

HPA3 和传统危险因素在急性心肌梗死的交互作用

陈 赟^{1,2}, 曾小菁^{*1}, 杨 芳¹, 张 婧¹, 罗福敏¹

(1.贵阳医学院医学检验系临床血液学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2.武警总部闵庄路干休所, 北京 100195)

摘要:【目的】探讨人类血小板抗原(HPA3)基因多态性与传统危险因素在急性心肌梗死(AMI)的交互作用。【方法】选择 215 例 AMI 患者和 210 例健康体检者作为研究对象, 采用序列特异性引物-多聚酶链反应(SSP-PCR)技术扩增目的基因, 进行 HPA 基因分型, 分析其在 AMI 中的危险因素, 使用叉生分析法分析 HPA3 基因与传统危险因素在 AMI 中的交互作用。【结果】①HPA3 基因多态性在 AMI 组和对对照组的分布差异无统计学意义($P > 0.05$); ②HPA3b 等位基因与年龄 ≤ 60 岁对 AMI 发病不存在交互作用($OR = 1.361, 95\% CI = 0.824-2.250$); HPA3b 等位基因与有吸烟史、伴高血压、糖尿病或血脂异常病史对 AMI 发病存在拮抗作用 ($OR = 0.238, 95\% CI 0.130 \sim 0.436$; $OR = 0.415, 95\% CI 0.248 \sim 0.695$; $OR = 0.279, 95\% CI 0.122 \sim 0.640$; $OR = 0.372, 95\% CI 0.212 \sim 0.654$)。【结论】HPA3b 等位基因在 AMI 发病中的作用可能与有吸烟史、伴高血压、糖尿病或血脂异常病史相互抵消。

关键词: 人类血小板抗原, 急性心肌梗死, 交互作用。

中图分类号: R543.3+1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)02-0256-06

Interaction between Human Platelet Alloantigens3 and Traditional Risk Factors in Acute Myocardial Infarction

CHEN Yun^{1,2}, ZENG Xiao-jing^{1*}, YANG Fang¹, ZHANG Jing¹, LUO Fu-min¹

(1. Department of Hematology, Faculty of Laboratory Medicine, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; Min Zhuang Road Cadre Sanatorium of Armed Police Headquarters, Beijing, 100195, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the interaction between human platelet alloantigens3 (HPA3) and traditional risk factors in acute myocardial infarction (AMI). 【Methods】The study consisted of 215 AMI patients, the controls were selected from healthy people. Total genomic DNA was isolated by the phenol-chloroform method, and HPA genotyping was done by the polymerase chain reaction method using sequence-specific primers. Meanwhile, regression analysis was applied in assessing the genetic risk factors to AMI. The method of crossover analysis was used to study the interaction between human platelet alloantigens3 and traditional risk factors in AMI. 【Results】(1) Compared with the control group, the difference of HPA3 gene polymorphism were not statistically significant ($P > 0.05$). (2) Compared with control group, there were no interaction in HPA3b allele with age (≤ 60) ($OR = 1.361, 95\% CI = 0.824-2.250$), and interaction analysis confirmed the abated negative association of HPA3b allele with smoking ($OR = 0.238, 95\% CI 0.130 \sim 0.436$), hypertension ($OR = 0.415, 95\% CI 0.248 \sim 0.695$), diabetes ($OR = 0.279, 95\% CI 0.122 \sim 0.640$) or dyslipidemia ($OR = 0.372, 95\% CI 0.212 \sim 0.654$). 【Conclusion】There may show abated negative association of the HPA3b allele with smoking, hypertension, diabetes, or dyslipidemia in AMI.

Key words: human platelet alloantigen; acute myocardial infarction; interaction

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2): 256-261]

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 贵州省科技厅项目(E2009-17)

作者简介: 陈赟, 硕士, 检验师, 研究方向: 血液疾病及心血管疾病临床检验、诊断与治疗, E-mail: chenyunchen2000@yahoo.com.cn; * 通信作者: 曾小菁, 本科, 主任医师, 研究方向: 各种血液病的研究, E-mail: gyshuxueke@126.com

随着分子生物学技术的发展,人类基因组测序工作的完成,人们对心血管疾病研究深入到分子生物学和基因水平上,认识到急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)属于多基因遗传性疾病。研究发现血小板通过其表面的膜糖蛋白(glycoprotein,GP)受体使血小板黏附、聚集和活化,是动脉血栓形成的主要原因之一^[1]。GP II b/III a在血小板聚集和血栓增长中起到非常重要的作用,对于定位于 GP II b 上的人类血小板抗原(human platelet alloantigens-3,HPA3)基因的多态性与急性心肌梗死的研究较少,而 AMI 的发生受多个基因和传统危险因素的影响,存在交互作用。同时,本文采用序列特异性引物-多聚酶链反应(sequence-specific primers-polymerase chain reaction,SSP-PCR)技术扩增目的基因,进行 HPA 基因分型,研究 HPA3 基因多态性与急性心肌梗死易感性的相关性。

1 材料与方 法

1.1 研究对象及标准

病例组:2010年4月至2011年8月在贵阳医学院附属医院心内科住院初发的AMI患者215例,汉族人,其中男170例,女45例,所有病例均符合1979年WHO诊断标准^[2],并行冠脉造影证实(一支病变40例,两支病变60例,三支病变110例,肌桥5例),除外肝、肾、血液疾病和感染性疾病;年龄36~79岁,平均年龄61.05($S=10.27$)岁;合并高血压病者135例,合并糖尿病者65例,合并血脂异常者127例,有吸烟史者130例、有饮酒史者110例。对照组:210例,其中男168例,女42例,年龄38~70岁,平均年龄60.74($S=6.88$)岁,汉族人,均为同期本院门诊健康体检者,经病史、体检、实验室检查等排除心脑血管疾病、血栓性疾病、肝、肾、血液疾病和感染性疾病。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 仪 器 北京普析通用仪器有限公司 TU-1810 紫外可分光光度计,美国 ABI 公司 PE9700

扩增仪,德国 Eppendorf 公司梯度 PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司 DNA 成像分析器 Gel Doc EQ 等; 1.2.2 试 剂 西班牙 Sigma 公司蛋白酶 K, 西班牙 Biowest 公司琼脂糖,大连宝生物工程有限公司 Taq 聚合酶等。

1.3 主要步骤

1.3.1 DNA 制备 采用酚-氯仿法提取外周血基因组 DNA,最后将 DNA 溶于 TE 缓冲液,置于-20℃保存备用。

1.3.2 PCR 引物序列 设计参考文献[3],内参照采用人类生长激素(human growth hormone,HGH),扩增产物长度为429 bp。由上海捷瑞生物工程有限公司合成提供。HPA3a GGG GGA GGG GCT GGG GA,HPA3b GGG GGA GGG GCT GGG GC, HPA3 公共引物 GAC CTG CTC TAC ATC CTG GA 230 bp。内参照(HGH)上游引物 GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA,下游引物 TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C。

1.3.3 PCR 反应体系 10×PCR Buffer 缓冲液 2.5 μL,dNTP(2.5 mmol/L each)0.5 μL,MgCl₂(25 mmol/L)2.0 μL,序列特异性引物(10 pmol/μL)1.0 μL×2,内参照引物(5 pmol/μL)0.5 μL×2,Taq(2.5 U/μL)0.4 μL,DNA(100 ng)1.0 μL,总体积 25.0 μL。

1.3.4 PCR 反应条件 预变性 94℃ 5 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 90 s,30 循环,最后延伸 72℃ 5 min,4℃ 保温。

1.3.5 扩增产物检测 取 PCR 扩增产物 10 μL,在 2%琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭),0.5×TBE 缓冲液电泳槽中,恒压 100 v 的电压下电泳 30 min,置凝胶成像系统观察结果,并保留电泳图。

1.4 统计方法

数据用 SPSS17.0 软件进行分析,均以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。基因型及基因频率采用频率计数法计算;病例组和对照组间的 Hardy-Weinberg 平衡(H-W 平衡)检验^[4],基因多态性及临床资料的差异用 χ^2 检验分析,相对危险度以比值比(Odds Ratios,OR)及 95%可信区间(confidence interval,CI)表示。

2 结 果

2.1 DNA 浓度测定结果

使用紫外分光光度计测定提取 DNA 纯度:本研究测 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 左右,浓度为 100~200 ng/ μ L。

2.2 HPA3 基因分型扩增产物鉴定

内参照带引物为人类生长激素,均为 429 bp,电泳结果显示每孔均可见清晰的内参照带,阴性孔中无特异性扩增带,表明无相应的基因。阳性孔中除内参照带(片段大小为 429 bp)外可见清晰、特异的扩增带(片段大小为 230 bp),表示有相应的基因。结果分析如下(图 1):泳道 1~6 均出现 429 bp 的内参照目的条带,1、2 中只有 HPA3a 出现 230 bp 的特异性条带,为 HPA3aa 型;泳道 3、4 中 HPA-3b 出现 230 bp 的特异性条带,为 HPA3bb 型;泳道 5、6 中 HPA3a 和 3b 均出现 230 bp 的特异性条带,为 HPA3ab 型;泳道 7 为 DNA Marker(100~600 bp)。

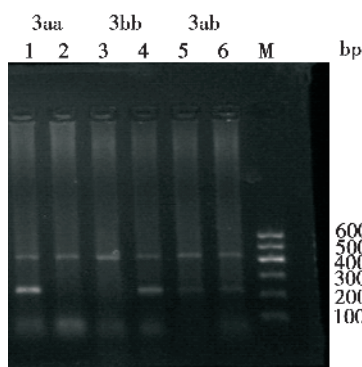


图 1 HPA3 基因 PCR 扩增产物的电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of HPA3 gene PCR product

2.3 HPA3 基因多态性在 AMI 组和对照组的分布

以 H-W 平衡检验基因频率的结果,发现 AMI

组和对照组实际基因型分布与理论基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$),符合 H-W 平衡定律,具有人群代表性。通过 χ^2 检验得出,HPA3 基因多态性在 AMI 组和对照组的分布差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

2.4 AMI 组和对照组临床资料的比较

2.4.1 性别和年龄 215 例 AMI 患者纳入本研究,男性 170 例 (79.07%),平均年龄 (59.26 ± 10.72)岁,女性 45 例 (20.93%),平均年龄 (67.78 ± 3.99)岁,男女之比为 3.78:1。女性 AMI 患者的发病年龄高于男性患者,并且明显少于男性患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4.2 各传统危险因素对 AMI 发病影响的分析

AMI 组和对照组临床资料比较(表 2)。AMI 组高血压病或血脂异常患者人数高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.224, P < 0.05$; $\chi^2 = 7.387, P < 0.05$),而在年龄、吸烟饮酒习惯、有家族史及合并糖尿病的发病人数方面 AMI 组与对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4.3 HPA3 基因与传统危险因素在 AMI 中的交互作用

选用叉生分析法^[5-6]分析 HPA3 基因与传统危险因素在 AMI 中的交互作用,使用二分类变量组成的四种可能的组合表。同时暴露于两因素相对于同时不暴露于两因素的危险性(OR)记为 OR₁₁,单独暴露于遗传或者传统危险因素的危险性分别记为 OR₁₀、OR₀₁,用标准粗分析法计算联合效应 OR 值(公式 $OR_{int} = OR_{11}/OR_{10} \times OR_{01}$, 95%CI = $OR_{int}^{1 \pm 1.96/\sqrt{v}}$),在 AMI 组与对照组中分别建立 HPA-3 基因 b 型与年龄(按 ≤ 60 岁和年龄 > 60 岁进行分析)、吸烟史、高血压病、血脂异常等传统危险因素的亚变量模型(表 3)。当 95%CI 包括 1.0 时,研究的两个因素不存在交互作用;而当 95%CI 不包括 1.0 时,表示两个变量存在交互作用,OR 值

表 1 AMI 组与对照组 HPA3 基因型和基因频率

Table 1 The genotype and gene frequencies of HPA3 in patients with AMI and in controls

HPA3	Actual frequency(predicted frequency)			Gene frequency		Hardy-Weinberg equilibrium		Chi-square test	
	aa	ab	bb	a	b	χ^2	P	χ^2	P
AMI group	60(66.943)	120(106.054)	35(42.003)	0.558	0.442	3.722	0.054	5.689	0.058
Control group	78(84.145)	110(97.571)	22(28.285)	0.633	0.367	3.431	0.064		

表 2 AMI 组和对照组临床资料的比较
Table 2 Characteristics of study participants

	Control group (210)	AMI group (215)	Statistic	P
Age	60.74 ± 6.88	61.05 ± 10.27	$t = 0.16$	0.873
Smoking (%)	108 (51.4%)	129 (60.0%)	$\chi^2 = 3.164$	0.075
Drinking (%)	86 (41.0%)	106 (49.3%)	$\chi^2 = 2.991$	0.084
Family history (%)	30 (14.3%)	45 (20.9%)	$\chi^2 = 3.227$	0.072
Hypertension (%)	91 (43.3%)	117 (54.4%)	$\chi^2 = 5.224$	0.022
Diabetes (%)	43 (20.5%)	59 (27.4%)	$\chi^2 = 2.826$	0.093
Dyslipidemia (%)	97 (46.2%)	122 (59.5%)	$\chi^2 = 7.387$	0.007

表 3 HPA3b 等位基因与传统危险因素在 AMI 中的交互作用
Table 3 HPA3b allele and traditional risk factors in the interaction of AMI

Interactive variables		AMI group(n)	Control group(n)	OR	95%CI
HPA3b allele age(≤60)	- -	36	49	1.0	-
	- +	32	25	0.857	0.152 ~ 4.819
	+ -	98	85	1.681	0.526 ~ 5.374
	+ +	49	51	1.961	0.481 ~ 5.929
	Combined effect			1.361	0.824 ~ 2.250
HPA3b allele smoking	- -	10	40	1.0	-
	- +	50	38	4.514	2.103 ~ 9.691
	+ -	76	62	0.858	0.505 ~ 1.456
	+ +	79	70	0.921	0.578 ~ 1.465
	Combined effect			0.238	0.130 ~ 0.436
HPA3b allele hypertension	- -	23	46	1.0	-
	- +	37	32	2.712	1.484 ~ 4.956
	+ -	75	73	1.173	0.656 ~ 2.096
	+ +	80	59	1.320	0.828 ~ 2.103
	Combined effect			0.415	0.248 ~ 0.695
HPA3b allele diabetes	- -	49	61	1.0	-
	- +	11	17	2.298	1.252 ~ 4.220
	+ -	107	106	2.853	1.165 ~ 6.990
	+ +	48	26	1.829	1.058 ~ 3.163
	Combined effect			0.279	0.122 ~ 0.640
HPA3b allele dyslipidemia	- -	19	42	1.0	-
	- +	41	36	2.935	1.555 ~ 5.543
	+ -	74	71	1.166	0.668 ~ 2.036
	+ +	81	61	1.274	0.800 ~ 2.029
	Combined effect			0.372	0.212 ~ 0.654

大于 1.0,表示协同作用,OR 值小于 1.0,表示拮抗作用。

表 3 结果显示:①HPA3b 等位基因与年龄 ≤ 60 岁对 AMI 发病不存在交互作用 (OR = 1.361, 95%CI = 0.824 ~ 2.250); ②HPA3b 等位基因与有吸烟史、伴高血压、糖尿病、血脂异常病史对 AMI 发病存在交互作用 (OR = 0.238, 95%CI 0.130 ~ 0.436; OR = 0.415, 95%CI 0.248 ~ 0.695; OR = 0.279, 95%CI 0.122 ~ 0.640; OR = 0.372, 95%CI 0.212 ~ 0.654),为拮抗作用。

3 讨 论

3.1 HPA3 与 AMI 的关系

Lekakis 等^[7]研究表明,当 HPA3b 等位基因纯合子患急性冠脉综合征时,易发生 ST 段抬高性心肌梗死,而不易发生非 ST 段抬高心肌梗死或不稳定型心绞痛,在长期的随访过程中发生心血管事件与 HPA3 基因无相关性。薛梅等^[8]对北京河北地区汉族人 212 例确诊冠心病患者和 106 例健康人进行 HPA3 基因多态性检测,发现 HPA3 多态位点基因型与冠心病发病密切相关,含有至少 1 个 HPA-3b 等位基因者是 HPA-3aa 纯合型发生冠心病风险的 2.105 倍,而冠心病患者不同病变支数基因型构成比较无显著差异。故认为 GP II b 的 HPA3 多态位点是汉族人冠心病发病的独立危险因素,尤其在年龄 > 45 岁的人群中表现明显。本研究通过对 HPA 基因多态性与 AMI 发病的关系进行 χ^2 检验分析,得出 HPA3 基因多态性在 AMI 组和对照组差异无统计学意义。

3.2 急性心肌梗死的传统危险因素

文献报道^[9-11],年龄、性别、吸烟饮酒、血脂异常、糖尿病、高血压等是 AMI 的传统危险因素。年龄是 AMI 的独立危险因素,随着年龄的升高发病率明显升高,在女性人群中其危险系数更高。50 岁以后女性 AMI 发病骤升,这与女性绝经后失去雌激素保护作用相关^[12]。吸烟可能是因为烟雾中的尼古丁和一氧化碳促进冠状动脉粥样硬化的发生和进展;饮酒可使甘油三酯升高,可加重动脉粥

样硬化。杨志寅等^[13]应用单因素和多因素 Logistic 回归分析研究行为、遗传因素及其交互作用对急性冠脉综合征发生的作用得出:有吸烟史、高血压病史、性格急躁是急性冠脉综合征发病的危险因素。

本研究中,女性 AMI 患者的发病年龄高于男性患者,并且患病人数少于男性患者,差异有统计学意义。而 AMI 组和对照组中吸烟饮酒史的差异无统计学意义。患高血压病或血脂异常的发生急性心肌梗死的情况与对照组存在显著差异。虽然糖尿病患者 AMI 组和对照组间无明显差异,但仍然可能是急性心肌梗死发病的危险因素。因此控制传统危险因素无论对急性心肌梗死的一级预防还是二级预防都是必要的。

3.3 基因与传统危险因素的交互作用

急性心肌梗死的发生受多个基因和传统危险因素的影响,存在基因-环境交互作用^[14]。Pellitero 等^[15]指出 GPIa 的 807T 基因突变或(和)GP III a 的 PIA2 突变时将会增加 2 型糖尿病发生动脉血栓的风险。本研究通过在 AMI 组与对照组中构建 HPA3 基因 b 型与年龄(按 ≤ 60 岁和年龄 > 60 岁进行分析)、吸烟史、高血压病、糖尿病、血脂异常等传统危险因素的亚变量模型分析得出:HPA3b 等位基因与年龄 ≤ 60 岁对 AMI 发病不存在交互作用;HPA3b 等位基因与有吸烟史、伴高血压、糖尿病、血脂异常病史对 AMI 发病存在拮抗作用。故推测 HPA3b 等位基因在 AMI 发病中的作用可能与有吸烟史、伴高血压、糖尿病或血脂异常病史相互抵消,这也许是 HPA3 基因多态性与 AMI 发病不确定性的原因所在。

参考文献:

- [1] Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, et al. The role of platelet adhesion receptor GP I b/alpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (45): 16900-16905.
- [2] Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task

- force on standardization of clinical nomenclature [J]. *Circulation*, 1979, 59(3): 607-609.
- [3] Kupatawintu P, Nathalang O, Charoen R, et al. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in thai blood donors[J]. *Immunohematol*, 2005, 21(1): 5-9.
- [4] 刘红, 胡永华. 遗传流行病学研究中的 H-W 平衡检验[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2010, 35(1): 90-92.
Liu H, Hu YH. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic epidemiology [J]. *J Central South Uni (Med Sci)*, 2010, 35(1): 90-92.
- [5] 王培桦, 沈洪兵, 陈峰, 等. 叉生分析在基因-环境交互作用研究中的应用与意义[J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(1): 54-57.
Wang PH, Shen HB, Chen F, et al. Study on the significance and application of crossover analysis in assessing gene-environment interaction [J]. *Chin J Epidem*, 2005, 26(1): 54-57.
- [6] 夏果, 廖芳芳, 邹延峰, 等. 基因与环境交互作用分析方法在复杂疾病研究中的应用 [J]. *中国卫生统计*, 2009, 26(1): 87-90.
Xia G, Lia FF, Zou YF, et al. Gene-environment interaction analysis methods in the study of complex diseases[J]. *Chin J Health Statistics*, 2009, 26(1): 87-90.
- [7] Lekakis J, Bisti S, Tsougos E, et al. Platelet glycoprotein II b HPA -3 polymorphism and acute coronary syndromes[J]. *Int J Cardiol*, 2008, 127(1): 46-50.
- [8] 薛梅, 陈可冀, 殷惠军. 汉族人血小板 GP II b HPA-3 基因多态性与冠心病的相关性研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(10): 1898-1902.
Xue M, Chen KJ, Yin HJ. Association between platelet membrane glycoprotein IIb polymorphism and coronary heart disease in Han people [J]. *Chin J Pathophys*, 2009, 25(10): 1898-1902.
- [9] Kilbourne AM, Brar JS, Drayer RA, et al. Cardiovascular disease and metabolic risk factors in male patients with schizophrenia, schizoaffective disorder and bipolar disorder [J]. *Psychosomatics*, 2007, 48(5): 412-417.
- [10] Yang X, So WY, Kong AP, et al. Development and validation of a total coronary heart disease risk score in type 2 diabetes mellitus [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101(5): 596-601.
- [11] Rinkūniene E, Petrulioniene Z, Laucevicius A, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2009, 45(2): 140-146.
- [12] 胡威, 郭志刚, 陈君, 等. 女性冠心病患者冠状动脉病变特点及相关危险因素分析 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(8): 1220-1222.
Hu W, Guo ZG, Chen J, et al. The features of coronary lesions and cardiovascular risk factors in female patients with coronary artery disease [J]. *J Pract Med*, 2009, 25(8): 1220-1222.
- [13] 杨志寅, 孔令斌, 崔芬. 急性冠脉综合征发生的遗传与行为交互作用分析 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2010, 9(8): 776-780.
Yang ZY, Kong LB, Cui F. The interaction analysis of genetic and behavioral factors on the occurrence of acute coronary syndrome [J]. *Chin J Behav Med Brain Sci*, 2010, 9(8): 776-780.
- [14] Coffey CS, Hebert PR, Ritchie MD, et al. An application of conditional logistic regression and multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions on risk of myocardial infarction: the importance of model validation [J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5(1): 49-56.
- [15] Pellitero S, Reverter JL, Tàssies D, et al. Polymorphisms in platelet glycoproteins I a and III a are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes [J]. *Thromb Haemost*, 2010, 103(3): 630-637.

(编辑 孙慧兰)