

脂联素基因多态性与北方汉族人群缺血性脑卒中易感性关系研究

陈小良 程锦泉 张仁利 刘建平 李晓霞 童叶青 耿艺介

【摘要】 目的 探讨脂联素基因多态性与北方汉族人群缺血性脑卒中易感性的关系。方法 采用荧光定量 PCR 的 TaqMan 探针方法检测 357 例缺血性脑卒中首发病例及 345 名健康对照的脂联素基因(rs2241766、rs266729)多态性,用 logistic 回归分析计算各基因型与缺血性脑卒中的相关性。结果 总体人群中 rs2241766 等位基因 T>G 突变增加了缺血性脑卒中的易感性($OR=1.55$, $P=0.01$);调整各因素后,多因素 logistic 回归分析仍为缺血性脑卒中的危险因素($OR=1.55$, $P=0.00$)。rs266729 多态性与总体人群缺血性脑卒中易感性无关($OR=1.13$, $P=0.57$),但在女性中 GG 纯合突变增加了缺血性脑卒中的易感性($OR=3.25$, $P=0.04$)。结论 rs2241766 基因多态性与北方汉族总体人群缺血性脑卒中的易感性相关;rs266729 等位基因 GG 纯合突变可能是北方汉族女性缺血性脑卒中易感性的危险因素。

【关键词】 缺血性脑卒中;脂联素;基因多态性

Study on the relationship between polymorphism of adiponectin gene and risk of ischemic stroke among Han population in the Northern parts of China CHEN Xiao-liang¹, CHENG Jin-quan², ZHANG Ren-li², LIU Jian-ping², LI Xiao-xia³, TONG Ye-qing², GENG Yi-jie². 1 Department of Epidemiology and Statistics, the College of Public Health of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2 Shenzhen Center for Disease Control and Prevention; 3 Mudanjiang Medical University
Corresponding author: CHENG Jin-quan, Email: cjinquan@vip.sohu.com

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30771852)

【Abstract】 **Objective** To explore the association between polymorphisms of adiponectin gene and the risk of ischemic stroke in Han population from the Northern parts of China. **Methods** TaqMan probe of RT-PCR was applied to detect the genotype frequency of single nucleotide polymorphism (SNPs) (rs266729 and rs2241766) of adiponectin gene in 357 ischemic stroke cases who developed the episode at first time and with 345 healthy controls. Logistic regression analysis was used to evaluate the relationship of each genotype of SNPs and ischemic stroke. **Results** Mutation of rs2241766 (T>G) increased the risk of ischemic stroke among all the samples ($OR=1.55$, $P=0.01$) and it was still the risk factor of ischemic stroke when analyzed by multi-factors logistic regression after each factor was adjusted ($OR=1.55$, $P=0.00$). The polymorphism of rs266729 was not related to the risk of ischemic stroke among all the samples ($OR=1.13$, $P=0.57$). However, the genotype GG of rs266729 increased the risk of ischemic stroke among female population ($OR=3.25$, $P=0.04$). **Conclusion** The variance of rs2241766 in adiponectin gene was related to the risk of ischemic stroke in Han population from the Northern parts of China and the genotype GG of rs266729 could possibly increase the risk of ischemic stroke in women of Han population from the Northern parts of the country.

【Key words】 Ischemic stroke; Adiponectin; Polymorphism

脂联素是调节体内糖脂代谢的重要生物活性肽,并在一定条件下影响炎症因子的释放与趋化作

用^[1]。现阶段研究证明脂联素是影响 2 型糖尿病易感性的重要因素,研究发现脂联素基因,如-11377C>G、-3971A/G、+45T>G、+276G/T、-11391G>A 等位点多态性与 2 型糖尿病易感性相关^[2-4]。这可能与脂联素基因位点多态性改变了脂联素表达水平从而影响体内糖脂代谢相关。缺血性脑卒中是中老年人致死致残的主要危险因素;动脉粥样硬化是导致缺血性脑卒中发生的主要因素,动脉粥样硬化在一定

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.02.003

基金项目:国家自然科学基金(30771852)

作者单位:450001 郑州大学公共卫生学院流行病与统计学教研室(陈小良);深圳市疾病预防控制中心(程锦泉、张仁利、刘建平、童叶青、耿艺介);牡丹江医学院(李晓霞)

通信作者:程锦泉,Email: cjinquan@vip.sohu.com

程度上是由体内糖脂代谢紊乱所引起。脂联素水平与脑卒中的5年存活率相关^[5];并且发现 rs266729、rs182052多态性与脑卒中的易感性相关^[6];这提示脂联素基因多态性与缺血性脑卒中存在关联。为此本研究对脂联素基因2位点多态性与缺血性脑卒中易感性的关系进行了初步研究。

对象与方法

1. 研究对象:选择2007年6月至2008年12月在黑龙江省牡丹江市第一、第二人民医院和牡丹江红旗医院住院的35~75岁汉族缺血性脑卒中首发病例为病例组。诊断标准参照中华神经科学会第四届全国脑血管学术会议修订的“各类脑血管疾病诊断要点(1995)”,由2名神经内科医师根据临床神经功能缺损表现和头部CT(MRI)检查确诊;并排除瓣膜性心脏病、房颤、血液病、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤、自身免疫性疾病等引起的继发性脑卒中患者。对照组为与病例同种族来自相同地区的35~75岁的体检健康者,均排除脑血管疾病患病史;对照以10岁为一个年龄组共四组,每组性别构成比与病例组相同并保持研究对象数量与病例组尽量一致。

2. 资料收集:运用成组病例对照研究设计方案,用自制的调查问卷对入选的研究对象进行调查,调查内容主要包括:研究对象的人口学资料、既往病史及家族史、个人行为危险因素、环境暴露史及心理危险因素等;调查过程中所有研究对象均签署知情同意书,并有专人负责数据质控。

3. 实验室研究:

(1)血液样本:受检者空腹12~15 h于次日晨8:00时抽取外周静脉血5 ml,分置于含有2%乙二胺四乙酸二钠5 ml的一次性试管中,共2管;1管1 ml用于DNA抽提;另1管4 ml用于血浆和淋巴细胞分离。

(2)全基因组DNA提取:用AXYGEN公司的全血基因组DNA提取试剂盒抽提DNA;其后用核酸检测仪检测其浓度和纯度。DNA存放于-80℃低温冰箱。

(3)多态位点基因型检测:采用荧光定量PCR的TaqMan探针法分别对脂联素基因的多态位点rs2241766、rs226729的基因型进行检测,预期扩增片段在300 bp左右。位点的上、下引物和探针(由上海超世生物科技有

限公司合成)见表1。反应体系为:Premix Ex Taq™ 2×(DRR039B,大连宝生物工程有限公司产品) 5.0 μl、上、下游引物(20 μmol)各0.3 μl、探针-MAR及探针-JUP(20 μmol)各0.1 μl、ddH₂O 3.7 μl、模板DNA 0.5 μl,共计10 μl。PCR反应条件:95℃预变性10 s,95℃5 s和60℃32 s共40个循环。反应在荧光定量PCR仪ABI7500上进行并由系统软件根据荧光强度自动分辨所检测位点基因型。

4. 统计学分析:数据用SAS 9.0软件进行分析,等位基因的频率采用直接计数法,计数资料的比较采用χ²检验,两组计量资料的比较采用t检验,三组以上计量资料采用方差分析,如果方差不齐则采用非参数检验;并采用logistic回归分析脂联素基因多态性与缺血性脑卒中的关系。

结 果

1. 一般情况:采用成组病例对照研究设计入选病例组357例及对照组345名;病例组平均年龄为(63.64±11.10)岁,对照组平均年龄为(53.70±9.05)岁;两组年龄差异有统计学意义(P=0.00)。入选样本人群中男女性别比为1.5:1;两组性别比无差异。病例组中高血压、糖尿病患病率(52.10%, 16.25%)高于对照组(33.33%, 8.40%),组间差异有统计学意义(P=0.00, P=0.00)。但在心脏病方面病例与对照组间患病情况的差异无统计学意义(P=0.75)。另外,两组间文化水平(P=0.00)、腰臀围比(P=0.00)、经常饮茶(P=0.00)、参加体育锻炼(P=0.00)、TG水平(P=0.00)及LDL-C(P=0.02)差异均存在统计学意义(表2)。

2. 遗传平衡检验:用Haploview软件对对照组中脂联素基因多态位点rs2241766、rs266729的基因型分布频率进行连锁平衡分析,位点rs2241766的HWp为0.08,MAF为0.20;另一位点rs266729的HWp为0.162,MAF为0.25。2位点基因型分布频率都符合Hardy-Weinberg定律。

3. 多态位点基因型及频率分布:在人群中脂联素基因多态位点rs2241766的基因型为GG、TG、TT;位点rs266729的基因型则为GG、CG、CC。在病例与对照组中2位点的三种基因型都存在,各基因型分布频率见

表1 研究的位点引物和探针

多态位点	引物序列(5'~3')	探针序列
Rs2241766	正 CTGTTGCTGGGAGCTGTCTAC	AG-t MAR-TGCCCGGTTCATGACCA-MAR
	反 GGCCCTTGAGTCGTGGTTT	AG-g JUP-TGCCCGGGCATGACC-JUP
Rs266729	正 TCATCAGAATGTGTGGCTTGC	AG-g MAR-TCAGATCTGCGCTTC-MAR
	反 TTGGACTTCTTGGCAGCT	AG-c JUP-TCAGATCTGCCCTTCA-JUP

表 2 研究对象一般人口学特征及相关因素分布

变量	病例组 (n=357)	对照组 (n=345)	F 值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	63.64 ± 11.10	53.70 ± 9.05	168.72	0.00
性别(男)	215	210	0.03	0.86
文化程度(初中及以上)	264	297	16.10	0.00
BMI(≥ 25 kg/m ²)	131	150	3.36	0.07
WHR (男性 ≥ 0.9 , 女性 ≥ 0.8)	290	313	13.05	0.00
有高血压病史	186	115	24.89	0.00
有糖尿病病史	58	29	10.20	0.00
有心脏病病史	62	45	0.10	0.75
吸烟	73	87	2.26	0.13
饮酒	74	56	2.35	0.13
饮茶	50	150	74.80	0.00
参加体育锻炼	117	150	8.53	0.00
发生负性生活事件	186	115	1.61	0.21
TG(mmol/L)	2.04 ± 1.50	1.60 ± 1.07	18.00	0.00
TC(mmol/L)	4.81 ± 1.49	5.06 ± 0.87	1.00	0.32
LDL-C(mmol/L)	3.03 ± 1.20	2.51 ± 0.58	5.54	0.02

表 3 脂联素基因 2 多态位点的基因型与缺血性脑卒中关系分析

基因型	病例组	对照组	P 值	OR 值(95%CI)
rs2241766*				
GG	36(10.4)	18(5.4)	0.01	2.30(1.26 ~ 4.17)
TG	117(33.9)	95(28.4)	0.04	1.41(1.01 ~ 1.97)
GG+GT	153(44.3)	113(33.8)	0.01	1.55(1.14 ~ 2.12)
TT	192(55.7)	221(66.2)	1.00	1
rs266729*				
GG	35(11.0)	24(7.9)	0.17	1.48(0.84 ~ 2.58)
GC	108(34.1)	104(34.2)	0.78	1.05(0.75 ~ 1.48)
GG+CG	143(45.1)	128(42.1)	0.57	1.13(0.82 ~ 1.55)
CC	174(54.9)	176(57.9)	1.00	1

注: * rs2241766 以 TT 基因型为参照基因型, rs266729 以 CC 型为参照基因型; 括号外数据为人数, 括号内数据为百分比(%)

男性位点 rs2241766 其基因型 GG+GT 增加缺血性脑卒中易感性(OR=1.57); 而在女性该位点基因型 GG(OR=2.79)增加了缺血性脑卒中易感性; 另外位点 rs266729 其基因纯合突变可能是增加缺血性脑卒中易感性的影响因素(OR=3.25)。见表 4。

6. 多因素 logistic 回归分析: 采用多因素 logistic 回归模型筛选危险因素, 以分类变量有无缺血性脑卒中为因变量, 将单因素分析中 $P < 0.05$ 的所有变量作为自变量放入多因素 logistic 回归模型中主要包括: 脂联素基因位点基因型、年龄、WHR、高血压病史、糖尿病患病史、饮茶、文化水平、体育锻炼、TG 等, 在调整上述因素后, rs2241766 基因型 T>G 突变仍是缺血性脑卒中易感危险因素其 OR 值为 1.55(表 5)。

讨 论

本研究表明, 脂联素基因位点 rs2241766 其等位基因 T>G 突变与北方汉族人群缺血性脑卒中易感性存在显著相关; 另一位点 rs266729 其等位基因 C>G 突变与北方汉族女性缺血性脑卒中易感性相关。对缺血性脑卒中的相关因素进行多因素 logistic 回归分析, rs2241766 其等位基因 T>G 突变仍是北方汉族人群缺血性脑卒中发生的独立危险因素(OR=1.55)。

表 3。对 2 位点基因型频率进行趋势检验, rs2241766 三基因型分布频率在病例与对照组间的分布差异有统计学意义($P=0.00$); 但 rs266729 三基因型分布频率的差异在两组间无统计学意义($P=0.25$)。

4. 基因型与缺血性脑卒中关系: 分别以 TT、CC 基因型作为 rs2241766 和 rs266729 的参照基因型, 采用 χ^2 检验分别计算脂联素多态位点 rs2241766 的等位基因型 GG、GT 及 GG+GT 以及位点 rs266729 的等位基因型 GG、CG 和 GG+CG 对比其参照基因型的 OR 值及 95%CI, 分析 2 位点各基因型同缺血性脑卒中的关联; 位点 rs2241766 其等位基因 G 突变增加了缺血性脑卒中的易感性(OR=1.55), 并且 GG 纯合突变的 OR 值达 2.30; 但 rs266729 其基因型分布频率在病例与对照组间不存在差异(表 3)。

5. 多态位点基因型与缺血性脑卒中关系: 把研究对象按性别分层后, 2 位点三基因型在两分层中均存在, 各位点基因型分布频率见表 4; 采用趋势检验分别统计位点 rs2241766 的 GG、GT、TT 基因型分布频率及位点 rs266729 的 GG、CG、CC 基因型分布频率在按性别分层后各病例对照间的分布差异, 其中位点 rs224176 基因型频率在不同性别中其分布差异都存在统计学意义(男 $Z=-2.23$, $P=0.03$; 女 $Z=-2.13$, $P=0.03$); 而位点 rs266729 则无统计学意义(男 $Z=-0.46$, $P=0.65$; 女 $Z=-1.38$, $P=0.17$)。按上述分析策略, 分析不同性别中 2 多态位点其基因型与缺血性脑卒中的关联,

表 4 按性别分层后脂联素基因 2 多态位点的基因型与缺血性脑卒中关系

基因型	男性				女性			
	病例	对照	P 值	OR 值(95%CI)	病例	对照	P 值	OR 值(95%CI)
rs2241766*								
GG	21	12	0.06	2.05(0.97 ~ 4.36)	15	6	0.04	2.79(1.03 ~ 7.56)
TG	70	56	0.08	1.47(0.95 ~ 2.26)	47	39	0.27	1.35(0.80 ~ 2.27)
GG+GT	91	68	0.03	1.57(1.05 ~ 2.35)	62	45	0.09	1.53(0.94 ~ 2.51)
TT	115	135	1.00	1	77	86	1.00	1
rs266729*								
GG	22	20	0.73	1.12(0.58 ~ 2.18)	13	4	0.04	3.25(1.01 ~ 10.40)
CG	70	65	0.67	1.10(0.71 ~ 1.70)	38	39	0.93	0.97(0.56 ~ 1.69)
GG+CG	92	85	0.63	1.10(0.74 ~ 1.65)	51	43	0.52	1.19(0.71 ~ 1.99)
CC	101	103	1.00	1	73	73	1.00	1

注: * rs2241766 以 TT 基因型为参照基因型, rs266729 以 CC 基因型为参照基因型

**表 5 脂联素基因多态性与缺血性脑卒中关系
多因素 logistic 回归分析结果**

变量	F 值	P 值	OR 值(95%CI)
rs2241766* T>G 突变	7.91	0.00	1.55(1.14 ~ 2.11)
年龄	64.29	0.00	1.09(1.06 ~ 1.11)
文化水平 ^a	1.60	0.21	0.90(0.74 ~ 1.07)
WHR	7.53	0.00	0.48(0.28 ~ 0.81)
有高血压病史 ^a	8.73	0.00	1.78(1.21 ~ 2.60)
有糖尿病病史 ^a	0.18	0.67	1.14(0.63 ~ 2.07)
饮茶 ^a	29.95	0.00	0.30(0.19 ~ 0.46)
体育锻炼 ^a	19.27	0.00	0.40(0.27 ~ 0.60)
TG	8.22	0.00	1.25(1.07 ~ 1.11)
LDL-C	3.71	0.06	1.10(1.00 ~ 1.21)

注：^a TT 型赋值为 1、TG 型赋值为 2、GG 型赋值为 3；^b 初中及以上文化水平、没有高血压病史、没有糖尿病史、经常饮茶、经常参加体育锻炼分别赋值为 1；而初中以下文化水平、有高血压病史、有糖尿病史、不饮茶、不参加体育锻炼则分别赋值为 2

脂联素是体内白色脂肪组织分泌的生物活性肽，包含 4 个功能区：信号肽、氨基端非螺旋功能区、胶原重复序列和羧基端，后者可能参与 C 端球状功能结构域的形成；单聚体和三聚体是脂联素生物活性形式或受体亲和配基。脂联素在整个机体都有分布，主要集中在肝脏和骨骼肌中。在肝脏中脂联素与受体 2 结合调节肝糖的输出和胰岛素的敏感性；在骨骼肌中脂联素可增强胰岛素刺激后胰岛素受体和胰岛素受体底物-1(IRS-1)的磷酸化，从而增加骨骼肌细胞的脂肪酸氧化、葡萄糖摄取和乳酸生成^[7,8]。另外脂联素通过与受体结合后激活或抑制一系列信号通道降低单核细胞的黏附作用、抑制 PDGF-BB 诱导的血管平滑肌增殖与迁移及抑制 TNF 的生成与释放，维持内皮细胞正常功能和抗动脉粥样硬化^[9-10]。这些是脂联素影响缺血性脑卒中发生的重要机制。目前与脂联素存在关联的疾病甚多，主要有 2 型糖尿病、肥胖、肾病、肿瘤及心血管疾病等。

脂联素基因位于 3q27，含 3 个外显子和 2 个内含子，位点 rs2241766 位于脂联素基因第二外显子区，参与编码脂联素第 15 号氨基酸，其等位基因 T>G 突变为同义突变，不影响脂联素功能^[11]；但等位基因 T>G 突变可能影响到基因的转录或翻译而影响脂联素水平的表达^[12]。位点 rs266729 位于脂联素基因启动子区，其等位基因 C>G 突变可能会稍微降低启动子活性而减少脂联素的表达^[13]。本研究发现 rs266729 其等位基因 C>G 突变增加了北方汉族女性缺血性脑卒中易感性，rs2241766 其等位基因 T>G 突变是北方汉族人群缺血性脑卒中的危险因素，可能与上述机制有关。但 Hegener 等^[6]的研究发现，rs266729、rs182052 多态性与美国人群缺血性脑卒中易感性相关，并构建了由 rs266729、rs182052、rs822396 组成的单型体，而 rs2241766 多态性与缺血

性脑卒中易感性无关联。该结论与本研究结论存在差异；这可能与脂联素基因表达有关，基因表达受环境和基因共同影响，不同种族与生活环境可能是影响差异性结果的主要因素。

本研究未对研究对象的脂联素水平以及脂联素基因表达水平进行检测，也未对研究对象脂联素水平与缺血性脑卒中易感性进行研究，因此不能明确脂联素基因多态性、脂联素水平及缺血性脑卒中之间的关联，对脂联素基因多态性与缺血性脑卒中关系研究只能停留在关联阶段；另外受样本量的限制，本研究结论还需要后续大样本量研究来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Bi N. Study progression of the construction and function of adiponectin — a new fatty factor. Chin J Arterioscler, 2005, 13 (4): 520-522. (in Chinese)
毕楠. 一个新的脂肪因子——脂联素的结构与功能的研究进展. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(4): 520-522.
- [2] Kim MJ, Maaichi M, Debard C, et al. Increased adiponectin receptor-1 expression in adipose tissue of impaired glucose-tolerant obese subjects during weight loss. Eur J Endocrinol, 2006, 155(1): 161-165.
- [3] Staiger K, Stefan N, Staiger H, et al. Adiponectin is functionally active in human islets but does not affect insulin secretory function or β -cell lipoptosis. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(12): 6707-6713.
- [4] Yan WL, Chen SF, Huang JF, et al. Common SNPs of APM1 gene are not associated with hypertension or obesity in Chinese population. Biomed Environ Sci, 2006, 19(3): 179-184.
- [5] Efsthathiou SP, Tsioulos DI, Tsiakou AG, et al. Plasma adiponectin levels and five-year survival after first-ever ischemic stroke. Stroke, 2005, 36(9): 1915-1919.
- [6] Hegener HH, Lee IM, Cook NR, et al. Association of adiponectin gene variations with risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: a nested case-control study. Clin Chem, 2006, 52 (11): 2021-2027.
- [7] Staiger H, Kaltenbach S, Staiger K, et al. Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. Diabetes, 2004, 53(9): 2195-2201.
- [8] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev, 2005, 26(3): 439-451.
- [9] Kim SM, Cho KH, Park HS. Relationship between plasma adiponectin levels and the metabolic syndrome among Korean people. Endocr J, 2006, 53(2): 247-254.
- [10] Patel JV, Abrahim A, Dotsenko O, et al. Circulating serum adiponectin levels in patients with coronary artery disease: relationship to atherosclerotic burden and cardiac function. J Intern Med, 2008, 264(6): 593-598.
- [11] Wang Y, Wang T, Zhong HT. An association research of adiponectin gene SNP45 T/G polymorphism and type 2 diabetes mellitus. Progress Modern Biomedicine, 2008, 8(1): 84-86. (in Chinese)
王艳, 王涛, 钟洪涛. 脂联素基因 SNP45T/G 多态性与 2 型糖尿病相关性研究. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 84-86.
- [12] Chung HK, Chae JS, Hyun YJ, et al. Influence of adiponectin gene polymorphisms on adiponectin level and insulin resistance index in response to dietary intervention in overweight-obese patients with impaired fasting glucose or newly diagnosed type 2 diabetes. Diabetes Care, 2009, 32(4): 552-558.
- [13] Yang M. Molecular hereditary study of type 2 diabetes in Han population of Beijing. Beijing: Peking Union Medical University, 2003. (in Chinese)
杨敏. 北京市汉族人群 2 型糖尿病的分子遗传学研究. 北京: 中国协和医科大学, 2003.

(收稿日期: 2009-07-21)
(本文编辑: 尹廉)