

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.10.009

慢性心力衰竭并发静脉血栓患者 vWF 活性与其基因多态性及民族的相关性研究^{*}

宋金萍,马 晶,黄国虹[△]

新疆维吾尔自治区人民医院临床检验中心,新疆乌鲁木齐 830001

摘 要:目的 分析慢性心力衰竭(CHF)并发静脉血栓患者血管性血友病因子(vWF)基因 rs7966230 多态性位点基因型分布特点及与其 vWF 活性和民族的相关性。**方法** 将 2017 年 3 月至 2020 年 3 月来该院就诊的 42 例 CHF 并发下肢静脉血栓患者作为 CHF 并发血栓组,将同期来该院体检的 104 例体检健康者作为健康对照组,观察两组 vWF 基因 rs7966230(G/C)基因型及 vWF 活性。采用 Pearson 相关分析 CHF 并发静脉血栓患者血浆 vWF 活性与其基因型及民族的相关性。**结果** 与健康对照组相比,CHF 并发血栓组患者 vWF 基因 rs7966230 多态性位点的基因型和等位基因的分布差异均无统计学意义($P>0.05$)。CHF 并发血栓组患者 vWF 基因 rs7966230 GC 基因型 vWF 活性明显高于 CC 型($P<0.05$),而各民族不同基因型 vWF 活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。CHF 并发静脉血栓患者血浆 vWF 活性与 rs7966230 位点基因呈正相关($r=0.433, P=0.034$),而与民族无明显相关性($r=-0.017, P=0.913$)。**结论** CHF 并发静脉血栓患者的血浆 vWF 活性与 rs7966230 位点基因型有相关性,与民族无明显相关性。

关键词:慢性心力衰竭; 静脉血栓; 血管性血友病因子; 基因多态性; 民族

中图法分类号:R541.6;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)10-1330-04

Relationship between vWF activity, gene polymorphism and nationalities in patients with chronic heart failure complicated with venous thrombosis^{*}

SONG Jinping, MA Jing, HUANG Guohong[△]

Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China

Abstract: **Objective** To analyze the distribution characteristics of von willebrand factor (vWF) rs7966230 and its relationship with vWF activity and nationality in patients with chronic heart failure(CHF) complicated with venous thrombosis. **Methods** From March 2017 to March 2020, 42 patients with CHF complicated with lower limb venous thrombosis in this hospital were enrolled as the heart failure complicated with thrombosis group, and 104 healthy subjects were enrolled as the healthy control group. VWF rs7966230 (G/C) genotype and vWF activity of the two groups were detected. Pearson correlation was used to analyze the correlation between plasma vWF activity and genotype and nationality in patients with CHF complicated with venous thrombosis. **Results** Compared with the healthy control group, there was no significant difference in the distribution of genotype and allele of rs7966230 polymorphism of vWF gene in patients with CHF complicated with venous thrombosis ($P>0.05$). The vWF activity of GC genotype rs7966230 in patients with CHF complicated with venous thrombosis was significantly higher than that of CC genotype ($P<0.05$), but there was no significant difference in vWF activity among different genotypes of different nationalities ($P>0.05$). Plasma vWF activity was positively correlated with rs7966230 genotype in patients with CHF complicated with venous thrombosis ($r=0.433, P=0.034$), but not with nationality ($r=-0.017, P=0.913$). **Conclusion** Plasma vWF activity in patients with CHF complicated with venous thrombosis was correlated with rs7966230 genotype, but not with nationality.

Keywords: chronic heart failure; venous thrombosis; von willebrand factor; gene polymorphism; nationality

慢性心力衰竭(CHF)是常见的心血管疾病,血栓 栓塞是其严重的并发症,近年来,CHF 发生率呈明显

^{*} 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2017D01C140)。

作者简介:宋金萍,女,助理研究员,主要从事心血管及血栓方面研究。 [△] 通信作者, E-mail:18999898689@163.com。

升高趋势,且常被心功能不全的临床表现所掩盖,易漏诊和误诊。CHF 患者血管内皮细胞损伤,血管性血友病因子(vWF)水平明显升高,血液呈高凝状态,是静脉血栓形成的高危人群^[1]。vWF 促进血小板的活化和聚集,充当凝血因子Ⅷ(FⅧ)载体,延长其半衰期,是血小板血栓和纤维素血栓形成的关键因素之一^[2]。近期研究证实,vWF 过表达在心血管事件和动静脉血栓形成中具有重要意义^[3-5]。遗传变异是静脉血栓最主要的原发性危险因素,凝血系统基因多态性是研究方向之一。目前与血栓性疾病相关的 vWF 基因多态性位点中 rs7966230(-1793G/C)多态性在不同种族之间存在明显差异,且影响血浆 vWF 表达水平^[6]。vWF 在动脉血栓中具有重要作用,但其在 CHF 患者并发静脉血栓中的研究国内外少见报道。鉴于 vWF 在心血管疾病和血栓形成中的重要作用,本研究探讨新疆维吾尔自治区 CHF 静脉血栓并发症患者 vWF 活性与其基因多态性及民族的相关性,探讨新疆 CHF 患者发生静脉血栓的机制,为 CHF 抗凝治疗提供重要依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 3 月至 2020 年 3 月来本院就诊的 42 例 CHF 并发下肢静脉血栓患者作为 CHF 并发血栓组,其中男 22 例,女 20 例,年龄 59~90 岁,平均 (72.47 ± 12.88) 岁,患者均为首次诊断出下肢静脉血栓。健康对照组来自同期本院 104 例体检健康者,男 52 例,女 52 例,年龄 49~80 岁,平均 (68.45 ± 9.72) 岁。

1.2 仪器与试剂 核酸蛋白定量仪 Nano-100(杭州奥康仪器有限公司);电泳仪电源 DYY-6C 型(北京市六一仪器厂);凝胶成像系统 Tanon-2500(上海天能科技有限公司);STAGO 全自动凝血分析仪(法国 STAGO 公司)。ABI3730xl 基因测序(美国 ABI 公司)。DNA 提取试剂盒[小量全血基因组 DNA 提取试剂盒(溶液型),北京君诺德试剂公司];DNA Marker-B(上海生工试剂公司);vWF 和凝血因子Ⅷ活性测定试剂盒(法国 STAGO 公司)。

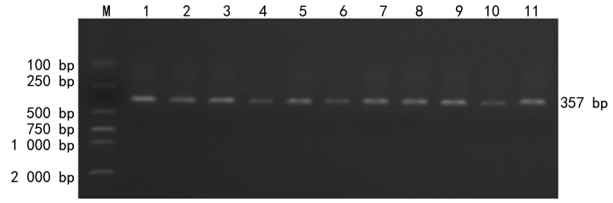
1.3 方法 采集研究对象乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝外周全血 2~3 mL,提取基因组 DNA。采用琼脂糖凝胶电泳评估 DNA 质量,采用核酸蛋白定量仪测定 DNA 浓度。vWF 基因 rs7966230 上游引物为 5'-AAAGCGGACAGTGCAGAC-3',下游引物为 5'-GGAGGAAGAGGAGCCTAAATG-3',扩增产物片段约 357 bp。PCR 反应体系 50 μ L,反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共循环 35 次。PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上 150 mV 电泳 25 min,并采用凝胶成像仪拍照。PCR 产物使用

ABI3730xl 测序。使用 BioEdit 和 DNAMAN 软件分析实验结果,获得分型数据。采集研究对象枸橼酸钠抗凝外周全血 2~3 mL,分离血浆,检测 vWF 和 FⅧ活性。

1.4 统计学处理 所有数据均采用统计学软件 SPSS19.0 进行处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;两组间比较采用 *t* 检验。vWF 基因 rs7966230 位点的基因型分布需符合 Hardy-Weinberg 定律,组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验。vWF 活性与其基因型及民族的相关性采用 Pearson 相关分析。双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 vWF 基因扩增及测序结果 vWF 基因 12 外显子 rs7966230 多态性位点位于 6 126 547 位碱基,其扩增产物大小为 357 bp,见图 1。测序结果显示,本研究检测到 3 种基因型 GC、GG 和 CC 型。



注:M 为 DNA Marker-B;泳道 1~11 为目的基因。

图 1 vWF 基因 rs7966230 多态性位点的 PCR 产物电泳图

2.2 两组 vWF 基因 rs7966230 多态性位点基因型和等位基因的分布情况 vWF 基因 rs7966230 多态性位点检出 GG、GC、CC 3 种基因型,vWF 基因 rs7966230 多态性位点基因型的分布符合 Hardy-Weinberg 定律($P > 0.05$)。与健康对照组比较,CHF 并发血栓组 vWF 基因 rs7966230 多态性位点的基因型和等位基因的分布频率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 不同民族 vWF 基因 rs7966230 多态性位点基因型分布情况 vWF rs7966230 不同基因型在汉族和维吾尔族患者中的分布比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 两组 vWF 基因 rs7966230 多态性位点不同基因型凝血因子差异比较 健康对照组 rs7966230 位点不同基因型 vWF、FⅧ活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。CHF 并发血栓组 GC 基因型 vWF 活性明显高于 CC 型,FⅧ活性明显高于 GG 型,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.5 不同民族 vWF 基因 rs7966230 位点不同基因型凝血因子差异比较 健康对照组和 CHF 并发血栓组各基因型不同民族 vWF 和 FⅧ活性比较,差异无统

计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 1 两组 vWF 基因 rs7966230 多态性位点基因型和等位基因分布情况[$n(\%)$]

基因型	n	基因型			等位基因	
		GG	GC	CC	G	C
健康对照组	104	46(44.23)	48(46.15)	10(9.62)	140(67.31)	68(32.69)
CHF 并发血栓组	42	18(42.86)	19(45.24)	5(11.90)	55(65.48)	29(34.52)
χ^2			4.184			0.119
P			0.382			0.945

表 2 不同民族 vWF 基因 rs7966230 多态性位点基因型分布情况(n)

组别	民族	GG	GC	CC	χ^2	P
健康对照组	汉族	23	21	5	0.466	0.809
	维吾尔族	23	27	5		
CHF 并发血栓组	汉族	11	11	3	0.184	1.000
	维吾尔族	7	8	2		

2.6 CHF 并发血栓患者 vWF 活性与其基因型及民族的相关性分析 Pearson 相关性分析显示,vWF 活性与 rs7966230 位点基因型(GC/CC)呈明显正相关($r=0.433,P=0.034$),而与民族无明显相关性($r=-0.017,P=0.913$)。

表 4 不同民族 vWF 基因 rs7966230 位点不同基因型 vWF 和 FⅧ活性比较($\bar{x}\pm s,\%$)

组别	n	基因型	民族	vWF			FⅧ		
				活性	t	P	活性	t	P
健康对照组	104	GG	汉族	86.87±17.46	0.21	0.83	97.58±31.94	1.23	0.23
			维吾尔族	87.95±16.84			88.36±15.46		
		GC	汉族	93.85±27.43	1.39	0.17	96.38±30.12	1.99	0.06
			维吾尔族	84.73±13.34			86.19±18.74		
		CC	汉族	113.60±20.82	2.03	0.07	104.40±16.02	1.66	0.14
			维吾尔族	88.00±19.07			83.80±22.59		
CHF 并发血栓组	42	GG	汉族	287.00±36.41	0.40	0.69	219.25±37.88	0.56	0.90
			维吾尔族	277.62±55.19			221.37±28.97		
		GC	汉族	302.80±93.16	0.03	0.97	262.20±35.99	0.43	0.67
			维吾尔族	304.12±77.12			275.25±88.03		
		CC	汉族	230.33±35.53	0.06	0.95	252.66±37.00	0.56	0.61
			维吾尔族	233.00±62.23			230.50±53.03		

3 讨 论

血浆 vWF 水平在普通人群中差异很大,并且这种变异与遗传和环境因素有关。有研究表明,vWF 水平变异主要是由遗传变异决定的^[7-8]。不同单核苷酸多态性基因型的人群 vWF 表达水平也不同,对疾病

表 3 vWF 基因 rs7966230 位点不同基因型 FⅧ和 vWF 活性比较($\bar{x}\pm s,\%$)

组别	n	基因型	vWF	FⅧ
健康对照组	104	GG	87.39±16.99	93.17±25.59
		GC	88.81±21.10	88.49±24.00
		CC	100.80±23.16	94.10±21.42
CHF 血栓并发组	42	GG	280.50±43.35	216.56±37.68
		GC	300.32±82.66 ^a	264.05±63.20 ^b
		CC	231.40±40.02	243.80±39.18

注:与同组 CC 基因型相比,^a $P<0.05$;与同组 GG 基因型相比,^b $P<0.05$ 。

的易感性也不同^[9-11]。本课题组前期的研究已证实,与健康人群相比,CHF 患者常存在高凝状态,vWF 和 FⅧ活性均明显升高,下肢静脉血栓发生率高达 20%,vWF 基因调节区 rs7966230(G/C)多态性位点在不同民族中的分布频率有明显差异,并与 vWF 的活性水

平明显相关^[11]。

维吾尔族是我国新疆维吾尔自治区主要的少数民族,具有特殊的遗传背景。傅玉等^[12]有研究发现,我国裕固族 rs7966230 多态性位点基因型 GG 的分布远高于汉族。在本研究中,rs7955230 多态性位点 GG、GC 和 CC 基因型分布在健康对照组和 CHF 并发血栓组中的差异无统计学意义($P>0.05$),同时在健康对照组和 CHF 并发血栓组不同民族中的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。其中,健康对照组汉族中 GG、GC 和 CC 基因型分别占 46.94%、42.86%、10.20%,维吾尔族中 GG、GC 和 CC 基因型分别 41.82%、49.09%、9.09%。这一研究结果与其他研究结果差异较大,尤其是 CC 基因型的分布频率远低于该研究中我国其他地区人群中的分布频率。但是在 NCBI 数据库中,该位点 CC 基因型在欧美人群中鲜见检出,GC 基因型占多数,同时鲜见中国人群的相关研究数据。考虑可能因为本研究纳入人群的年龄和性别与已知文献报道不完全一致有关。

本研究结果显示,在 CHF 并发血栓患者中 GC 基因型患者 vWF 活性高于 CC 型,相应 GC 基因型 FⅧ活性高于其他基因型($P<0.05$),但是相同基因型的不同民族患者的 vWF 和 FⅧ活性差异无统计学意义($P>0.05$)。这一结果提示 CHF 并发血栓患者可能存在影响 rs7955230 位点 GC 基因型表达翻译的调控因素,进而影响 vWF 活性。vWF 是 FⅧ的载体蛋白,可延长 FⅧ的半衰期,因而 GC 型 FⅧ活性也相应高于其他基因型。相关性分析提示,CHF 并发血栓患者血浆 vWF 活性与其基因多态性呈明显正相关,而与民族无明显相关性。

CHF 并发血栓患者严重影响患者预后和生活质量,而在临床上被及时诊断的仅仅是实际血栓发生数量的极小部分。改变血液高凝状态、阻断和逆转血栓形成是治疗 CHF 并发血栓的关键环节。临床上对具有高危获得性危险因素静脉血栓患者普遍采用大剂量抗凝疗法,但缺乏充分的用药依据,并可引起严重的不良反应^[13-14]。积极探索以缓解血管内皮损伤为基础的预防 CHF 患者血栓栓塞发生的有效方法,将有助于揭示 CHF 患者发生静脉血栓的机制,为 CHF 抗凝治疗提供重要依据。

综上所述,新疆维吾尔自治区 CHF 并发静脉血栓患者 vWF 基因 rs7955230 多态性位点 GC 基因型与其活性密切相关,其可能受病理因素的调控,也有可能与其他基因位点存在连锁反应。该位点 GC 基因型 vWF 活性升高的具体机制值得进一步研究。由

于 CHF 并发血栓病例相对难收集,因而样本量较小,后续研究还需扩大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] 田文. 慢性心力衰竭与血栓栓塞性疾病[J]. 临床内科杂志, 2017, 34(9): 587-590.
- [2] DU J, ASPRAY E, FOGELSON A. Computational investigation of platelet thrombus mechanics and stability in stenotic channels[J]. J Biomech, 2021, 122: 110398.
- [3] PAGLIARI M T, BOSCARINO M, CAIRO A, et al. ADAMTS13 activity, high vWF and FⅧ levels in the pathogenesis of deep vein thrombosis[J]. Thromb Res, 2021, 197: 132-137.
- [4] 闫彬, 赵益明. 血管性血友病因子与急性心肌梗死关系的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(7): 630-633.
- [5] 张伯玮, 张珠博, 任静, 等. vW 因子联合 D-二聚体预测非瓣膜性心房颤动患者抗凝治疗后发生血栓风险的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(10): 1014-1020.
- [6] 刘娟, 楚艳艳, 牛锁成. 外周血中血管性血友病因子水平与 ST 段抬高型心肌梗死患者冠状动脉病变程度的关系[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(5): 548-550.
- [7] 王阳斌, 夏茂, 夏永泉. 血浆 vWF、D-二聚体水平与外周血中性粒细胞/淋巴细胞比值联合检测在血栓性疾病中的临床诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 86-89.
- [8] SADLER B, CHRISTOPHERSON P A, HALLER G, et al. von Willebrand factor antigen levels are associated with burden of rare nonsynonymous variants in the VWF gene[J]. Blood, 2021, 137(23): 3277-3283.
- [9] SWYSTUN L L, LILLICRAP D. Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels in health and disease[J]. J Thromb Haemost, 2018, 16(12): 2375-2390.
- [10] 王燕, 金虎, 黄时伟, 等. 血管性血友病因子基因多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关性研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(2): 235-239.
- [11] 宋金萍, 卢佩佩, 王昌敏, 等. 慢性心衰患者血管性血友病因子活性及其基因多态性的相关性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(9): 1111-1116.
- [12] 傅玉, 朱平, 卜定方, 等. vWF 基因 A1381T 和-1793G/C 多态性对中国裕固、藏及汉族人血浆 vWF 水平的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1200-1204.
- [13] 赖春花, 潘莉丽, 万瑾瑾, 等. 乳腺癌化疗后深静脉血栓形成患者的个体化抗凝治疗分析及药学监护[J]. 海峡药学, 2020, 32(11): 187-190.
- [14] 尚元春, 郝登舸. 急性右下肢深静脉血栓的临床治疗评价[J]. 血栓与止血学, 2019, 25(4): 626-627.