

# 甘肃地区汉族和回族脑出血患者 $\alpha$ -内收蛋白基因 rs4963 多态性分析

范红燕 司江华 彭小兰 严雯 谢守嫔 范彩霞

**【摘要】** 目的 分析甘肃地区汉族和回族脑出血患者  $\alpha$ -内收蛋白基因 rs4963 多态性的分布情况。方法 对甘肃地区汉族和回族脑出血患者各 176 例应用血液基因组 DNA 提取试剂盒方法检测  $\alpha$ -内收蛋白基因 rs4963 多态性,比较 rs4963 多态性的分布差异。结果 汉族组和回族组  $\alpha$ -内收蛋白基因 rs4963 基因型分布、等位基因频率均无明显差异( $P>0.05$ );按性别分层后汉族组与回族组基因型分布和等位基因频率仍均无明显差异( $P>0.05$ )。结论  $\alpha$ -内收蛋白基因 rs4963 多态性在甘肃地区汉族和回族脑出血人群中无民族差异。

**【关键词】** 脑出血  $\alpha$ -内收蛋白基因 甘肃地区 汉族 回族

**【中图分类号】** R743.34 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)05-0436-03

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.05.013

**The analysis of ADD1 gene rs4963 polymorphisms between Hanzu and Huizu populations with cerebral hemorrhage in Gansu** Fan Hongyan\*, Si Jianghua, Peng Xiaolan, et al. \* Department of Gerontology, The First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730050

**【Abstract】 Objective** To investigate the genetic polymorphisms in the ADD1 gene rs4963 (C/G) polymorphisms in patients with cerebral hemorrhage(CH) from Han nationality and Hui minority populations in Gansu province, China. **Methods** A total of 352 subjects (176 Hanzu and 176 Huizu patients) were collected from Gansu residents. The DNA was extracted by blood genomic DNA extraction kit, and the tag SNP rs4963 polymorphisms of ADD1 gene was detected by Tm-shift genotyping method for all subjects. **Results** The results showed the genotype and allele frequency of rs4963 were not significantly different between Hanzu and Huizu CH patients( $P>0.05$ ). The stratification analysis of gender indicated that the genotype and allele frequency of rs4963 were not significantly different between Hanzu and Huizu CH patients( $P>0.05$ ). **Conclusion**

The genetic polymorphisms in ADD1 gene rs4963 were not significantly different between Hanzu and Huizu CH patients in Gansu Province, China.

**【Key words】** Cerebral hemorrhage ADD1 gene Gansu Hanzu Huizu

种族是遗传学研究中不可忽略的因素,不同种族人群具有不同的遗传背景,基因多态性的差异造成了对疾病易感性的差异。甘肃是少数民族聚集较多的省份,尤其是回族。社会、饮食、自然等因素使甘肃回族形成遗传学上相对隔离的人群,成为非常珍贵的遗传资源。脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是一种多因素疾病,受遗传和环境因素共同作用的影响<sup>[1-4]</sup>,严重威胁人类的生命健康。 $\alpha$ -内收蛋白基因(ADD1 基因)是目前研究较多的钠离

子转运调控基因,多聚焦于其与高血压病的相关性<sup>[5-6]</sup>。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<sup>[7-8]</sup>,但其与 ICH 的关联尚不明确。鉴于人类基因多态性在不同地区和种族间的差异,本研究旨在探讨甘肃地区世居回族和汉族 ICH 患者 ADD1 基因 rs4963 多态性的分布情况。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

在知情同意的基础上选取 2013 年 1 月~2015 年 12 月在兰州市第一人民医院、兰州大学第一医院、兰州军区兰州总医院神经内科就诊的汉族和回

基金项目:兰州市卫生科技发展计划项目(LZWSKY2014-2-01)

作者单位:730050 兰州市第一人民医院干部病房(范红燕),神经内科(司江华(通信作者) 彭小兰 严雯 谢守嫔 范彩霞]

族 ICH 患者(各 176 例)的临床资料及外周血标本。入组研究对象祖籍均为中国甘肃地区(居住 3 代以上),3 代内无族外通婚、彼此间无直接血缘关系,性别、年龄匹配,无脑血管疾病家族史,无其他遗传疾病。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<sup>[7]</sup>)。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。2 组间年龄和性别均无明显差异( $P>0.05$ )。

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 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(The International Hap Map Project)数据库([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap24\\_B36/](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap24_B36/))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;索 ADD1 基因获得 tag SNP rs4963;提取 DNA 样本浓度稀释到 10 ng/ $\mu$ 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  $\mu$ 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;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'-GCGGGCAGGGCG-GC-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'-GATTACCG-3'),分别命名为长引物、短引物;上游长引物序列为 5'-gcgggcagggcggc GAGAGGAAGCAGAAGGGCTG-3',短引物序列为 5'-gattaccg GAGAGGAAG-CAGAAGGGCTC-3',下游引物序列为 5'-GTGC-CCAGGACCACAAGCAC-3';PCR 反应体系为 10  $\times$  PCR 缓冲液(10  $\times$  PCR buffer)1.25  $\mu$ L、SYBR Green I 染色剂(4  $\times$ )0.625  $\mu$ L、二甲基亚砜(DMSO,10%)1.25  $\mu$ L、三磷酸脱氧核苷(d NTP,2.5

mmol/L)2  $\mu$ L、ASP-长引物(ASP-long primer,10  $\mu$ mol/L)0.25  $\mu$ L、ASP-短引物(ASP-short primer,10  $\mu$ mol/L)0.25  $\mu$ L、共同引物(Common primer)0.25  $\mu$ L、DNA 模板 1  $\mu$ L、Taq gold 酶(5 U/ $\mu$ L)0.06  $\mu$ L,添加超纯水(dd H<sub>2</sub>O)至 12.5  $\mu$ L;PCR 扩增程序为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。进入溶解曲线分析程序: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,结合溶解曲线峰形分型,峰值在前的溶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 统计学处理

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 统计软件对组间数据差异进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较使用 t 检验,组间计数资料比较使用  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 H-W 遗传平衡检验 ADD1 基因 rs4963 基因型分布符合遗传平衡定律( $P>0.05$ )。回族组和汉族组 ADD1 基因 rs4963 的基因型分布、等位基因频率均无明显差异( $\chi^2$  分别为 0.93 和 0.71,  $P>0.05$ )(表 1)。

2.2 按性别分层后回族组和汉族组的基因型分布及等位基因频率的比较 不同性别中 ADD1 基因的基因型分布仍符合遗传平衡定律( $P>0.05$ ),回族组与汉族组的基因型分布(男  $\chi^2 = 4.46, P = 0.09$ ;女  $\chi^2 = 2.83, P = 0.17$ )均无明显差异;回族组与汉族组的等位基因频率(男  $\chi^2 = 0.63, P = 0.54$ ;女  $\chi^2 = 3.04, P = 0.09$ )也均无明显差异(表 2)。

表 1 ADD1 基因 rs4963 基因型分布及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
回族组	43(24.4%)	88(50.0%)	45(25.6%)	174	178
汉族组	45(25.6%)	87(49.4%)	44(25.0%)	177	175

表2 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
男性回族组	20	49	26	89	101
男性汉族组	24	43	29	91	101
女性回族组	23	42	18	88	78
女性汉族组	21	39	22	81	83

3 讨论

遗传学研究认为,不同种族人群具有不同的遗传学特征,而环境与遗传因素相互作用可影响人体对某些疾病的易感性。甘肃是一个多民族聚集地,回族是仅次于汉族的第二大民族,具有较高的 ICH 发病风险。这种高风险考虑除受人群封闭居住、不良生活饮食习惯和生活状况影响外,还考虑回族和汉族可能存在 ICH 的易感基因。

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  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基或  $\alpha$  亚基和  $\gamma$  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 基因与高血压病的关系的研究较多,但结论却不一致,而高血压病是脑出血最重要的危险因素。有 2 项研究报道发现 ADD1 基因 Gly460Trp 多态性与原发性高血压病无相关性,且这 2 项研究均包含 1 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,推测其原因有可能是未能收入当前所有的关于 ADD1 基因 Gly460Trp 多态性与高血压病的关联研究<sup>[5,8]</sup>。龚敏莉等<sup>[9]</sup>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 多态性与高血压病无相关性。日本学者 Watanabe<sup>[10]</sup>对正常血压的日本人群进行了 12 年的随访研究,发现 Gly460Trp 与高血压病的发生相关,且经过 logistic 多元回归校正后发现 Gly460Trp 仍能独立预测高血压病的进展风险。

本研究结果显示,ADD1 基因 rs4963 多态性在甘肃地区回族、汉族的 ICH 患者中的分布差异无统计学意义( $P>0.05$ ),表明 ADD1 基因 rs4963 多态

性可能在汉族和回族 ICH 发病中无显著区别。进一步以性别为分层因素分析 rs4963 基因位点在回族、汉族 ICH 患者中的分布,结果仍然为阴性。但是本研究具有局限性,因为遗传学研究需要大量研究样本,每一种疾病可能有很多基因相互作用,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或样本量所含信息量不足有关。此外,还有环境因素的影响。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] Catto AJ. Genetic aspects of the hemostatic system in cerebrovascular disease[J]. Neurology, 2001, 57(5, 2): S24-S30.

[2] Srivastava Kamna, Sundriyal Ruchi, Meena C, 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.

[3] Zhang na, Ji dan, Fei juan, et al. Association between polymorphisms of alpha-adducin gene and essential hypertension in Chinese population[J]. Biomed Res Int, 2013; 451094.

[4] Reddy K, Labhasetwar Vinod. Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury[J]. FASEB J, 2009, 23(5): 1384-1395.

[5] Ramu P, Umamaheswaran G, Shewade DG, 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.

[6] 李哲, 王丹, 李翠丽, 等. 山西地区血管紧张素原基因和  $\alpha$ -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.

[7] 中华医学会神经病学分会. 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.

[8] 龚敏莉, 郝玲妹, 范瑞, 等.  $\alpha$ -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, 2015, 23(9): 667-671.

[9] Watanabe Yumiko, Metoki Hirohito, Ohkubo Takayoshi, et al. Accumulation of common polymorphisms is associated with development of hypertension: a 12-year follow-up from the Ohasama study[J]. Hypertens Res, 2010, 33(2): 129-134.

[10] 杨艳, 肖玉娟. 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): 72-73, 74.

(2016-12-30 收稿)