

p47<sup>phox</sup> 基因第 6 外显子多态性与长沙市汉族人群脑出血的关联研究黄晓松<sup>1</sup>, 杨期东<sup>2</sup>, 刘运海<sup>2</sup>, 谭李红<sup>1</sup>, 杨松林<sup>1</sup>, 汤清平<sup>1</sup>, 王艳<sup>1</sup>

1. 湖南省脑科医院神经内科, 湖南省长沙市 410007

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

**摘要:**目的 探讨 p47<sup>phox</sup> 基因第 6 外显子 A566G (Asn166Asp) 多态性与湖南省长沙市汉族人群脑出血的关系。方法 采用 PCR-单链构象多态技术和 DNA 直接测序法检测湖南省长沙市汉族人群 110 例脑出血患者、10 个脑出血家系成员 110 例和 100 名健康对照者的 p47<sup>phox</sup> 基因第 6 外显子 A566G 多态性, 同时检测血脂水平。结果 脑出血组及脑出血家系组 A566G (Asn166Asp) 多态基因频率分布与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。脑出血家系组中患病组和未患病组及脑出血组的 A566G 多态分布与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。脑出血组中各基因型血脂水平与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 湖南省长沙市汉族人群 p47<sup>phox</sup> 基因 A566G 多态性可能与脑出血的易患性无关。

**关键词:** 脑出血; p47<sup>phox</sup>; 第 6 外显子; 基因多态性; 血脂

Relationship of A566G polymorphism in the exon 6 of p47<sup>phox</sup> gene with cerebral hemorrhage in Han people in Changsha

HUANG Xiao-Song, YANG Qi-Dong, LIU Yun-Hai, TAN Li-Hong, YANG Song-Lin, TANG Qing-Ping, WANG Yan. Department of Neurology, Hunan Brain Hospital, Changsha 410008, China

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between A566G (Asn166Asp) polymorphism in the exon 6 of p47<sup>phox</sup> gene and cerebral hemorrhage in the Han people in Changsha of Hunan Province. **Methods** A566G (Asn166Asp) polymorphism in p47<sup>phox</sup> gene was determined by PCR-single strand conformation polymorphism analysis and DNA sequencing in 100 healthy controls, 110 patients with cerebral hemorrhage and 10 cerebral hemorrhage pedigrees from Han population in Changsha of Hunan Province. Plasma lipid levels were measured by routine methods. **Results** No statistically significant differences were found in the frequencies of genotypes and alleles of A566G (Asn166Asp) polymorphism between the cerebral hemorrhage patients and the controls and between cerebral hemorrhage pedigrees and the controls. There were no statistically significant differences in the plasma lipid levels between the cerebral hemorrhage patients and the controls ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** There seems no correlation between A566G (Asn166Asp) polymorphism and cerebral hemorrhage in Han people in Changsha of Hunan Province.

**Key words:** cerebral hemorrhage; p47<sup>phox</sup>; exon 6; gene polymorphism; plasma lipid

湖南省长沙市社区人群脑出血连续 15 年中平均发病率达 128.5/10 万, 为世界脑出血的高发区<sup>[1]</sup>。目前流行病学研究表明, 遗传基因在脑卒中发病中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>。p47<sup>phox</sup> (嗜中性粒细胞质因子 1) 在活性氧的产生过程中发挥了重要作用, 与动脉粥样硬化的形成和高血压等血管性疾病

密切相关。目前研究表明, p47<sup>phox</sup> 基因编码区第 6 外显子的 A566G (Asn166Asp) 多态性与活性氧的产生密切相关。目前对该多态位点与脑出血关系的研究国内外尚未见报道。本研究探讨 p47<sup>phox</sup> 基因第 6 外显子 A566G (Asn166Asp) 多态性与长沙市汉族人群脑出血的相关性。

**基金项目:** 湖南省卫生厅科研计划项目 (B2008-046)

**收稿日期:** 2011-02-28; **修回日期:** 2011-06-01

**作者简介:** 黄晓松 (1971-), 男, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事脑血管病和脑血管介入方面研究。

**通讯作者:** 杨期东, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事脑血管病的研究。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

1.1.1 脑出血组 (cerebral hemorrhage, CH) 无血缘关系的脑出血患者 110 例, 祖籍均为中国湖南省长沙市, 均为汉族, 为中南大学湘雅医院和湖南省脑科医院神经内科 2006 年 1 月至 2008 年 12 月住院和门诊病人。所有病例均符合 1995 年全国第四次脑血管病学术会议修订的诊断标准<sup>[3]</sup>, 经头颅 CT 或 MRI 确诊。不包括心源性、动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤等引起的脑出血; 排除患有严重肝肾疾病、甲状腺疾病、血液病和最近 3 个月服用雌激素患者, 近 2 周均未服用降血脂药和抗凝药。共 110 例, 男 59 例, 女 51 例, 最大年龄 82 岁, 最小年龄 28 岁, 平均年龄  $(58.13 \pm 14.22)$  岁。有高血压的脑出血组 (HBP + CH) 及无高血压的脑出血组 (非 HBP + CH) 分别为 79 例和 31 例; 有糖尿病的脑出血组 (DM + CH) 及无糖尿病的脑出血组 (非 DM + CH) 分别为 9 例和 101 例。

1.1.2 脑出血家系组 脑出血家系定义为先证者一级亲属中至少有 1 人为脑出血患者。共收集以脑出血为主的家族聚集现象的家系 10 个, 家系分布在中国湖南省长沙市, 先证者为中南大学湘雅医院和湖南省脑科医院神经内科同期住院和门诊病人, 10 个以脑出血为主的家系共包括成员 110 例, 祖籍均为中国湖南省长沙市, 均为汉族, 男 60 例, 女 50 例, 最大年龄 79 岁, 最小年龄 16 岁, 平均年龄  $(56.1 \pm 13.2)$  岁, 其中患病者 74 例, 未患病者 36 例。

1.1.3 正常对照组 无血缘关系的正常健康人共 100 例, 祖籍均为中国湖南省长沙市, 均为汉族, 其中男 54 例, 女 46 例, 最大年龄 75 岁, 最小年龄 18 岁, 平均年龄  $(57.31 \pm 13.33)$  岁, 为中南大学湘雅医院和湖南省脑科医院健康体检人员, 病史询问无脑卒中家族史, 无肝、肾、血液病、自身免疫性疾病和甲状腺病史。

### 1.2 方法

1.2.1 人基因组 DNA 样品的制备 抽取研究对象外周静脉血 4 ml, 肝素抗凝, 用常规酚/氯仿抽提法提取 DNA, 并在 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 p47<sup>phox</sup> 基因型检测 扩增 p47<sup>phox</sup> 基因第 6 外显子的引物经 Primer Premier 5 软件设计, 并进行同源性分析 (BLAST) 确定其特异性高, 然后由上海

英骏公司合成, 引物序列为: 上游: S-5' CACTCAC-CCTGCCCTCCCTCTT3'; 下游: A-5' ACGGTCCCAT-ACCCATCC3', 扩增片段: 402 bp。反应在 PE4800 型 PCR 仪 (美国 PE 公司) 上进行, 反应条件为: 预变性: 94℃ 5 min; 循环程序: 93℃ 变性 40 s → 复性温度 67℃ 复性 30 s → 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 循环结束后, 将反应管在 72℃ 充分延伸 10 min; 反应管冷却至 4℃。

单链构象多态 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 分析: 取 4 μl PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测产物, 如特异性好, 则将 PCR 产物加等量 2x 变性载样液, 混合后 99℃ 变性 10 min, 然后立即置冰上 5 min, 取 8 μl 上样于含 5% 甘油的 8% 49: 1 的中性聚丙烯酰胺凝胶中, 180 V 电压 4℃ 电泳 10 h, 电泳结束后采用银染法染色并拍照。选取中性聚丙烯酰胺凝胶电泳中有异常泳带的阳性样本进行正反向测序。测序结果在 Genbank 和 SNP 数据库中进行比较分析。

### 1.3 统计学分析

所有资料在 Dbase 软件中建立数据库, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。等位基因频率 =  $(2 \times \text{纯合子} + \text{杂合子}) / (2 \times \text{受检人数})$ , 基因型频率和等位基因频率的差异用  $\chi^2$  检验或有关校正方法。按 Hardy-Weinberg 平衡法检验样本的群体代表性。组间血脂比较用 t 检验, 不同基因型亚组间血脂比较采用 ANOVA 方差分析及 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑出血组和对照组的临床特点

脑出血 (CH) 组和脑出血家系组中有高血压病史、糖尿病病史及冠心病史者高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 脑出血 (CH) 组和脑出血家系组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 3 组在年龄、性别构成、体重指数、吸烟及饮酒史上差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

### 2.2 p47<sup>phox</sup> 基因第 6 外显子 A566G (Asn166Asp) 多态性分析

PCR-SSCP 分析显示, p47<sup>phox</sup> 基因第 6 外显子有 3 种不同的电泳图谱, 经测序后证实为 A566G (Asn166Asp), 分别为 AA (Asn/Asn)、AG (Asn/Asp)、GG (Asp/Asp) 3 种基因型, 见图 1、图 2、图 3。

表 1 脑出血组、脑出血家系组和对照组临床资料比较 % (n)

	例数	年龄(岁)	性别(男/女)	体重指数	吸烟人数	饮酒人数	高血压病史	糖尿病病史	冠心病史
脑出血组	110	58.1 ± 14.2	59/51	24.3 ± 2.6	9.1(10)	7.3(8)	71.8(79) <sup>△</sup>	8.2(9) <sup>△</sup>	17.3(19) <sup>△</sup>
脑出血家系组	110	56.1 ± 13.2	60/50	23.3 ± 2.5	8.2(9)	8.2(9)	71.8(79) <sup>△</sup>	8.2(9) <sup>△</sup>	17.3(19) <sup>△</sup>
对照组	100	57.3 ± 13.3	54/46	23.8 ± 2.3	7.0(7)	6.0(6)	4.0(4)	2.0(2)	3.0(3)

注:△为与对照组相比, $P < 0.01$ 。

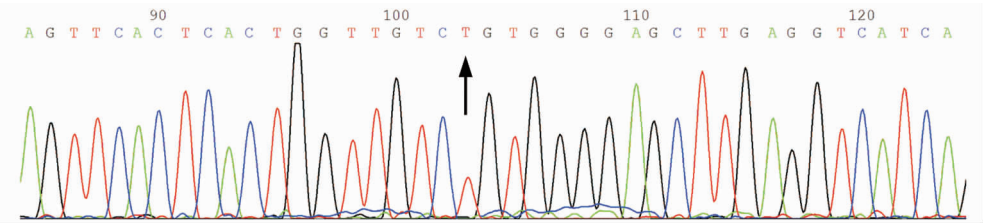


图 1 A566G(Asn166Asp)AA 基因型反向测序图(箭头所指)。

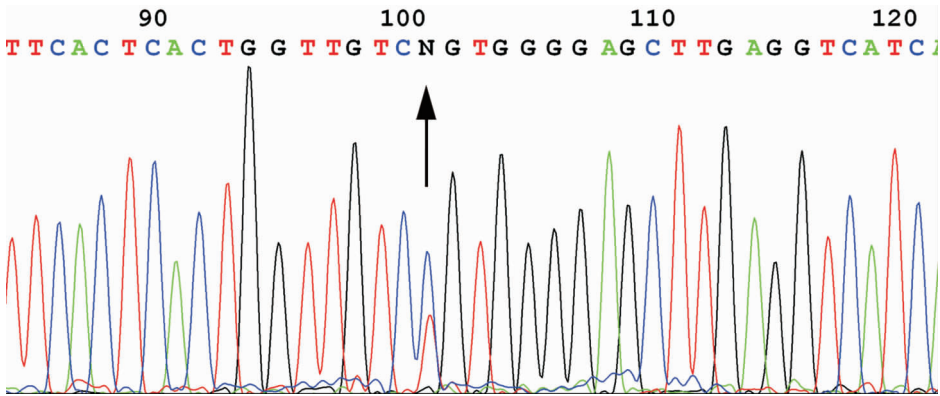


图 2 A566G(Asn166Asp)AG 基因型反向测序图(箭头所指)。

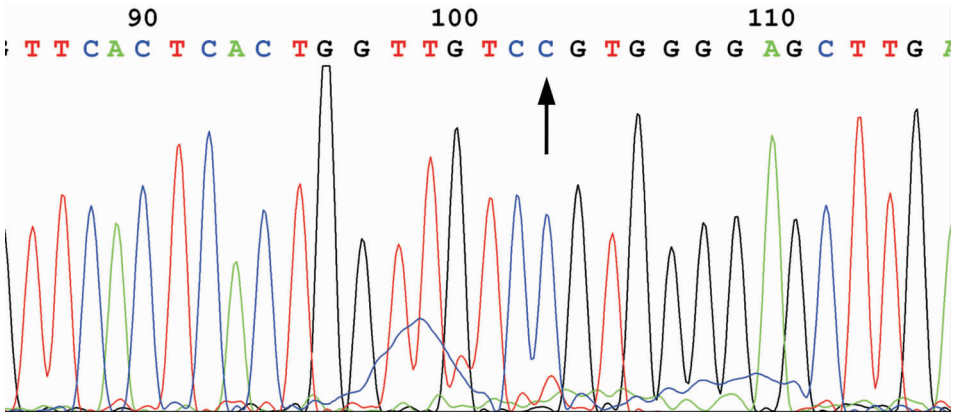


图 3 A566G(Asn166Asp)GG 基因型反向测序图(箭头所指)。

2.3 湖南省长沙市汉族人群的 p47<sup>phox</sup> 基因 A566G (Asn166Asp) 多态分布

脑出血组及对照组基因型及等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡检验 ( $P > 0.05$ ) ; 脑出血组及不同亚型组与对照组 A566G

(Asn166Asp) 多态基因频率分布比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) , 见表 2 ; 脑出血家系组中患病组和未患病组及脑出血组的 A566G 多态分布与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) , 见表 2 。

表 2 各组 p47<sup>phox</sup> 基因 6 号外显子 A566G( Asn166Asp) 多态分布

组别	例数	基因型[例(%) ]		等位基因频率	
		CC	CT + TT	C	T
脑出血组	110	100(90.9)	8 + 2(9.1)	0.946	0.054
HBP + CH 组	79	72(91.1)	7(8.9)	0.949	0.051
非 HBP + CH 组	31	28(90.3)	3(9.7)	0.952	0.048
DM + CH 组	9	8(88.9)	1(11.1)	0.944	0.056
非 DM + CH 组	101	91(91.1)	10(8.9)	0.950	0.050
脑出血家系组	110	100(90.9)	8 + 2(9.1)	0.946	0.054
患病组	74	69(93.2)	2 + 3(6.8)	0.946	0.054
未患病组	36	33 (91.7)	2 + 1(13.9)	0.944	0.056
对照组	100	91(91.0)	7 + 2(9.0)	0.945	0.055

2.4 p47<sup>phox</sup> 基因 A566G ( Asn166Asp) 多态性对

脑出血组和对照组两组的血脂、脂蛋白水平差

血脂、脂蛋白水平的影响

异无统计学意义( *P* > 0.05 ), 见表 3。

表 3 p47<sup>phox</sup> 基因 6 号外显子 A566G( Asn166Asp) 多态不同等位基因对血脂和脂蛋白水平的影响

组别	基因型 (例数)	TC	TG	HDL-C	LDL-C	ApoAI	apoB100	LP( a)
		(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
脑出血组	110	4.48 ± 1.03	1.58 ± 0.76	1.14 ± 0.35	2.53 ± 0.92	1.07 ± 0.21	0.99 ± 0.35	0.26 ± 0.27
	AA(93)	4.38 ± 0.91	1.55 ± 0.85	1.18 ± 0.33	2.43 ± 0.78	1.02 ± 0.35	0.97 ± 0.31	0.23 ± 0.16
	AG 或 GG(17)	4.55 ± 0.83	1.64 ± 0.69	1.07 ± 0.47	2.57 ± 0.85	1.11 ± 0.34	1.10 ± 0.42	0.31 ± 0.18
对照组	100	4.30 ± 0.85	1.30 ± 0.63	1.23 ± 0.32	2.26 ± 0.73	0.99 ± 0.28	0.97 ± 0.21	0.21 ± 0.13
	AA(88)	4.29 ± 0.95	1.29 ± 0.61	1.26 ± 0.37	2.29 ± 0.76	0.93 ± 0.33	0.94 ± 0.37	0.19 ± 0.10
	AG 或 GG(12)	4.33 ± 0.89	1.34 ± 0.46	1.20 ± 0.49	2.20 ± 0.58	1.01 ± 0.25	1.05 ± 0.45	0.23 ± 0.12

3 讨论

p47<sup>phox</sup> 是 Lomax 等于 1989 年克隆,是 NAD( P) H 氧化酶系统的一个主要成份,位于 7q11.23,含有 11 个外显子,其功能区由 5 个功能域组成,其翻译产物是一个长度为 399 个氨基酸的片段<sup>[4, 5]</sup>。目前研究表明,在活性氧( reactive oxygen species, ROS)的产生过程中,p47<sup>phox</sup> 发挥了始动功能<sup>[6]</sup>,而 ROS 与动脉粥样硬化的形成和高血压等血管性疾病密切相关,是血管性疾病的危险因素<sup>[7, 8]</sup>。可见,p47<sup>phox</sup> 与高血压病、动脉粥样硬化形成和缺血性卒中等血管性疾病和糖尿病密切相关。若编码 NAD( P) H 氧化酶亚单位的基因多态性或基因突变使 ROS 生成增加,就可通过直接氧化作用和间接作为第二信使参与信号转导加速动脉粥样硬化形成、高血压病和糖尿病的发生与发展,从而使其对脑卒中的易感性增加。p47<sup>phox</sup> 在 ROS 产生过程中的功能与 PX 区和两个 SH-3 区密切相关,而第 6 号外显子是编码 PX 区和两个 SH-3 区的外显子, A566G( Asn166Asp, 天冬酰胺 166 天冬氨酸)多态是第 6 号外显子的一个多态位点。Yuzawa 等<sup>[9]</sup> 研究发现 566A 位点位于 p47<sup>phox</sup> 富含脯氨酸的 N-SH3 结构域,是与 p22<sup>phox</sup> 在胞质尾区的 C-末端有一个富含脯氨酸的 SH3 结构域与细胞色素 b<sub>558</sub> 结合部位。Groemping 等<sup>[10]</sup> 研究发现, p47<sup>phox</sup> 的 156-340 氨基酸位点和 p47<sup>phox</sup> 生理功能密切相关,而 N-SH3 结构域位于该区域。我们研究结果表明,在中国湖南省长沙市汉族人群 NCF1 基因 A566G ( Asn166Asp) 多态位点有 AA、AG、GG 三种基因型, A 等位基因频率为 0.930, G 等位基因频率为 0.070。目前,此多态位点在不同人种的分布情况国内外尚未见报道。脑出血组、脑出血家系组和正常对照人群 A566G 多态的基因型和等位基因频率分布无显著性差异。将脑出血组根据脑出血亚型进行分类后再比较,也未发现某种类型的脑出血组与对照组有明显差别。在脑出血家系组中,患病组和未患病组与对照组相比较,差异无统计学意义。脑出血家系组与脑出血组相比较,差异无统计学意义。以上结果提示 p47<sup>phox</sup> 基因 A566G 多态可能与脑出血易患性无关。

近年来的研究表明血管壁的活性氧能引起低密度脂蛋白( LDL) 的氧化修饰,产生氧化型低密度脂蛋白( ox-LDL), ox-LDL 能导致泡沫细胞的形成

和发展,并能促进胆固醇在细胞内的聚集,引起动脉粥样硬化<sup>[11]</sup>;过量的活性氧在脂质过氧化过程中产生的  $H_2O_2$  可直接损伤内皮细胞,增加中性粒细胞的黏附性或促进损伤过程。可见,活性氧是血脂血症和动脉粥样硬化发生发展的主要诱因之一<sup>[12]</sup>。血管壁的活性氧的主要来源是 NAD(P)H 氧化酶系统,因此,NAD(P)H 氧化酶 p47<sup>phox</sup> 与血脂血症和动脉粥样硬化发生发展密切相关。我们分析长沙市汉族人群 p47<sup>phox</sup> 基因 A566G (Asn166Asp) 多态位点不同基因型对血脂、脂蛋白水平的影响,发现脑出血组和对照组差异无统计学差异,以上结果提示长沙市汉族人群 p47<sup>phox</sup> NCF1 基因 A566G (Asn166Asp) 多态可能与血脂代谢无关。

我们认为上述结果可能机制是 p47<sup>phox</sup> 基因第 6 号外显子第 566 位点密码子突变(A→G),发生非同义突变,导致相应的 166 位氨基酸由天冬酰胺置换为天冬氨酸,而 Asn 是位于与 p22<sup>phox</sup>-C 末端 SH3 结构相结合的 NCF1 富含脯氨酸的 N-SH3 结构域,导致 p47<sup>phox</sup> 富含脯氨酸的 N-SH3 结构域改变,可能引起脑出血患者 p47<sup>phox</sup> 分子结构改变,但对 NAD(P)H 氧化酶活性氧的产生功能可能无影响。综上所述,长沙市汉族人群 p47<sup>phox</sup> 基因 A566G 多态可能与脑出血及血脂代谢易患性无关。这也许可能与我们研究的种群、方法和研究的样本量不够大等有关,尚需进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 杨期东,周艳宏,刘运海,等. 长沙社区人群脑卒中患者发病的监测研究. 中华医学杂志, 2003, 83(4): 302-305.
- [2] Catto AJ. Genetic aspect of the hemostatic system in Cerebrovascular disease. *Neurology*, 2001, 57(5): 24-30.
- [3] 王新德. 各类脑血管病诊断要点. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-380.
- [4] Hidekazu H, Tetsuro A, Takashi I, et al. Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(6): 526-530.
- [5] Brunson T, Wang Q, Chambers I, et al. A copy number variation in human NCF1 and its pseudogenes. *BMC Genet*, 2010, 23(2): 11-13.
- [6] Ralf P, Francis J, Stefani B, et al. The vascular NADPH oxidase subunit NCF1 is involved in redox-mediated gene expression. *Free Radical Bio Med*, 2002, 32(11): 1116-1122.
- [7] Cifuentes ME, Pagano PJ. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(2): 179-186.
- [8] 王志平,孙红斌. 氧自由基与缺血性卒中. 西南军医, 2010, 12(5): 534-537.
- [9] Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, et al. A molecular mechanism for auto inhibition of the tandem SH3 domains of p47<sup>phox</sup>, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells*, 2004, 9(5): 443-456.
- [10] Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, et al. Molecular basis of phosphorylation induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*, 2003, 113(3): 343-355.
- [11] Niemiec P, Zak I. Vascular NAD(P)H oxidases-role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Postepy Biochem*, 2005, 51(1): 1-11.
- [12] HUANG XS, YANG QD, GUO TS, et al. The relation of between the exon 10 of the p47<sup>phox</sup> polymorphism and stroke and the effect of the polymorphism on plasma lipid. *Chin J Med Genet*, 2007, 24(5): 524-528.