

TAFI 基因编码区 C291T 的多态性与脑梗死的相关性研究

何芳梅 陈煜森

【摘要】 目的 探讨中国汉族人群中凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)基因编码区 C291T 的多态性与脑梗死的相关性。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 173 例脑梗死患者(脑梗死组)和 158 例健康人(对照组)的 TAFI 基因编码区 C291T 多态性的基因型。结果 脑梗死组 TAFI 基因 C291T 多态性的 CC 基因型为 53.2%(92/173),T 等位基因携带者为 46.8%(81/173); 而对照组 CC 基因型为 68.4%(108/158),T 等位基因携带者为 31.6% (50/158), 两组之间的差异有统计学意义 ($\chi^2=7.952, P=0.005$)。脑梗死组 C、T 等位基因频率分别为 70.8% (245/346), 29.2%(101/346); 对照组 C、T 等位基因频率分别为 81.9%(259/316), 18.1%(57/316), 两组之间的差异有统计学意义($\chi^2=11.306, P=0.001$)。结论 TAFI 基因编码区 C291T 的多态性与脑梗死呈显著性相关。

【关键词】 凝血酶激活的纤溶抑制物基因; 单核苷酸多态性; 脑梗死

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)03-0254-04

Association of C291T polymorphism in the coding region of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor gene with cerebral infarction

HE Fang -mei, CHEN Yu -sen. Department of

Neurology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China

Corresponding author: CHEN Yu-sen, Email: chenysusen925@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the association between C291T polymorphism in the coding region of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and cerebral infarction in Chinese Han population. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine C291T polymorphism in the encoding region of TAFI gene in 173 patients with cerebral infarction and 158 healthy control subjects. **Results** The frequencies of CC genotype and T alleles carriers of C291T gene were 53.2% (92/173) and 46.8% (81/173) in the case group and 68.4% (108/158) and 31.6% (50/158) in the control group, respectively. Chi-square test showed significant difference in the frequencies of these genotypes between the two groups ($P<0.05$). The frequencies of C and T alleles were 70.8% (245/346) and 29.2% (101/346) in the case group, and 81.9% (259/316) and 18.1% (57/316) in the control group, respectively, also showing significant differences between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion** C291T polymorphism in the coding region of TAFI gene is significantly associated with cerebral infarction.

【Key words】 Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor gene; Single nucleotide polymorphism; Cerebral infarction

凝血酶激活的纤溶抑制物(thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI) 是由肝脏分泌的具有抑制纤维蛋白溶解作用的单链糖蛋白, 亦称血浆羧肽酶原 B(procarboxypeptmase B)或羧肽酶原 U^[1]。它可被纤维蛋白酶、纤维蛋白溶酶(plasmin)、纤维蛋白酶

- 血栓调节素复合物(thrombin-thrombomodulin complex)等激活成为羧肽酶 B 样的酶(TAFI-a)。当 TAFI-a 接触到纤维蛋白凝块时, 它就催化其 C- 末端切去赖氨酸, 从而减少纤维蛋白酶原激活所需的辅助因子(cofactor)的活性, 故纤维蛋白酶原对纤维蛋白凝集作用效力减小, 从而导致纤维蛋白溶解更漫长。TAFI-a 通过这种途径起到抗纤维蛋白溶解的作用^[2-5], 并在血液凝固和纤维蛋白溶解的平衡中发

挥重要作用。有实验研究表明血浆中 TAFI 抗原水平明显受遗传控制^[6-9],也有推测 TAFI 基因是动脉粥样硬化血栓形成疾病的候选基因之一。TAFI 的多态性可能成为预测动脉粥样硬化性心脑血管疾病发生血栓事件的一个新标志物^[10-12]。最近 Ladenvall 等^[13]的研究也提示 TAFI 有可能为急性脑梗死发生的危险性预测因子。中国人群中 TAFI 基因 C291T 的多态性与急性脑梗死关系的研究在国内外目前尚少见报导。因此,本研究在中国人群中检测 TAFI 基因 C291T 频率的分布特点,并分析其基因多态性与脑梗死的相关性,目的在于探讨 TAFI 基因 C291T 的多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的关系及可能的作用机制,为寻找更有效而安全的溶栓治疗提供理论基础。

材料与方 法

一、研究对象和分组标准

脑梗死组:为自 2006 年 8 月至 2007 年 11 月在我院神经内科住院的动脉粥样硬化性脑梗死患者,病程在 1 周内,均为汉族人,共 173 例,其中男 107 例,女 66 例;年龄 38~80 岁,平均(67.4±8.7)岁。所有患者均经过临床及 CT 和(或)MRI 确诊(依照第四届全国脑血管病学术会议诊断标准),排除心脏源性脑栓塞(房颤、心瓣膜病、心肌梗死、二尖瓣脱垂、心脏粘液瘤)、动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤等其他原因引起的脑梗死者。对照组:为同期我院健康体检者,均为汉族人,共 158 例,其中男 96 例,女 62 例;年龄 37~78 岁,平均(66.8±8.2)岁;均无脑卒中史,并经过临床检查(或)影像学检查排除脑卒中。经 χ^2 检验和 t 检验,两组之间男女比例、平均年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有标本的收集均经本人或其家属同意,并经广东医学院医学研究伦理委员会同意。

二、DNA 的提取和 TAFI 基因的分型

取早晨空腹静脉血 5 mL,柠檬酸钠 (3.8%)抗凝,用碘化钾法提取外周血白细胞的基因 DNA。用聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法检测脑梗死组和对照组全部样本 TAFI 基因 C291T 的多态性。根据多态性位点 C291T 及其两侧的 DNA 序列,用 Primer5 引物设计软件设计引物,用 NEBcutterV2.0 设计 HpyCH4IV 限制性内切酶,根据酶切片段条带的不同来分析其基因型和多态性。引物由上海生工合成,上游引物:5'-TTTACCACAATGCGAGAT-3',下游引物:5'-ATAGTACGATGCGGAGGC-3'。PCR 反应体系

12.5 μ L,其中包括 10 \times Buffer 1.25 μ L,dNTP (10 mmol/L)1.0 μ L,引物 (20 μ mol/L) 0.2 μ L,基因组 DNA 1.0 μ L,TaqDNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.125 μ L,H₂O 8.525 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C、热变性 5 min;94 $^{\circ}$ C、45 s,退火 52 $^{\circ}$ C、45 s,延伸 72 $^{\circ}$ C、45 s,扩增 33 个循环后延伸 72 $^{\circ}$ C、10 min,终止反应。取 PCR 扩增产物 1 μ L、NEB Buffer 0.5 μ L、HpyCH4IV 0.12 μ L、水 3.88 μ L,总体积为 5 μ L,37 $^{\circ}$ C 酶切 7 h,进行 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。100 V 电泳 4 h 以后用银染色,观察结果。含有 TAFI 基因 Exon4 C291T 的 PCR 产物是 246 个碱基对,C291C 经 HpyCH4IV 酶消化后产生两个片段分别是 199 bp 和 57 bp 片断,C291T 则有 3 个片段,分别为 246 bp、199 bp 和 57 bp,T291T 则只有一个片断,为 246 bp。

三、统计学分析

应用 SPSS13.0 统计软件包和遗传学数理统计方法进行所有资料的统计分析。基因型和等位基因频率采用直接计数法统计。研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、基因型和等位基因频率的组间比较采用四格表 χ^2 检验。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并用 t 检验分析。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

TAFI 基因位点 C291T 上从 C 到 T 的突变产生了 HpyCH4IV 限制性内切酶的酶切点。我们用 PCR-RFLP 法分析了 331 个样本中 TAFI 基因 C291T 的基因型,结果 C291T 的基因型及等位基因频率分布以及各自卡方检验结果见表 1。

表 1 TAFI 基因 C291T 的多态性及等位基因频率与脑梗死的相关性

Tab.1 Association of C291T polymorphism in the encoding region of TAFI gene and the allele frequencies with cerebral infarction

组别	例数	基因型频率		等位基因型频率	
		CC(%)	CT+TT(%)	C(%)	T(%)
脑梗死组	173	92(53.2)	81(46.8)	245(70.8)	101(29.2)
对照组	158	108(68.4)	50(31.6)	259(81.9)	57(18.0)
χ^2 值		7.952		11.306	
P 值		0.005		0.000	

脑梗死组与对照组人群中 TAFI 基因编码区 C291T 的基因型分布经 Pearson χ^2 检验均符合 Hardy-Weinberg 平衡,脑梗死组 $\chi^2=1.761$, $P=0.415$,对照组 $\chi^2=0.479$, $P=0.787$,表明 TAFI 基因编码区

C291T位点的基因型分布在所研究的人群中已达到了遗传平衡。在脑梗死组中,T等位基因携带者(CT或TT基因型)及T等位基因的频率分别是46.8%和29.2%,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。T等位基因增加脑梗死患病风险,其关联强度 $OR=1.62$,95%CI(1.22,1.16)。T等位基因携带者增加脑梗死患病风险,其关联强度 $OR=1.48$,95%CI(1.12,1.96);T等位基因纯合子患脑梗死风险更高,其关联强度 $OR=2.61$,95%CI(1.13,6.00)。

讨 论

血液凝固和纤维蛋白溶解往往被认为是两个分离的系统,近年来TAFI的研究发现使这种看法有所改变。TAFI属于羧肽酶家族成员,血液凝固时其可以被凝血酶激活,特异性裂解纤维蛋白C末端赖氨酸残基,下调纤溶系统^[1-3],从而提示血浆中TAFI浓度升高可能增加血栓形成的危险性。而且血浆中TAFI浓度的个体差异很难仅以生活习惯等环境因素来解释,有研究表明它是受遗传因素决定的^[6-9]。Henry等^[6]对TAFI基因的启动子和3'端的DNA序列进行测序,研究发现7个新的单核苷酸多态性,其中5个位于启动子区(C-2599G、-2345G/C、A-1690G、G1102T、G438A),2个位于3'非翻译区(C+1542G、T+1583A),这些多态性位点均与其抗原水平有关。在单变量分析中,这7个单核苷酸多态性都分别与血浆中的TAFI浓度差异有关,它们可以解释血浆中的TAFI浓度个体变异的20%~52%。多变量分析提示最少有两个多态性对血浆中TAFI浓度有独立并有叠加作用,这两个多态性位点C+1542G和Thr147Ala结合起来可以解释血浆变异的60%以上。编码区Thr147Ala和Thr325Ile2个多态性位点呈现高度连锁不平衡并与TAFI抗原水平及其活性有关。最近Juhan-Vague等^[14]用多中心的病例-对照方法研究血浆中的浓度以及TAFI基因的多态性(G505A和3'UTR上的C+1542G)与心肌梗死的关系,研究结果表明血浆中TAFI抗原浓度以及TAFI基因的多态性与心肌梗死显著相关。由于心肌梗死与脑梗死都与动脉粥样硬化血栓形成密切相关,所以根据以上情况可以推测脑梗死该位点变异可能与血浆中TAFI抗原的浓度有关。

本研究所选TAFI基因C291T位点处从C到T的突变导致了HpyCH4IV酶的限制性酶切位点,但是由C到T的突变并没有引起氨基酸(天门冬氨酸)的改变,是一种同义突变。传统观念认为,同义突变由于未导致氨基酸一级结构改变,就不影响蛋白质

的高级结构,因而不引起蛋白质功能变化,所以不会成为致病的原因。近年来Feederico等^[15]对抗生素诱发的LQTS基因突变研究中发现同义突变也可能通过转录、转录后翻译及翻译后加工等多环节中的某些步骤而导致疾病的发生。Duan等^[16]发现位于人类多巴胺受体D2(dopamine receptor D2,DRD2)上的同义突变C957T可以改变mRNA的构象,从而降低mRNA的稳定性和翻译效率,导致多巴胺介导的多巴胺受体D2的表达减少,与精神分裂症和酒精中毒的发病有关。由于基因编码区内出现的同义突变可能由于同一氨基酸对简并密码子的翻译效率不同,或转录水平的差异而导致蛋白质表达量上的改变。因此我们推测C291T突变可能通过转录、转录后翻译及翻译后加工等多环节中的某些步骤而导致TAFI抗原的表达改变,从而影响血浆中TAFI抗原浓度,促进动脉粥样硬化而增加了脑梗死发病危险性。我们检测了173例脑梗死组和158例对照组的TAFI基因C291T位点的基因型,分析TAFI基因C291T位点的基因型和等位基因频率分布以及它们与脑梗死之间的关联性,结果发现两组间TAFI基因C291T的基因型和等位基因的频率分布差异均有统计学意义($P<0.05$),表明TAFI基因C291T的多态性与脑梗死之间的相关性有统计学意义。

脑梗死是多种病因的病理改变,而即使是最常见的高血压脑动脉硬化所致脑血管病也是一种多基因遗传病,目前确认的易感基因都直接或间接影响着脑血管病的危险因素或动脉粥样硬化的形成。由于脑血管病是一系列病理过程的最终结局,很可能有多种基因共同作用影响最终表型。本结果可提供临床参考。

但是Morange等^[17]研究(亦是在欧洲的大规模多中心病例-对照法研究)Thr325Ile多态性与心肌梗死的关系,其结果Thr325Ile多态性与心肌梗死无显著性相关。Brouwe等^[18]指出Thr325Ile等位基因有正反两方面的作用,既可以增加血浆中TAFI抗原的浓度,同时亦可以降低TAFI抗纤维蛋白溶解的活性。这些结果提示TAFI基因对血浆TAFI浓度的调节是复杂的,可能有多个功能变异位点参与。也有研究表明TAFI的启动子、编码区以及3'末端的非翻译区内存在数种基因多态性,都对血浆中TAFI水平具有调节作用,因此也不能排除其它基因对TAFI水平的调节作用。本研究的样本较小,其代表性与普通人群可能有差异,因此很有必要对TAFI基因位点C291T进一步深入研究,增加样本量,最好是大规模的多中心研究,以正确评价TAFI基因

位点 C291T 多态性在脑梗死中的作用机制和临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB, et al. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent[J]. *Blood*, 1996, 88(6): 2093-2100.
- [2] Sakharov DV, Plow EF, Rijken DC, et al. On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(22): 14477-14482.
- [3] Wang W, Boffa MB, Bajzar L, et al. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(42): 27176-27181.
- [4] Boffa MB, Reid TS, Joo E, et al. Characterization of the gene encoding human TAFI (Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, plasma procarboxy-peptidase B)[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(20): 6547-6558.
- [5] Zhao L, Moer J, Bajzar L, et al. Identification and characterization of two thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor isoforms [J]. *Thrombosis Haemostasis*, 1998, 80(6): 949-955.
- [6] Henry M, Aubert H, Morange PE, et al. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled [J]. *Blood*, 2001, 97(7): 2053-2058.
- [7] Brouwe GJ, Vos HL, Leebeek FW, et al. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin - activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels[J]. *Blood*, 2001, 98(6): 1992-1993.
- [8] Tregouet DA, Aubert H, Henry M, et al. Combined segregation-linkage analysis of plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels with TAFI gene polymorphisms[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(2): 191-197.
- [9] Franco RF, Fagundes MG, Meije JC, et al. Identification of polymorphisms in the 5'- untranslated region of the TAFI gene relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis [J]. *Haematologica*, 2001, 86(5): 510-517.
- [10] Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidaseU)[J]. *Thromb Res*, 2001, 101(5): 329-354.
- [11] Schneider M, Brufatto N, Neill E, et al. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor reduces the ability of high molecular weight fibrin degradation products to protect plasmin from antiplasmin[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 13340-13345.
- [12] Morange PE, Juhan-Vague I, Scarabin PY, et al. Association between TAFI antigen and Ala147Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence. The PRIME Study (Prospective Epidemiological Study of MI) [J]. *Thromb Haemost*, 2003, 89(3): 554-560.
- [13] Ladenvall C, Gils A, Jood K, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation peptide shows association with all major subtypes of ischemic stroke and with TAFI gene variation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 955-962.
- [14] Juhan-Vague I, Morange PE, Aubert H, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the north and south of Europe [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(5): 867-873.
- [15] Feederico S, Geoffren W, Jian Wei, et al. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia[J]. *PNAS*, 2000, 97(19): 10613-10618.
- [16] Duan JB, Wainwright MS, Comeron JM, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(3): 205-216.
- [17] Morange PE, Henry M, Frere C, et al. Thr325Ile polymorphism of the TAFI gene does not influence the risk of myocardial infection [J]. *Blood*, 2002, 99(5): 1878-1879.
- (收稿日期:2008-10-09)
(本文编辑:刘凯)
-
- (上接 253 页)
- recording[J]. *Neuroimage*, 2005, 26(4): 1174-1183.
- [11] Cohen-Gadol AA, Pan JW, Kim JH, et al. Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis[J]. *J Neurosurg*, 2004, 101(4): 613-620.
- [12] Najm IM, Wang Y, Shedid D, et al. MRS metabolic markers of seizures and seizure-induced neuronal damage[J]. *Epilepsia*, 1998, 39(3): 244-250.
- [13] Singh AK, Behari J, Raghunathan P. Acoustical damage to the rat brain[J]. *Applied Acoustics*, 1996, 48 (3): 187-193.
- [14] Nadler JV. The Recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain[J]. *Neuroch Res*, 2003, 28 (11): 1649-1658.
- [15] 倪宏. 发育期脑惊厥性损伤与海马锌离子转移[J]. *生理科学进展*, 2006, 37(4): 331-334.
- [16] Sankar R, Auvin S, Mazarati A, et al. Inflammation contributes to seizure-induced hippocampal injury in the neonatal rat brain [J]. *Acta Neurol Scand*, 2007, 115(4): 16-20.
- [17] Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(7): 711-722.
- [18] Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, et al. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(23): 12676-12681.
- (收稿日期:2008-10-05)
(本文编辑:卢丽玉)