

· 临床研究 ·

# PAF-AH 基因多态性与房颤血栓形成的关系

韩延辉, 王红雷, 来利红, 朱继红, 邢适颖, 贾静蔚

河南科技大学临床医学院 河南科技大学第一附属医院心内科, 河南 洛阳 471003

**摘要:** **目的** 探究血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)基因多态性与心房颤动(房颤)患者血栓形成之间的关系。**方法** 2012年1月至2014年1月连续收住河南科技大学一附院心内科124例非瓣膜性心脏病房颤患者,均为首诊房颤,均行经食管超声心动图检查,选择有血栓事件的患者为房颤血栓组(34例),而无血栓事件的为对照组(90例)。采用聚合酶链反应(PCR)法检测 PAF-AH 基因 994(G-T)点突变导致的不同基因型在房颤患者中的分布情况。**结果** 相比于对照组,携带有突变基因 T 的基因型(GT+TT)显著存在于房颤血栓组(41.18% vs 22.22%,  $P < 0.01$ );同时,房颤血栓组 T 等位基因频率显著高于对照组(25.00% vs 11.67%,  $P < 0.01$ )。PAF-AH 基因基因型频率( $OR = 2.450$ , 95%  $CI = 1.053 \sim 5.701$ )及等位基因频率( $OR = 2.524$ , 95%  $CI = 1.237 \sim 5.149$ )与房颤血栓形成均具有相关性。与房颤血栓形成均具有相关性。**结论** PAF-AH 基因多态性(G-T 突变)与房颤血栓形成有关,推测该基因突变是房颤血栓形成的危险因素。探究 PAF-AH 基因与房颤血栓形成间的具体机制,将有助于更好地了解房颤血栓形成的发病机制。

**关键词:** 血小板活化因子乙酰水解酶; 基因多态性; 心房颤动; 血栓形成

**中图分类号:** R 541.7<sup>+</sup>5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)08-1075-03

心房颤动(房颤)是临床上最常见的心律失常,其导致左心房血栓形成,是引起脑卒中的重要因素之一,严重可引起患者死亡<sup>[1]</sup>。在房颤人群中,脑卒中发生率可高达 13.0%~24.8%;因此抗血栓治疗是房颤治疗策略中的重要一环。华法林是现阶段房颤抗血栓治疗的一线药物,其主要通过抗凝以降低血栓的发生。虽然,华法林的使用可明显减少房颤血栓发生率,但房颤患者脑卒中发生率仍高达 1.5%。提示,房颤血栓的发生不仅仅与机体凝血异常相关。

近年来研究显示,房颤患者中与血小板活化的相关指标 $\alpha$ 颗粒膜糖蛋白(GMP-140)、 $\beta$ -血小板球蛋白( $\beta$ -TG)、血小板第四因子(PF4)均明显上调<sup>[2]</sup>;同时,此类指标在左心房的浓度显著高于其他部位,呈现出一定的部位特异性<sup>[3]</sup>。这与临床上房颤血栓事件中左心房血栓发生率最高的结果相一致<sup>[1]</sup>。以上研究提示,房颤血栓可能与血小板活化相关。

血小板活化因子(PAF)为强血小板聚集诱导剂,具有强烈的炎性介导及血小板活化作用,可促使血小板释放 GMP-140、 $\beta$ -TG、PF4 等生物活性物质及微量 PAF,该作用不依赖于花生四烯酸和二磷酸腺苷(ADP)途径,前期实验已发现在房颤人群中有心房血栓患者血浆 PAF 水平高于无血栓患者。PAF 乙酰水解酶(PAF-AH)是机体内一重要的抗动脉粥样硬

化蛋白<sup>[4-5]</sup>,其主要通过水解 PAF 和氧化磷脂而表现出抗氧化和抗炎效应。PAF-AH 基因变异可导致 PAF-AH 的催化活性降低或丧失,引起 PAF 在血液及组织液中积聚,从而延长 PAF 的生物学活性时间,促进动脉粥样硬化的发展和血栓的形成。大量研究显示,PAF-AH 基因 994(G-T)突变可明显增加患者缺血性脑卒中的发生与发展<sup>[6-8]</sup>。但该基因多态性与房颤患者血栓形成之间有无关系目前尚无大规模研究。因此,本研究基于前期初步发现 PAF 在房颤血栓形成中扮演的重要作用,通过分析房颤患者体内 PAF-AH 不同基因型的分布情况,探究 PAF-AH 基因多态性与房颤患者血栓形成之间的关系。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选取 2012 年 1 月至 2014 年 1 月本院心内科连续收治的 124 例非瓣膜性房颤患者为研究对象,均为首诊房颤,包括阵发性房颤及持续性房颤,其中男 68 例,女 56 例;年龄 45~78(60.37 $\pm$ 5.58)岁。所有患者均经超声心动图、心电图检查确诊,均符合 2010 年由美国心脏病学院(ACC)、美国心脏协会(AHA)及欧洲心脏协会(ESC)共同修订的房颤治疗指南。经食管超声心动图检查,依据是否有左房血栓或自发显影分为房颤血栓组(发生血栓,34 例),对照组(未发生血栓,90 例)。排除标准:有卒中史者;近 6 个月内有活动性出血者;精神病;心脏瓣膜病;严重肝肾功能损伤;恶性肿瘤者;消化道溃疡;

甲状腺功能亢进;急性冠脉综合征、心源性休克等;依从性差者等。本研究方案通过医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

## 1.2 研究方法

1.2.1 标本采集 所有研究对象取血前 10 d 内均不服用阿司匹林、潘生丁、肝素及非甾体类抗炎药等影响凝血机能的药物。两组患者均抽取 2 ml 外周血置于含 EDTA 的抗凝试管中。

1.2.2 DNA 提取 采用杭州博日科技有限公司提供的 Biospin 全血基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,置 -20 °C 保存。

1.2.3 PAF-AH 基因多态性检测 (1)聚合酶链反应(PCR)扩增:参照 Stafforini 等<sup>[9]</sup>报道的引物序列、反应体系和参数进行扩增(上海生工生物工程技术服务有限公司),A 和 B 引物位于第 9 外显子两侧,A 为公共引物,C 和 D 引物为等位基因特异性引物,仅在 3'端相差一个碱基,A:5'-CTATAAATTTATATCATGCTT-3';B:5'-TTTACTATTCTCTTGCTTTAC-3';C:5'-TCACTAAGAGTCTGAATAAC-3'; D: 5'-TCACTAAGAGTCTGAATAAA-3'。(2)PCR 产物鉴定:取 5 μl 产物经含溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外线灯下观察结果。每份标本分别以 A 和 B、A 和 C 以及 A 和 D 引物扩增 3 次。A 和 B 扩增产物长度 160 bp,为乙烯水解酶基因的第 9 外显子,A 和 C 扩增产物长度 108 bp,为正常等位基因的扩增片段,A 和 D 扩增产物长度 108 bp,为突变等位基因的扩增产物。计算出研究组和对照组的基因型突变频率。

1.3 统计学方法 本研究用 Graph Pad 6.0 软件进行统计学处理。对照组和房颤血栓组间计数资料比较采用  $\chi^2$  检验和校正  $\chi^2$  检验;基因型及等位基因间相对危险度用比数比(OR)及 95% CI 表示。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组 PAF-AH 基因基因型频率比较 对照组 GG 型基因频率显著存在于房颤血栓组(77.78% vs 58.82%, $P < 0.05$ )。相比于对照组,携带有突变基因 T 的基因型(GT + TT)频率显著存在于房颤血栓组(41.18% vs 22.22%, $P < 0.05$ )。见表 1。PAF-AH 基因基因型频率与房颤血栓形成具有相关性( $OR = 2.450$ , 95% CI = 1.053 ~ 5.701)。

2.2 两组 PAF-AH 基因等位基因频率比较 房颤血栓组 T 等位基因频率显著高于对照组(25.00% vs 11.67%, $P < 0.01$ )。见表 2。等位基因频率与房颤血栓形成具有相关性( $OR = 2.524$ , 95% CI = 1.237 ~

表 1 两组 PAF-AH 基因基因型频率比较 例(%)

组别	例数	GG	GT	TT
对照组	90	70(77.78)	19(21.11)	1(1.11)
房颤血栓组	34	20(58.82)	11(32.35)	3(8.82)
P 值		<0.01		

表 2 两组 PAF-AH 基因等位基因频率比较 频次(%)

组别	频次	G	T
对照组	180	159(88.33)	21(11.67)
房颤血栓组	68	51(75.00)	17(25.00)
P 值		<0.01	

5.149)。提示 PAF-AH 基因(G-T)突变可能与房颤血栓形成相关。

## 3 讨论

房颤是最常见的心律失常,可以形成血栓引起致死致残。一般认为,血栓形成与血流动力学改变、血液高凝及内皮损伤相关。而针对房颤引起血流动力学改变所致的血栓形成,目前治疗主要集中于抗凝,但效果并不理想。因此,寻求其他有效抗血栓形成手段,具有重要意义。在血栓形成过程中,除了机体凝血因子参与外,血小板活化是重要的一步。PAF 是新发现的较强的血小板聚集诱导剂,有致动脉粥样硬化作用,而阿司匹林和氯吡格雷不能抑制 PAF 诱导的血小板聚集和活化,其 PAF-AH 通过水解 PAF 表现出抗动脉粥样硬化作用。PAF-AH 基因变异可导致 PAF-AH 的催化活性降低或丧失,以促进动脉粥样硬化的发展和血栓的形成。人血浆型 PAF-AH 基因位于染色体 6p12 ~ p21.1,由 12 个外显子组成<sup>[10]</sup>。近年研究发现,人血浆型 PAF-AH 基因存在多个位点突变类型,目前在东亚人主要为第 9 号外显子的变异(G994→T),使第 279 位缬氨酸(Val)被苯丙氨酸(Phe)取代,而这一错义突变恰位于 PAF-AH 的催化结构域内,结果导致 PAF-AH 活性降低或丧失,使 PAF 降解减少。而在人群中则表现为 GG 型、GT 型或 TT 型的单核苷酸多态性(SNP)。Stafforini 等<sup>[9]</sup>研究发现在 127 例随机抽样的日本人群中,27% 为杂合子(GT 型),4% 为纯合子(TT 型);杂合子血浆 PAF-AH 活性比 GG 型减少 50%,纯合子则完全缺乏活性。Hiramoto 等<sup>[11]</sup>在 120 例日本缺血性卒中患者中发现 52 例(43.3%)有 PAF-AH 基因突变(GT 或 TT 型),显著高于对照组的 25.4%,认为这是缺血性脑卒中的一个危险因子。国内张雄等<sup>[7]</sup>报道的 63 例脑梗死患者中 24 例(38.10%)有 PAF-AH 基因突变,对照组为 20.46%,提示 PAF-AH 基因 G994→T 变异增加了缺血性脑卒中的危险性。但该基因多态性与房

颤患者血栓形成之间有无关系目前尚缺乏大规模研究。

本研究基于课题组前期初步发现房颤患者外周血浆 PAF 升高与房颤血栓形成有关,推测 PAF-AH 基因突变可能是房颤血栓形成新的机制。本研究中我们进一步采取分子生物学技术,比较无血栓事件发生组(对照组)及房颤血栓事件发生组(房颤血栓组)间,PAF-AH 基因基因型频率及等位基因频率间的差异,结果显示,相比于对照组,携带有突变基因 T 的基因型显著存在于房颤血栓组;同时,房颤血栓组 T 等位基因频率显著高于对照组,提示,PAF-AH 基因多态性(G-T 突变)可能与房颤血栓形成相关。此外,有研究报道,PAF 与 PAF-AH 间失衡是引起机体血栓形成的重要因素<sup>[12-13]</sup>。一定浓度 PAF-AH 可有效促进血管内皮修复及再生<sup>[14]</sup>。基于血小板活化在血栓形成过程中扮演的重要角色,合理干预血小板活化剂聚集,对于阻止血栓形成具有重要意义。因此,以 PAF-AH 为聚焦点,深入探究 PAF-AH 基因与房颤血栓形成间的具体机制,将有助于更好地干预房颤血栓形成,以降低卒中发生率,从而为房颤新的抗血栓策略提供思路。此外由于血栓形成机制的复杂性,不可能用单基因突变去解释,因此需要寻找新的基因突变位点。采用较为先进的标签单核苷酸多态性策略方法去寻找 PAF-AH 基因突变新的位点将是我们下一步研究的方向。

#### 参考文献

- [1] 黄从新,张澍,马长生,等.心房颤动:目前的认识和治疗建议-2010[J].中华心律失常学杂志,2010,14(5):328-369.
- [2] Hayashi M, Takeshita K, Inden Y, et al. Platelet activation and induction of tissue factor in acute and chronic atrial fibrillation; involvement of mononuclear cell-platelet interaction[J]. Thromb Res, 2011, 128(6): e113 - e118.
- [3] Kamath S, Blann AD, Chin BS, et al. Platelet activation, haemorrhol-

ogy and thrombogenesis in acute atrial fibrillation; a comparison with permanent atrial fibrillation[J]. Heart, 2003, 89(9): 1093 - 1095.

- [4] Manolis AS, Tzeis S, Andrikopoulos G, et al. Aspirin and clopidogrel: a sweeping combination in cardiology[J]. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2005, 3(3): 203 - 219.
- [5] Milovanovic M, Fransson E, Hallert C, et al. Atrial fibrillation and platelet reactivity[J]. Int J Cardiol, 2010, 145(2): 357 - 358.
- [6] Zhang X, Pan XL, Liu XT, et al. Down-regulation of platelet-activating factor receptor gene expression during focal reversible cerebral ischemia in rats[J]. Neurochem Res, 2007, 32(3): 451 - 456.
- [7] 张雄,袁成林,张衍忠,等.血小板活化因子乙酰水解酶基因 994(G→T)突变与脑梗塞的关联性[J].中华医学遗传学杂志, 2005, 22(4): 450 - 451.
- [8] Sutton BS, Crosslin DR, Shah SH, et al. Comprehensive genetic analysis of the platelet activating factor acetylhydrolase (PLA2G7) gene and cardiovascular disease in case-control and family datasets[J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(9): 1318 - 1328.
- [9] Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, et al. Platelet - activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti - inflammatory phospholipase[J]. J Clin Invest, 1996, 97(12): 2784 - 2791.
- [10] Sekuri C, Cam FS, Tengiz I, et al. Association of platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism with premature coronary artery disease in Turkish patients[J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2006, 6(2): 132 - 134.
- [11] Hiramoto M, Yoshida H, Imaizumi T, et al. A mutation in plasma platelet - activating factor acetylhydrolase (Val<sup>279</sup>→Phe) is a genetic risk factor for stroke[J]. Stroke, 1997, 28(12): 2417 - 2420.
- [12] 周建平,沈玉霞,殷葵,等.血小板活化因子乙酰水解酶基因多态性与缺血性脑卒中患者血小板活化和预后关系的研究[J].中国医师进修杂志, 2009, 32(10): 27 - 31.
- [13] de Winter RJ, Heyde GS, Koch KT, et al. The prognostic value of pre-procedural plasma C-reactive protein in patients undergoing elective coronary angioplasty [J]. Eur Heart J, 2002, 23(12): 960 - 966.
- [14] Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia[J]. Br J Surg, 1994, 81(9): 1254 - 1269.

收稿日期:2016-04-06 修回日期:2016-05-03 编辑:周永彬