

E 选择素基因多态性与新疆哈萨克族患者脑梗死的关系

谢 靖¹ 高慧春² 赵 雯³ 耿玉荣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 832002 2 阜康市人民医院内二科 新疆 阜康 831500 ;

3 伊犁新华医院 新疆 伊犁 835000)

摘要 目的 探讨 E-选择素(E-selectin)基因多态性与新疆哈萨克族患者脑梗死(cerebral infarction, CI)的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)和 DNA 序列测定法检测 103 例 CI 及 110 例对照组 E-selectin 基因第 4 外显子 A561C(S128R)、第 10 外显子 C1839T (L554F) 多态性。结果 E-selectin 基因 S128R 基因型频率和等位基因频率在 CI 组和对照组比较差异有显著性($P < 0.05$), 基因型频率的相对风险分析发现, SR 基因型携带者患 CI 的风险是 SS 基因型的 2.355 倍 ($OR = 2.355, 95\% CI: 1.209 \sim 4.588$) E-selectin L554F 基因型在两组中的分布差异有显著性($\chi^2 = 5.463, P < 0.05$), 基因型频率的相对风险分析, LF 基因型患 CI 的风险是 LL 基因型的 2.315 倍 ($OR = 2.315, 95\% CI: 1.132 \sim 4.737$)。结论 E-selectin S128R 和 L554F 多态性与脑梗死易感性有关; R 等位基因和 F 等位基因可能是新疆哈萨克族 CI 发病的遗传易感基因。

关键词 E-选择素 脑梗死 基因 多态性

中图分类号 R743.3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 06-1102-04

Relationship between Polymorphisms of E-selectin Gene and Kazak Patients with Cerebral Infarction in Xinjiang

XIE Jing¹, GAO Hui-chun², ZHAO Wen³, GENG Yu-rong¹, WANG Hong^{1△}

(1 Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Medical College SHIhezh University, 832002, SHIhezh China;

2 Xinjiang Fukang People's Hospital of the Second Division, 831500, Fukang China; 3 Yili Xinghua hospital, 835000, Yili China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship between polymorphisms of E-selectin gene and cerebral infarction (CI) in Xinjiang Kazakh Group. **Methods:** The S128R polymorphism in the exon 4 and The L554F polymorphism in the exon 10 of E-selectin gene were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis and DNA sequencing among 99 patients with CI of xinjiang Kazakh group and 100 healthy controls. **Results:** There was significant difference in frequencies of allele and genotype in S128R and L554F polymorphism between CI and control groups respectively. The relative risk suffered from IS of SS geno. type was 2.335 times of the SR genotype ($OR = 2.335, 95\% CI: 1.209 \sim 4.588$). The relative risk suffered from LF of LL geno. type was 2.315 times of the SR genotype ($OR = 2.315, 95\% CI: 1.132 \sim 4.737$). **Conclusion:** E-selectin S128R and L554F polymorphism was associated with IS, R and F allele may be a genetic risk factor of IS among Xinjiang Kazakh Group.

Key words: E-selectin cerebral ischemia gene polymorphism

Chinese Library Classification: R743.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 06-1102-04

前言

中风是世界上第二个最常见的死亡原因^[1], 以及是致残的主要原因^[2]。有证据表明, 炎症过程和急性脑梗死有关^[3]。在可以调节炎症细胞因子以及粘附分子的基因中, 它们大部分都具有多态性。E-选择素(E-selectin)是粘附分子家族成员之一, 它与高血压、血脂代谢紊乱、凝血机制异常、动脉粥样硬化形成等脑梗死危险因素密切相关。E-selectin 基因存在着基因变异及基因多态性, 这种基因多态性与多种疾病存在相关性, 在新疆地区的人群中, 尚未进行过 E-selectin (S128R 和 L554F) 基因多态

性与脑梗死风险的关系研究。这促使我们进行本研究, 旨在探索 E-selectin 遗传变异与脑梗死易感性之间的潜在相关性。

1 材料与方法

1.1 对象

1.1.1 脑梗死组 共 103 例, 男 57 例, 女 53 例, 年龄(60 ± 11)岁。患者来自同一地区, 非一二级亲属, 为新疆北疆地区自 2009 年 10 月~2010 年 10 月哈萨克族住院病人, 无血缘关系, 无民族通婚史。诊断符合全国第四届脑血管病诊断标准, 全部病例均经临床及头颅 CT 或 MRI 扫描确诊, 不包括心源性、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。

1.1.2 对照组 共 110 例, 其中男 55 例、女 48 例, 年龄(62 ± 11)岁, 均为健康查体者, 无脑卒中、肝、肾、血液病、自身免疫性疾病、甲状腺病、妊娠和脑血管病史。全部研究对象均来自新疆北疆地区哈萨克族人群, 且无血缘关系。

作者简介 谢靖, 汉, (1979), 男, 住院医师, 硕士研究生, 研究方向 脑血管病

△通讯作者 王宏, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病的研究, 电话 0993-2858492, Email: wang832000@sina.com (收稿日期: 2010-11-12 接受日期: 2010-12-10)

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 两对引物由上海生工生物有限公司合成。用于特异性扩增 E-selectin 基因包含 128 位点的一段 DNA 引物序列为 F 5'-gcggtcccaaaagggtcagtAGGACG-GAGAGACTT-TAACATCA-3',R 5'-gcggtcccaaaagggtcagtG-CATTTCCGAAGCCAGAAGA-3'; 用于特异性扩增 E-selectin 基因包含 554 位点的一段 DNA 引物序列为 F 5'-ATTAGCAT-CAAGGTTTA-GGATAGGT-3' R 5'-TGAAGAAAGAGGCAA-GAACCA-3'。

1.2.2 人类基因组 DNA 提取 采用全血基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)提取。

1.2.3 PCR 扩增条件 E-selectin 的 PCR 扩增反应体系均为 15μ l, 其中含 10× PCR Buffer 1.5μ l,dNTP (2.5mM each) 0.3μ l,引物 P1、P2(50pmol/μ l)各 0.2μ l,模板 DNA0.5μ l,Taq (5U/μ) 0.1μ l,MgCl₂ 1.2μ l, 灭菌双蒸水补 11μ l。扩增包含 S128R 位点目的 DNA 步骤: 热循环仪 (T 加拿大 BBI 公司)中 95℃ 预变性 5 min; 按下列程序循环 20 次, 即 95℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min; 末次循环后,72℃ 延伸 6min。扩增包含 L554F 位点目的 DNA 步骤: 热循环仪(加拿大 BBI 公司) 中 95℃ 预变性 5 min; 按下列程序循环 20 次,即

95℃ 变性 30s,66℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min; 再按下列程序循环 20 次,即 95℃ 变性 30s,68℃ 退火 60s 末次循环后,72℃ 延伸 6min。

1.2.4 扩增产物的限制性酶切 分别取 PCR 扩增产物 10μ l, 10× Buffer R2.0μ l, dH₂O 2.8μ l,(10U/μ l) 限制性内切酶酶切 E-selectin 基因 S128R 位点及 E-selectin 基因 L554F 位点, 37℃ 水浴 12h, 反应终止后, 酶切片段在 2% (S128R) 及 4% (L554F) 琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色,染色后通过凝胶成像系统 (Gene Genius 公司) 判断结果。

1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件包进行分析。基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算,各组间基因型及等位基因频率比较采用四格表 X² 检验,并以比值比(OR)及其 95%(CI) 表示相对风险度。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间数据的比较依据资料的性质,用 t 检验、方差分析。以 P<0.05 为统计学意义。

2 结果

2.1 脑卒中组与对照组一般临床资料的比较

两组在性别和年龄上进行了匹配。高血压病、吸烟、糖尿病在两组间比较差异无显著性(P>0.05)(表 1)。

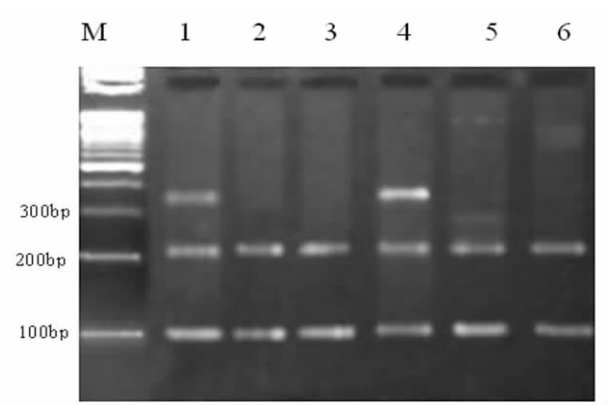
表 1 脑卒中组与对照组一般临床资料
Table 1 Clinical data in stroke patients and control

	Control group	Stroke	p
N	110	103	
Age,years	62± 11	60± 11	0.217
Sex(M/F),n	57/53	55/48	0.818
Diabetes,%	19.1%	28.2%	0.119
Smoking,%	15.5%	22.3%	0.199
Hypertension,%	27.3%	34%	0.28

2.2 E-selectin 基因型分析

E-selectin S128R 基因多态性 PCR 扩增产物片段大小为 326bp,根据限制性内切酶 PstI 酶切片段的情况,基因型有三种,正常纯合子 SS 型 (212 bp,104bp 两条带),杂合子 SR 型(326 bp,212,104bp 三条带),突变纯合子 RR 型(326 bp 一条带,本研究

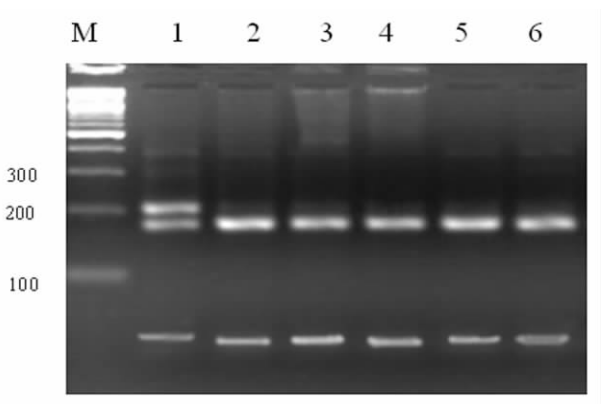
究未检测到) E-selectin L554F 基因多态性 PCR 扩增产物片段大小为 332 bp,根据限制性内切酶 HphI 酶切片段的情况,基因型有三种,正常纯合子 LL 型(163 bp,38 bp 两条带),杂合子 LF 型(201 bp,163 bp,38 bp 三条带),突变纯合子 TT 型(201 bp 一条带,本研究未检测到) (图 1、2)。



M:DI2000 maker; 1,4: Genotype SR;2,3,5,6: Genotype SS

图 1 E-selectin S128R 基因型电泳图结果

Fig 1 Electrophoretic results of E-selectin gene S128R polymorphism



M:DI2000 maker; 1: Genotype LF;2,3,4,5,6: Genotype LL

图 2 E-selectin L554F 基因型电泳图结果

Fig 2 Electrophoretic results of E-selectin gene L554F polymorphism

2.3 E-selectin 基因型与脑梗死的相关性分析

E-selectin 基因型在两组人群中分布频率经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,达到遗传平衡,具有群体代表性。经 X^2 检验及相关分析,E-selectin S128R 基因型在两组中的分布差异有显著性($X^2=6.533, P<0.05$),基因型频率的相对风险分析,SR 基因型患脑梗死的风险是 SS 基因型的 2.355 倍($OR=2.355, 95\%CI: 1.209\sim4.588$) 等位基因频率在两组中存在着显著性

差异 ($X^2=5.703, P<0.05, OR=2.115, 95\%CI: 1.132\sim3.952$) ;E-selectin L554F 基因型在两组中的分布差异有显著性 ($X^2=5.463, P<0.05$),基因型频率的相对风险分析, LF 基因型患脑梗死的风险是 LL 基因型的 2.315 倍 ($OR=2.315, 95\%CI: 1.132\sim4.737$); 等位基因频率在两组中也存在着显著性差异($X^2=4.896, P<0.05, OR=2.215, 95\%CI: 1.077\sim4.194$) (表 2)

表 2 脑卒中组和对照组 E-selectin 等位基因和基因型分布 (%)

Table2 Distribution of E-selectin gene polymorphism between stroke and controls(%)

Genotype or allele	Control group (n=110)	Stroke patients (n=103)	X^2	Pvalue	OR(95% CI)
S128R					
SS	93(84.5%)	72(69.9%)	6.533	0.011	2.355(1.209~4.588)
SR	17(15.5%)	31(30.1%)			
S	203(94.6)	175(88.8%)	5.703	0.017	2.115(1.132~3.952)
R	17(3.4%)	31(11.2%)			
L554F					
LL	96(87.3%)	77(74.8%)	5.463	0.019	2.315(1.132~4.737)
LF	14(12.7%)	26(25.2%)			
L	206(96.8%)	180(87.4%)	4.896	0.027	2.215(1.077~4.194)
F	14(6.4%)	26(13.6%)			

3 讨论

动脉粥样硬化是脑梗死的重要病理基础,最广泛被接受的观点是 Ross^[4]提出的 " 动脉粥样硬化是一种炎症性疾病 " 的学说。近 10 年来,炎症在动脉粥样硬化、免疫等过程中的作用逐渐为我们所认识和重视。炎症机制在介导动脉粥样硬化形成、发展的各个时期中,包括最初的血液循环中的白细胞附壁,到最终不稳定斑块的破裂都发挥了主要作用^[5,6]。E-selectin 由一组碳水化合物结合型蛋白(凝集素)构成,它们在小动脉受损或发炎区域参与白细胞的聚集。E-selectin 分子有利于以下二种细胞之间的相互粘附作用,即白细胞和内皮细胞,它们将导致循环白细胞缓慢下来,并沿着内皮细胞滚动。白细胞的滚动被认为是连续事件中的初始现象,使内皮细胞形成稳固的粘附,接着迁移到内皮下的空间。各种动物模型^[7-9]已经证明,E-selectin 在局灶性脑缺血中为正调节性。有报道说,在人类的缺血性中风急性期时候,E-selectin 在血液中的浓度增加之间,存在较强的分级性非依赖关系^[10]。E-selectin 基因位于第 1 号染色体长臂上,为一段长 13 kb 的 DNA 序列,含 14 个外显子和 13 个内含子。有研究证实 E-selectin 基因第 4 和第 10 外显子分别存在 S/R 和 L/F 多态性,这两种多态性可影响 E-selectin 基因表达,并影响 E-selectin 相关疾病的发生、发展和转归。

哈萨克族 E-selectin 遗传变异和脑梗死易感性之间的相关性方面,资料仍十分缺乏。这促使我们进行本研究。我们的研究表明,脑梗死患者 E-selectin 基因 S128R 多态性分布与正常人

比较差异具有显著性($P<0.05$),其中携带 SR 基因型个体患脑梗死的风险约是 SS 基因型的 2.355 倍。提示 R 等位基可能是哈萨克族脑梗死的遗传易感基因,这与国内外文献报道一致^[11-14]。出现这一结果的可能原因是 E-selectin S128R 基因多态性,可以在功能上改变白细胞内-皮细胞的相互作用。这种单核苷酸多态性加强了白细胞的锚定,同时扩展了经 E-selectin 所募集到的淋巴细胞等的范围^[15]。此外,S128R 介导的内皮细胞(EC)的黏附作用,与野生型 E-selectin 转导的内皮细胞进行比较,前者可以显著增加中性粒细胞和单核细胞更多的滚动和粘附。在细胞外信号调节激酶 1 和 2 以及 p38 丝裂原活化蛋白激酶的磷酸化方面,这些 S128R 介导的内皮细胞的信号传导,也表现出较高水平的磷酸化。这表明,所改变的内皮细胞信号通路与此种多态性相关^[16]。最后,在内毒素诱导组织因子触发凝血的人体模型中,E-selectin S128R 基因型与促凝血作用有关。这可以解释它与各种血栓性心脑血管疾病的关联性^[17]。

而对 E-selectin L554F 多态性基因变异的评估,脑梗死患者 E-selectin 基因 L554F 多态性分布与正常人比较差异具有显著性 ($P<0.05$),其中携带 LF 基因型个体患脑梗死的风险约是 LL 基因型的 2.315 倍。提示 F 等位基可能是哈萨克族脑梗死的遗传易感基因, E-selectin L554F 多态性与动脉粥样硬化之间的关系,已经被报道过^[18],可能反映了增强性炎症响应, Mehran Haidari 等人^[13]研究表明 E-selectin L554F 多态性与脑梗死有关, F 等位基因是脑梗死的独立危险因素。Wenzel 等人^[19]已在体外证实 L554F 多态性影响到蛋白在细胞膜上的锚定,同时通

过这种方式,影响到可溶性蛋白的浓度。因此,在容易形成动脉粥样硬化斑块的地方,E-selectin L554F 等位基因可能增加白细胞在活化内皮细胞中的粘附性,从而促进了动脉粥样硬化的加深。此外,在脑梗死发生后,它们促进了白细胞进入到动脉内皮细胞上。

综上所述,本研究表明,E-selectin 基因 S128R 和 L554F 多态性,和哈萨克族人群中脑梗死的风险具有显著性关联。E-selectin 多态性对脑梗死形成以及发展产生影响,而进一步的研究将揭示这种影响机制 E-selectin 基因多态性与脑梗死的研究才刚起步,还有待进行大样本、多地域、多民族广泛深入的协同研究,将有可能为脑梗死的风险预测、防治和治疗提供一条新的线索和途径。

参考文献(References)

- [1] World Health Organization: The World Health Report 1999[C]. Geneva, World Health Organization, 1999
- [2] American Heart Association: Heart Disease and Stroke Statistics - 2004 Update[C]. Dallas, American Heart Association, 2003
- [3] Kim JS: Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases[J]. Neurol Sci, 1996;137:69-78
- [4] Ross R: Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999,340:115-126
- [5] Shebuski RJ, Kilgoreks, et al. Role of Inflammatory mediators in thrombogenesis[J]. Pharmacol Exp ther, 2002,300(3):729-735
- [6] Blake GJ, Ridker Smith J, et al. Novel clinical markers of vascular Wall inflammation[J]. Circ Res, 2001,89(9):763-771
- [7] Zhang R, Chopp M, Zhang Z, Jiang N. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion [J]. Brain Res, 1998,785:207-214
- [8] Haring HP, Berg EL, Tsurushita N, et al. E-selectin appears in non-ischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia [J]. Stroke, 1996,27:1386-1392
- [9] Wang X, Feuerstein GZ: Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia[J]. Neurotrauma, 1995,12:825-832
- [10] Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes[J]. Stroke, 2003,34:2132-2137
- [11] 王芳,刘荣臻,刘志伟. 血浆 E-选择素及基因 S128R 多态性与山西汉族脑梗死患者的关系[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010,8(5): 549-551
Wang Fang, Liu Rongzheng, Liu Zhiwei. Association of plasma E-selectin S128R gene polymorphisms and cerebral infarction in shanxi han population [J]. Chinese journal of integrative medicine on cardio-/cerebrovascular disease, 2010,8(5): 549-551
- [12] 韦叶生,徐群清,蒙兰青,等. E-选择素基因多态性与广西壮族人缺血性脑卒中的遗传易感性的关系 [J]. 第三军医大学学报, 2005,27(21) 2160-2163
Wei Ye-sheng, Xu Qun-qing, Meng Lan-qing, et al. Polymorphisms of E-selectin gene and genetic susceptibility of ischemic stroke in Zhuang nationality of Guangxi province [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2005,(21):2160-2163(in chinese)
- [13] Hattori H, Sato H, Ito D, et al. A561C polymorphism of E-selectin is associated with ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population without diabetes mellitus and hypercholesterolemia [J] Brain Res, 2006;1108:221-223
- [14] Mehran Haidari, Mehrdad Hajilooi, et al. E-Selectin Genetic Variation as a Susceptibility Factor for Ischemic Stroke [J]. Cerebrovascular Diseases, 2009,28:26-32
- [15] Rao RM, Clarke JL, Ortlepp S, et al. The S128R polymorphism of E-selectin mediates neuraminidase-resistant tethering of myeloid cells under shear flow [J]. Eur J Immunol, 2002;32:251-260
- [16] Rao RM, Haskard DO, Landis RC. Enhanced recruitment of Th2 and CLA-negative lymphocytes by the S128R polymorphism of E-selectin [J]. Immunol, 2002,169:5860-5865
- [17] Jilma B, Marsik C, Kovar F, et al. The single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene is associated with enhanced coagulation during human endotoxemia [J]. Blood, 2005,105: 2380-2383
- [18] Wenzel K, Stahn R, Speer A, et al. Functional characterization of atherosclerosis-associated Ser128Arg and Leu554Phe E-selectin mutations [J]. Biol Chem, 1999,380:661-667
- [19] Wenzel K, Ernst M, Rohde K, et al. DNA polymorphisms in adhesion molecule genes - a new risk factor for early atherosclerosis [J]. Hum Genet, 1996,97:15-20