

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.040

VKORC1 基因 rs9923231 及 GGCX 基因 rs2592551 位点多态性与新疆维吾尔族、汉族人群心源性脑栓塞的相关性研究 *

王红霞^{1,2} 刘文萍² 高翔¹ 赵华见¹ 毕方方³ 彭颜晖^{2Δ}

(1 新疆医科大学 新疆 乌鲁木齐 830000; 2 新疆医科大学第六附属医院 神经内科 新疆 乌鲁木齐 830000;

3 中南大学湘雅医院 神经内科 湖南 长沙 410000)

摘要 目的:探讨维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1(VKORC1)基因 rs9923231 及 γ -谷氨酰羧化酶(GGCX)基因 rs2592551 位点多态性同新疆维吾尔族和汉族人群发生心源性脑栓塞的关系。**方法:**选取 2017 年 1 月至 2018 年 10 月曾就诊于新疆医科大学第六附属医院神经内科的维吾尔族和汉族散发性房颤致脑栓塞患者各 50 例做为病例组,同时选取非心源性脑卒中维吾尔族患者 50 名及汉族患者 150 名为对照组,从外周静脉血中提取基因组 DNA,采用 PCR-RFLP 技术检测 VKORC1 基因 rs9923231 及 GGCX 基因 rs2592551 多态性位点在不同人群中的分布。**结果:**维吾尔族脑栓塞组及对照组 VKORC1 基因 rs9923231 多态性位点基因型频率分布差异有统计学意义($P<0.05$);汉族脑栓塞组及对照组 VKORC1 基因 rs9923231 多态性位点基因型频率的分布比较差异无统计学意义($P>0.05$)。GGCX 基因 rs2592551 多态性位点在汉族、维吾尔族脑栓塞组及对照组的分布差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**VKORC1 基因 rs9923231 多态性可能与新疆维吾尔族人群心源性脑栓塞的发病有关,而与汉族人群无关;GGCX 基因 rs2592551 多态性可能与维吾尔族及汉族人群心源性脑栓塞的发病均无关。

关键词:汉族;维吾尔族;维生素 K;环氧化物还原酶复合体亚单位 1; γ -谷氨酰羧化酶;基因多态性;心源性脑栓塞

中图分类号:R-33;R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)15-2974-06

Association of VKORC1 gene rs9923231, GGCX Gene rs2592551 Polymorphism with the Cardiogenic Cerebral Embolism in Xinjiang Uyghur and Han Population*

WANG Hong-xia^{1,2}, LIU Wen-ping², GAO Xiang¹, ZHAO Hua-jian¹, BI Fang-fang³, PENG Yan-hui^{2Δ}

(1 Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 2 Department of Neurology, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 3 Department of Neurology, The XiangYa Hospital of Central South University, Changsha, Hunan, 410000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) gene rs9923231 and γ -glutamyl carboxylase (GGCX) gene rs2592551 polymorphism and cardiogenic cerebral embolism in Xinjiang Uyghur and Han populations. **Methods:** 50 patients with cerebral embolism caused by sporadic atrial fibrillation in Uyghur and Han nationality who had been treated in the Department of Neurology, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from January 2017 to October 2018 as a case group. At the same time, 50 non-cardiac stroke Uyghur patients and 150 Han patients were selected as the control group. Genomic DNA was extracted from peripheral venous blood, and the distribution of VKORC1 gene rs9923231 and GGCX gene rs2592551 polymorphisms in different populations was detected by PCR-RFLP technique. **Results:** The frequency distribution of VKORC1 gene rs9923231 polymorphism in Uyghur cerebral embolism group and control group was statistically significant ($P<0.05$); Han nationality cerebral embolism group and control group VKORC1 gene rs9923231 polymorphism gene There was no significant difference in the distribution of type frequency ($P>0.05$). There was no significant difference in the distribution of GGCX gene rs2592551 polymorphism in Han and Uyghur cerebral embolism group and control group ($P>0.05$). **Conclusion:** The VKORC1 gene rs9923231 polymorphism may be associated with the onset of cardiogenic cerebral embolism in Xinjiang Uyghur population, but not related to the incidence of cerebral embolism in Han population; The GGCX gene rs2592551 polymorphism may not be associated with the onset of cardiogenic cerebral embolism in Uyghur and Han populations.

Key words: Han population; Uyghur; vitamin K epoxide reductase complex subunit 1; γ -glutamyl carboxylase; gene polymorphism; cardiogenic cerebral embolism

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2974-06

* 基金项目:新疆维吾尔自治区科技援疆项目(2016E02058)

作者简介:王红霞(1991-),女,硕士研究生,主要研究方向:脑血管病与睡眠障碍,电话:17599791805, E-mail: 2478954231@qq.com

Δ 通讯作者:彭颜晖(1962-),女,本科,硕士生导师,主任医师,主要研究方向:脑血管病与睡眠障碍, E-mail: xjpengyanhui@sina.cn

(收稿日期:2019-03-31 接受日期:2019-04-26)

前言

脑梗死 (cerebral infarction, CI) 占有脑卒中患者的 70%~80%^[1], 基于脑梗死的病因及发病机制, TOAST 分型将其分为五型^[2]。心源性脑栓塞患者发病率约占脑梗死患者的 20%, 非瓣膜性心房颤动是心源性脑栓塞的最常见原因, 约占 50%^[3,4]。研究显示有高达 36% 的老年人致死性大面积脑梗死是由心房颤动引起^[5,7], 与其他亚型脑梗死相比, 心源性脑栓塞常易出现闭塞动脉的再次开通(60%至 90%), 引起 40% 梗死灶出现出血性转化, 导致早期高病死和致死率, 给社会、经济及家庭带来严重影响^[8]。因此, 了解心源性脑栓塞的病因及发病机制对控制此类脑梗死的发生发展有重要作用, 目前研究表明遗传因素在心源性脑栓塞的发病中具有重要作用。

维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1 (Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, VKORC1) 及②-谷氨酰羧化酶(②-glutamyl carboxylase, GGCX)通过催化体内维生素 K 还原反应, 使维生素 K 依赖性蛋白(VKDP)逐渐被羧化为有活性的凝血因子, 从而维持机体的正常凝血途径^[9]。VKORC1 及 GGCX 基因具有遗传多态性, 有研究显示 VKORC1 及 GGCX 的基因变异可能影响维生素 K 依赖性蛋白的血浆活性水平, 从而影响血栓形成的风险^[10,11]。目前尚无 VKORC1 及 GGCX 基因多态性与心源性脑栓塞之间关系的相关报道, 研究基因多态性与心源性脑栓塞的关系有助于更好的认识及预防疾病。本研究采用病例对照的研究方法, 对 VKORC1 基因 rs9923231、GGCX 基因 rs2592551 位点多态性与新疆维吾尔族、汉族人群心源性脑栓塞的关系进行分析, 旨在了解 VKORC1 及 GGCX 的基因变异与不同民族心源性脑栓塞发生的相关性。

1 对象及方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 1 月至 2018 年 10 月就诊于新疆医科大学第六附属医院神经内科非瓣膜心源性脑栓塞患者共 100 例, 收集其临床资料及外周血标本相关资料, 房颤患者均由心电图结果诊断, 脑栓塞患者均依照第四届全国脑血管病学术会议诊断标准, 经过临床及 CT 和 / 或 MRI 确诊, 且符合脑栓塞影像学表现。心源性脑栓塞患者的排除标准: 1) 合并其他病因所致脑梗死(如合并颅内大血管狭窄或闭塞); 2) 合并有非心源性栓子来源可能(如脂肪栓塞、空气栓塞、癌性栓塞等); 3) 房颤致脑栓塞家族史; 4) 排除患有严重心脏病、恶性肿瘤、精神疾患、意识障碍、血液病、自身免疫性疾病、甲状腺疾病及妊娠者。

所有研究对象具体分组如下: 病例组: 汉族脑栓塞组 50 例, 男 26 例, 女 24 例, 年龄 58-91(68.22±12.53)岁, 维吾尔族脑栓塞组 50 例, 男 23 例, 女 27 例, 年龄 26-85(60.74±14.50)岁; 对照组: 无血缘关系的新疆汉族对照 150 例, 男 76 例, 女 74 例, 年龄 15-84(40.23±9.23)岁, 维吾尔族对照 50 例, 男 20 例, 女 30 例, 年龄 17 至 81(45.60±15.50)岁, 均为新疆医科大学第六附属医院的非心源性脑栓塞患者, 排除房颤及其他严重威胁生命的重大疾病。两组研究对象均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 抽取所有研究对象的外周静脉血

每人 4 mL, 利用肝素抗凝, 保存于 -80 °C 冰箱, 经过离心之后, 统一提取白细胞中 DNA, 方法为常规酚 / 氯仿抽提法。紧接着对提取的 DNA 样本进行质量检查及浓度估计, 将 1 μL 样本置于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 然后根据紫外成像仪上成像的条带亮度估计的 DNA 浓度, 将完成质检及浓度估计的样本稀释到 5-10 ng/μL。

1.2.2 PCR 反应 使用 Primer 3 软件设计扩增目标基因的引物序列, 并由 GCG 软件完成 Blast, 确定引物序列具有高特异性后, 由上海艾吉析科技有限公司最终合成引物序列。引物序列 rs9923231-F: 5'-GCAGGGACATCTTTGGTG-3', rs9923231-R: 5'-AGTGGTTCTCGTGCCTCA-3'; rs2592551-F: CTTACCCCTGCTCTACCTC, rs2592551-R: GATAGTTCAATCTGGCTCTTG。共 25 μL PCR 扩增反应体系, 其中包括: 0.2 mmol/L dNTP、2.0 mmol/L Mg²⁺、1× HotStarTaqbuffer 各 0.2 μmol/L, 1 μL 模板 DNA 及 HotStarTaq 多聚酶 1 U。PCR 反应程序: 第一步: 预变性 15 min(94 °C); 第二步: 94 °C 反应 20 s, 68 °C 反应 60 s(每个循环递减 0.6 °C), 72 °C 下 1 min, 共 10 个循环; 第三步: 经过 94 °C 20 s, 55 °C 60 s, 72 °C 1 min, 共 26 个循环; 第四步 72 °C 下 2 min 结束。完成以上内容后对 PCR 产物进行纯化, 取 15 μL PCR 产物, 其中加入大肠杆菌核酸外切酶(Exonuclease I, Exo I) 2 U 和虾碱酶(Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) 5 U, 温浴 1 h (37 °C), 最后灭活 15 min(75 °C)。

1.2.3 SNaPshot 单碱基延伸反应 设计延伸引物, 引物序列为 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-TTTTGGGCTCAAACAAGGCCTGC-3'。(1)延伸反应体系(10 μL)包括 5 μL SNaPshot Multiplex Kit, 延伸引物混合物(延伸引物 0.4 μmol/L) 2 μL, 纯化后的 PCR 产物 2 μL, 1 μL 超纯水。(2)延伸循环程序如下: 94 °C 下 3 min; 48 循环× (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s); 72 °C 再延伸 6 min 结束。(3)产物纯化如下: 将 1 USAP 酶置于 10 μL 延伸产物中, 并 37 °C 下温浴 1 h, 最后 75 °C 灭活 15 min。

1.2.4 产物检测及 SNP 信息分析 取纯化后的延伸产物 0.5 μL, 与 0.5 μL Liz120 Size Standard、9 μL Hi-Di 混匀, 变性 5 min (95 °C) 后, 置于 ABI 3130XL 测序仪进行分析。用 GeneMapper5.0 (Applied Biosystems Co., Ltd., USA) 软件对 ABI 3130XL 测序仪上的原始数据进行 SNP 信息分析并得到样本的基因型。

1.2.5 测序 选取每种基因型中具有代表性的样本进行测序, 将测序结果在 SNP 数据库中进行比较分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。按 Hardy-Weinberg 平衡法检测样本的群体代表性。满足正态分布的定量资料用均数±标准差表示, 满足正态分布且方差齐的两组定量资料, 差异性用两独立样本 t 检验进行组间比较, 满足正态分布并方差不齐, 用 t' 检验进行组间比较, 对不满足正态分布的定量资料采用秩和检验, 三种及以上差异比较采用方差分析。计数资料用频数和百分比表示, 比较其差异性用卡方检验。等位基因频率=(2×纯合子+杂合子)/(2×受检人数)。用卡方检验比较组间等位基因和基因型频率的差异。取 P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑栓塞组与对照组的一般临床数据比较

汉族及维吾尔族脑栓塞组年龄、BMI 值、高血压病史等方面明显高于对照组($P<0.05$)。汉族及维吾尔族脑栓塞组与对照组

一般资料性别、吸烟、血脂等方面差异均无统计学意义($P>0.05$)，汉族脑栓塞组在冠心病及糖尿病病史方面明显高于对照组($P<0.05$)，而维吾尔族脑栓塞组与对照组在冠心病及糖尿病病史方面差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 1。

表 1 脑栓塞组与对照组的临床数据资料比较

Table 1 Comparison of the clinical data between cerebral embolism group and control group

	Han nationality			Uighur		
	Cerebral embolism group(n=50)	Control group (n=150)	<i>P</i>	Cerebral embolism group(n=50)	Control group (n=50)	<i>P</i>
Age/year	68.22± 12.53	40.23± 9.23	0.000	60.74± 14.50	45.60± 15.50	0.000
Gender: Male/ Female	26/24	76/74	0.870	23/27	20/30	0.545
Smoking/n(%)	4(8 %)	15(10 %)	0.676	10(20 %)	12(24 %)	0.629
BMI/kg/m ²	24.65± 2.09	21.15± 2.15	0.000	24.40± 2.51	22.56± 4.65	0.016
Diabetes/n(%)	14(28 %)	4(3 %)	0.000	12(24 %)	11(22 %)	0.812
Hypertension/n(%)	31(62 %)	17(11 %)	0.000	28(56 %)	15(30 %)	0.009
Coronary heart disease/n(%)	20(40 %)	2(1 %)	0.000	6(12 %)	10(20 %)	0.275
Systolic blood pressure/mmHg	134.78± 19.69	122.84± 13.93	0.000	133.04± 16.92	122.34± 13.28	0.001
Diastolic blood pressure/mmHg	77.80± 8.93	76.65± 9.45	0.441	79.10± 13.60	77.76± 8.97	0.562
TG/mmol/L	1.57± 0.81	1.64± 1.00	0.633	1.52± 0.83	1.70± 1.00	0.292
TC/mmol/L	4.12± 1.32	4.06± 1.17	0.762	4.12± 1.14	3.95± 1.79	0.571
LDL-C/mmol/L	2.64± 1.04	2.72± 1.02	0.627	2.74± 1.43	2.43± 1.10	0.315
HDL-C/mmol/L	1.31± 0.44	1.29± 0.43	0.829	1.41± 0.97	1.31± 0.53	0.496

2.2 汉族、维吾尔族脑栓塞组和对照组 VKORC1 基因 rs9923231 多态位点及 GGCX 基因 rs2592551 多态位点的基因型频率与等位基因频率比较

汉族和维吾尔族健康人群 VKORC1 基因 rs9923231、GGCX 基因 rs2592551 位点基因型及等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。维吾尔族脑栓塞组及对照组之间 VKORC1 基因 rs9923231 多态性位点基因型频率的分布比较，维吾尔族脑栓塞组 GG 基因型频率达 26%，明显高于对照组 GG 基因型频率 10%($P=0.037$)，汉族脑栓塞组及对照组之间 VKORC1 基因 rs9923231 多态性位点基因型频率的分布比较差异无统计学意义($P>0.05$)，汉族脑栓塞组及对照组 AA 基因型频率分别为 84%、84.7%，而未见 GG 基因型人群分布。GGCX 基因 rs2592551 多态位点在汉族、维吾尔族脑栓塞组和对照组的分布差异均无统计学意义($P>0.05$)，均以 CC 及 CT 基因型为主，其中 C 等位基因频率达 63%以上，见表 2。

2.3 不同种族及民族之间 VKORC1-1639G/A 基因多态性分布的比较

将国外研究报道的欧美人、非洲人及日本人群的 VKORC1 基因 rs9923231 多态位点和 GGCX 基因 rs2592551 多态位点研究与本实验研究进行比较分析，结果显示汉族 VKO-

RC1 基因 rs9923231 多态位点的基因型频率及等位基因频率分布与日本人群没有差异，而与维吾尔族、国外欧美人群及非洲人群 VKORC1 基因 rs9923231 位点基因多态性分布存在显著性差异($P<0.05$)，见表 3)，汉族及日本人群主要以 AA 基因型为主，AA 基因型频率达 80%以上，未见 GG 基因型分布，维吾尔族及欧美人群以 AG 基因型多见，而 AA 基因型频率所占比例不超过 46%，非洲人群则 GG 基因型频率占 89.6%。汉族 GGCX 基因 rs2592551 多态位点的基因型频率及等位基因频率分布与维吾尔族、非洲人及日本人群中没有差异，而与欧美人群 GGCX 基因 rs2592551 位点基因多态性分布存在统计学差异($P<0.05$)，见表 4)，汉族及维吾尔族均存在 CC、CT、TT 三种基因型频率，以 CC 及 CT 基因型分布为主，TT 基因型人群分布亦可达 12%以上，而欧美人群 TT 基因型分布则在 9%以下。

3 讨论

维生素 K 依赖性促凝(凝血因子 II、VII、IX 和 X)和抗凝血蛋白(蛋白 C 及其辅因子蛋白 S)被认为与动脉硬化和血栓形成有关，凝血因子 VII 和凝血酶原与富含甘油三酯的脂蛋白(TGRLP)，即乳糜微粒(CMs)相关。当 CM- 凝血酶原复合物为

表 2 汉族、维吾尔族脑栓塞组和对照组 VKORC1 基因 rs9923231 多态位点及 GGCX 基因 rs2592551 多态位点的基因型频率与等位基因频率比较

Table 2 Comparison of genotype frequency and allele frequency of VKORC1 gene rs9923231 polymorphism locus and GGCX gene rs2592551 polymorphism locus in Han and Uyghur cerebral embolism groups and control group

		Han nationality			Uighur		
		Cerebral embolism group(n=50)	Control group (n=150)	<i>P</i>	Cerebral embolism group(n=50)	Control group (n=50)	<i>P</i>
rs9923231	Genotype frequency						
	AA	42(0.840)	127(0.847)	0.910	25(0.500)	23(0.460)	0.037
	AG	8(0.160)	23(0.153)		12(0.240)	22(0.440)	
	GG	0(0.000)	0(0.000)		13(0.260)	5(0.100)	
	Allele frequency						
	A	92(0.920)	277(0.923)	0.914	62(0.620)	68(0.680)	0.374
rs2592551	G	8(0.080)	23(0.077)		38(0.380)	32(0.320)	
	Genotype frequency						
	CC	22(0.440)	67(0.450)	0.140	22(0.440)	19(0.380)	0.821
	CT	25(0.500)	58(0.389)		23(0.460)	25(0.500)	
	TT	3(0.060)	24(0.161)		5(0.100)	6(0.120)	
	Allele frequency						
	C	69(0.690)	192(0.644)	0.405	67(0.670)	63(0.630)	0.553
	T	31(0.310)	106(0.356)		33(0.330)	37(0.370)	

表 3 不同种族及民族之间 VKORC1 基因 rs9923231 多态位点分布的比较

Table 3 Comparison of polymorphic loci distribution of VKORC1 gene rs9923231 among different races and ethnic groups

Nationality	n	Rs9923231 locus genotype frequency/(%)			Rs9923231 locus allele frequency/n(%)	
		AA	AG	GG	A	G
African	661	0.004*	0.100*	0.896*	72(0.054)*	1250(0.946)*
American	347	0.173*	0.476*	0.351*	285(0.414)*	409(0.589)*
European	503	0.157*	0.461*	0.382*	390(0.388)*	616(0.612)*
Japanese	104	0.808	0.192	0.000	188(0.904)	20(0.096)
Uighur	50	0.460*	0.440*	0.100*	68(0.680)*	32(0.320)*
Han nationality	150	0.847	0.153	0.000	277(0.923)	23(0.077)*

Note: *Indicates that the healthy Han population in Xinjiang is compared with other people $P < 0.05$.

表 4 不同种族及民族之间 GGCX 基因 rs2592551 多态位点分布的比较

Table 4 Comparison of polymorphic loci distribution of GGCX gene rs2592551 among different races and ethnic groups

Nationality	n	Rs2592551 locus genotype frequency/n			Rs2592551 locus allele frequency/n(%)	
		CC	CT	TT	C	T
African	661	0.365	0.490	0.145	806(0.610)	516(0.390)
American	347	0.608*	0.340*	0.052*	540(0.778)*	154(0.222)*
European	503	0.467*	0.443*	0.090*	693(0.689)	313(0.311)
Japanese	104	0.413	0.490	0.097	137(0.659)	71(0.341)
Uighur	50	0.380	0.500	0.120	63(0.630)	37(0.370)
Han nationality	150	0.447	0.393	0.160	193(0.643)	107(0.357)

Note: *Indicates that the healthy Han population in Xinjiang is compared with other people $P < 0.05$.

血红蛋白时,这种关联增强了血小板因子 Xa 介导的凝血酶原激活,从而进一步增加血栓形成的风险^[12,13]。生成维生素 K 依赖性凝血因子的限速酶是维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1(VKORC1),通过催化体内维生素 K 还原反应,使维生素 K 依赖性蛋白(VKDP)羧化为 γ -羧基谷氨酸,含有 γ -谷氨酸残基的凝血因子前体进一步被持续羧化为有活性的凝血因子,其中由 γ -谷氨酰羧化酶(GGCX)进行的 γ -羧化是激活维生素 K 依赖性蛋白(VKDP)必需的酶促过程^[14]。VKORC1 及 GGCX 基因突变会影响维生素 K 的还原及维生素 K 依赖蛋白的正常羧化,从而导致凝血异常^[15,16]。

VKORC1 是位于 16 号染色体上的维生素 K 环氧化物还原酶复合体的第一个亚基,含有 3 个外显子,编码 163 个氨基酸序列^[17,18]。VKORC1 基因的变异会导致 VKORC1 酶的活性降低,进而使维生素 K 依赖性凝血因子的功能降低^[19,21]。GGCX 基因位于染色体 2p12 上,跨越 13-kb 基因组区域,由 15 个外显子组成,编码 758 个氨基酸序列^[22]。GGCX 可以催化凝血因子 II、VII、IX、X 的 γ -羧化作用,它的作用依赖于维生素 K 和 O_2 ,当存在维生素 K 和 O_2 时,GGCX 特异性地将 CO_2 掺入谷氨酸残基中,产生 γ -羧化谷氨酸同时还生产维生素 K 2,3-环氧化物。含有维生素 K 依赖性凝血因子 II、VII、IX、X、蛋白质 C 和蛋白质 S 的谷氨酸残基通过 GGCX 羧化以获得活性。然后发生一系列的级联反应导致血液凝固^[23-25]。而 GGCX 基因突变将对凝血因子及蛋白羧化产生影响,破坏凝血过程^[14,19]。有报道非瓣膜性房颤患者多有多种凝血系统功能紊乱造成的凝血异常,这些紊乱可增加发生脑栓塞的风险^[26]。Sychev 等^[27]人也得出相同结论。

既往众多研究证实 VKORC1 基因多态性在不同人种的健康人群中分布存在显著差异^[28-30]。中国地域辽阔,目前有 56 个不同的民族,不同民族间生活方式、饮食习惯各具特色,为了解其在遗传方面的差异性,本研究针对新疆维吾尔族及汉族人群展开研究。研究发现维吾尔族心源性脑栓塞患者与健康对照人群相比,VKORC1 基因 rs9923231 多态位点中携带 GG 型基因频率人群(26%)明显高于健康对照组(10%),分布存在统计学差异($P < 0.05$),推测 1639G>A 等位基因可能是维吾尔族人群中心源性脑栓塞的遗传风险因子,Dubovyk 等^[10]人在乌克兰人群中的研究数据中也得出了同样的结论,近期有报道表明乌克兰人群中缺血性脑卒中患者 TT 型基因频率高于 C 等位基因^[31]。而这种差异在新疆汉族人群中并不明显,汉族心源性脑栓塞组及对照组均以 AA 型等位基因为主,分布无统计学差异($P > 0.05$),且未见 GG 型基因分布人群。而在 GGCX 基因 rs2592551 位点多态性分布中,维吾尔族及汉族脑栓塞患者与健康对照人群中可见 CC、CT、TT 三种基因型分布,且三种基因型频率分布在不同民族的脑栓塞组及对照组中均未见统计学差异($P > 0.05$)。故猜测 GGCX 基因 rs2592551 位点多态性可能与维吾尔族及汉族房颤患者脑栓塞的发病无关。

为了比较 VKORC1 基因 rs9923231 多态位点和 GGCX 基因 rs2592551 多态位点在不同种族、不同民族间的分布情况,通过查询 <http://asia.ensembl.org/> 中 dbSNP 数据库发现新疆汉族 VKORC1 基因 rs9923231 多态位点的基因型频率及等位基因频率分布与日本人没有差异,而与维吾尔族、国外欧美人群

及非洲人群分布存在显著性差异,汉族及日本人以 AA 基因型分布为主,均未见 GG 基因型分布^[32]。维吾尔族及欧美人群以 AG 基因型多见,GG 基因型频率达 10%以上,而非洲人群 GG 基因型频率所占比例更高达 89.6%。Yuan 等^[28]人的实验证明,相比较于 A 等位基因,rs9923231 位点的 G 等位基因将 VKORC1 的启动子活性提升了 44%,使 VKORC1 的 mRNA 和蛋白量表达增加,增强凝血因子羧化能力,从而导致房颤患者血栓形成的风险更大。亚洲人群 VKORC1 基因 rs9923231 多态性位点分布主要以 AA 基因型为主,而维吾尔族及欧美、非洲人群则主要以 AG 型及 GG 型分布为主,其房颤患者更易导致脑栓塞的发生。在 GGCX 基因 rs2592551 多态性位点的基因型频率及等位基因频率人群分布中,汉族与维吾尔族、非洲人和日本人相比并无差异,而与欧美人群 GGCX 基因 rs2592551 位点基因多态性分布存在统计学差异,欧美人群以 CC 基因型分布为主,TT 基因型分布人群较少^[33],尤其在美国人群中该分布差异最为明显,而维吾尔族、汉族及日本、非洲人群 TT 基因型分布频率则达 9.6%以上。以上结果说明 VKORC1 基因 rs9923231 及 GGCX 基因 rs2592551 多态性位点基因型分布频率在亚洲、非洲及欧美人群中分布均存在差异。

综上所述,本研究结果表明 VKORC1 基因 rs9923231 与维吾尔族房颤患者脑栓塞的发病有关,而与汉族人群无关;GGCX 基因 rs2592551 与维吾尔族及汉族房颤患者脑栓塞的发病均无关。此外,VKORC1 基因 rs9923231 位点及 GGCX 基因 rs2592551 位点多态性在不同种族、不同民族健康人群中分布存在差异。

参考文献(References)

- [1] Randolph SA. Ischemic Stroke[J]. Workplace Health Saf, 2016, 64(9): 444
- [2] Harris S, Sungkar S, Rasyid A, et al. TOAST Subtypes of Ischemic Stroke and Its Risk Factors: A Hospital-Based Study at Cipto Mangunkusumo Hospital, Indonesia[J]. Stroke Res Treat, 2018, 2018: 1-6
- [3] Hong KS, Lee J, Bae HJ, et al. Greater stroke severity predominates over all other factors for the worse outcome of cardioembolic stroke [J]. Stroke Cerebrovasc Dis, 2013, 22(8): 373-380
- [4] 张浩然,张媛.心源性脑栓塞的病因及预防研究进展[J].心血管病学进展, 2017, 38(06): 644-647
- [5] Yamanouchi H, Tomonaga M, Shimada H, et al. Nonvalvular atrial fibrillation as a cause of fatal massive cerebral infarction in the elderly [J]. Stroke, 1989, 20(12): 1653-1656
- [6] Amin A, Keshishian A, Vo L, et al. Real-world comparison of all-cause hospitalizations, hospitalizations due to stroke and major bleeding, and costs for non-valvular atrial fibrillation patients prescribed oral anticoagulants in a US health plan[J]. J Med Econ, 2018, 21(3): 244-253
- [7] Dalen JE, Alpert JS. Silent Atrial Fibrillation and Cryptogenic Strokes [J]. Am J Med, 2017, 130(3): 264-267
- [8] Cope S, Clemens A, Hammes F, et al. Critical appraisal of network meta-analyses evaluating the efficacy and safety of new oral anticoagulants in atrial fibrillation stroke prevention trials [J]. Value Health, 2015, 18: 234-249
- [9] 蒋年新,居海宁,江冰,等. CYP2C9、CYP4F2、GGCX 和 VKORC1

- 基因多态性对房颤患者华法林使用剂量的影响[J].中国医院药学杂志, 2016, 36(7): 574-577
- [10] Dubovyk YI, Harbuzova VY, Ataman AV. G-1639A but Not C1173T VKORC1 Gene Polymorphism Is Related to Ischemic Stroke and Its Various Risk Factors in Ukrainian Population [J]. BioMed Research International, 2016, 2016: 1-10
- [11] Elkhazraji A, Bouaiti EA, Boulahyaoui H, et al. Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, and GGCX gene variants and patient characteristics on acenocoumarol maintenance dose: Proposal for a dosing algorithm for Moroccan patients[J]. Drug Discov Ther, 2018, 12(2): 68-76
- [12] Xu N, Dahlbäck B, Ohlin A K, et al. Association of vitamin K-dependent coagulation proteins and C4b binding protein with triglyceride-rich lipoproteins of human plasma[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(18): 33-39
- [13] Ooi QX, Wright DFB, Tait RC, et al. A Joint Model for Vitamin K-Dependent Clotting Factors and Anticoagulation Proteins [J]. Clin Pharmacokinet, 2017, 56(12): 1555-1566
- [14] Jin DY, Vermeer C, Stafford DW, et al. Splice-Site Mutation of Exon 3 Deletion in the Gamma-Glutamyl Carboxylase Gene Causes Inactivation of the Enzyme [J]. J Invest Dermatol, 2016, 136 (11): 2314-2317
- [15] 陈懿建, 张立群, 万通, 等. 92例获得性维生素K依赖性凝血因子缺乏症临床研究[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(3): 236-237
- [16] Spronk H MH, Farah RA, Buchanan GR, et al. Novel mutation in the gamma-glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors[J]. Blood, 2000, 96(10): 3650-3652
- [17] Fung E, Patsopoulos N, Belknap S, et al. Effect of Genetic Variants, Especially CYP2C9 and VKORC1, on the Pharmacology of Warfarin [J]. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2012, 38(08): 893-904
- [18] Turgut Cosan D, Yazıcı HU, Colak E, et al. Susceptiveness of Vitamin K epoxide Reductase Complex Subunit 1 Gene Polymorphism in Essential Hypertension [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2017, 21(5): 292-297
- [19] Jin DY, Ingram BO, Stafford DW, et al. Molecular basis of the first reported clinical case of congenital combined deficiency of coagulation factors[J]. Blood, 2017, 130(7): 948-951
- [20] Boitet M, Hamed A, Chatron N, et al. Elevated difenacoum metabolism is involved in the difenacoum-resistant phenotype observed in Berkshire rats homozygous for the L120Q mutation in the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (Vkorc1) gene[J]. Pest Manag Sci, 2018, 74(6): 1328-1334
- [21] Tang XY, Zhang J, Peng J, et al. The association between GGCX, miR-133 genetic polymorphisms and warfarin stable dosage in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement[J]. Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics, 2017, 42(4): 438-445
- [22] Kuo WL, Stafford DW, Cruces J, et al. Chromosomal localization of the gamma-glutamyl carboxylase gene at 2p12 [J]. Genomics, 1995, 25(3): 746-748
- [23] Kamali X, Wulasihan M, Yang YC, et al. Association of GGCX gene polymorphism with warfarin dose in atrial fibrillation population in Xinjiang[J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12(1): 149
- [24] Watzka M, Geisen C, Scheer M, et al. Bleeding and non-bleeding phenotypes in patients with GGCX gene mutations [J]. Thromb Res, 2014, 134(4): 856-865
- [25] 马建赢, 李金, 唐燕华. 华法林使用剂量影响因素及临床应用研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(18): 4633-4638
- [26] 黄达军. 高龄非瓣膜病性房颤应用华法林抗凝治疗的疗效及安全性研究[J]. 中国实用医药, 2016, 11(29): 154-155
- [27] Sychev DA, Rozhkov AV, Kazakov RE, et al. The impact of CYP4F2, ABCB1, and GGCX polymorphisms on bleeding episodes associated with acenocoumarol in Russian patients with atrial fibrillation[J]. Drug Metab Pers Ther, 2016, 31(3): 173-178
- [28] Yuan H. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity[J]. Human Molecular Genetics, 2005, 14(13): 1745-1751
- [29] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen[J]. Blood, 2005, 106(7): 2329-2333
- [30] Jiang HH, Liu J, Wang YC, et al. The Impact of Gene Polymorphisms on Anticoagulation Control With Warfarin [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2018, 24(4): 640-646
- [31] Dubovyk YI, Harbuzova VY, Obukhova OA, et al. ANALYSIS OF γ -GLUTAMYL CARBOXYLASE GENE rs2592551 POLYMORPHISM ASSOCIATION WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE[J]. Fiziol Zh, 2017, 63(1): 33-42
- [32] Cha PC, Mushiroda T, Takahashi A, et al. Genome-wide association study identifies genetic determinants of warfarin responsiveness for Japanese[J]. Human Molecular Genetics, 2010, 19(23): 4735-4744
- [33] Elkhazraji A, Bouaiti EA, Boulahyaoui H, et al. Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, and GGCX gene variants and patient characteristics on acenocoumarol maintenance dose: Proposal for a dosing algorithm for Moroccan patients[J]. Drug Discov Ther, 2018, 12(2): 68-76