

α -内收蛋白基因 rs4963 多态性与脑出血的关系

司江华¹, 彭小兰¹, 范红燕², 严雯¹, 谢守嫔¹, 范彩霞¹

1. 兰州市第一人民医院神经内科, 甘肃省兰州市 730050

2. 兰州市第一人民医院干部病房, 甘肃省兰州市 730050

摘要:目的 研究 α -内收蛋白基因 rs4963 多态性与脑出血的关系。方法 对甘肃地区 238 例脑出血患者和 240 例健康对照者应用血液基因组 DNA 提取试剂盒方法检测 α -内收蛋白基因 rs4963 多态性, 分析比较脑出血病例组和对照组 rs4963 多态性的分布差异。结果 病例组和对照组 α -内收蛋白基因 rs4963 基因型分布、等位基因频率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。按性别分层后, 病例组与对照组基因型分布和等位基因频率差异仍无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 甘肃地区 α -内收蛋白基因 rs4963 多态性与脑出血无关联。

关键词: 脑出血; α -内收蛋白基因; 甘肃地区

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.04.006

Association between polymorphism of rs4963 in the α -adducin gene and cerebral hemorrhage

SI Jiang-Hua, PENG Xiao-Lan, FAN Hong-Yan, YAN Wen, XIE Shou-Pin, FAN Cai-Xia. Department of Neurology, The First People's Hospital, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: PENG Xiao-Lan, E-mail: pxl39331@163.com

Abstract: Objective To investigate the association between polymorphism of rs4963 in the α -adducin gene and cerebral hemorrhage. **Methods** A total of 238 patients with cerebral hemorrhage and 240 healthy controls were collected in Gansu, China. Blood genomic DNA extraction kit was used to evaluate the polymorphism of rs4963 in the α -adducin gene, and the genotype and allele frequencies of rs4963 polymorphism were compared between the cerebral hemorrhage group and the control group. **Results** There were no significant differences in the genotype and allele frequencies between the cerebral hemorrhage group and the control group ($P > 0.05$), even after the two groups were stratified by sex ($P > 0.05$). **Conclusions** The polymorphism of rs4963 in the α -adducin gene is not associated with cerebral hemorrhage.

Key words: cerebral hemorrhage; α -adducin gene; Gansu province

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是一种多因素疾病, 严重威胁人类的生命健康, 受遗传和环境因素共同作用的影响。流行病学研究表明遗传因素在 ICH 发病机制中发挥了重要作用^[1,2], 一些候选基因多态性与 ICH 的关联性在不同人群中也经被验证^[3-5]。 α -内收蛋白基因 (α -adducin gene, ADD1 gene) 是目前研究较多的钠离子转运调控基因, 研究多聚焦于其与高血压的关联性^[6,7]。ADD1 基因 rs4963 作为该基因的一个标签单核苷酸多态

性 (tag SNP), 已被证实与癌症等疾病相关^[8,9], 但其与 ICH 的关联尚不明确。本研究探寻 ADD1 基因 rs4963 多态性与 ICH 的关联, 并讨论基因与环境因素之间的相互作用对 ICH 发病的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

收集 2013 年 1 月至 2015 年 12 月在兰州市第一人民医院、兰州大学第一医院和兰州军区兰州总医院神经内科就诊的病人及部分正常体检人员的

基金项目: 兰州市卫生科技发展计划项目 (LZWSKY2014-2-01)

收稿日期: 2016-12-27; 修回日期: 2017-07-06

作者简介: 司江华 (1983-), 男, 主治医师, 硕士, 主要从事脑血管病的研究。

通信作者: 彭小兰 (1962-), 女, 主任医师, 学士, 主要从事脑血管病的研究。E-mail: pxl39331@163.com。

临床资料及外周血标本。在此基础上再次进行抽样,以性别和年龄(± 3 岁)为匹配因素成组匹配。根据资料情况,确定脑出血组 238 例,对照组 240 例。对象祖籍均为中国甘肃地区(居住 3 代以上),均为汉族,并签署知情同意书。所有病例均经头颅 CT 和/或 MR 确诊(参照第四届全国脑血管病学术会议诊断标准^[8])。排除标准:①混合型脑血管病(梗死后出血或出血后梗死)病例;②外伤、动脉炎、肿瘤、动静脉畸形、动脉瘤或药物引起的脑出血病例;③严重肝肾功能障碍、甲状腺疾病、自身免疫疾病、血液病、妊娠。所有对象均无脑血管疾病家族史。对照组除上述排除标准外,还需无脑血管疾病及家族史。

1.2 主要试剂与仪器

实时荧光定量聚合酶链反应仪(德国 Roche 公司)、AU2700 型生化检测仪(美国 Beckman 公司)、DNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物有限公司)、引物合成(美国 Invitrogen 公司)及相关配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 调查问卷和辅助检查 采用统一调查表进行流行病学的问卷调查,内容主要包括性别、年龄、吸烟饮酒史、既往疾病史和家族史等。辅助检查主要包括身高、体重、血压、血糖、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)等。

1.3.2 SNP 选取、DNA 提取和单核苷酸多态性检测 通过国际人类基因组计划数据库中 tag SNP data 选项,进行检索获取 ADD1 基因 tag SNP。配置如下:选择中国汉族人群(CHB),Pairwise Methods 选择为 Tagger Pairwise*, R Square cut off 设为 0.8,最小等位基因频率设为 0.1。检索 ADD1 基因获得 tag SNP rs4963。将提取 DNA 样本浓度稀释到 10 ng/ μ l,进行荧光聚合酶链反应(PCR)扩增。镁离子浓度 2 mmol/L,特异性长引物短引物比为 1:1,PCR 总反应体系 12.5 μ l。不同 tag SNP,实验前均需摸索特异性长引物和短引物的合适比例,进而确保获取准确的分型结果。

为使产物的 Tm 值差异更易区分,在其 5'-端添加富含 GC 的尾巴,通常在 3'-末端为 G/C 碱基的特异性引物上加入 14 bp 的长尾巴(5'-GCGGGCAGGGCGGC-3'),而在 3'-末端为 A/T 碱基的特异性引物上添加 8 bp 的短尾巴(5'-GAT-TACCG-3'),分别命名为长引物、短引物。上游长

引物序列:5'-gcgggcagggcggc GAGAGGAAGCAGAAGGGC TG-3',短引物序列:5'-gattaccg GAGAGGAAG-CAGAAGGGCTC-3',下游引物序列:5'-GTGCCAG-GACCACAAGCAC-3'。

PCR 反应体系:10 \times PCR 缓冲液(10 \times PCR buffer) 1.25 μ l、SYBR Green I 染色剂(4 \times) 0.625 μ l、二甲基亚砷(DMSO,10%) 1.25 μ l、三磷酸脱氧核苷(d NTP,2.5 mmol/L) 2 μ l、ASP-长引物(ASP-long primer,10 μ mol/L) 0.25 μ l、ASP-短引物(ASP-short primer,10 μ mol/L) 0.25 μ l、共同引物(Common primer) 0.25 μ l、DNA 模板 1 μ l、Taq gold 酶(5 U/ μ l) 0.06 μ l,添加超纯水(dd H₂O)至 12.5 μ l。

PCR 扩增程序:①95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;②95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,引物 Tm 值复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,总计 35 个循环;③72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

进入熔解曲线分析程序:95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,以 0.11 $^{\circ}$ C/s 的速度将温度上升至 90 $^{\circ}$ C,连续采集荧光信号,后 40 $^{\circ}$ C 冷却。溶解曲线数据由 Roche 公司提供的软件进行聚类分析。根据 tag SNP rs4963 特异性引物的设计,结合熔解曲线峰形分型结果,峰值在前的熔解曲线所对应的基因型为短引物 3'-末端相应碱基的纯合子,峰值在后为长引物 3'-末端相应碱基的纯合子,具有 2 个峰值的溶解曲线为该 tag SNPrs4963 的杂合子基因型。

1.4 统计学分析

运用遗传分析软件 Arlequin 3.11 对 rs4963 基因型分布是否符合哈迪-温伯格平衡定律(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)进行检验。运用 SPSS 16.0 统计软件对数据组间差异进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较使用 *t* 检验;计数资料组间比较使用 χ^2 检验。脑出血影响因素分析用 logistic 回归,赋值情况如表 1 所示。用 Haploview 4.2 软件对 ADD1 基因 rs4963 位点进行连锁不平衡分析。运用多因子降维法(MDR) 2.0 软件分析基因和环境因素的交互作用对脑出血的影响。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象基本情况

病例组和对照组性别、年龄、饮酒、BMI、TC、TG 差异无统计学意义($P > 0.05$);而高血压、吸烟、HDL、LDL 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 脑出血相关危险因素的 logistic 回归分析

高血压患者发生脑出血的风险是血压正常者的 7.081 倍 (95% CI: 3.826 ~ 13.297); 吸烟者发生脑出血的风险是非吸烟者的 1.621 倍 (95% CI: 0.982 ~ 2.416); HDL 降低者发生脑出血的危险是正常者的 1.248 倍 (95% CI: 0.879 ~ 1.970)。见表 3。

2.3 ADD1 基因 rs4963 多态性与脑出血的关联分析

2.3.1 H-W 遗传平衡检验 结果显示, ADD1 基因 rs4963 基因型分布符合遗传平衡定律 ($P > 0.05$), 说明样本抽样可靠, 群体代表性较好。对照组和病例组 ADD1 基因 rs4963 的基因型分布、等位基因频率差异均无统计学意义 (χ^2 值分别为

0.98 和 0.76, $P > 0.05$), 见表 4。

表 1 脑出血影响因素的赋值

因素	赋值
性别	0 = 男性; 1 = 女性
年龄(岁)	按连续型变量分析
高血压	0 = SBP < 140mmHg 且 DBP < 90mmHg; 1 = SBP ≥ 140mmHg 和(或) DBP ≥ 90mmHg
吸烟	0 = 不吸烟; 1 = 吸烟
饮酒	0 = 不饮酒; 1 = 饮酒
BMI	0 = < 25; 1 = ≥ 25
TC (mmol/L)	0 = < 5.7; 1 = ≥ 5.7
TG (mmol/L)	0 = < 1.7; 1 = ≥ 1.7
HDL (mmol/L)	0 = < 2.0; 1 = ≥ 2.0
LDL (mmol/L)	0 = < 3.12; 1 = ≥ 3.12

注: SBP: 收缩压; DBP: 舒张压; BMI: 体重指数; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白。

表 2 对照组与病例组基础资料 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别		年龄(岁)	BMI (kg/m ²)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	高血压		吸烟		饮酒	
		男	女							是	否	是	否	是	否
对照组	240	128	112	59.3 ± 6.5	25.11 ± 2.36	5.38 ± 1.05	1.66 ± 0.58	1.51 ± 0.40	3.29 ± 0.57	58	182	43	197	36	204
病例组	238	129	109	60.5 ± 7.0	25.94 ± 2.96	5.44 ± 1.08	1.66 ± 0.78	1.18 ± 0.47	3.01 ± 0.76	166	72	59	179	40	198
t 值或 χ^2 值		$\chi^2 = 0.28$		$t = 0.58$	$t = 0.74$	$t = 0.81$	$t = 0.77$	$t = 3.01$	$t = 2.13$	$\chi^2 = 32.17$		$\chi^2 = 19.47$		$\chi^2 = 0.35$	
P 值		0.58		0.61	0.70	0.42	0.46	< 0.05	< 0.05	< 0.05		< 0.05		0.66	

注: BMI: 体重指数; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白。

表 3 脑出血影响因素的 logistic 回归分析

因素	β 值	s_x ▼	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
性别	0.162	0.126	1.763	0.197	1.172 (0.962 - 1.473)
年龄	0.001	0.016	0.002	0.941	1.022 (0.971 - 1.121)
高血压	1.962	0.360	28.984	< 0.05	7.081 (3.826 - 13.297)
吸烟	0.521	0.223	3.748	< 0.05	1.621 (0.982 - 2.416)
饮酒	-0.083	0.291	0.084	0.736	0.918 (0.512 - 1.781)
BMI	0.362	0.438	0.687	0.393	1.412 (0.798 - 2.915)
TC	0.512	0.379	1.312	0.214	1.480 (0.753 - 3.011)
TG	0.452	0.401	0.992	0.259	1.383 (0.810 - 2.719)
HDL	0.212	0.030	44.316	< 0.05	1.248 (0.879 - 1.980)
LDL	-0.365	0.442	0.681	0.409	0.692 (0.287 - 1.671)
常数	-8.527	1.492	38.163	< 0.05	0.000

注: BMI: 体重指数; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白。

表 4 ADD1 基因 rs4963 基因型分布及等位基因频率的比较 [n (%)]

组别	基因型频率			等位基因频率	
	CC	CG	GG	C	G
对照组	58 (24.2%)	121 (50.4%)	61 (25.4%)	237	243
病例组	62 (25.9%)	117 (49.2%)	59 (24.9%)	241	235
χ^2 值	0.98			0.76	
P 值	0.57			0.63	

2.3.2 按性别分层后对照组和病例组的基因型分布及等位基因频率的比较 H-W 遗传平衡检验结果显示, 不同性别中 ADD1 基因的基因型分布仍符合遗传平衡定律 ($P > 0.05$), 对照组与病例组的基因型分布 (男: $\chi^2 = 5.01$, $P = 0.08$; 女: $\chi^2 = 0.63$, $P = 0.52$) 差异无统计学意义; 对照组与病例组的等位基因频率 (男: $\chi^2 = 3.46$, $P = 0.15$; 女: $\chi^2 = 2.99$, $P = 0.08$) 差异无统计学意义。见表 5。

表 5 性别分层后 ADD1 基因 rs4963 基因型分布和等位基因频率的比较

组别	基因型频率			等位基因频率	
	CC	CG	GG	C	G
男性对照组	27	66	35	120	136
男性病例组	32	58	39	122	136
χ^2 值	5.01			0.63	
P 值	0.08			0.52	
女性对照组	31	57	24	119	105
女性病例组	34	58	17	126	92
χ^2 值	3.46			2.99	
P 值	0.15			0.08	

2.4 ADD1 基因 rs4963 多态性与环境因素的相互作用分析

使用 MDR 对基因与环境的相互作用对脑出血的影响进行分析。将高血压、吸烟、饮酒、BMI、TC、TG、HDL、LDL 和 rs4963 基因型检测结果纳入 MDR

模型。运用 MDR 2.0 软件对变量进行拟合,采用十重交叉验证法对模型的拟合优度进行检验。在拟合的 4 个模型中,选取 3 阶相互作用模型为最优模型,即在脑出血高危因素中,BMI、HDL 和吸烟情况三者之间存在交互作用。见表 6。

表 6 环境与基因相互作用 MDR 拟合模型

拟合模型	预测准确度	预测敏感性	OR 值(95% CI)	χ^2 值	P 值	交叉验证一致性
高血压	0.65	0.53	2.81(0.89-5.62)	3.77	0.05	10/10
高血压、吸烟	0.63	0.48	3.16(1.36-6.35)	5.01	0.02	10/10
高血压、HDL、吸烟	0.62	0.51	3.90(1.28-10.03)	6.22	0.01	10/10
高血压、HDL、rs4963	0.62	0.53	2.81(0.95-5.41)	3.86	0.05	5/10

3 讨论

内收蛋白是 1986 年 Gardner 等在红细胞中发现的一种细胞膜骨架蛋白,参与细胞膜骨架网状结构的构建及维持、细胞膜离子转运、细胞信号转导等多项生理功能。内收蛋白由 α 亚基和 β 亚基或 α 亚基和 γ 亚基构成的异源二聚体,3 种亚基分别由 ADD1、ADD2、ADD3 3 种基因编码。目前关于 ADD1 基因与高血压的关系的研究较多,结论却不一致。有两项研究报道发现 ADD1 基因 Gly460Trp 多态性与原发性高血压无相关性,且这两项研究均包含一个荟萃分析,分析结果仍为阴性,按人种的亚组分析后也未发现相关性,推测原因有可能是未能收入当前所有的关于 ADD1 基因 Gly460Trp 多态性与高血压的关联研究^[6,9]。龚敏莉等^[10]进行了一项大规模的社区抽样研究,涉及 2040 例受试者,对照组和病例组各 1020 例,结果显示,ADD1 基因 rs4963 多态性与高血压无相关性。而日本学者 Watanabe 等^[11]对正常血压的日本人群进行了 12 年的随访研究,发现 Gly460Trp 与高血压的发生相关,且经过 logistic 多元回归校正后,发现 Gly460Trp 仍能独立预测高血压的进展风险。高血压是脑出血的独立危险因素,脑出血又是一种受遗传和环境双重影响的多基因复杂疾病,因此,我们采用病例对照研究方法分析遗传和环境因素以及两者之间的相互作用与脑出血的关联性。

脑出血病例组与对照组的基础资料比较,发现高血压、吸烟、HDL 和 LDL 水平与脑出血的发病相关。将研究因素纳入 logistic 回归模型进行相互校正,发现高血压、吸烟和 HDL 降低仍与脑出血有关,但 LDL 不再与脑出血相关。高血压仍然与脑出血密切相关,高血压患者发生脑出血的风险是血

压正常者的 7.081 倍,这与目前认识一致。吸烟以及低 HDL 水平者发生脑出血概率也明显升高,这与其他研究基本一致^[12]。因此,戒烟、控制血压、合理膳食、适度运动、维持正常 HDL 水平可以有效降低脑出血发病的风险。

本研究未发现 ADD1 基因 rs4963 多态性与脑出血存在关联性,有关该位点与脑出血的关联也鲜有报道。进一步以性别为分层因素分析 rs4963 基因位点与脑出血的相关性,结果仍然为阴性。尽管结果为阴性。我们也不能就此完否定 ADD1 基因 rs4963 多态性与脑出血的相关性。因为脑出血是一个复杂性疾病,是多个基因和环境因素共同作用的结果,故而每个基因所起的作用相对较小,所以在验证某个基因与疾病的关系时很难得到统计学差异;也有可能样本量不足,样本量所含信息量不足有关;此外还有环境因素的影响。

MDR 作为一种非参数检验方法,对遗传模式没有特定要求,适合在样本量较小的情况下对复杂疾病进行基因与基因、基因与环境的高阶交互作用分析^[13]。本研究运用 MDR 软件分析基因与环境的交互作用对脑出血的影响,结果提示脑出血发病风险中 rs4963 基因与环境因素之间无交互作用,但高血压、吸烟和 HDL 降低对脑出血的发病存在交互影响。

疾病的遗传学研究是目前的研究热点,由于疾病的复杂性以及研究方法的局限性,目前研究结论多不相同。脑出血是多个基因和环境因素共同作用的复杂性疾病,所以,下一步继续扩大样本量,并且针对多个基因位点进行联合分析,并充分考虑环境因素的影响,才能进一步明确脑出血的遗传学病因。

参 考 文 献

- [1] Chong M, O'Donnell M, Thijs V, et al. Mendelian Genes and Risk of Intracerebral Hemorrhage and Small-Vessel Ischemic Stroke in Sporadic Cases [J]. *Stroke*, 2017, 57(5): 24-30.
- [2] 袁宁, 许宏伟, 刘学军. PPAR γ 基因 C1431T 多态性及其与脑出血的关系 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(3): 229-232.
- [3] Srivastava K, Sundriyal R, Meena PC, et al. Association of angiotensin converting enzyme (insertion/deletion) gene polymorphism with essential hypertension in northern Indian subjects [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2012, 16(3): 174-177.
- [4] Zhang LN, Ji LN, Fei LJ, et al. Association between polymorphisms of alpha-adducin gene and essential hypertension in Chinese population [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 1-5.
- [5] Reddy MK, Labhasetwar V. Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia [J]. *FASEB J*, 2009, 23(5): 1384-1395.
- [6] Ramu P, Umamaheswaran G, Shewade D, et al. Gly460Trp polymorphism of the ADD1 gene and essential hypertension in an Indian population: A meta-analysis on hypertension risk [J]. *Indian J Hum Genet*, 2010, 16(1): 8-15.
- [7] 李哲, 王丹, 李翠丽, 等. 山西地区血管紧张素原基因和 α -内收蛋白基因多态性与原发性高血压的相关性研究 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2011, 15(9): 740-744.
- [8] 全国第四届脑血管病学术会议标准 (1995) [J]. *中华神经科杂志*, 1996, 29(6): 376-381.
- [9] Niu WQ, Zhang Y, Ji KD, et al. Lack of association between alpha-adducin G460W polymorphism and hypertension: evidence from a case-control study and a meta-analysis [J]. *J Hum Hypertens*, 2010, 24: 467-474.
- [10] 龚敏莉, 郝玲妹, 范瑞, 等. α -内收蛋白基因 rs4963 多态性与原发性高血压的关联研究 [J]. *中国慢性病预防与控制杂志*, 2015, 23(9): 667-671.
- [11] Watanabe Y, Metoki H, Ohkubo T, et al. Accumulation of common polymorphism is associated with development of hypertension: a 12-year follow-up from the Ohasama study [J]. *Hypertens Res*, 2010, 33: 129-134.
- [12] 杨艳, 肖玉娴. 高血压脑出血的危险因素分析及治疗体会 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 18(19): 72-74.
- [13] Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(3): 376-382.