 血浆水平的影响机制究竟是怎样的,还并没有彻底阐明^[9,11-14]。

作者的随机病例-对照研究分析了在天津地区心肌梗死、脑梗死患者 PAI-1 基因启动子区 4G/5G 基因多态性,PAI-1 血浆水平和疾病发生危险性的相关性。作者研究对象的基因型分布频率与从前的报道不同,心肌梗死组中的 4G/4G 基因型分布频率相对更高(71.4%),而脑梗死患者却又不同,5G/5G 基因型分布却是在 3 种基因型中最高。同时在两个疾病组中 PAI-1 血浆水平和 4G/5G 基因多态性的相关关系呈相反。是否由于地区的差异,人群样本的选取,其他多种基因,环境协同作用影响了这种关联性的分析,还有待深入探究。

总之,本研究中,天津地区 4G/5G 基因多态性在心肌梗死、脑梗死患者的分布频率差异及 PAI-1 血浆水平,4G/5G 多态性与疾病发生危险性的相关性,说明 PAI-1 启动子区 4G/5G 基因多态性可能是一种重要的遗传性血栓性疾病的危险因素。而血浆甘油三酯水平和血糖水平作为心肌梗死、脑梗死重要的环境危险因素,是否也参与 PAI-1 活性的调节,是作者今后工作的目标。

参考文献

- 1 Cesari M, Sartori MT, Patrassi GM, et al. Determinants of plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1: a study of normotensive twins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 316-320.
- 2 Ginsbueg D, Zeheb R, Yang AY, et al. cDNA cloning of human plasminogen activator inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest*, 1996, 78: 1673-1680.
- 3 Ny T, Sawdey M, Lawrence D, et al. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83: 6776-6780.
- 4 Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, et al. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the serpin gene family. *EMBO J*, 1986, 5: 2539-2544.
- 5 Kruithof EKO, Tran-Thang C, Raansjin A, et al. Demonstration of the fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma. *Blood*, 1998, 64: 907-913.
- 6 Thorsen S, Philips M, Selmer J, et al. Kinetics of inhibition of tissue-type and urokinase-type plasminogen activator by

plasminogen-activator inhibitor type 1 and type 2. *Eur J Biochem*, 1988, 175: 33-39.

- 7 Pawse AR, Tarachand U. Clotlysis: role of plasminogen activator inhibitors in haemostasis and therapy. *Indian J Exp Biol*, 1997, 35: 545-552.
- 8 Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 in thrombotic disease. *Curr Opin Hematol*, 1996, 3: 372-378.
- 9 Gardemann A, Lohre J, Katz N, et al. The 4G/4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost*, 1999, 82: 1121-1126.
- 10 Eriksson P, Kallin B, van's Hooft FM, et al. Allele-specific increases in basal transcription of the plasminogen activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 1851-1855.
- 11 Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, et al. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 1993, 268: 10739-10745.
- 12 Ye S, Green FR, Scarabin PY, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAT-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost*, 1995, 74: 837-841.
- 13 Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor 1 in Caucasian patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost*, 1995, 74: 842-847.
- 14 Panahloo A, Mohamed-Ali V, Lane A, et al. Determinants of plasminogen activator inhibitor 1 activity in treated NIDDM and its relation to a polymorphism in the plasminogen activator inhibitor 1 gene. *Diabetes*, 1995, 44: 37-42.
- 15 Henny M, Chomiki N, Scarabin PY, et al. Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 851-858.

(收稿日期: 2002-11-27)

(本文编辑 李楠生)