

【临床研究】

通信作者:吴纪珍(1965-),女,河南内乡人,学士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:肺栓塞与肺血管病的治疗;E-mail:18538298-377@163.com。齐咏(1975-),女,河南封丘人,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:慢性气道疾病、神经调控与肺部疾病;E-mail:rose20000@126.com。

静脉血栓栓塞症 (venous thromboembolism, VTE) 包括肺栓塞 (pulmonary embolism, PE) 和深静脉血栓形成 (deep venous thrombosis, DVT)。造成 VTE 的因素包括内皮损伤或活化、血流减少和血液高凝状态,即 Virchow 三联征。VTE 是一种具有高遗传性的复杂疾病,研究显示,50% 以上 VTE 患者与遗传学危险因素有关^[1]。F11 基因^[2-6] 位于 4q35.2 位点上,编码凝血因子 XI,其多态性与 VTE 密切相关^[4,7]。最近研究显示,F11 基因 rs2036914 T/C 多态性与 VTE 的发生密切相关,但研究人群多来源于国外,种族多为高加索人、非洲人等^[4,8-11]。但是目前关于中国人的 F11 基因 rs2036914 T/C 多态性与 VTE 的研究,国内尚未见报道。本研究采用 PSTAR 高通量位点测序技术研究 F11 的 rs2036914 T/C 位点多态性,并分析其与河南省汉族人口 VTE 的关系,为基因治疗的机制方面提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 3 月至 2017 年 3 月在河南省人民医院住院治疗的 VTE 患者 82 例为病例组,其中男 46 例,女 36 例,年龄 21 ~ 89 (60.00 ± 16.22) 岁,继发性 VTE 63 例 (继发组),其中 PE 18 例,DVT 55 例。另选择性别、年龄匹配的正常志愿者 82 例作为对照组,男 46 例,女 36 例,年龄 18 ~ 89 (60.00 ± 16.73) 岁。本研究通过医院伦理委员会审核批准。病例组和对照组患者性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 纳入标准和排除标准 纳入标准:(1) 年龄 18 ~ 89 岁;(2) DVT 诊断符合中华医学会外科学分会血管外科学组制定的 DVT 诊断和治疗指南中的诊断标准^[12];(3) PE 的诊断符合中华医学会呼吸病分会肺栓塞与肺血管病学组制定的肺血栓栓塞症诊治与预防指南中的诊断标准^[13];(4) 临床资料完整;(5) 患者及家属对本研究知情同意。排除标准:恶性肿瘤、自身免疫性疾病、血液系统疾病及已经使用溶栓、抗凝药物的患者。

1.3 主要试剂与仪器 血液基因组 DNA 提取试剂盒、测序反应通用试剂盒购自武汉康昕瑞基因健康科技有限公司,100 bp DNA Ladder 购自 Takara 宝生物工程 (大连) 有限公司,所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。基因测序仪购自深圳华因康基因科技有限公司、聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自德国艾本德公司, -80 °C 冰箱购自青岛海尔股份有限公司,涡旋震荡仪购自海门其

林贝尔仪器制造有限公司, NanoDrop 超微量分光光度计购自美国赛默飞公司,凝胶成像仪购自上海天能科技有限公司,电泳仪、垂直电泳槽购自上海天能科技有限公司,水平电泳槽购自北京市六一仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 静脉血采集 病例组患者入院确诊 VTE 后,在应用抗凝药物治疗前采集空腹外周静脉血,对照组受试者采集清晨空腹外周静脉血,储存于 -80 °C 冰箱。

1.4.2 全血 DNA 的提取和多态位点检测区域序列的获取 采用 DNA 提取试剂盒,按照操作步骤提取全血 DNA 2 μg。应用 Primer premier 5 引物设计软件在多态性位点附近 100 bp 左右区域设计引物,引物序列在国家生物技术信息中心数据库中进行比对,确定引物特异性,上游引物序列: 5'-CAGAAGGCTCGTTCCAGACC-3',下游引物序列: 5'-TTGTCTTGGAGACAAGGAGTGC-3',PCR 反应体系共 25 μL,PCR 反应程序为 94 °C 4 min; 94 °C 20 s, 57 °C 20 s, 72 °C 20 s, 20 个循环; 72 °C 3 min; 10 °C 保存。目的片断连接磁珠,对连接目的片断的磁珠进行回收混合。

1.4.3 高通量测序 开启测序仪,使用 PStar 软件中初始化操作模块,点击初始化 (I); 将反应小室上的进液口与测序仪 XY 平台一端与泵相连的软管相连,将反应小室上的出液口与废液瓶上软管相连; 使用 PStar 软件,从装有 Buffer 离心管中吸取溶液,用于测序; 在 PStar 主控界面中点击“检测 (T)”,进入“硬件检测 (H)”模块。将试剂盒中 10 × Seq Buffer B、10 × Seq Buffer C、10 × Seq Buffer W 用 ddH₂O 稀释 10 倍,配制成 1 × Seq Buffer B、1 × Seq Buffer C、1 × Seq Buffer W 后放在测序仪的 Work Station B 区位置上; 加入上述组分后混匀, 3 000 r · min⁻¹ 离心 30 s,放入测序仪相应试剂区域。在 PStar 主控界面中依次点击设置,进行试剂参数设置; 在 PStar 主控界面中点击“Run”Custom 功能模块,点击 Start,运行测序程序。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。2 组受试者基因型和等位基因频率的比较采用 χ^2 检验。应用 logistic 回归模型分析 F11 基因 rs2036914 T/C 多态性与 VTE 的相关性。从 logistic 回归模型中得到优势比 (odds ratio, OR) 和 95% 可信区间 (confidence interval, CI)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组和对照组受试者 F11 基因 rs2036914 基因型和等位基因频率比较 结果见表 1。对照组和病例组受试者基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。病例组患者等位基因 C 频率高于对照组,差异有统计学意义($OR=2.192,95\%CI$:下限为 1.298、上限为 3.703, $P<0.05$)。

表 1 病例组和对照组受试者 F11 基因 rs2036914 基因型和等位基因频率比较

| Tab. 1 Analysis of F11 rs2036914 genotype and allele frequency in the case group and the control group 例(%) | | | | | | |
|---|----|--------|----------|----------|----------|------------------------|
| 组别 | n | 基因型 | | | 等位基因 | |
| | | TT | CT | CC | T | C |
| 对照组 | 82 | 3(3.7) | 45(54.9) | 34(41.4) | 51(31.1) | 113(68.9) |
| 病例组 | 82 | 3(3.7) | 22(26.8) | 57(69.5) | 28(17.1) | 136(82.9) ^a |

注:与对照组比较^a $P<0.05$ 。

2.2 病例组和对照组受试者 F11 基因 rs2036914 位点遗传模型的分析 结果见表 2。病例组患者隐性遗传模型(CC 比 CT+TT)中 CC 基因型频率高于对照组($OR=3.219,95\%CI$:下限为 1.690、上限为 6.126, $P<0.01$);病例组隐性遗传模型(CC+CT 比 TT)中 TT+CT 基因型频率与对照组比较差异无统计学意义($OR=1.000,95\%CI$:下限为 0.196、上限为 5.106, $P>0.05$)。

表 2 病例组和对照组受试者 F11 基因 rs2036914 位点遗传模型的分析

| Tab. 2 Analysis of F11 rs2036914 locus genetic model of the case group and the control group 例(%) | | | | | | |
|---|----|----------|-----------------------|--------|----------|--|
| 组别 | n | 隐性遗传模型 | | 显性遗传模型 | | |
| | | TT+CT | CC | TT | CT+CC | |
| 对照组 | 82 | 48(58.5) | 34(41.5) | 3(3.7) | 79(96.3) | |
| 病例组 | 82 | 25(30.5) | 57(69.5) ^a | 3(3.7) | 79(96.3) | |

注:与对照组比较^a $P<0.05$ 。

2.3 继发组和对照组受试者 F11 基因 rs2036914 T/C 多态性比较 结果见表 3。继发组患者 C 等位基因频率明显高于对照组,差异有统计学意义($OR=2.392,95\%CI$ 下限为 1.338、上限为 4.277, $P<0.05$)。

表 3 继发组和对照组受试者 F11 基因 rs2036914 T/C 多态性比较

Tab. 3 Polymorphism analysis of F11 gene rs2036914 T/C in the secondary group and the control group 例(%)

| 组别 | n | 基因型 | | | 等位基因 | |
|-----|----|--------|----------|----------|----------|------------------------|
| | | TT | CT | CC | T | C |
| 对照组 | 82 | 3(3.7) | 45(54.9) | 34(41.4) | 51(31.1) | 113(68.9) |
| 继发组 | 63 | 2(3.2) | 16(25.4) | 45(71.4) | 20(15.9) | 106(84.1) ^a |

注:与对照组比较^a $P<0.05$ 。

3 讨论

VTE 是凝血因子、凝血蛋白和纤溶蛋白等多种因素参与的一类机制复杂的疾病,遗传因素和获得性因素共同作用导致 VTE 的发生。目前,已发现遗传性易栓症存在多种基因缺陷种类,但具有种族和地域性差异^[14]。2011 年我国一项 22 省市 60 多家三甲医院参与的研究显示,近 15 年来住院患者 PE 发病率逐年上升,已达 1%,该水平已与白种人群 VTE 发病率持平^[15]。然而,关于中国人群患 VTE 的遗传方面的研究甚少。

凝血因子 XI 是一种血浆丝氨酸蛋白酶原,在体内和体外的凝血途径中都起着重要作用,在血浆止血的起始和扩增阶段起着桥梁作用。研究发现,F11 基因敲除小鼠的血栓形成率降低^[5]。凝血因子 XI 水平升高与血栓形成有关^[7]。LI 等^[9]研究发现,F11 基因 rs2036914 多态性是 VTE 的独立危险因素。Meta 分析显示,F11 基因 rs2036914 多态性与 VTE 显著相关^[16],其研究的人群来源于国外,但目前关于中国人 F11 基因 rs2036914 多态性与 VTE 的关系尚未见报道。

本研究纳入者均为河南省汉族 VTE 患者,应用 PSTAR 高通量位点测序技术初步探讨凝血因子 F11 基因 rs2036914 T/C 多态性与 VTE 的相关性,结果显示,等位基因 C 为风险基因,其携带者发生 VTE 风险会增加,结合继发组的分析结果,提示携带等位基因 C 的患者更具易感性,与以往的研究结果一致^[16-17]。本研究结果显示,病例组患者隐性遗传模型中 CC 基因型频率高于对照组,其 95%CI 下限大于 1,提示基因型 CC 可能为 VTE 的遗传危险因素,该结果与文献报道^[16]相符。但本研究为单中心小样本研究,未进一步检测血样本中凝血因子 XI 的水平及活化水平。F11 基因多态性与中国人群患 VTE 的相关性有待进一步的研究。

综上所述,F11 基因 rs2036914 T/C 多态性可能是河南省汉族人口发生 VTE 的遗传危险因素,在外伤或手术的影响下,携带等位基因 C 人群罹患 VTE 的风险更高。

参考文献:

[1] HEIT J A, ARMASU S M, ASMANN Y W, et al. A genome-wide association study of venous thromboembolism identifies risk variants in chromosomes 1q24.2 and 9q[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10 (8):1521-1531.

[2] BRUZELIUS M, LJUNGQVIST M, BOTTAI M, et al. F11 is

associated with recurrent VTE in women. A prospective cohort study[J]. *Thromb Haemost*,2016,115(2):406-414.

[3] MOHAMMED B M,MATAFONOV A,IVANOV I,*et al*. An update on factor XI structure and function[J]. *Thromb Res*,2018,161:94-105.

[4] BARE L A,ARELLANO A R,TONG C H,*et al*. Genetic variants of F11,statin use and venous thrombosis[J]. *J Thromb Haemost*,2011,9(6):1249-1251.

[5] WANG X,SMITH P L,HSU M Y,*et al*. Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice [J]. *J Thromb Haemost*,2006,4(9):1982-1988.

[6] TUCKER E I,MARZEC U M,WHITE T C,*et al*. Prevention of vascular graft occlusion and thrombus-associated thrombin generation by inhibition of factor XI[J]. *Blood*,2009,113(4):936-944.

[7] MEIJERS J C,TEKELENBURG W L,BOUMA B N,*et al*. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis [J]. *N Engl J Med*,2000,342(10):696-701.

[8] GERMAIN M,CHASMAN D I,DE HAAN H,*et al*. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism [J]. *Am J Hum Genet*,2015,96(4):532-542.

[9] LI Y,BEZEMER I D,ROWLAND C M,*et al*. Genetic variants associated with deep vein thrombosis;the F11 locus[J]. *J Thromb Haemost*,2009,7(11):1802-1808.

[10] HARRINGTON L B,WIGGINS K L,SITLANI C M,*et al*. The association of F11 genetic variants with the risk of incident venous thrombosis among women, by statin use [J]. *Thromb Haemost*,2016,115(3):682-684.

[11] DE HAAN H G,VAN HYLCKAMA VLIEG A,LOTTA L A,*et al*. Targeted sequencing to identify novel genetic risk factors for deep vein thrombosis: a study of 734 genes [J]. *J Thromb Haemost*,2018,16(12):2432-2441.

[12] 李晓强,张福先,王深明. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南(第三版)[J]. 中国血管外科杂志:电子版,2017,9(4):250-257.

[13] 中华医学会呼吸病学分会肺栓塞与肺血管病学组. 肺血栓栓塞症诊治与预防指南[J]. 中华医学杂志,2018,98(14):1060-1069.

[14] MARGAGLIONE M,DRANDONE E. Population genetics of venous thromboembolism. A narrative review [J]. *Thromb Haemost*,2011,105(2):221-231.

[15] YANNG Y,LIANG L,ZHAI Z,*et al*. Pulmonary embolism incidence and fatality trends in chinese hospitals from 1997 to 2008: a multicenter registration study [J]. *PLoS One*,2011,6(11):e26861.

[16] 张建敏,马信龙,马剑雄,等. 凝血因子 11 基因 rs2289252 和 rs2036914 多态性与静脉血栓栓塞症易感性关系的 Meta 分析[J]. 中国中西医结合急救杂志,2016,23(1):31-35.

[17] BEZEMER I D,BARE L A,DOGGEN C J,*et al*. Gene variants associated with deep vein thrombosis[J]. *JAMA*,2008,299(11):1306-1314.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

(上接第 546 页)

[2] 谭必春. 影响急性脑梗死患者治疗效果的相关因素分析[J]. 中国临床研究,2014,27(3):283-284.

[3] NAESS H,KURTZ M,THOMASSEN L,*et al*. Serial NIHSS scores in patients with acute cerebral infarction[J]. *Acta Neurol Scand*,2016,133(6):415-420.

[4] 黄育梅,黄顺贵. 巴曲酶治疗时间对急性脑梗死患者脑血管储备功能的影响[J]. 医学综述,2016,22(13):2640-2642.

[5] 耿赤子,魏建朝. 不同巴曲酶治疗时间窗对急性脑梗死患者脑血管储备的影响[J]. 安徽医学,2015,36(12):1467-1469.

[6] 中华神经科学会,中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志,1996,29(6):379-380.

[7] 赵继宗,周定标. 神经外科学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2014:233-235.

[8] 凌国琴,闵鹏. Barthel 指数评定量表在急性脑梗死康复护理中的应用效果分析[J]. 中外医疗,2017,36(33):153-155.

[9] 柴美静,王佩,杨凡,等. 小檗碱对急性脑梗死患者神经功能及血清氧化低密度脂蛋白及基质金属蛋白酶-9 的影响[J]. 医药导报,2017,36(6):650-653.

[10] 王昌权. 早期康复训练对急性脑梗死患者运动功能及血清脑源性神经营养因子水平的影响[J]. 新乡医学院学报,2017,34(10):946-948.

[11] 赵家松,陈伟. 依达拉奉联合川芎嗪治疗急性脑梗死的临床观察[J]. 临床医学,2015,35(3):123-124.

[12] 王倩,王鹏,王广,等. 经颈动脉注射巴曲酶治疗高龄急性脑梗死患者的疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志,2016,23(6):651-652.

[13] 严澎,魏立平,李文波,等. 丁苯酞注射液联合巴曲酶治疗急性进展性脑梗死的疗效[J]. 临床神经病学杂志,2014,27(2):145-147.

[14] 潘辉. 巴曲酶联合阿加曲班治疗急性进展性脑梗死的疗效观察[J]. 实用心脑血管病杂志,2014,22(3):7-8.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)