

DDAH2C-449G 基因多态性与动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的相关性

刘洁 王前 郭艳敏 卢军栋 齐凡星

【摘要】 目的 探讨 DDAH2C-449G 基因多态性与动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死 (atherothrombotic infarct of brain) 的关系。**方法** 共纳入 345 例脑梗死患者和 201 例对照人群,以 DDAH2C-449G 基因为遗传标志,采用聚合酶链式反应 (PCR) 和限制性片段长度多态性技术 (RFLP) 检测 DDAH2C-449G 基因多态性。**结果** 动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死 GG 基因型、G 等位基因频率较对照组高 ($P < 0.05$)。**结论** DDAH2C-449G 基因多态性可能与动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死发病有关,G 等位基因可能是动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的易感基因。

【关键词】 AIS 遗传 基因 DDAH2C-449G 聚合酶链反应

【中图分类号】 R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)02-0088-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.02.004

Relationship between dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2C-449G gene polymorphism and atherothrombotic cerebral infarction Liu Jie, Wang Qian, Guo Yanmin, et al. First Central Hospital of Baoding, Baoding 071000

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2C-449G Gene and atherothrombotic cerebral infarction. **Methods** A total of 345 patients with ischemic stroke and 201 controls were enrolled in the study. DDAH2C-449G gene was chosen as the genetic marker. Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to detect DDAH2 gene polymorphism. **Results** GG genotype and G allele frequency in atherothrombotic cerebral infarct group were higher than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** DDAH2C-449G gene polymorphism may be related to the incidence of atherothrombotic cerebral infarction. G allele may be the predisposing gene of atherothrombotic cerebral infarction.

【Key words】 Atherothrombotic cerebral infarction Genetics Gene DDAH2C-449G Polymerase chain reaction

近年来有研究报道,脑梗死患者的血浆中非对称性二甲基精氨酸 (ADMA) 水平增高,并且其增高的水平与高血压病、高血糖和高脂血症等危险因素呈正相关,这提示了 ADMA 与脑梗死有重要关系^[1]。

有研究表明 90% 以上体内的 ADMA 经二甲基精氨酸二甲胺水解酶 (DDAH) 代谢,该酶的量 and 活性与 DDAH2 基因的多态性密切相关。研究发现,糖尿病、高血压病和高脂血症患者的血浆 ADMA 水平增高与 DDAH2 的转录、表达和基因多态性密切相关^[2,3]。本研究对保定地区汉族人群 DDAH2C-449G 基因多态性的分布进行研究,以探

讨 DDAH2C-449G 基因多态性与动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 4 月~2013 年 3 月在保定市第一中心医院神经内科住院的脑梗死患者 345 例,其中男 256 例,女 89 例,年龄 40~90 岁,平均年龄 (58.75 ± 10.11) 岁,均经头颅核磁共振成像 (MRI) 检查确诊为脑梗死,诊断均符合 1995 年全国第四届脑血管病学术会议修订的诊断标准^[4]。对照组 201 例,来自保定市第一中心医院体检中心体检健康人群,其中男 112 例,女 89 例,年龄 43~88 岁,平均年龄 (59.45 ± 8.21) 岁,与脑梗死组的年龄、性别相匹

配,无脑血管病家族史,排除肝肾疾病、血液病、自身免疫性疾病、妊娠等疾病。所有研究对象均来自保定地区汉族人群,无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 收集 2 组血糖、血压及血脂水平。

1.2.2 基因组 DNA 的提取及聚合酶链反应 (PCR) 取空腹 12 h 静脉血 5 mL,肝素抗凝,常规酚/三氯甲烷抽提法提取基因组 DNA。使用 Primer3 引物分析软件设计 DDAH2C-449G 引物,上游引物: 5'-GCGGAGAGAG GATGCTTAAC-3',下游引物: 5'-GCT CCT GTC GAC CTC ACT CT-3'。PCR 反应体系: 总体积为 25 μ L,模板 DNA 1 μ L,10 \times 缓冲液 2.5 μ L, Tap 酶 0.5 μ L (1U),引物分别为 1 μ L (20 pmol), dNTP 0.5 μ L (10 mmol/L),用双蒸水补足至 25 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后以下列温度和时间循环 35 次: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min。

1.2.3 限制性片段长度多态性分析 取 PCR 扩增产物 10 μ L,加入内切酶 HpaII 1 μ L (10 U/ μ L), 10 \times Buffer 2 μ L,用双蒸水补足至 31 μ L 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜,取酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶板上 0.5 \times TBE 电泳缓冲液电泳检测酶切产物 (110 V, 30 min),用 Eagle EyeII 型图像分析处理系统观察电泳产物并拍照。

1.2.4 基因型判定 DDAH2C-449G 片段扩增酶切产物: PCR 扩增的 DDAH2 基因片段为 389 bp 的 DNA 片段,经 HpaII 限制性内切酶消化后可产生 3 种基因型,即 GG 型,酶切后仅有 389 bp 片段; GC 型,酶切后有 3 条片段: 389、243、146 bp; CC 型,酶切后有两条片段: 243、146 bp (图 1)

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件,应用拟和优度检验分析两组对象基因型频率的分布是否符合 Hardy-Weinberg (H-W) 平衡; DDAH2 基因型及等位基因计数用直接计数法,并计算基因频率,两组间基因频率比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

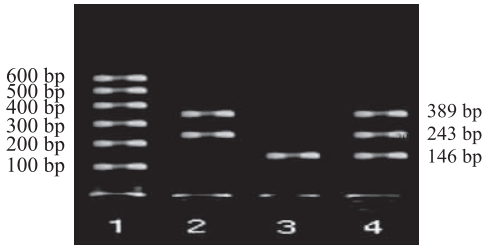


图 1 DDAH2 基因 C-449G PCR 产物酶切后电泳图谱

2 结 果

2.1 2 组临床指标比较 脑梗死组的 HDL-C 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$); 与对照组相比,脑梗死组血脂中的 TG、TC、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$); 脑梗死组的血糖及 SBP 和 DBP 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 脑梗死组与对照组 DDAH2C-449G 多态性分布比较

脑梗死组 GG 基因型、G 等位基因频率较对照组高 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 脑梗死组与对照组 DDAH2C-449G 基因型频率和等位基因频率比较

组别	n	基因型[例数(%)]			等位基因频率[%]	
		GG	GC	CC	G	C
脑梗死组	345	168(48.7)*	144(41.7)*	33(9.6)	0.696*	0.304
对照组	201	66(32.8)	107(53.2)	32(16.0)	0.594	0.406

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

3 讨 论

DDAH2 基因位于 6p 21.3 上,有 8 个外显子和 7 个内含子。Jones 等研究发现,DDAH2 存在 6 个核苷酸多态性位点,5 个位于启动子区,1 个位于外显子上,分别为 -1415G/A、-1151C/-1020C/G、-8716G/7G、-449C/G、618C/T。-1415G/A、-1151C/A、-449C/G 的多态性在 NCBI SNP 数据库中编号分别是 rs227259、rs805304、rs805305。除 -8716G/7G 外,所有多态性均为点突变。TATA 盒能准确识别转录起点并促进转录,同时对转录水平

表 1 脑梗死组和对照组的血脂、血压、血糖水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	FBS (mmol/L)
脑梗死组	345	1.71 \pm 1.38*	4.87 \pm 1.23*	2.86 \pm 0.88*	1.16 \pm 0.38*	155 \pm 26*	89 \pm 15*	6.1 \pm 2.32*
对照组	201	1.57 \pm 1.34	4.35 \pm 1.21	2.55 \pm 0.63	1.51 \pm 0.29	123 \pm 18	76 \pm 11	5.3 \pm 1.32

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

有定量效应。由于 DDAH2 上游区域无 TATA 盒,启动子区核苷酸突变虽不能完全抑制启动子活性但使其活性降低。DDAH2 基因的多态性影响 DDAH2 基因的转录、表达和 DDAH 的活性。Jones 等发现 DDAH2 基因 - 8716G/7G 基因多态性影响 DDAH 的基础转录,7G 基因型上调 DDAH2 转录活性,降低 ADMA 水平,具有心血管保护效应。

ADMA 是以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,由蛋白质甲基转移酶(PRMT)催化蛋白质或多肽中的精氨酸胍基甲基化,然后在蛋白水解酶的作用下,由甲基化蛋白水解而来。ADMA 小部分经肝脏代谢和肾脏排泄,90%以上经二甲甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)代谢为胍氨酸和二甲胺。临床研究表明,败血症、高血压、高血脂和糖尿病患者的血浆 ADMA 浓度增高与 PRMT 活性增高和肝肾功能不全无明显相关,而与 DDAH2 的转录、表达和活性密切相关。DDAH 酶的催化活性部位是一个 cys-his-glu 三连体结构,DDAH 通过其第 249 位半胱氨酸残基上亲核的巯基攻击 ADMA 胍基上的氮代谢 ADMA。

Jun-Hyun Yoo 等^[5]报道,血清 ADMA 水平增高与脑梗死发病密切相关,血浆 ADMA 升高是动脉粥样硬化一氧化氮依赖性内皮功能不全的早期标志,是心脑血管事件的独立预测因子^[6],而 DDAH2C-449G 基因多态性影响其血浆水平。有研究表明,高水平的 ADMA 不仅与 L-精氨酸竞争内皮一氧化氮合酶以阻止内皮一氧化氮合成,导致一氧化氮依赖的内皮功能不全,血管张力增加,白细胞和血小板粘附、聚集,血管平滑肌增殖,而且其本身还诱导和促进机体产生自由基,参与内皮的“炎症因子瀑布”反应。ADMA90%以上经 DDAH 代谢为胍氨酸和二甲胺^[7]。本研究从遗传角度出发,探讨 DDAH2C-449G 基因多态与脑梗死的相关性。

本研究发现 DDAH2 基因 C-449G 多态性与脑梗死有关,G 等位基因可能是脑梗死的易感基因。本实验推测 DDAH2 基因 C-449G 位点多态性通过调节血浆 ADMA 的水平而影响脑梗死的发生。(1)动脉粥样硬化是动脉粥样硬化性脑梗死的病理基础,ADMA 可能通过以下途径促进其发展:① ADMA 作为内源性 NOS 抑制剂,使 NO 合成减少、导致 NO 依赖性内皮功能不全,促进脑梗死的发生发展;② ADMA 水平的升高与机体自由基增加所导致的氧应激有关,而增加的 ADMA 又能通过 NOS 失偶联产生更多的自由基,从而形成一个恶性循环,

加速内皮功能损伤及促进血管性疾病发展;③ ADMA 水平与 TNF- α 、C-反应蛋白等传统炎症因子存在明显关联,被认为是内皮炎症因子的潜在诱导物;(2)本研究结果显示脑梗死患者组中 SBP 和 DBP 水平均高于对照组($P < 0.05$),这可能是由于高血压使动脉内膜内皮细胞间的连续性中断,内皮细胞回缩,使内皮下的组织暴露,促进和加重脑动脉粥样硬化;(3)本研究结果显示脑梗死患者组中 TG、TC、LDL-C 水平明显高于对照组($P < 0.05$),而 HDL-C 水平明显低于对照组($P < 0.05$),脑梗死组的血糖水平显著高于对照组($P < 0.05$),这可能由于高血糖、高血脂症均能抑制 DDAH 酶的活性,使 ADMA 水平升高;ADMA 通过抑制一氧化氮合酶,使一氧化氮合成减少,生物利用度降低,内皮功能下降,导致血管内皮依赖性血管舒张作用减弱和血管张力增高,血管壁增厚和血管内膜增生,从而加重脑动脉粥样硬化^[8]。因此,降低脑梗死患者血浆 ADMA 水平,从而阻断其病理生理作用,对于防治脑梗死具有重要的理论和实践意义。

上述研究结果由于样本量小、入选标准、实验设计差别、不同人种、地区差异等因素的影响。所以本研究结论有待于更大量样本的试验研究加以验证。

参 考 文 献

- [1] Nishiyama Y, Ueda M, Katsura KI et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a possible risk marker for ischemic stroke[J]. *Neuro Sci*, 2010, 290(1/2): 12-15.
- [2] Andreozzi F, Presta I, Mannino GC, et al. A functional variant of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 gene is associated with insulin sensitivity[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36224.
- [3] Lueneburg N, Maas R, Lieb W, et al. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension[J]. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 2008, 19(S): S40.
- [4] 李黎, 韩莉娜, 霍富元, 等. 2012 年广州市海珠区居民脑卒中患病率及相关危险因素调查分析[J]. *热带医学杂志*, 2013, 13(6): 712-715.
- [5] Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke[J]. *Atherosclerosis*, 2001, 158(2): 425-430.
- [6] Wilson AM, Shin DS, Weatherby C, et al. Asymmetric dimethylarginine correlates with measures of disease severity, major adverse cardiovascular events and all-cause mortality in patients with peripheral arterial disease[J]. *Vascular Medicine*, 2010, 15(4): 267-274.
- [7] Tran CT, Fox MF, Vallance P, et al. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins[J]. *Genomics*, 2000, 68(1): 101-105.

(2015-12-10 收稿 2015-12-27 修回)