

囊泡相关膜蛋白 8 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死相关性研究

宋冰鑫,夏健

中南大学湘雅医院神经内科,湖南省长沙市 410008

摘要:目的 探讨囊泡相关膜蛋白 8 (VAMP8) 基因 rs13426038 和 rs10666612 多态性与动脉粥样硬化性脑梗死 (ACI) 的相关性。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术,对动脉粥样硬化性脑梗死组和正常对照组 VAMP8 基因 rs13426038 和 rs10666612 位点进行基因分型。结果 两位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。VAMP8 基因 rs13426038 位点 CC/GG 基因型频率在 ACI 组和对照组分别为 20.5%/35.9% 和 15.0%/36.0%, C/G 等位基因频率为 42.3%/57.7% 和 39.5%/60.5%; 两组间基因型及等位基因频率差异比较无统计学意义 ($P=0.08$, $P=0.25$)。VAMP8 基因 rs10166612 位点 AA/GG 基因型频率在 ACI 组和对照组分别为 92.7%/0.5% 和 91.8%/0%, A/G 等位基因频率为 96.1%/3.9% 和 95.9%/4.1%; 两组间基因型及等位基因频率分布比较亦无统计学差异 ($P=0.16$, $P=0.46$)。结论 VAMP8 基因 rs13426038 C/G 和 rs10166612 A/G 多态性可能与 ACI 发生无关。

关键词:动脉粥样硬化性脑梗死;囊泡相关膜蛋白 8;单核苷酸多态性

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.01.009

Association between vesicle-associated membrane protein 8 gene polymorphisms and atherosclerotic cerebral infarction

SONG Bing-Xin, XIA Jian. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: XIA Jian, E-mail: jianxia08@yahoo.com

Abstract: Objective To investigate the association between vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) gene polymorphisms (rs13426038 and rs10166612) and atherosclerotic cerebral infarction (ACI) in Han Chinese population in Hunan, China.

Methods The genotypes of rs13426038 and rs10166612 in VAMP8 gene were determined using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in patients diagnosed with ACI (ACI group) and healthy controls (control group). The genotype and allele frequencies were analyzed by χ^2 test. **Results** The genotype distributions at rs13426038 and rs10166612 were in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium. In the ACI group, the frequencies of CC, CG, and GG genotypes at rs13426038 were 20.5%, 43.6%, and 35.9%, respectively, and the frequencies of C and G alleles were 42.3% and 57.7%, respectively. In the control group, the frequencies of CC, CG, and GG genotypes at rs13426038 were 15.0%, 49.0%, and 36.0%, respectively, and the frequencies of C and G alleles were 39.5% and 60.5%, respectively. There were no significant differences in genotype and allele frequencies at rs13426038 between the ACI group and the control group ($P=0.08$, $P=0.25$). In the ACI group, the frequencies of AA, AG, and GG genotypes at rs10166612 were 92.7%, 6.8%, and 0.5%, respectively, and the frequencies of A and G alleles were 96.1% and 3.9%, respectively. In the control group, the frequencies of AA, AG, and GG genotypes at rs10166612 were 91.8%, 8.2%, and 0%, respectively, and the frequencies of A and G alleles were 95.9% and 4.1%, respectively. There were no significant differences in genotype and allele frequencies at rs10166612 between the two groups ($P=0.16$, $P=0.46$). **Conclusions** The polymorphisms of VAMP8 gene (rs13426038 and rs10166612) may not be associated with ACI in Han Chinese population in Hunan, China.

Key words: atherosclerotic cerebral infarction; vesicle-associated membrane protein 8; single nucleotide polymorphism

收稿日期:2016-10-20;修回日期:2017-01-07

作者简介:宋冰鑫(1988-),女,硕士研究生,主要从事脑血管疾病方面的研究。

通信作者:夏健(1973-),女,博士,教授,主要从事脑血管疾病的基础与临床研究。E-mail:jianxia08@yahoo.com。

脑卒中是一种常见的心脑血管疾病,具有高发病率、高致残率、高死亡率及高复发率等特点,是当前严重危害人类健康的世界性公共卫生问题^[1],脑梗死占脑卒中发生率的第一位,也是脑卒中死亡的第一位原因^[2]。动脉粥样硬化是其最常见的病因。囊泡相关膜蛋白 8 (vesical-associated membrane protein 8, VAMP8) 基因是一个参与血小板脱颗粒的基因,通过编码血小板致密核颗粒,α颗粒和溶菌体分泌所必须的囊泡停靠蛋白,调控血小板活化并参与动脉粥样硬化的发生发展^[3]。因此,进一步研究 VAMP8 基因多态性分布,对动脉粥样硬化性脑梗死 (atherosclerotic cerebral infarction, ACI) 早期预警有重要意义。本研究采用病例对照方法,通过对 VAMP8 基因 rs13426038 和 rs10666612 基因型频率和等位基因频率进行分析,旨在探讨湖南地区汉族人群 VAMP8 基因 rs13426038 和 rs10666612 多态性与 ACI 的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

病例组为 2009 年至 2012 年到中南大学湘雅医院神经内科住院的脑梗死患者,并均经临床表现、CT 和 (或) MRI 确诊 (依照第四届全国脑血管病学术会议诊断标准),根据 2007 年韩国改良的 TOAST 分型标准筛选出动脉粥样硬化性脑梗死患者作为 ACI 组。

对照组成员为随机收集的中南大学湘雅医院健康体检者,且相互之间无血缘关系,性别与年龄与 ACI 组相配。

两组均为湖南地区汉族人,均排除: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梗死;有严重肝、肾功能疾病的病例及自身免疫性疾病、妊娠者、甲状腺疾病,半年内曾降脂治疗者和最近 6 个月服用雌激素患者。

每位入组者均签署知情同意书,并经中南大学湘雅医院伦理委员会批准同意。

1.2 研究方法

1.2.1 一般资料收集 收集所有受试者的资料,包括性别、年龄、吸烟史、饮酒史、糖尿病史、高血压病史、冠心病病史、高脂血症史;其空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG) 和血脂检测由医院检验科完成。

1.2.2 基因组 DNA 提取及基因多态性检测 所有受试者均抽取空腹 12 h 静脉血约 5 ml,EDTA 抗凝,常规酚/氯仿抽提法提取 DNA。根据 NCBI 数据库,本研究主要选择 VAMP8 两个位于启动子区多态性位点 (rs13426038 和 rs10166612) 进行检测。

1.2.3 PCR 扩增及基因型鉴定 从 NCBI 的 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.gov/genbank/>, accessionnumberNT-007819) 中检索 VAMP8 基因序列,利用专业引物设计软件 Primer5 设计引物 (表 1),由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 总反应体系 15 μl,包含 DNA 模板 1 μl,上下游引物各 0.25 μl,2 * Taq PCR Master Mix 7.5 μl (含缓冲液、DNA 聚合酶、dNTP 和 MgCL₂),加双蒸水至 15 μl;PCR 扩增条件:冷启动,95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,退火 50 s (退火温度 rs13426038 57℃;rs10166612 59.2℃),72℃ 延伸 50 s,共 39 个循环,最后 72℃ 延伸 4 min,4℃ 终止反应.;用限制性内切酶 BclI (rs13426038)、Alu (rs10166612),分别在 55℃、37℃ 酶切相应的 PCR 扩增产物,然后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物,用凝胶分析系统观察电泳结果 (图 1、图 2)。

表 1 SNP 位点的 PCR 引物序列和片段长度

SNP	位置	引物序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
rs13426038	启动子区	正向: TGTGGAGAAGCTGACATTTCT	240
		反向: ACCGCAGAGGTAATTGATCCC	
rs10166612	启动子区	正向: TAAGCATCAGCACCTGCAAAC	204
		反向: CTCACAGGAAACAAAATGCAG	

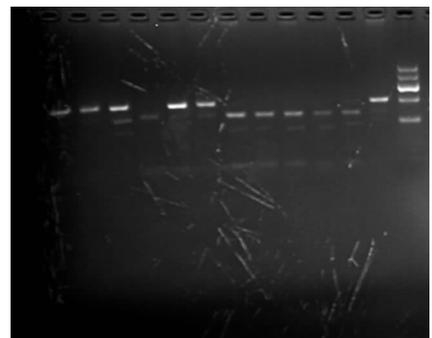


图 1 rs13426038 位点 PCR-RFLP 产物电泳图 (CC 240 bp, GG 141 + 99 bp, Maker 为 100 bp)

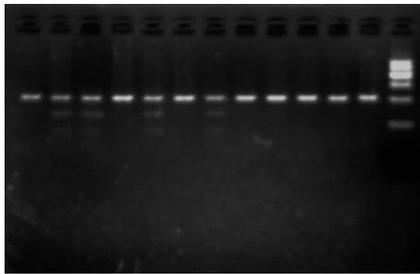


图2 rs10166612 位点 PCR-RFLP 产物电泳图 (AA 204 bp, GG 132 + 72 bp, Maker 为 100 bp)

1.2.4 基因型鉴定 rs13426038 位点经 BclI 酶切后测序验证, 鉴定出 CC、CG、GG 3 种基因型; rs10166612 位点经 Alu I 酶切后测序验证, 鉴定出 AA、AG、GG 3 种基因型。

1.3 统计学分析

所有数据统计分析采用 SPSS 18.0 软件。以基因计数法计算基因型和等位基因频率, 采用 Hardy-

Weinberg 平衡法检测样本的群体代表性, 组间基因型和等位基因频率比较用 χ^2 检验; 计量资料数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 并进行正态性检验, 符合正态分布的两组间计量资料的比较采用独立 t 检验, 病例组和对照组基因型频率与等位基因频率的比较并计算比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% 的置信区间 (confidence index, CI)。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 ACI 组与对照组临床数据比较

本研究两个 SNP 位点所纳入的动脉粥样硬化性脑梗死 (ACI) 组和对照组在年龄、性别、BMI、饮酒史、TC 上差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); ACI 组中有吸烟史者与对照组相比有统计学差异 ($P < 0.05$); ACI 组收缩压、舒张压、LDL-C、FPG 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对照组 HDL 水平明显高于 ACI 组 ($P < 0.05$)。见表 2、表 3。

表2 rs13426038 位点两组人群临床特征比较

特征	ACI 组 (n = 390)	对照组 (n = 453)	$t(\chi^2)$	P
性别 (男/女)	269/121	296/157	1.251	0.263
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	61.09 \pm 11.28	59.92 \pm 10.42	1.563	0.118
BMI (kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	23.69 \pm 3.44	23.91 \pm 3.31	-0.828	0.408
吸烟史 (有/无)	156/235	132/321	10.806	0.001*
饮酒史 (有/无)	84/306	101/354	0.053	0.817
收缩压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	148.24 \pm 24.04	122.88 \pm 13.45	19.21	0.000*
舒张压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	87.01 \pm 14.09	76.32 \pm 9.01	13.27	0.000*
FPG (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	6.17 \pm 2.07	5.21 \pm 1.47	7.700	0.000*
TC (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.67 \pm 1.01	4.75 \pm 0.95	-1.030	0.303
TG (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.61 \pm 1.13	1.98 \pm 2.25	-2.852	0.004*
LDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.86 \pm 0.89	2.57 \pm 0.79	4.758	0.000*
HDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.13 \pm 0.30	1.26 \pm 0.31	-5.705	0.000*

注: * 为 ACI 组与对照组相比较, $P < 0.05$ 。吸烟史定义为每天吸烟 > 10 支; 饮酒史定义为每天饮酒 > 1 dri (换算为 ml)。

表3 rs10166612 位点两组人群临床特征比较

特征	ACI 组 (n = 572)	对照组 (n = 560)	$t(\chi^2)$	P
性别 (男/女)	390/182	352/208	3.553	0.059
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	60.93 \pm 11.80	59.68 \pm 13.08	1.582	0.114
BMI (kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	24.07 \pm 3.99	23.93 \pm 3.35	0.348	0.728
吸烟史 (有/无)	214/358	162/418	11.776	0.001*
饮酒史 (有/无)	126/446	143/417	1.922	0.166
收缩压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	146.33 \pm 23.89	122.94 \pm 12.98	20.14	0.000*
舒张压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	86.11 \pm 13.82	76.16 \pm 8.92	14.18	0.000*
FPG (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	6.09 \pm 2.11	5.20 \pm 1.37	7.944	0.000*
TC (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.69 \pm 1.05	4.71 \pm 0.96	-0.459	0.646
TG (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.66 \pm 1.14	2.09 \pm 2.48	-2.035	0.042*
LDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.83 \pm 0.90	2.57 \pm 0.79	4.857	0.000*
HDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.16 \pm 0.31	1.26 \pm 0.30	-5.086	0.000*

注: * 为 ACI 组与对照组相比较, $P < 0.05$ 。吸烟史定义为每天吸烟 > 10 支; 饮酒史定义为每天饮酒 > 1 dri (换算为 ml)。

2.2 基因多态性分析

中国湖南地区汉族人群中存在 VAMP8 基因 rs13426038 C/G 和 rs10166612 A/G 多态性,且基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。

VAMP8 基因 rs13426038 位点 CC、CG 和 GG 基因型频率在 ACI 组分别为 20.5%、43.6% 和 35.9%,等位基因 C 和 G 的频率分别为 42.3% 和 57.7%;对照组 rs13426038 CC、CG 和 GG 基因型频率分别为 15.0%、49.0% 和 36.0%;C 和 G 等位基因频率分别为 39.9% 和 60.5%;两组间基因

型及等位基因频率分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

VAMP8 基因 rs10166612 位点 AA、AG 和 GG 基因型频率在 ACI 组分别为 92.7%、6.8% 和 0.5%,A 和 G 等位基因频率分别为 96.1% 和 3.9%;对照组分别为 91.8%、8.2% 和 0%,A 和 G 等位基因频率分别为 95.9% 和 4.1%;两组间基因型及等位基因频率分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 3 两组人群 VAMP8 rs13426038 位点基因型频率和等位基因频率比较

rs13426038	n	基因型频率			P	MAF	
		CC	CG	GG		C	P
ACI 组	390	20.5% (80)	43.6% (170)	35.9% (140)	0.08	42.3% (330)	0.25
对照组	453	15.0% (68)	49.0% (222)	36.0% (163)		39.5% (358)	

表 4 两组人群 VAMP8 rs10166612 位点基因型频率和等位基因频率比较

rs13426038	n	基因型频率			P	MAF	
		CC	CG	GG		C	P
ACI 组	572	92.7% (530)	6.8% (39)	0.5% (3)	0.16	3.9% (45)	0.46
对照组	560	91.8% (514)	8.2% (46)	0% (0)		4.1% (46)	

3 讨论

动脉粥样硬化是脑梗死最常见的病因及重要的病理生理学基础^[4,5],众多研究表明,血小板活化与动脉粥样硬化的发生发展密切相关^[6,7]。VAMP8 是一种血小板内涵体的囊泡可溶性黏附蛋白受体,是血小板致密核颗粒,α 颗粒和溶菌体分泌所必须的囊泡停靠蛋白,参与血小板颗粒包膜和开放小管系统间的直接融合以及颗粒间的混合融合^[8]。Gwenda 等^[9]通过研究 VAMP8 基因缺失 (VAMP8^{-/-}) 的大鼠模型,发现 Vamp8 基因缺失的血小板在所有 3 个颗粒 (致密颗粒、α 颗粒和溶菌体) 释放的动力学上有明显的缺陷,以及 VAMP8^{-/-} 的大鼠血管损伤后血栓形成延迟并减弱。Kondkar 等^[10]研究发现高活化性血小板 VAMP8 mRNA 表达及 VAMP8 蛋白水平分别高于低活化性血小板 4.8 倍和 2.5 倍。这些研究均提示 VAMP8 在血小板活化和促凝物质的释放起着重要的调节作用。

VAMP8 基因位于 2 号染色体中一个宽度为 68 Mbp 的尖端区域中,含有 303 bp 的开放读码框,编码 101 个氨基酸的蛋白质 (VAMP8)。目前对于

VAMP8 基因多态性与冠心病的研究较多,段成城等发现冠心病患者 VAMP8 rs1010 等位基因频率显著高于对照组^[11]。Shiffman 等^[12]也在研究心肌梗死病例组 1200 例和正常对照组 262 名实验中,发现 VAMP8 多态性与心肌梗死显著相关。目前,尚未有 VAMP 基因多态性与脑梗死的研究,鉴于心脑血管疾病有相似发病机制及危险因素^[13],VAMP8 可能为脑梗死重要的致病候选基因。本研究首次进行 VAMP8 多态性与脑梗死研究,选取位于 VAMP8 启动子区两个多态性位点 rs13426038 和 rs10166612,对 ACI 和正常对照组人群进行检测,发现都存在 3 种基因型,分别为 CC、CG、GG 和 AA、AG、GG,提示湖南汉族人群中存在 rs13426038 和 rs10166612 多态性,且符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,说明样本具有较好的代表性。但是通过统计学分析显示,ACI 组与对照组间 rs13426038 和 rs10166612 的基因型与等位基因频率分布比较均无显著性差异,提示 VAMP8 rs13426038 和 rs10166612 多态性可能与湖南汉族人群动脉粥样硬化性脑梗死无关。我们考虑,未发现关联性的原因除了可能与样本数量、选择及

分类偏倚性有关,还可能和脑梗死发病因素多样性有关,脑梗死的发生发展是多位点、多基因及多种环境因素共同作用的结果,且各因素间存在交互作用,下一步我们可选择更多位点、更多基因,或进行基因连锁研究,来探索脑梗死的发病遗传学机制。

参 考 文 献

[1] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010; a systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380: 2095-2128.

[2] 涂雪松. 缺血性脑卒中的流行病学研究[J]. *中国临床神经科学*, 2016, 24(5): 594-599.

[3] Ren Q, Barber HK, Grawford GL, et al. Endobrevin/VAMP 8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 24-33.

[4] 李爱松,李婧,朱榆红,等. 动脉粥样硬化相关基因与缺血性卒中的相关性研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2011, 38(5): 477-481.

[5] 王龙,赵学敏,袁肖征,等. 急性脑梗死患者血清促动脉硬化指数与颈动脉内膜中层厚度及氧化型低密度脂蛋白水平的研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(5): 447-450.

[6] Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, et al. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession

and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb [J]. *Circulation*, 2005, 112(8): 1180-1188.

[7] Jennings LK. Role of platelets in the atherothrombosis [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103(3 Suppl): 4A-10A.

[8] Polgár J, Chung SH, Reed GL. Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion [J]. *Blood*, 2002, 100(3): 1081-1083.

[9] Graham GJ, Ren Q, Dilks JR, et al. Endobrevin/VAMP-8-dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo [J]. *Blood*, 2009, 114(5): 1083-1090.

[10] Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, et al. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(2): 369-378.

[11] 段成城,徐力辛,陈倩. 囊泡相关膜蛋白8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*, 2010, 27(3): 329-332.

[12] Shiffman D, Rowland CM, Louie JZ, et al. Gene variants of VAMP8 and HNRPUL1 are associated with early-onset myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 1613-1618.

[13] Dichgans M, Malik R, König IR, et al. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease - a genome-wide analysis of common variants [J]. *Stroke*, 2014, 45(1): 24-36.