

新疆哈萨克族脑梗塞与 ICAM-1 基因 G241R 多态性的关系

耿玉荣¹ 赵雯² 古丽松³ 谢靖¹ 余娟¹ 梁华锋¹ 王宏^{1△}

(1 石河子大学医学院第一附属医院神经内科 新疆 石河子 832008 2 伊犁新华医院 新疆 伊犁 835000;

3 新疆博尔塔拉蒙古自治州人民医院内二科 新疆 博乐 833400)

摘要 目的 探讨新疆哈萨克族脑梗死与细胞黏附分子 1(ICAM-1)G241R 基因多态性的关系。方法 采用多聚酶链式反应法及限制性内切酶片段长度多态性技术,对新疆哈萨克族 100 例脑梗死患者及 110 例健康者(对照组)进行 ICAM-1 基因 G241R 多态性检测,比较不同基因型与哈萨克族脑梗塞发病风险的关系。结果:脑梗塞患者 ICAM-1 基因 G41R 多态性的基因型频率和等位基因频率与健康对照组相比无明显差异。结论:ICAM-1 基因 G214R 多态性可能不是新疆哈萨克族脑梗塞发病的遗传学危险因素。

关键词 酸性 ICAM-1 基因 多态性 脑梗塞

中图分类号 R743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1093-04

The Relationship Between ICAM-1 Gene G241R Polymorphism and Cerebral Infarction in Xinjiang Kazakans

GENG Yu-rong¹, ZHAO Wen², GU Li-song¹, XIE Jin¹, YU Juan¹, LIANG Hua-feng¹, WANG Hong^{1△}

(1 Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China;

2 Xinghua hospital, Yili, Yili, 835000, China; Xinjiang Boertala Mongolia Autonomous People's Hospital of the Second Division, Bole 833400)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the polymorphism of ICAM-1 gene K241R and cerebral infarction in Kazakans of Xinjiang. **Methods:** RePolymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods were used to detect the G241R polymorphism of ICAM-1 gene in Kazakans including 100 patients with cerebral infarction and 110 healthy individuals (control group). The frequencies of genotype and allele and the association between the genetic polymorphisms and cerebral infarction were analyzed. **Results:** The prevalence rates of genotype and allele frequency of ICAM-1 gene G241R polymorphism are not significantly different between cerebral infarction and contron group ($P>0.05$). **Conclusion:** ICAM-1 gene G241R polymorphism is not associated with cerebral infarction in Kazakans of Xinjiang.

Key words: ICAM-1; Gene ;Polymorphism; cerebral infarction

Chinese Library Classification(CLC): R743 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)06-1093-04

前言

血管的炎症,在动脉硬化的发病机制中扮演着重要的角色^[1],其特征是通过内皮细胞上的粘附分子,聚集和粘附循环中的白细胞。Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)在粘附循环中的白细胞^[2],促使脂质等物质进入血管内皮组织,促进动脉硬化进程,起了重要的作用^[3]。动脉粥样硬化是脑梗塞的主要病理基础。脑梗塞患者在急性期、恢复期 sICAM-1 均有高水平表达^[4],sICAM-1 的表达与 ICAM-1G241R 位点的多态性有关^[5]。新疆哈萨克族生活环境相对封闭,很少与外界通婚,为基因多态性研究提供了条件。ICAM-1G241R 多态性存在种族,民族的差异。新疆哈萨克族是否存在这种多态性,这种多态性与哈萨克族脑梗塞之间是否存在相关性,目前尚不清楚,这促使了本次研究。

1 对象与方法

作者简介 耿玉荣(1979),女,住院医师,硕士研究生,研究方向:脑血管病变。

△通讯作者 王宏,教授,主任医师,硕士研究生导师,主要从事脑血管病变的研究,Email: wang832000@sina.com

(收稿日期:2010-12-04 接受日期:2010-12-30)

1.1 对象

所有对象均为来自新疆北疆的哈萨克族人,非一、二级亲属,无血缘关系,群体入选年龄 50-80 岁。脑梗死组:共 100 例,来自 2009 年 8 月-2010 年 8 月在新疆北疆县级以上医院神经内科病房收治的患者,脑梗死诊断符合 1996 年中华医学会第四次全国脑血管病学术会议修订的各类脑血管疾病诊断要点标准^[6],经 CT 或 MRI 确诊。不包括心源性、动脉炎、动脉瘤、血液病、外伤、肿瘤、药物、或脑血管畸形等引起的脑梗死。对照组 110 例,为同期健康体检人员,与患病组年龄、性别相当。无脑血管病史、无肝、肾、血液病、自身免疫病及恶性肿瘤。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 空腹状态下用含有 EDTA-Na2 抗凝生化管抽取静脉血 2mL,放入 -20℃ 冰箱短期储存,使用百泰克基因组 DNA 提纯试剂盒(北京百泰克生物技术公司)严格按照说明书操作,提取基因组 DNA 后置于 -4℃ 冰箱内保存。

1.2.2 聚合酶链反应基因扩增 采用聚合酶链反应(PCR)技术对 ICAM-1 基因第 4 外显子的目的片段进行扩增,使用引物设计软件 premier5.0 设计引物,上游引物 5' gcgggtcccaaaagggtcagtC-CGTGGTCTGTTCCCTGTAC 3',下游引物 5' gcgggtcccaaaagggtcagtGCATTTCGAAGCCAGAAGA 3' (由上海生工

生物工程公司提供) 反应体系为 15 μ L, 含 10 倍缓冲液 1.5 μ L、MgCl₂ 1.2 μ L、dNTP 0.3 μ L、引物各 0.2 μ L、模板 DNA 0.5 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.1 μ L (Taq NA 聚合酶和 dNTP 由上海生物工程公司提供)。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30sec、66 $^{\circ}$ C 退火 30sec、72 $^{\circ}$ C 延伸 60sec, 循环 20 次, 95 $^{\circ}$ C 变性 30sec、68 $^{\circ}$ C 退火 60sec, 循环 20 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 6min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 限制性片段长度多态性分析基因型测定 取 PCR 产物 10 μ L, 加入 Bsp14071 0.2U 限制性内切酶, 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜。取酶切产物进行 4% 琼脂糖凝胶电泳 (电压 150 V, 时间 1.5h, Marker 作参照), 在紫外灯下检测照相, 经美国 Kodak 凝胶成像系统观察片段电泳图并保存结果。

1.3 统计学分析

各使用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。临床资料采用 t 检验, 显著性差异为 $P < 0.05$ 。计算各组的 ICAM-1 基因 G241R 多态性的基因型频率, 确认符合 Hardy-Weinberg 平衡。组间基因型和等位基因频率比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 脑梗塞组和健康对照组的一般临床资料 见表 1

病例组和对照组的年龄、性别比例、甘油三酯、血浆总胆固醇、血糖水平均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 病例组和健康对照组的一般临床参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The case group and control group comparison of general clinical parameters ($\bar{x} \pm s$)

	Case group (n = 100)	Control group (n = 110)	P 值
Male/female	56/ 44	57/ 53	0.5720
Age(years)	61.06 $\pm$ 9.28	62.11 $\pm$ 9.72	0.4253
SBP(mmHg)	141.41 $\pm$ 17.78	142.19 $\pm$ 20.23	0.7679
DBP(mmHg)	85.19 $\pm$ 11.28	86.01 $\pm$ 12.49	0.6194
BMI (kg/m ²)	25.08 $\pm$ 3.53	24.46 $\pm$ 2.98	0.1693
TC(mmol/L)	5.12 $\pm$ 1.09	4.89 $\pm$ 1.10	0.1301
TG(mmol/L)	1.64 $\pm$ 0.87	1.49 $\pm$ 0.62	0.1490
FBG(mmol/L)	6.16 $\pm$ 2.14	5.69 $\pm$ 1.83	0.0879

2.2 缺血性脑血管病组与对照组 ICAM-1 基因 G241R 多态性基因型和等位基因频率

2.2.1 ICAM-1G241R PCR 扩增产物片段 为 153bp, 电泳结果见图 1, 根据限制性内切酶 Bsp1407 酶切片段的种结果, 有两种基因型, GG 型 (153bp 一条带), AG 型 (153bp, 115bp, 38bp 三条

带), AA 型 (115bp, 38bp 二条带, 本次研究未检测出) 基因型分析结果 ICAM-1 基因 G241R 基因型电泳结果见图 2。

2.2.2 ICAM-1 基因 G241R 多态性在缺血性脑卒中组及对照组中的分布情况 见表 2。

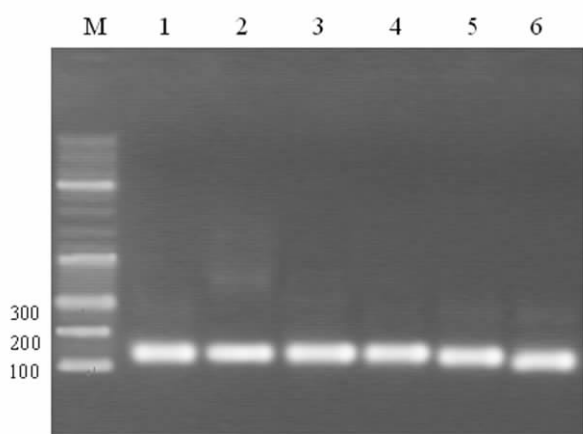


图 1 ICAM-1G241R PCR 产物

Fig.1 ICAM-1 G241R PCR product

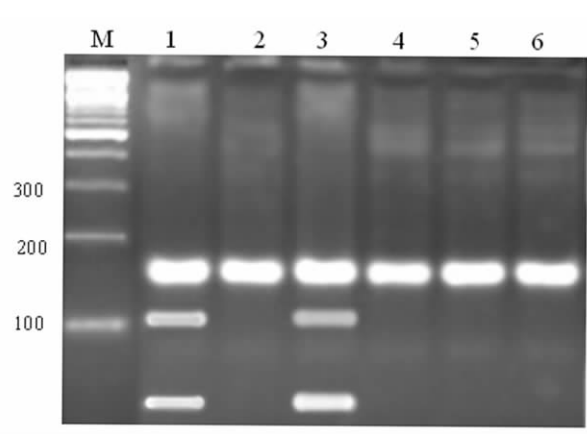


图 2 ICAM-1G241R 基因型电泳图结果

1, 3, 4, 5, 6 GG 基因型; 2 AG 基因型

Fig.2 ICAM-1G241R Genotype electrophoresis results

1, 3, 4, 5, 6 GG Genotype; 2 AG Genotype

3 讨论

细胞间黏附分子 -1 (ICAM-1, intercellular adhesion

molecule-1, [CD54]) 属于免疫球蛋白(Ig)超家族成员之一, 分子量为 76-114KD, 单链跨膜糖蛋白^[7], 是体内分布最广的细胞间

表 2 脑梗塞组 and 对照组 ICAM-1 G241R 基因的基因型和等位基因频率的分布

Fig.2 ICAM-1G241RGenotype electrophoresis results 1,3,4,5,6GGGenotype ; 2 AGGenotype

group	case(n)	Genotype frequency			allele frequency	
		AA	AG	GG	A	G
CI group	100	0 (0%)	10 (10%)	90 (90%)	10 (0.05)	190(0.95)
Control group	110	0 (0%)	8 (7.27%)	102 (92.23%)	8 (3.63%)	212(96.36)
χ^2		0.497			0.475	
P		0.481			0.490	

粘附分子之一,正常情况下白细胞、上皮细胞、成纤维细胞等表面均有低水平的表达^[8]。血管内皮细胞表面 ICAM-1 可与纤维蛋白原结合,促进内皮细胞对血液中的白细胞和循环中血小板俘获并使之局限性聚集,促进血栓的形成^[8-9]。ICAM-1 基因位于人类染色体 19p13.3-p13.2, cDNA 全长约 3kb,由 7 个外显子、6 个内含子、1 个 2.4kb 的上游区和 1 个 1.5kb 的 3' 非编码区组成^[10]。第四外显子位于 ICAM-1 胞外 Ig 区域的第三区段,与配体结合有关^[11]。此区域 778 位核苷酸的 G→A 置换,使 214 位氨基酸由甘氨酸变为精氨酸,即 G214R^[12]。此多态性位点由于位于配体结合区^[13],因而影响 ICAM-1 的粘附功能,ICAM-1 在动脉粥样硬化的发生和发展中起着重要作用^[14],动脉粥样硬化是脑梗塞的基本病理基础,因而 ICAM-1 的基因多态性与脑梗死的关系也倍受研究者重视^[15]。国际上著名的社区动脉粥样硬化风险研究 (Atherosclerosis Risk in Communities, ARIC) 是有 14595 名患者参与的前瞻性队列研究, Kelly 等^[16]人选取了该研究中 13491 例参与者为研究对象,截止到随访日期有 517 人发生缺血性卒中,对参与者进行 ICAM-1 基因检测发现, ICAM-1 基因的 G241R 位点位点的多态性与常见的心、脑血管病危险因素无关联性 (例如: 体重指数、HDL、总胆固醇、吸烟、糖尿病或高血压) 在所研究的白种人和黑人中,缺血性卒中组中的 ICAM-1 241GA 和 241AA 基因型频率都明显高于对照组; A 等位基因是一个重要的预测指标在白种人 (HRR 1.80; 95% CI, 1.34 to 2.43; P<0.001) 和黑人 (HRR 2.77; 95% CI, 1.68 to 4.57; P<0.001)。马丽媛等^[17]对北京地区 294 例缺血性脑卒中患者进行 ICAM-1 基因 G214R 多态性的检测和分析,并与 279 例北京地区的非卒中对照进行比较,发现缺血性脑卒中患者 ICAM-1 基因 G214R 多态性的基因型频率和等位基因频率与对照组相比无明显差异,病例组 A 等位基因频率 0.34%,未发现 AA 型纯合子,健康对照组 A 等位基因频率 0.18%,亦未发现 AA 型纯合子。意大利健康人中 AA 型和 A 等位基因频率分别只有 0.4 和 3.1%^[18]。

我们研究的哈萨克族脑梗塞患者 A 等位基因频率 0.05% 远远低于汉族人群,同样也未发现 AA 型纯合子。因基因分布具有地域性,民族性。本研究首次对哈萨克族 ICAM-1 基因 G241R 多态性脑梗塞与的关系作了初步的探索,研究结果发现 ICAM-1 基因 G241R 位点多态性等位基因频率和基因型频率在脑梗塞和健康对照组差异无统计学意义。研究结果提示 ICAM-1 基因 G241R 多态性,可能不是新疆哈萨克族脑梗塞的

重要遗传标志。由于 G241R 的多态性突变率较低,因而需大样本的实验来证实 ICAM-1G241R 与哈萨克族脑梗塞的关系。

参考文献(References)

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340: 115-126
- [2] Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, et al. Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients[J]. Atherosclerosis, 2003, 167(2): 237-242
- [3] Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2003, 170: 191-203
- [4] Orion D, Schwammenthal Y, Reshef T. Interleukin-6 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in acute brain ischaemia [J]. Eur J Neurol, 2008, 15(4):323-8
- [5] 郑乃智,李雪梅,纪德信. 脑血管病患者细胞间黏附分子-1 的测定及意义[J]. 中风与神经疾病杂志, 2000, 7(2): 84-85
Zheng Naizhi, Li Xuemei, Ji Dexi, et al. The examination and implication of intercellular adhesion molecule-1 in serum of patients with cerebrovascular disease [J]. Stroke and Nervous Diseases journal, 2000, 7(2): 84-85
- [6] 中华医学会神经科分会,各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 9(6): 379-80.
Neurology Branch of the Chinese Medical Association, Elements of various types of cerebral vascular disease diagnosis[J]. Chinese Journal of Neurology journal, 1996, 9(6): 379-80
- [7] Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) gene expression[J]. Leukoc Biol, 1999, 66:876-888
- [8] Tsakadze NL, Sen U, Zhao Z, et al. Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287: C55-63
- [9] Guo M, Daines D, Tang J, et al. Fibrinogen-gamma C-terminal fragments induce endothelial barrier dysfunction and microvascular leak via integrin-mediated and RhoA-dependent mechanism [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29: 394-400
- [10] Vischer P, Telgmann R, Schmitz B. Molecular investigation of the functional relevance of missense variants of ICAM-1[J]. Pharmacogenetics and Genomics, 2008, 18(11):1017-1019
- [11] Cambi A, Joosten B, Koopman M, et al. Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(10): 4270-4281
- [12] Amoli MM, Mattey DL, Calvino MC, et al. Polymorphism at codon 469 of the intercellular adhesion molecule-1 locus is associated with

- protection against severe gastrointestinal complications in Henoch-Schönlein purpura. [J] Rheumatol, 2001, 28: 1014-1018
- [13] Wee H, Oh HM, Jo JH, Jun CD. ICAM-1/LFA-1 interaction contributes to the induction of endothelial cell-cell separation: implication for enhanced leukocyte diapedesis [J]. Experimental & Molecular Medicine, 2009, 41(5): 341-348
- [14] Rallidis L S, Paschos G, Liakos GK, et al. Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients [J]. Atherosclerosis, 2003, 167(2): 237-242
- [15] Pola R, Flex A, Gaetani E, et al. Synergistic Effect of -174G/C Polymorphism of the Interleukin-6 Gene Promoter and 469 E/K Polymorphism of the Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene in Italian Patients With History of Ischemic Stroke [J]. Stroke, 2003, 34: 881-885
- [16] Kelly A. Volcik, Christie M. Ballantyne, Ron Hoogveen, et al. Incident Ischemic Stroke: Atherosclerosis Risk in Communities Study Intercellular Adhesion Molecule-1 G241R Polymorphism Predicts Risk of [J]. Stroke, 2010, 41: 1038-1040
- [17] 马丽媛, 赵勇, 王兴宇, ICAM-1 基因 Gly 214Arg 多态性与缺血性脑卒中的关系 [J]. 现代诊断与治疗, 2000, 11: 328-329
- Ma Li-yuan, Zhao Yong, Wang Xing-yu, et al. Relationship between ICAM-1 Gene Gly 214Arg Polymorphism and Ischemic Stroke [J]. Modern Diagnosis and Treatment, 2000, 11: 328-329
- [18] Boeardi L, Salvarani C, Casalia B, et al. Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in Behcet's Disease [J]. Rheumatol, 2001, 28: 1283-1287

(上接第 1101 页)

- [17] Miric G, Dallemagne C, Endre Z, et al. Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats [J]. Br J Pharmacol, 2001, 133(5): 687-94
- [18] Sato A, Hayashi K, Saruta T. Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease [J]. Am J Hypertens, 2005, 18(1): 44-9
- [19] Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy [J]. Kidney Int, 2001, 59: 1304-1314
- [20] Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13: 96-107
- [21] Azuma H, Takahara S, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor prevents the development of chronic allograft nephropathy in rats [J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12: 1280-1292
- [22] Yazawa K, Isaka Y, Takahara S, et al. Direct transfer of hepatocyte growth factor gene into kidney suppresses cyclosporin A nephrotoxicity in rats [J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19: 812-816
- [23] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis: The role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor [J]. Kidney Int, 2003, (87): S105-12
- [24] Mou S, Wang Q, Shi B, et al. Hepatocyte growth factor suppresses transforming growth factor-beta-1 and type III collagen in human primary renal fibroblasts [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2009, 25(11): 577-87
- [25] Hills CE, Squires PE. TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy [J]. Am J Nephrol, 2010, 31(1): 68-74
- [26] Yuan J, Jia R, Bao Y. Beneficial effects of spironolactone on glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2007, 8(3): 118-26