

CCR2b 基因 190G/A 多态性与脑出血的相关性研究

杨敏慧¹, 许宏伟², 刘秋庭¹, 向光红¹, 涂鄂文¹

1. 湖南省第二人民医院神经内科 22 病室, 湖南省长沙市 410005

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘 要:目的 探讨趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 多态性与中国湖南地区汉族人群脑出血 (ICH) 的关系。方法 应用聚合酶链反应 (PCR) 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 技术检测 158 例脑出血患者和 150 名年龄、性别相匹配的正常对照者趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 的基因型分布及等位基因频率, 比较不同群体的表型差异及其对脑出血的影响。结果 中国湖南汉族人群存在趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 多态性, 趋化因子受体 CCR2b 190G/A 基因型分布为 AA 3.6%, GA 22.1% 和 GG 74.3%, 等位基因 A 和 G 频率分别 0.146 和 0.854。在对照组中, 趋化因子受体 CCR2b 190G/A 基因型分布为 AA 5.3%, GA 28.0% 和 GG 66.7%, 等位基因 A 和 G 频率分别 0.193 和 0.807。在脑出血组中, 趋化因子受体 CCR2b 190G/A 基因型分布为 AA 1.9%, GA 16.5% 和 GG 81.6%, 等位基因 A 和 G 频率分别 0.102 和 0.898。脑出血组趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 多态位点的 A 等位基因频率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 这种差异在合并高血压和冠心病患者中尤为明显。应用 Logistic 回归校正了脑出血的环境危险因素后, CCR2b190A 仍可使脑出血发生的危险性降低 ($OR = 0.205$, 95% CI : 0.092 ~ 0.454, $P = 0.000$)。结论 CCR2b 基因 190G/A 位点的 A 等位基因可能是湖南地区汉族人群脑出血的一种保护性基因多态。

关键词:趋化因子受体; 基因多态性; 脑出血; 限制性片段长度多态性

Relationship between chemokine receptor CCR2b gene 190G/A polymorphism and intracerebral hemorrhage in Hunan population of China

YANG Min-Hui, XU Hong-Wei, LIU Qiu-Ting, XIANG Guan-Hong, TU Er-Wen. Department of Neurology, the People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China

Abstract: Objective To explore the relationship of the chemokine receptor CCR2b gene 190G/A polymorphism with intracerebral hemorrhage (ICH) in Han population in Hunan Province. **Methods** For the case-control study, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed to identify the distributions of allele and genotype frequencies of the chemokine receptor CCR2b gene 190G/A polymorphism in 158 patients with ICH and 150 age- and sex-matched healthy controls. Genotypes of different populations were compared to explore the association between the chemokine receptor CCR2b gene 190G/A polymorphism and ICH. **Results** Chemokine receptor CCR2b gene 190G/A polymorphism existed in Chinese Han people of the Hunan area. In the study population, the frequencies of the chemokine receptor CCR2b 190G/A genotypes were 3.6% (AA), 22.1% (GA) and 74.3% (GG) respectively, and the frequencies of allele A and G were 0.146 and 0.854 respectively. In the control group, the frequencies of the chemokine receptor CCR2b 190G/A genotypes were 5.3% (AA), 28.0% (GA) and 66.7% (GG) respectively, and the frequencies of allele A and G were 0.193 and 0.807 respectively. In the ICH group, the frequencies of the chemokine receptor CCR2b 190G/A genotypes were 1.9% (AA), 16.5% (GA) and 81.6% (GG) respectively, and the frequencies of allele A and G were 0.102 and 0.898 respectively. To the chemokine receptor CCR2b gene 190G/A polymorphism, a significantly lower frequency of A allele was confirmed in the ICH group compared with the control group ($P < 0.05$), especially in patients with hypertension and coronary heart disease. After environmental risk factors for ICH had been adjusted through Logistic regression method, the CCR2b 190A allele was still related to a lower incidence of ICH ($OR = 0.205$, 95% CI : 0.092 - 0.454, $P = 0.000$). **Conclusions** CCR2b 190A allele

收稿日期: 2011-11-14; 修回日期: 2012-02-21

作者简介: 杨敏慧 (1979-), 女, 主治医师, 主要从事脑血管病和癫痫的研究。E-mail: 26139747@qq.com。

通讯作者: 许宏伟, 男, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 主要从事脑血管疾病的研究。E-mail: xhw_xiangya@sina.com。

may be a protective gene polymorphism for ICH in Han population of the Hunan area.

Key words: chemokine receptor; gene polymorphism; intracerebral hemorrhage; restriction fragment length polymorphism

脑出血的病因和发病机制复杂,是环境和遗传等多种因素共同作用的结果。高血压是脑出血最常见的病因,因此,高血压相关基因是脑出血的重要候选基因。近来许多实验证据提示 CCR2 基因在原发性高血压的发病中发挥了作用^[1,2],提示 CCR2 基因多态性可能是高血压的一种遗传因素。关于 CCR2b 基因多态性与脑出血相关性的研究,目前国内外尚未见公开报道,而 CCR2b 基因 190G/A 位点基因多态性及其等位基因频率与湖南汉族人群中的脑出血是否存在相关性,国内外亦未见相关报道。相关的流行病学调查表明,湖南地区为世界脑出血的高发区^[3],对该地区人群的脑出血研究具有重要代表意义。本研究利用 PCR、RFLP 等手段,对 CCR2b 基因多态性及其等位基因在湖南汉族脑出血患者及正常对照人群中的分布情况进行病例对照研究,探讨 CCR2 基因多态性及其等位基因频率在湖南汉族脑出血人群中分布,从分子水平揭示脑出血的发病机制,为脑出血的预防、治疗提供有力的理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

病例组:为脑出血患者共 158 例,为湖南汉族人,无血缘关系,平均年龄 (58.47 ± 9.53) 岁。所有病例均经临床及 CT 和/或 MRI 确诊,脑出血的诊断遵循全国第四届脑血管病学术会议制定的诊断标准,不包括外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤等引起的出血,排除梗死后出血,并排除严重肝肾功能障碍、心肌病、心瓣膜疾病及先天性心脏病的病例。

对照组:无血缘关系的湖南地区健康人员共 150 例,平均年龄 (57.35 ± 8.44) 岁,均为汉族,无脑卒中史及家属史,无肝、肾、血液病,无自身免疫疾病。

两组年龄、性别构成比,经统计学分析差异无统计学意义 $(P > 0.05)$ 。

1.2 方法

1.2.1 血标本采集和基因组 DNA 的提取 受试者常规禁食 12 h 后,于次日 7 时取肘静脉血 5 ml,EDTA 抗凝,常规酚-氯仿法抽提基因组 DNA, -20℃ 保存。

1.2.2 PCR 扩增 引物的合成:参考文献^[4]合成,扩增目标 CCR2b,上引 5'-acaacatgctgtccacatct-3',下引 5'-aacacagccaccaaccag-3',扩增片段长度为 514 bp,退火温度 59℃。PCR 反应体系:20 μl,其中含 ddH₂O 7.0 μl,上引(浓度 10 pmol/μl) 1.0 μl,下引(浓度 10 pmol/μl) 1.0 μl,模板 DNA(浓度 250 ng/μl) 1.0 μl,2 × Taq PCR Master Mix 10.0 μl。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min → (94℃ 变性 45 s → 59℃ 退火 45 s → 72℃ 延伸 1 min) 共 32 个循环 → 最后 72℃ 延伸 10 min → 4℃ 终止。

1.2.3 限制性片段长度多态性(RFLP)分析 CCR2b 基因酶切反应体系:总体积 20.0 μl,PCR 扩增产物 10.0 μl,Fok I 内切酶(4000 U/ml),2.5 μl,10 × buffer 2.0 μl,灭菌 ddH₂O 5.5 μl。酶切反应条件:37℃ 孵育 3 h 使样品完全酶切。反应终止后,酶切消化片段在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后,紫外灯观察并照相,在电泳图像分析仪上分析结果。

1.3 统计学分析

应用软件 SPSS 13.0 对数据进行统计分析。通过直接计数对病例组和对照组的 CCR2b 基因 190 位点等位基因和基因型的频率进行计算。病例组和对照组分别进行基因型实际频数与理论频数的卡方检验,以检验 Hardy-Weinberg 平衡。病例组和对照组基因型与等位基因频率的比较采用卡方检验。计量资料值采用“均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)”来表示,组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析(one-way ANOVA)。计数资料采用卡方检验。应用 Logistic 回归来校正年龄、性别、BMI、吸烟史、饮酒史、高血压病史、冠心病史、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)其他脑出血发生的相关危险因素所可能产生的影响。分析 CCR2b190G/A 基因型与脑出血的相关性,计算出概率(*P*值),比值比(odds ratio, OR)及其 95% 的可信区间(confidence interval, CI)。所有的统计检验均为双侧概率检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.0125$ (3 个样本率间的多重比较检验水准 $\alpha = 0.0125$) 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑出血组与对照组的资料对比

将脑出血组与对照组进行一般数据的比较,两组在年龄、性别、BMI、吸烟史、饮酒史方面均无显著性差异 ($P > 0.05$)。脑出血组中有高血压史、冠心病史者显著高于对照组 ($P < 0.05$)。脑出血组与对照组的血脂、血压、血糖比较,脑出血组除了低密度脂蛋白与对照组相比没有显著差异外,其余指标差异皆有统计学意义。

2.2 趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 多态性分析

2.2.1 CCR2b 基因 190G/A 多态位点 PCR 产物酶切图谱分析 PCR 扩增含 190G/A 位点的

CCR2b 目的基因,产物片段长度为 514 bp (见图 1),存在两个 FokI 酶切位点(包括 190G/A 位点在内),限制性内切酶 Fok I 完全酶切后分成 199bp, 198bp 和 117bp,以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后分析(见图 2)。基因型有 3 种:A/A 型:两个酶切位点均酶切为 199bp, 198bp 和 117bp 三种片段(因 199bp 与 198bp 接近而无法区分,在凝胶上仅显示 199/198bp 和 117bp 两种片段);G/G 型:仅有一个酶切位点,酶切后则在凝胶上仅显示 397bp 和 117bp 两种片段;G/A 型:酶切为 397bp, 199bp, 198bp 和 117bp 四种片段(因 199bp 与 198bp 接近而无法区分,在凝胶上仅显示 397bp, 199/198bp 和 117bp 三种片段)。

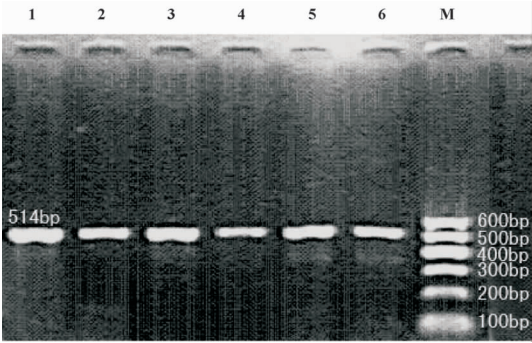


图 1 趋化因子受体 CCR2b 基因 G190A PCR 扩增产物电泳图。M:100bp Maker;1-6 泳道是 PCR 扩增产物。

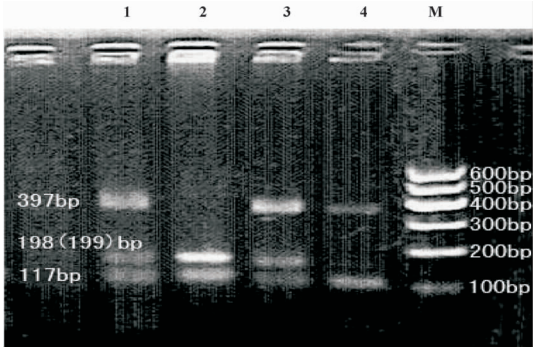


图 2 趋化因子受体 CCR2b 基因 190 位点 Fok I 酶切后电泳图。M:100bp Maker;4:纯合子 GG 型;2:纯合子 AA 型;1、3:GA 型。

2.2.2 脑出血组及其亚组与对照组趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 多态性分布比较 脑出血组和对照组都有 AA、GA 和 GG 三种基因型,在研究总人群中(脑出血组 + 对照组)中的频率分别为:3.6%、22.1% 和 74.3%;等位基因 A、G 的频率分别为 14.6%、85.4%。各基因型及等位基因频率,见表 1。按 Hardy-Weinberg 平衡定律对研究人群进行了平衡检验 ($P > 0.05$),证明本研究选择的总研究人群、对照组和脑出血组基因型及等位

基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡检验,表明样本来自同一群体,群体达到遗传平衡,可代表所在地区的人群分布。根据脑出血合并的危险因素,将脑出血组以是否伴有高血压为脑出血的病因分为高血压(HBP)和非高血压(NHBP)两亚组进行比较,见表 2。将脑出血组以是否伴有冠心病可分为冠心病(CHD)和非冠心病(NCHD)两亚组进行比较,见表 3。

表 1 脑出血组和对照组 CCR2b190G/A 基因型频率及等位基因频率比较

组别	例数(n)	基因型(%)		等位基因频率(%)	
		AA + GA	GG	A	G
脑出血组	158	3(1.9) + 26(16.5)	129(81.6) ^a	10.2	89.8 ^b
对照组	150	8(5.3) + 42(28.0)	100(66.7)	19.3	80.7

注:检验水准 $\alpha = 0.05$ 。a 为与对照组比较, $\chi^2 = 9.053$, $df = 1$, $P = 0.002$; b 为与对照组比较, $\chi^2 = 6.586$, $df = 1$, $P = 0.010$ 。

表2 脑出血(高血压)亚组与对照组基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数(n)	基因型(%)		等位基因频率(%)	
		AA + GA	GG	A	G
HBP + ICH 组	117	1(0.9) + 18(15.4)	98(83.7) ^{a,c}	8.5	91.5 ^{d,f}
NHBP + ICH 组	41	2(4.9) + 8(19.5)	31(75.6) ^b	14.6	85.4 ^e
对照组	150	8(5.3) + 42(28.0)	100(66.7)	19.3	80.7

注:检验水准 $\alpha = 0.0125$ 。a 为与对照组比较, $\chi^2 = 10.022$, $df = 1$, $P = 0.002$; b 为与对照组比较, $\chi^2 = 1.195$, $df = 1$, $P = 0.274$; c 为与 NHBP + ICH 组比较, $\chi^2 = 1.346$, $df = 1$, $P = 0.246$; d 为与对照组比较, $\chi^2 = 9.746$, $df = 1$, $P = 0.002$; e 为与对照组比较, $\chi^2 = 1.569$, $df = 1$, $P = 0.210$; f 为与 NHBP + ICH 组比较, $\chi^2 = 3.642$, $df = 1$, $P = 0.056$ 。

表3 脑出血(冠心病)亚组与对照组基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数(n)	基因型(%)		等位基因频率(%)	
		AA + GA	GG	A	G
CHD + ICH 组	34	0(0.0) + 1(2.9)	33(97.1) ^{a,c}	8.5	91.5 ^{d,f}
NCHD + ICH 组	124	3(2.4) + 25(20.2)	96(77.4) ^b	14.6	85.4 ^e
对照组	150	8(5.3) + 42(28.0)	100(66.7)	19.3	80.7

注:检验水准 $\alpha = 0.0125$ 。a 为与对照组比较, $\chi^2 = 12.779$, $df = 1$, $P = 0.000$; b 为与对照组比较, $\chi^2 = 3.854$, $df = 1$, $P = 0.050$; c 为与 NCHD + ICH 组比较, $\chi^2 = 6.868$, $df = 1$, $P = 0.009$; d 为与对照组比较, $\chi^2 = 34.002$, $df = 1$, $P = 5.51E-09$; e 为与对照组比较, $\chi^2 = 3.458$, $df = 1$, $P = 0.063$; f 为与 NCHD + ICH 组比较, $\chi^2 = 18.587$, $df = 1$, $P = 1.62E-05$ 。

2.3 脑出血危险因素的 Logistic 回归分析

将年龄、性别、BMI、吸烟史、饮酒史、高血压史、冠心病史、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)脑出血的危险因素和趋化因子受体 CCR2b190 基因的三种基因型同时纳入到多因素 Logistic 回归模型,采用逐步回归方法筛选出独立的危险因素。回归方程似然比检验结果为: $\chi^2 = 161.222$, $P = 0.000$, 所拟合的 Logistic 回归方程有统计学意义。按 α 入 = 0.05, α 出 = 0.10 标准,进入脑出血回归方程的独立危险因素包括高血压史、冠心病史、趋化因子受体 CCR2b190 基因型。趋化因子受体 CCR2b190 基因型 $P = 0.000$, $OR = 0.205$ 。

3 结论

CCR2b 基因 190G/A 位点的 A 等位基因可能是湖南地区汉族人群脑出血的一种保护性基因多态。

4 讨论

CCR2b 是单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的受体。众多研究发现^[5-8]人类 MCP-1 受体 CCR2b 基因存在 190G/A 多态性,引起 CCR2 蛋白第一个跨膜区中缬氨酸至异亮氨酸的变异(valine 64 isoleucine)。

中枢神经系统曾被定义为组织学上的“免疫豁免”区域。但越来越多的证据表明,居留于中枢神经系统的细胞也可分泌各种炎症介质并表达其受体,启动免疫过程。MCP-1 是一种很强的促炎症因

子,在炎症反应中的主要作用有:①趋化和激活炎症细胞,增加其黏附活性^[10];②上调各种黏附分子;③调节其它炎症因子的释放^[11];④直接参与免疫、炎症级联反应等。大量研究表明,MCP-1 在许多中枢神经系统疾病的炎症反应过程中上调,已报道较多的有多发性硬化^[12]、脑梗死^[13]、阿尔茨海默病^[14]等,2009 年黄坚^[15]研究发现血清 MCP-1 水平在脑出血 1~3 d 达到高峰,第 7 天、第 14 天时稍降低,但仍维持在较高水平,第 30 天时又上升并达到另一个高峰。近年来一系列相关研究发现,趋化因子及其受体的基因变异与动脉粥样硬化、冠心病、脑梗死等疾病的发病有一定的相关性^[4, 7, 16],陈施艳等^[4]研究发现 CCR2b 基因 190A 等位基因有可能是脑梗死的一种保护性基因多态。Valdes 等^[7]研究发现,CCR2b 基因 190G/A 位点中的 A 等位基因可减轻动脉粥样硬化损害,从而提示 CCR2b 基因 A 190(Ile64)多态可能是动脉粥样硬化的一种保护性基因多态。但是也有研究提出不同的结论,认为 CCR2b 基因 190G/A 位点中的 A 等位基因是冠心病的危险因素^[6]。国内李嫣然等^[17]研究中未证实中国老年汉族人群的 CCR2-64I 基因位点与高血压相关。我们的研究发现,在中国湖南地区,脑出血患者的趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 多态性分布与正常人比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。脑出血组趋化因子受体 CCR2b 基因 190G/A 多态位点的 A 等位基因

频率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 这种差异在合并高血压和冠心病患者中尤为明显。提示 CCR2b 基因 190G/A 位点的 A 等位基因可能是湖南地区汉族人群脑出血的一种保护性基因多态。

CCR2bV64I 这种基因变异所介导的包括脑出血在内的疾病发病机制尚不明确, 众多研究认为 MCP-1 介导的单核细胞转内皮迁移在动脉硬化形成早期起关键作用, 而且有研究表明参与高血压及其靶器官损害炎症反应的各种前炎症细胞因子中, MCP-1 可能是关键的趋化因子之一, 是活化和聚集炎症细胞至靶器官的重要介导者。MCP-1 被激活释放以后, 通过活化 CCR2 受体从而诱导化学趋化反应, 介导单核细胞和巨噬细胞迁移至活化的炎症部位^[13]。推测 CCR2b190A 等位基因可能通过影响受体与 MCP-1 结合, 从而抑制动脉硬化特别是小动脉硬化中的炎症免疫反应过程而发挥其保护作用。

迄今为止, 关于 CCR2b 基因 190G/A 多态性与这些疾病的发病之间是否存在相关性仍有争议。造成各研究结果上的差异可能与该基因多态性发生率相对低以及研究样本量的大小不一等因素有关。CCR2b 基因 190G/A 多态性本身有可能不存在功能性, 但其有可能与其他尚未知的有功能、有意义的多态性连锁, 从而在包括脑出血在内的炎症性疾病发病中发挥一定的作用。而这些疑惑与猜测都还需要更进一步关于基因功能方面的研究探讨来解决或证实。

参 考 文 献

- [1] Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling. *Circulation Res*, 2004, 94(9): 1203-1210.
- [2] Izawa H, Yamada Y, Okada T, et al. Prediction of genetic risk for hypertension. *Hypertension*, 2003, 41(5): 1035-1040.
- [3] Yang QD, Niu Q, Zhou YH, et al. Incidence of cerebral hemorrhage in the Changsha community. *Cerebrovasc Dis*, 2004, 17(4): 303-313.
- [4] 陈施艳. 趋化因子及其受体基因多态性与脑梗死的关系: [博士学位论文]. 长沙: 中南大学, 2006.
- [5] Bursill CA, Channon KM, Greaves DR, et al. The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr Opin Lipidol*, 2004, 15(2): 145-149.
- [6] Ortlepp JR, Vesper K, Mevissen V, et al. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. *J Mol Med*, 2003, 81(6): 363-367.
- [7] Valdes AM, Wolfe ML, O'Brien EJ, et al. Val64Ile polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 is associated with reduced coronary artery calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(11): 1924-1928.
- [8] Petrakova J, Cernakova Z, Drabek J, et al. CC chemokine receptor (CCR) 2 polymorphism in Czech patients with myocardial infarction. *Immunol Lett*, 2003, 88(1): 53-55.
- [9] Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, et al. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol*, 2001, 22(3): 147-184.
- [10] Green SR, Han KH, Chen Y, et al. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. *J Immunol*, 2006, 176(12): 7412-7420.
- [11] Shimizu S, Nakashima H, Karube K, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 activates a regional Th1 immunoresponse in nephritis of MRL/lpr mice. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, 23(2): 239-242.
- [12] Subileau EA, Rezaie P, Davies HA, et al. Expression of chemokines and their receptors by human brain endothelium: implications for multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(3): 227-240.
- [13] 郭秀凤, 李运刚, 李化勇, 等. 急性脑梗死患者血浆单核细胞趋化蛋白-1 和组织因子的变化. *中华老年心脑血管病杂志*, 2008, 10(10): 790.
- [14] Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P, et al. Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2006, 63(4): 538-543.
- [15] 黄坚. 急性脑出血患者血清 MCP-1、RANTES 水平的动态测定: [硕士学位论文]. 广州: 中山大学, 2009.
- [16] Hegele RA. SNP judgments and freedom of association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(7): 1058-1061.
- [17] 李嫣然, 杜萱, 卢佳艳, 等. 老年高血压患者 CCR 基因多态性研究. *上海交通大学学报(医学版)*, 2008, 28(4): 431-434.