

5-脂氧合酶激活蛋白及磷酸二酯酶 4D 基因多态性与脑梗死易患性的分子流行病学研究

王剑南¹, 杨兆宁², 隋强¹

[摘要] **目的:** 分析 5-脂氧合酶激活蛋白 (ALOX5AP) 及磷酸二酯酶 4D (PDE4D) 基因多态性与脑梗死 (CI) 易患性的分子流行病学特征。 **方法:** 收集 CI 患者 396 例作为病例组, 另选取 300 名健康体检者作为对照组, 运用 PCR 检测技术和基质辅助激光解析分析 2 组受检者 ALOX5AP 基因中 SG13S89、SG13S114 和 PDE4D 基因中 SNP83 的多态性, 分析 ALOX5AP 及 PDE4D 基因多态性与 CI 的关系。 **结果:** 病例组 SG13S89 中 AG 基因型、A 等位基因频率均高于对照组 ($P < 0.05$)。多元 logistic 逐步回归分析显示, 调整年龄、高血压及糖尿病等因素的影响后, SG13S89 中 AG 基因型是增加 CI 发生的危险性因素 ($P < 0.05$); AT 型及 SAD 型 CI 患者 SG13S89 基因中的基因型及基因频率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 年龄分层后分析发现, 女性是增加 SG13S89 基因中的 AG 基因型发生脑卒中的危险因素 ($P < 0.05$)。 **结论:** SG13S89 中的 AG 基因型和 A 等位基因使得 CI 的频率高于其他等位基因, 可能的机制是通过介导的血管炎性反应实现, 而未发现 SG13S114 及 SNP83 基因的多态性与 CI 有关。

[关键词] 脑梗死; 5-脂氧合酶激活蛋白; 磷酸二酯酶 4D; 基因多态性; 分子流行病学特征

[中图分类号] R 743.33

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.10.014

The polymorphism of ALOX5AP and PDE4D gene and molecular epidemiology of the susceptibility of cerebral infarction

WANG Jian-nan¹, YANG Zhao-ning², SUI Qiang¹

(1. Department of Encephalopathy, 2. Department of Clinical Laboratory,

Chinese Traditional and Western Medicine Hospital of Beijing, Beijing 100195, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the polymorphism of ALOX5AP and PDE4D gene and molecular epidemiology of the susceptibility of cerebral infarction (CI). **Methods:** Three hundred and ninety-six patients with CI and 300 healthy people were divided into the CI group and control group. The polymorphism of SG13S89 and SG13S114 in ALOX5AP gene, and SNP83 in PDE4D gene in two groups were detected using PCR and matrix assisted laser desorption, and the relationship between the polymorphism of ALOX5AP and PDE4D gene and CI were analyzed. **Results:** The AG gene type and allele A frequency in SG13S89 in CI group were higher than those in control group ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that the AG gene type in SG13S89 was the risk factor in increasing the CI after adjusting the influence factors of age, hypertension and diabetes mellitus ($P < 0.05$). The differences of the gene type and frequency of AT and SAD in SG13S89 gene of cerebral infarction patients were not statistically significant ($P > 0.05$). The age stratification analysis found that female was the risk factor of the CI in increasing AG gene type of SG13S89 of patients ($P < 0.05$). **Conclusions:** The frequency of CI in the patients with AG type and A allele in SG13S89 is higher than other alleles, the possible mechanism of which is implemented through mediating vascular inflammatory reaction, and the relationship between the polymorphism of SG13S114 and SNP83 gene and CI is not found.

[Key words] cerebral infarction; ALOX5AP; PDE4D; gene polymorphism; molecular epidemiology

脑梗死 (CI) 是临床常见的血管急症, 其发病是环境因素及遗传因素共同作用的结果, 是与多种基因有关的复杂疾病。CI 的遗传易感性早在 20 年前就已得到证实, 且有 CI 家族病史的人群发生大动脉粥样硬化型 CI (AT) 及小动脉闭塞型 CI (SAD) 的风险分别是无 CI 家族史的 2.93 和 3.15 倍^[1]。因此, 基因学研究在 CI 的防治中有重要的临床意义^[2-3]。

有学者^[4-5] 研究发现, 5-脂氧合酶激活蛋白 (ALOX5AP) 及磷酸二酯酶 4D (PDE4D) 基因突变与 CI 的发生密切相关, 近年成为临床研究热点。但具体的突变基因型及发生机制仍不明确, 国内的研究方法也未统一。我们对 CI 患者及健康体检者 ALOX5AP 及 PDE4D 基因发生突变的情况进行检测, 并分析其与 CI 发生的关系, 为 CI 的防治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2014 年 3 月

[收稿日期] 2014-12-29

[作者单位] 北京市中西医结合医院 1. 脑病科, 2. 检验科, 100195

[作者简介] 王剑南 (1980 -), 男, 住院医师。

我院收治的 CI 患者 396 例为病例组,其中男 234 例,女 162 例;年龄 56~71 岁。根据病因分为 AT 型 263 例,SAD 型 133 例。纳入标准:(1)经头颅 CT 及 MRI 确诊;(2)患者知情同意。排除标准:(1)心源性脑栓塞等其他原因或者不明原因 CI;(2)有既往 CI 病史者;(3)有动脉炎、感染、肿瘤、心肾等重要脏器器质性病变等;(4)患者拒绝参加。同期选取 300 名我院体检健康者(无脑卒中病史,无动脉炎、感染、肿瘤、心肾等重要脏器器质性病变等,无家族 CI

史)作为对照组,其中男 194 名,女 106 名;年龄 54~75 岁。病例组年龄大于对照组($P < 0.01$);病例组高血压及糖尿病的患病率(高血压及糖尿病的诊断标准按照国际通用的诊断标准进行诊断)均高于对照组($P < 0.01$);2 组性别、吸烟(指至少吸烟 1 年,每天至少 1 支)、饮酒(指过去的 12 个月内摄入乙醇至少 12 次)、胆固醇水平、低密度脂蛋白水平、三酰甘油水平及血小板含量差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 2 组一般资料比较

分组	<i>n</i>	年龄/ 岁	男性/ 例	吸烟/ 例	饮酒/ 例	高血压/ 例	糖尿病/ 例	胆固醇/ (mmol/L)	低密度脂蛋白/ (mmol/L)	三酰甘油/ (mmol/L)	血小板/ ($10^9/L$)
病例组	396	68.12 ± 12.01	234	176	182	317	132	4.67 ± 1.34	2.88 ± 1.02	1.78 ± 1.21	187.00 ± 64.00
对照组	300	64.15 ± 10.34	194	123	148	84	72	4.84 ± 1.12	3.02 ± 1.21	1.84 ± 1.04	192.00 ± 49.00
<i>u</i>	—	4.69	2.24*	0.83*	0.78*	189.37*	7.18*	1.82	1.62	0.70	1.17
<i>P</i>	—	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

* 示 χ^2 值

1.2 基因标识及检测方法 在 PubMed 中查找单核苷酸多态性,选取 ALOX5AP 基因中的 2 个单核苷酸多态性:SG13S89 和 SG13S114,以及 PDE4D 基因中 SNP83 的多态性;运用 PCR 检测技术和基质辅助激光解析分析 2 组受检者 ALOX5AP 基因中 SG13S89、SG13S114 和 PDE4D 基因中 SNP83 的多态性。具体的操作步骤为:(1)病例组入院时抽取静脉血 2 ml,对照组于清晨空腹抽取,加入乙二胺四乙酸二钠进行抗凝处理,置于 -80 °C 冰箱中备用;(2)采用低渗溶血、氯/酚仿法提取白细胞中的 DNA,双蒸水溶解后采用核酸分析仪测定 DNA 的浓度;(3)PCR 扩增第一个靶序列后加入特异性引物连接扩增的片段单核苷酸多态性;(4)利用 PCR 的引物扩增以及基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱法进行单核苷酸多态性分型数据的测定。SG13S89、SG13S114 和 SNP83 中均存在 2~3 种不同的基因型。分析 ALOX5AP 及 PDE4D 基因多态性与 CI 的关系。

1.3 统计学方法 采用 *t* 检验、 χ^2 检验和多元 logistic 逐步回归分析。

2 结果

2.1 2 组 ALOX5AP 及 PDE4D 基因突变情况比较 病例组 SG13S89 基因的 AG 基因型及 A 基因频率高于对照组($P < 0.05$);2 组的 SG13S114 基因及 SNP83 基因中的各基因型及基因频率差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 2)。

表 2 2 组 ALOX5AP 及 PDE4D 的基因突变情况比较 [*n*; 百分率(%)]

单核苷酸 多态性	病例组 (<i>n</i> =396)	对照组 (<i>n</i> =300)	OR	95% CI	<i>P</i>
SG13S89 基因型					
AG	17(4.29)	4(1.33)	3.319	1.105~9.969	<0.05
GG	379(95.71)	296(98.67)			
SG13S114 基因型					
AA	71(17.93)	40(13.33)	1.431	0.896~2.287	>0.05
TT	124(31.31)	100(33.33)			
AT	201(50.76)	160(53.33)	1.413	0.910~2.193	>0.05
SNP83 基因型					
CC	13(3.28)	19(6.33)	0.621	0.285~1.354	>0.05
CT	123(31.06)	100(33.33)			
TT	260(65.66)	181(60.33)			
SG13S89 基因频率					
A	17(2.15)	4(0.67)	3.268	1.094~9.764	<0.05
G	775(97.85)	596(99.33)			
SG13S114 基因频率					
A	343(43.31)	240(40.00)	1.146	0.924~1.421	>0.05
T	449(56.69)	360(60.00)			
SNP83 基因频率					
C	149(18.81)	138(23.00)	1.302	0.996~1.703	>0.05
T	383(81.19)	462(77.00)			

2.2 病例组危险因素多元 logistic 逐步回归分析 校正年龄、高血压、糖尿病的影响后,多元 logistic 逐步回归分析显示,SG13S89 基因中的 AG 基因型是增加 CI 风险的危险因素($P < 0.05$)(见表 3)。

表3 病例组危险因素多元 logistic 逐步回归分析 ($n = 396$)

变量	OR	OR 95% CI	P
年龄	1.03	1.01 ~ 1.05	<0.01
高血压	10.64	7.30 ~ 16.04	<0.01
糖尿病	1.02	0.66 ~ 1.52	>0.05
SG13S89 基因	4.21	1.18 ~ 15.21	<0.05

2.3 SG13S89 基因在 AT 型与 SAD 型 CI 患者中比较 AT 型及 SAD 型 CI 患者 SG13S89 基因型及基因频率的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 4)。

表4 SG13S89 基因在 AT 型与 SAD 型 CI 患者比较 [n ; 百分率 (%)]

单核苷酸 多态性		AT 型	SAD 型	OR	OR 95% CI	P
		($n = 263$)	($n = 133$)			
SG13S89 基因型	AG	8(3.04)	8(6.01)	0.490	0.180 ~ 1.337	>0.05
	GG	255(96.96)	125(93.09)			
SG13S89 基因频率	A	8(1.52)	8(3.01)	0.498	0.185 ~ 1.342	>0.05
	G	518(98.48)	258(96.09)			

2.4 年龄分层后 CI 易感基因分析 年龄分层后分析发现,女性是增加 SG13S89 基因中的 AG 基因型发生 CI 的危险因素,危险度 OR 为 9.71,95% CI 为 (1.22 ~ 71.21) ($P < 0.05$)。女性与 SG13S114 基因和 PDE4D 基因发生 CI 均无明显关系 ($P > 0.05$)。

3 讨论

CI 是一种病死率极高的临床急症,预后不良,严重影响患者的生命质量和寿命长短,临床证实 CI 是一种环境因素和遗传因素共同作用导致的复杂疾病^[6]。ALOX5AP 基因位于染色体 13q12-13 上,包含外显子 5 个,内含子 4 个,长度为 31 kb。冰岛研究组^[1]研究发现,其中由 SG13S25、SG13S32、SG13S114、SG13S894 种基因组成的 HapA 是增加冰岛居民发生 CI 的危险因素。PDE4D 基因位于染色体 5q12 上,长度为 1.6 Mb,包含外显子 24 个,内含子 22 个。国际上有研究者^[1,7]发现 PDE4D 的等位基因是发生 CI 的危险因素。但是国内对于 CI 的基因学研究并无统一方法,得到的结论也并不一致,对于 CI 发病的基因学分析罕有学者进行。本研究通过比较 CI 患者与健康者的基因多态性发现,病例组 SG13S89 中 AG 基因型、A 等位基因频率高于对照组 ($P < 0.05$),而且女性是增加 SG13S89 基因中的 AG 基因型发生脑卒中的危险因素,AT 型及 SAD 型 CI 患者 SG13S89 基因中的基因型及基因频率的差

异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。多元 logistic 逐步回归分析显示调整高血压、糖尿病及年龄等影响因素后,SG13S89 的 AG 型发生 CI 的危险性高于 GG 型,其危险度 OR 为 4.21 ($P < 0.05$),与已有研究^[1-3,8-9]结果相近。出现这些结果的原因可能是这两个基因分子的突变与动脉粥样硬化有关,ALOX5AP 基因发生突变后其产后可提高 5-脂氧合酶的活性,促进多种炎性介质损害血管壁,造成血管内膜增厚形成斑块,血管狭窄导致血流不畅发生 CI^[1,9-10]。PDE4D 基因编码的蛋白主要存在于炎性细胞及免疫细胞中,通过影响炎性环境、斑块稳定性等参与 CI 的发生发展,但是本研究发现 SG13S114 及 SNP83 基因与 CI 的发生并无关联,可能是由于 CI 的发生由多种因素共同作用,而这两种基因的多态性的作用结果被其他因素所抵消。

综上,SG13S89 中的 AG 基因型和 A 等位基因使得 CI 的频率高于其他等位基因,可能的机制是通过介导的血管炎性反应实现,而未发现 SG13S114 及 SNP83 基因的多态性与 CI 有关系。且本研究是横断面研究,尚需进一步的随访观察进行确认。

[参 考 文 献]

- [1] 邵敏洁,易兴阳,池丽芬. 浙江南部地区人群 5-脂氧合酶激活蛋白和磷酸二酯酶 4D 基因突变与缺血性脑卒中的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2013,15(6):592-595.
- [2] 池丽芬,易兴阳,邵敏洁,等. 5-脂氧合酶激活蛋白基因多态性与细胞色素 P450 酶 3A5 基因多态联合交互作用显著增加脑梗死风险[J]. 中华神经科杂志,2013,46(8):536-540.
- [3] 王玉飞,石聪熊,焦连龙,等. 5-脂氧合酶激活蛋白基因多态性与环境因素在缺血性卒中发生中的交互作用[J]. 中华神经科杂志,2013,46(8):531-535.
- [4] 余治平,王晋伟,刘括,等. ALOX5AP 基因多态性与缺血性卒中关系[J]. 中国公共卫生,2013,29(8):1172-1175.
- [5] 王建华. 促炎基因 ALOX5AP 多态性与脑卒中伴动脉粥样硬化患者功能恢复的相关性[J]. 中国老年学杂志,2013,33(7):1631-1632.
- [6] 邵敏洁,易兴阳. ALOX5AP 和 PDE4D 基因多态性与缺血性卒中[J]. 国际脑血管病杂志,2012,20(8):621-626.
- [7] 叶静,王瑶,孙昊,等. 缺血性卒中 5-脂氧合酶激活蛋白基因多态性和相关药物的治疗进展[J]. 中国临床研究,2012,25(12):1237-1239.
- [8] 王瑶,王淦楠,孙昊,等. 华东地区 ALOX5AP 基因单核苷酸多态性与缺血性脑卒中的相关性研究[J]. 中国急救医学,2012,32(5):410-415.
- [9] 韩晶,梁庆成,吴云,等. PDE4D、ALOX5AP 与缺血性脑卒中的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志,2011,21(17):1995-1999.
- [10] 徐佳亮,蔺慕会,陈晓虹,等. 中国人群 ALOX5AP 基因 SG13S114A/T 多态性与缺血性卒中相关性的 Meta 分析[J]. 中风与神经疾病杂志,2010,27(9):811-814.