

• 论 著 •

某地区急性缺血性脑梗死患者 GP I b α 基因 VNTR 多态性研究

张 健, 欧阳红梅, 翟 明, 张 芹, 车 爽, 台 虹 Δ

(昆明医学院附属昆华医院/云南省第一人民医院检验科 650031)

摘要:目的 探讨 GP I b α VNTR 基因多态性与脑梗死的相关性。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析、DNA 测序分析技术,对 119 例急性缺血性脑梗死患者和 117 例健康对照者进行血小板膜糖蛋白(GP) I b α 基因可变数目串联重复序列(VNTR)分析。结果 该地区汉族人群中不仅存在 B、C、D 等位基因和 CC、DD、CD、BC、BD 基因型,而且还发现了 A 等位基因和 AC 基因型;其中以 C、D 等位基因和 CC、CD 基因型为主;急性缺血性脑梗死病例组血小板膜 GP I b α VNTR CC 基因型和 CD 基因型与健康对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 该地区汉族人血小板膜 GP I b α VNTR CC 基因型和 CD 基因型与缺血性脑梗死显著相关。

关键词:脑梗死; 血小板膜糖蛋白类; 小卫星重复; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0322-02

Investigation of VNTR polymorphism on GPIb α gene of patients with acute ischemic cerebral infarction in some district

Zhang Jian, Ouyang Hongmei, Zhai Ming, Zhang Qin, Che Shuang, Tai Hong Δ

(Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical College/ The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650031, China)

Abstract: Objective To study the correlation between variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism on platelet membrane glycoprotein(GP) I b α gene and cerebral infarction (CI). **Methods** VNTR polymorphism on GP I b α gene of 119 cases of patients with acute ischemic cerebral infarction and 117 cases of healthy controls were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis and DNA sequencing. **Results** B, C, D allele and CC, DD, CD, BC, BD genotype were detected in Han people of Kunming district. An allele and AC genotype were also detected. Among these alleles and genotypes, the mainly detected were C, D allele and CC, CD genotype. There was statistically significant difference in the frequency of CC and CD genotype between patients with acute ischemic CI and the controls ($P < 0.05$). **Conclusion** The CC and CD genotype of the VNTR polymorphism on GPIb α gene is significantly associated with ischemic CI in Han people of Kunming district.

Key words: brain infarction; platelet membrane glycoprotein; minisatellite repeats; gene polymorphisms

脑梗死(cerebral infarction, CI)是世界范围内主要的致死和致残疾病之一。脑梗死又称缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS),是指局部脑组织因血液循环障碍、缺血、缺氧而发生的软化坏死。在 CIS 的发生中血小板起促进血栓形成的作用^[1-2]。血小板膜糖蛋白(glycoprotein, GP)受体在血栓形成中调节血小板,是 CIS 的候选基因^[3]。近年来许多学者对血小板 GP 受体基因的多态性进行了研究,包括 GP I b α Kozak、GP I b α 可变数目串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)、GP I b α HPA-2、GP III a HPA-1 和 GP I a 807 等,但得出的结果并不一致。基因多态性在不同民族、不同地区间可存在差异。昆明平均海拔为 1 894 m 左右,尚不知汉族人血小板膜 GP I b α VNTR 基因多态性与 CIS 的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2008 年 1 月至 2009 年 9 月在云南省第一人民医院神经内科就诊的初发 CIS 患者汉族人 119 例,其中男 56 例,女 63 例;年龄 42~83 岁,平均(66 \pm 10)岁,符合全国第 4 届脑血管病会议修订的诊断标准,全部病例均经头部 CT

或核磁共振证实,排除血栓性脑梗死、栓塞性脑梗死、腔隙性脑梗死、多发性脑梗死。健康对照组为 117 例汉族健康体检者,其中男 51 例,女 66 例;年龄为 39~84 岁,平均(54 \pm 10)岁,均无心、脑、肝、肾疾病,无糖尿病、甲状腺病史,近期无感染,检查前 10 天内未用阿司匹林、潘生丁、肝素等影响血小板功能药。

1.2 方法 (1)试剂与方法:血液基因组 DNA 小量抽提试剂盒、TaqDNA 聚合酶、DNA 相对分子质量标准品、引物、琼脂糖、上样缓冲液等均购自上海生物工程技术服务有限公司。应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、DNA 测序分析技术。(2)DNA 提取:取空腹静脉血 2 mL, EDTA 抗凝。按离心柱型血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。紫外分光光度计测定 DNA 浓度,模板 DNA 保存于-70 $^{\circ}$ C 备用。(3)PCR 引物及方法^[4]:检测血小板糖蛋白 GP I b α 基因 VNTR 多态性用多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法进行扩增。PCR 扩增的上游引物为 5'-TCC ACT GCT TCT CTA GAC AG-3', 下游引物为 5'-GGC TGA TCA AGT TCA GGG AT-3', PCR 反应总体积 50 μ L, 含

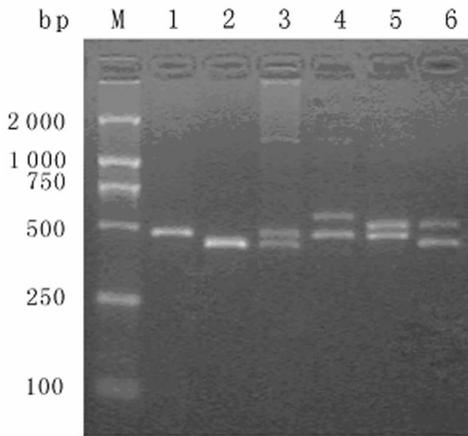
Δ 通讯作者, E-mail: taihongth@hotmail.com。

200 μmol/L 硫代磷酸二乙基硝基苯酯、1.5 U Taq 酶、各 20 pmol 上述引物和 1 μg DNA 模板。94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环, 最后 1 个循环延伸 7 min。(4) PCR 产物电泳及测序: 取 PCR 产物 10 μL, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察结果。pBR322DNA/HaeIII 作为标准分子质量。选取部分 PCR 产物送上海生物工程技术服务公司测序。

1.3 统计学处理 两样本率比较采用 χ^2 检验, 全部分析采用 SPSS11.5 统计软件完成。

2 结果

GP I b α 基因 VNTR 多态性中, 各等位基因间依次相差 39 bp, PCR 扩增后分别产生 554、515、476、437 bp 4 种扩增产物, 其依次为 39 bp 的核心序列重复 4、3、2、1 次的 A、B、C、D 等位基因。理论上, 4 种等位基因可以产生 10 种基因型, 在本研究中 4 种等位基因全部见到, 但仅发现 6 种基因型: CC、DD、CD、AC、BC、BD, 未见 AA 和 BB 型纯合子及 AB 和 AD 型杂合子, 见图 1。图 1 中第 1 泳道 PCR 产物经测序为全长 476、39 bp 的 VNTR 2 次重复的 C 等位基因纯合子(CC 型)、第 2 泳道的 PCR 产物经测序为全长 437、39 bp 的 VNTR 1 次重复的 D 等位基因纯合子(DD 型); CC 比 DD 多出 39 bp 的序列, 位置大约在测序图的第 380~419 位之间。血小板膜 GP I b α VNTR C/C 基因型在 CIS 组(52.9%)中的分布频率显著高于健康对照组(38.5%), $OR=1.8$; 95% $CI: 1.07\sim 3.02$; $P=0.026$, 而 GP I b α VNTR C/D 基因型在 CIS 组(26.9%)中的分布频率显著低于健康对照组(41.0%), $OR=0.53$; 95% $CI: 0.31\sim 0.91$; $P=0.022$ 。



注: M 为 DNA 相对分子质量标准品; 1 为 CC; 2 为 DD; 3 为 CD; 4 为 AC; 5 为 BC; 6 为 BD。

图 1 血小板膜 GP I b α VNTR 基因 PCR-RFLP 电泳结果

3 讨论

血栓性卒中与血小板膜 GP 受体密切相关。GP 受体在血小板活化及初期血栓形成中起着关键作用。GP I b 由 2 个亚单位组成, 即 GP I b α (相对分子质量为 145×10^3) 和 GP I b β (相对分子质量为 24×10^3) 以二硫键连接而成。GP I b α 与 GPIIb 以非共价键结合形成 GP I b-IIIa 复合物。VNTR 存在于血小板 GP I b α 的巨糖肽区, 相当于 cDNA 序列第 1258~1323

位的 39 个碱基对编码丝氨酸 399~苏氨酸 411 的 13 个氨基酸区段, 由于 39 个碱基对串联重复不同数量, 从而使编码的 GP I b α 蛋白分子长度不同, 构成了 VNTR 的多态性, 表现为 4 种不同的等位基因 A、B、C 和 D。A 等位基因为 39 bp 的 VNTR 出现 4 次重复, B 等位基因为 39 bp 的 VNTR 出现 3 次重复, C 等位基因为 39 bp 的 VNTR 出现 2 次重复, D 等位基因为 39 bp 的 VNTR 出现 1 次重复。有报道显示, CIS 患者体内存在血小板活化, 但与 VNTR 基因多态性无关^[5]。另 1 项缺 CIS 研究显示, 血小板膜 GP I b VNTR 多态性 D 等位基因与动脉粥样硬化性 CIS 相关^[6]。早期的报道显示在美国和意大利的高加索人群中仅发现 B、C、D 3 种等位基因。A 等位基因仅在北美印第安人中发现。中国东北地区汉族人群中存在 B、C、D 3 种等位基因和 CC、DD、CD、BC、DB 5 种基因型^[7]。在昆明汉族人中, 不仅发现了 B、C、D 等位基因和 CC、DD、CD、BC、BD 基因型, 而且还发现了 A 等位基因和 AC 基因型; 其中以 C、D 等位基因和 CC、CD 基因型为主, 略同于东北地区汉族人^[7]。Gonzalez-Conejero^[8] 等报道 C/B 基因型与 CIS 显著相关, Zhang^[6] 等报道 D 等位基因是 CIS 的独立危险因素。本组研究显示脑梗死病例组血小板膜 GP I b α VNTR CC 基因型和 CD 基因型与健康对照组相比, $P < 0.05$, 与缺血性脑梗死显著相关。血小板膜 GP I b α 基因多态性可影响血小板膜 GP I b α 的结构或表达水平, 从而影响血小板的粘附、聚集和活化反应, 进一步调节血栓形成。活化血小板与静息血小板相比, 其膜 GP 分子的种类、数量、分布和构型等出现显著变化^[9]。GP I b α VNTR 多态性重复片段数量的改变可能影响附近 vWF 和凝血酶受体的活性, 从而影响受体的结构和功能。

综上所述, 昆明汉族人群中存在血小板膜 GP I b α VNTR A、B、C、D 4 种等位基因和 CC、DD、CD、BC、BD、AC 6 种基因型, 以 C、D 等位基因和 CC、CD 基因型为主, 血小板膜 GP I b α VNTR CC 基因型和 CD 基因型与 CIS 显著相关, 可能是 CIS 主要的独立危险因素。

参考文献

- [1] Seizer P, Gawaz M, May AE. Platelet-monocyte interactions—a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(20): 1976-1980.
- [2] 潘瑞华, 库建伟. 辛伐他汀对急性脑梗死患者血清 IL-6 及 CRP 水平的影响[J]. *山东医药*, 2007, 47(5): 53-54.
- [3] Debette S, Seshadri S. Genetics of atherothrombotic and lacunar stroke[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009, 2(2): 191-198.
- [4] Baker RI. Platelet glycoprotein I b α Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke[J]. *Blood*, 2001, 98(1): 36-40.
- [5] 韩悦, 朱明清, 阮长耿. 脑梗死患者血小板活化与膜糖蛋白 I b α 基因多态性研究[J]. *江苏医药*, 2002, (11): 847-848.
- [6] Zhang Y, Wang Y, Wang Y, et al. Platelet glycoprotein polymorphisms: risk, in vivo expression and severity of atherothrombotic stroke in Chinese[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 378(1-2): 99-104.
- [7] Jin YY, Yu GZ, Wang Y, et al. Variable number of tandem repeats polymorphism of platelet glycoprotein I b α in Chinese people and CC genotype with aspirin sensitivity in patients with cerebral infarction [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2009, 34(2): 239-243. (下转第 326 页)

的样本 4 例(9.3%)，镜检与 UF-1000i 尿液有形成分分析仪结果相符。故将 UF-1000i 尿液有形成分分析仪提示 REVIEW 列为镜检复查规则④。分析总颗粒数大于 40 000/ μL ，其他颗粒大于 300/ μL ，电导率大于 38 mS/cm 的数据，多见于红细胞、白细胞、结晶引起的混浊尿，或符合镜检复查规则①~④。由于混浊尿内干扰因素众多，内含细胞团等大团块物，易阻塞管道，而 UF-1000i 尿液有形成分分析仪缺乏预警能力，导致后面的样本分析错误。故将混浊尿列为镜检复查规则⑤，不进行流式分析，以显微镜镜检尿有形成分。

3 讨 论

研究表明，UF-1000i 尿液有形成分分析仪受许多因素干扰，如结晶、白细胞碎片、细菌、真菌、脂肪球、卵磷脂小体等干扰 RBC 测定，较大的结晶、EC 碎片、细菌、真菌、SRC(包括体积相似的吞噬细胞、移行上皮细胞、肾小管上皮细胞等)等干扰 WBC 测定，黏液丝、较大的结晶、上皮细胞、假菌丝、纤维丝、成团的细胞等干扰 CAST 测定，导致不同程度的假阳性，分别占样本总数的 8.9%、7.1%、45.9%；同时也存在假阴性，分别占样本总数的 1.9%、1.6%、0.5%。与文献报道较为一致^[3-7]。究其原因，可能是 UF-1000i 尿液有形成分分析仪的基本原理仍是根据有形成分的大小进行非形态分析，其作用只能是筛选^[1]。同时，干化学的影响因素众多，也只能作为一种过筛手段。实验室必须制定适合的复查标准，以保证尿液整体化分析的质量。本室 UF-1000i 尿液有形成分分析仪测定 RBC 的敏感度(91.4%)与特异度(88.5%)与文献报道有所不同，这可能是因为各室 UF-1000i 尿液有形成分分析仪 RBC 生物参考区间不一、判别标准有所所致^[8]。

本研究基于 1 053 例尿样的整体化分析结果，同时观察 UF-1000i 尿液有形成分分析仪的异常数据及报警，建立镜检复查规则如下：①RBC/BLD 不符合、及 RBC 散点图异常的样本；②WBC 与 LEU 结果不符合、LEU 阳性伴 EC、SRC 阳性以及 WBC 散点图异常的样本；③PRO 阳性的样本，应显微镜检查管型；④UF-1000i 仪提示复核(REVIEW)的样本；⑤混浊尿；⑥泌尿、肾病患者，临床有要求的样本，及 UF-1000i 仪分析数据为零的样本。本组结果提示，顾可梁^[9]报道的其他一些镜检复查规则，如总颗粒数大于 40 000/ μL 、其他颗粒大于 300/ μL ，电导率小于 5 mS/cm 或大于 38 mS/cm，红细胞荧光强度分布宽度大于 40 ch 等，常伴镜检复查规则①~⑤出现，因此这些规则可不单独列出。1 053 例样本查见 CAST 而 PRO 阴性的样本 12 例，除 1 例细颗粒管型外其他均为透明管

型 0~1/低倍视野，主要见于老年患者。通过镜检复查，CAST 的正确度达到 99.8%，故本组认为镜检复查规则③可以接受。经验证，本室建立的复查规则复查率 41.9%，假阳性和假阴性均大为降低，RBC 漏检率(1.3%)低于周强等^[10]报道的 3.9%。经 U 检验或 χ^2 检验，运用规则后各项临床诊断性试验评价指标均有改善，其中特异度、正确度、阳性预测值显著提高($P < 0.001$)。说明本室复查规则能保证尿液整体化分析的质量与速度。

综上所述，本研究为建立本实验室的镜检复查规则提供了基础性数据，也为尿液整体化分析规则的确立与细化提供了参考。

参考文献

- [1] 丛玉隆, 马骏龙. 尿液有形成分镜检与自动化检测方法学利弊和互补分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(5): 609-611.
- [2] 徐天和. 中国医学统计百科全书医学研究统计设计分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 116.
- [3] 黄幼香. 尿液分析仪红细胞假阳性对比[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(10): 1693-1694.
- [4] 黄松音, 黄雪琼, 谢文峰, 等. 菌尿对两种全自动尿沉渣分析仪检测尿红细胞的影响[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(14): 1440-1442, 1444.
- [5] 李艳丽. UF-1000i 尿沉渣分析仪与显微镜联合检测尿液有形成分结果比较[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(8): 749.
- [6] 申爽. 应用 UF-1000i 全自动尿沉渣分析仪尿干化学分析法、显微镜镜检联合检测尿白、红细胞结果分析[J]. 中外健康文摘, 2010, 7(25): 16-17.
- [7] 邵永珍, 孙雅娟, 邹艳玲. UF-1000i 尿沉渣分析仪、尿干化学法和显微镜用于病理管型检查的价值[J]. 中国医疗前沿, 2010, 5(21): 69-70.
- [8] 曲明亮, 李长荣, 佟风芝, 等. UF-1000i 分析法、尿干化学法和尿沉渣镜检法检测血尿的对比分析[J]. 中国医疗前沿, 2010, 5(2): 56, 62.
- [9] 顾可梁. 尿液有形成分检查的难点与疑点[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6): 605-608.
- [10] 周强, 罗森珊, 林楨, 等. 干化学与流式计数在尿液常规检测中的过筛价值分析[J]. 医学检验与临床, 2006, 17(1): 17-19.

(收稿日期: 2010-08-02)

(上接第 323 页)

- [8] Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease[J]. Blood, 1998, 92(8): 2771-2776.
- [9] Shimizu M, Kohara S, Yamamoto M, et al. Significant relationship

between platelet activation and intra-media thickness of the carotid artery in patients with ischemic cerebrovascular disease[J]. Thromb Res, 2006, 117(6): 647-652.

(收稿日期: 2010-03-15)