

· 论 著 ·

口服避孕药和基因多态性与不同类型脑卒中关系的初步探讨

陈建锋 李瑛 周建伟 王心如

【摘要】 目的 探讨使用复方口服避孕药(COC)与不同类型脑卒中发生的关系,以及遗传易感因素在服药妇女发生脑卒中的过程中作用。方法 选取 111 例女性脑卒中患者,用基因多态性分析法观察凝血因子 V Leiden 突变(G1691→A)、凝血酶原基因多态性(G20210→A)和血管紧张素转化酶(ACE)基因多态性(I/D)的分布。运用病例-病例研究的方法分析危险因素在出血性和缺血性脑卒中之间的差异。结果 与未使用 COC 妇女相比,服药妇女发生出血性脑卒中的危险要显著高于缺血性脑卒中($OR = 3.03$)。体质指数 $\geq 24 \text{ kg/m}^2$ 与缺血性脑卒中的联系强于出血性脑卒中($OR = 2.99$)。基因多态性分析未能找到 G1691→A 和 G20210→A 突变,D 型 ACE 等位基因频率在缺血性脑卒中组中略高,但无显著性。结论 结果提示口服避孕药可能与出血性脑卒中有关,而未见与 G1691→A 和 G20210→A 突变以及 ACE 基因 I/D 多态性有相关性。

【关键词】 口服避孕药;脑卒中;病例-病例研究;基因

A study of relationship between oral contraceptives and gene polymorphism and types of stroke CHEN Jianfeng*, LI Ying, ZHOU Jianwei, et al. *School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the relationship between combined oral contraceptives (COC) taking and differential types of stroke, together with the role of the susceptible genetic factors associated with the onset of stroke in women using pills. **Methods** Case-case study was used. A total of 111 female patients with stroke were selected and with questionnaires filled in and blood samples collected. The distributions of coagulative factor V Leiden mutation (G1691→A), prothrombin gene mutation (G20210→A) and angiotensin converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion (I/D) polymorphism were observed. Differences of genetic and nongenetic risk factors between hemorrhagic and ischaemic stroke were compared. **Results** Women using pills had a higher risk developing hemorrhagic than ischaemic stroke ($OR = 3.03, P < 0.05$), comparing with those never used pills. The strength of association between body mass index (BMI) $\geq 24 \text{ kg/m}^2$ and ischaemic stroke was much greater than it between BMI and hemorrhagic stroke ($OR = 2.99, P < 0.05$). No mutation of G1691→A or G20210→A was found. The deletion allele frequency of ACE gene was slightly higher in ischaemic stroke group, but with no statistic significance. **Conclusion** The results suggested that possible association existed between the use of COC and the onset of hemorrhagic stroke, however the mutations of G1691→A in factor V gene, G20210→A in prothrombin gene and I/D polymorphism of ACE gene did not seem to contribute to this association.

【Key words】 Oral contraceptives; Stroke; Case-case study; Gene

口服避孕药(COC)是否增加脑卒中的危险性,这一直是避孕药安全性评价中存有争议的问题。最近 WHO 作了一项多国家、多中心的有关避孕药不良反应的大型病例对照研究^[1],结果表明,口服避

孕药的妇女如果年龄大于 35 岁,或同时有吸烟、患高血压等心血管疾病危险因素,患脑卒中的危险性显著增加。国内在这方面的深入研究不多,对于服用 COC,尤其是长期服用 COC 与不同类型脑卒中的关系,尚未见有详细的报道。我们收集江苏太仓、如东两地发生脑卒中的妇女,采取病例-病例研究方法进行分析,并初步探讨了基因多态性在这其中所起的作用,旨在进一步澄清 COC 对脑卒中可能的危险。

基金项目 国家“九五”科技攻关项目(96-904-03-06)

作者单位 210029 南京医科大学公共卫生学院生殖毒理室(陈建锋、周建伟、王心如)江苏省计划生育科学技术研究所流行病学研究中心(李瑛)

对象与方法

1. 研究对象 :1997 年 7 月 1 日至 2000 年 6 月 30 日为病例收集期限。按使用 COC 比例在 15% 以上的要求 ,在太仓、如东两地共选择 25 个乡镇作为病例监测收集区域。对象选择标准 :两地区凡是 1932 年 7 月 1 日以后出生 ,在收集期限内首次发生脑卒中(包括蛛网膜下腔出血、脑梗死和脑出血)的妇女 ,经 CT 确诊 ,均被列为研究对象。

2. 资料收集方法 :中专以上的医护人员 ,经培训合格后作为表格调查人员和随访人员。调查内容包括个人一般情况、疾病史、职业情况、吸烟史、饮酒史、饮茶史、饮食情况、生活起居及居住情况、月经生育史、家族史等。调查同时由专人负责数据的质控 ,以保证资料的完整可靠。

3. 实验室研究方法 :

(1) 基因组 DNA 的提取 :每位研究对象采集外周静脉血 4 ml 并置 -20℃ 保存 ,待全部样本收齐后集中处理。低渗法分离白细胞 ,常规蛋白酶 K 消化后酚-氯仿抽提法提取 DNA^[2]。

(2) 目的基因片段的扩增 :按文献报道设计各引物 ,序列及退火温度见表 1。应用热循环仪(Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480)扩增 ,总体积 50 μ l ,基因组 DNA 0.2 μ g ,引物终浓度 0.2 μ mol/L ,dNTPs 终浓度 0.2 mmol/L ,Taq 酶 1.5 U ,其余按常规聚合酶链反应(PCR)产物应用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

(3) 基因片段长度多态性的分析 :取 10 μ l PCR 产物 ,分别用 HindⅢ 5 U 和 Mnl Ⅰ 1 U ,于 37℃ 酶切 5 h。之后用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察凝血酶原基因扩增产物 ,而凝血因子 V 基因扩增产物酶切结果用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳观察。我们同时取凝血因子 V 基因和凝血酶原基因突变阳性的样品(荷兰 Leiden 大学 Vos 教授馈赠)与检测样品同步操作 ,以排除酶切过程中的假阴性。ACE 基因多态

性直接以 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。

4. 资料统计分析方法 :全部资料经审查无误后 ,用 Epi 6.0 软件录入 ,并进行交叉检查和逻辑校对 ,采用 SPSS 软件包进行资料运算。单因素分析和多因素 logistic 回归分析的结果用比值比(OR)和 95% 可信限(CI)来表示。基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律及组间等位基因频率差异的比较用 χ^2 检验。

结 果

研究期限内共发生了 264 例脑卒中患者 ,死亡 92 例 ,另有 61 例未能收集到标本(脑出血 31 例 ,脑梗死 21 例 ,蛛网膜下腔出血 10 例) ,该部分病例的各亚型比例及平均年龄与收集到的病例相比差异无显著性。在收集到的 111 例病例中 ,蛛网膜下腔出血 15 例 ,脑出血 49 例 ,脑梗死 47 例。由于蛛网膜下腔出血例数较少 ,因此将患者分为出血性与缺血性两种 ,其中缺血性脑卒中占 42.34% ,出血性脑卒中占 57.66%。缺血平均年龄(58.02 \pm 7.18)岁 ,高于出血组(54.89 \pm 9.02)岁 ,组间差异有显著性($t = 1.97$, $P < 0.05$)。

1. 使用 COC 的种类和时间 :111 例患者中有 50 例为服用 COC 者 ,占 45.05% ,使用种类以国产 1 号避孕片(复方炔诺酮片)为主 ,共 38 例 ,占服药总数的 76% ;其余为 0 号片 2 例 ,复方 18 甲 4 例 ,探亲 1 号 1 例 ,混用(1 号片 + 0 号片或 1 号片 + 复方 18 甲)3 例 ,2 例用药情况不详。服用时间超过 60 个月的有 34 例 ,占服药总数的 68%。

2. 多元 logistic 回归分析 :在单因素分析中 ,除使用 COC 与出血性脑卒中有联系以外(OR = 3.03 ,95% CI 1.27 ~ 7.29 , $\chi^2 = 7.67$, $P < 0.01$) ,体质指数(BMI ,kg/m²) $\geq 24^{[6]}$ 与缺血性脑卒中呈现强的联系(OR = 2.99 ,95% CI 1.17 ~ 7.75 , $\chi^2 = 6.47$, $P = 0.01$) ,而脑卒中其他可能的一些危险因素 ,如高血压、高血脂、糖尿病、生活紧张程度、口味偏咸

表 1 所用引物序列及扩增时的退火温度

| 名 称 | 染色体位置 | | 引 物 序 列 | 退火温度(℃) |
|------------------------------|-------------|-----|---------------------------------|---------|
| 凝血因子 V ^[3] | 1q23 ~ 1q24 | 有义链 | 5'-TGCCAGTGCTTAAACAAGACCA-3' | 50 |
| | | 反义链 | 5'-TGTTATCACACTGGTGCTAA-3' | 55* |
| 凝血酶原 ^[4] | 11p11 ~ q12 | 有义链 | 5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3' | 57 |
| | | 反义链 | 5'-GAGTGCTCGGACTACCAAGCGTGC-3' | |
| 血管紧张素转化酶(ACE) ^[5] | 17q23 | 有义链 | 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' | 55 |
| | | 反义链 | 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTGACAT-3' | |

* 凝血因子 V 扩增时先以 50℃ 5 个循环后再以 55℃ 30 个循环

等在两组患者中差异并无显著性($P > 0.05$)。在 logistic 回归模型中将变量逐一进行筛选,最后进入模型的变量为服用 COC 和 $BMI \geq 24$,服用 COC 与出血性脑卒中的联系仍几乎为缺血性的 3 倍($OR = 2.93$, $95\% CI$ 1.28 ~ 6.72, $\chi^2 = 6.48$, $P = 0.011$)。

3. 使用 COC 时间与妇女脑卒中分析 :与从未使用 COC 相比,服用 COC 发生出血性脑卒中的危险性较发生缺血性脑卒中大,且随着使用年限的增加而有增大的趋势,特别是在使用 15 年以上这种趋势更为明显($OR = 10.16$),见表 2。同时,在停药时间的分析中,能观察到在停药以后服用 COC 对出血性脑卒中的影响仍持续存在,随着停药时间的延长这种效应虽有降低,但仍存在较强的联系($OR > 2.0$)。

表 2 使用 COC 时间与妇女脑卒中的关系

| 因 素 | 脑卒中例数 | | OR 值 | OR95% CI | 趋势检验 | |
|---------|-------|-----|-------|------------|----------|--------|
| | 出血性 | 缺血性 | | | χ^2 | P 值 |
| 服用时间(月) | | | | | | |
| (不服用) | 28 | 33 | 1.00 | | | |
| 1~ | 8 | 7 | 1.35 | 0.38~4.81 | | |
| 60~ | 9 | 5 | 2.12 | 0.56~8.37 | 11.56 | <0.001 |
| 180~ | 18 | 2 | 10.61 | 2.07~72.65 | | |
| 停药时间(月) | | | | | | |
| (不服用) | 28 | 33 | | | | |
| 1~ | 11 | 2 | 6.48 | 1.19~46.47 | | |
| 60~ | 11 | 6 | 2.16 | 0.63~7.64 | 4.07 | 0.043 |
| 180~ | 13 | 6 | 2.55 | 0.77~8.78 | | |

4. 凝血因子 V 基因和凝血酶原基因的聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)分析 :凝血因子 V 基因 PCR 扩增片段长度为 267 bp,用 Mnl I 酶切后可得到 37 bp、67 bp 和 163 bp 三个片段,若存在突变,则只有 67 bp 和 200 bp 两个片段。若个体为突变纯合子,电泳只出现两个片段;突变杂合子则出现 37 bp、67 bp、163 bp 和 200 bp 四个片段。凝血酶原基因 PCR 扩增片段长度为 455 bp,若存在 G20210→A 突变,则将形成一个内切酶 Hind III 的酶切位点,酶切后可得到 322 bp 和 123 bp 两个片段,否则不被酶解。若个体为突变纯合子,电泳只出现两个片段;突变杂合子则出现 123 bp、322 bp 和 455 bp 三个片段。我们对全部患者进行了这两项基因分析,电泳结果均显示为正常条带,提示所有的被研究妇女个体均不存在这两项基因多态性。而我们对阳性样品的 PCR-RFLP 分析结果均与预期相符,证实了 PCR 反应的特异性和限制性内切酶酶切反应的可靠性。

5. ACE 基因 I/D 多态性分析。ACE 基因经 PCR 扩增后电泳可呈现为三种条带之一:纯合子插入型(II 型,490 bp);纯合子缺失型(DD 型,190 bp);杂合子插入/缺失型(I/D 型,490 bp/190 bp)。ACE 等位基因频率及基因型分布见表 3。两组 ACE 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律(出血性脑卒中组 $\chi^2 = 0.05$, $P > 0.05$;缺血性脑卒中组 $\chi^2 = 0.19$, $P > 0.05$),表明两组样本均来自同一群体。缺血性脑卒中组 D 型等位基因频率(0.50)高于出血组(0.41),但差别无显著性($\chi^2 = 1.4$, $P = 0.24$)。

表 3 ACE 等位基因频率及基因型在两组患者中的分布

| 插入/缺失多态性 | 出血性(n = 64) | 缺血性(n = 47) |
|----------|---------------|---------------|
| 基因型 | | |
| II | 23 | 11 |
| ID | 30 | 25 |
| DD | 11 | 11 |
| 等位基因频率 | | |
| I | 0.59 | 0.50 |
| D | 0.41 | 0.50 |

讨 论

在流行病学研究中,为探讨不同临床类型与疾病的其他危险因素之间的关系和相互作用,可以采取两亚组直接比较,按病例对照研究的方式处理资料,因而称之为病例-病例研究(case-case study)^[7],此时不另设对照组,这样可免除从无研究疾病的对照组中去收集资料特别是生物标本的麻烦。本研究正是用这种研究方法,将收集的脑卒中病例分为出血性与缺血性,研究两组之间危险因素的差异部分,而其相同或近似的危险因素将被掩盖或低估,这样就能比普通病例-对照给出更多的信息与线索,为避孕药不良反应监测提供进一步的依据和参考。

WHO 研究认为^[8],现在使用 COC 与缺血性脑卒中的 OR 值在欧洲组和发展中国家组均接近 3.0;与出血性脑卒中的 OR 值分别为 1.76($95\% CI$ 1.34 ~ 2.30)和 1.38($95\% CI$ 0.84 ~ 2.25),但在年龄 ≥ 35 岁的妇女中两组 OR 值均上升至 2.0 以上,其他研究也有类似的结果。而本次研究结果与以上资料并不一致,无论是单因素分析还是多因素分析,使用 COC 与出血性脑卒中的联系均为缺血性脑卒中的近 3 倍,而且呈现随使用时间延长而增加的效应。本研究中两组之间其他危险因素,如高血压、脑卒中家族史、高血脂以及发生负性事件等均无明显差别,说明并不存在这些因素的干扰。

我们的研究对象与其他资料相比,有以下特点:

①服药年限长。50 名服药妇女中,连续服药 5 年以上的占 68%,连续服药 15 年以上的有 20 名(40%)。②年龄偏大。研究对象平均年龄超过 55 岁,未绝经者有 14 例(12.61%),发病时正在服药者仅 2 例,占服药总数的 4%。因此本研究对象主要表现的是长期服用 COC 且停药后的效应,而 WHO 及其他研究的对象主要是正在服药的青年女性(平均年龄 < 40 岁)。Vessey^[9]认为现在服药与缺血性脑卒中的相对危险度为 5.0 左右,停药后这种危险性无明显增加,但无论是现在服药或是过去服药,妇女得出血性脑卒中的相对危险度均为 1.5 左右。本研究由于样本有限未作停药与正在服药组的比较,但可以看出,停药后 5 年内服药与出血性脑卒中的相关性较缺血性脑卒中差别最大,随着时间延长,甚至停药 15 年后这种效应仍持续存在。这其中原因何在,尚需作进一步的研究。

许多研究认为 ACE 基因是心血管疾病的重要候选基因,该基因由于其 16 内含子存在 287 bp 的插入/缺失(I/D)多态性,其基因型表现为 II、ID 和 DD。Tiret 等^[10]研究显示个体间血浆 ACE 活性的 28%~44% 归因于 ACE I/D 多态性。含有 D 等位基因的 plasma ACE 活性明显增高,从而引起肾素-血管紧张素系统的一系列反应,最终对心血管系统产生不利影响。本研究的结果表明缺血性脑卒中组的 D 型等位基因频率高于出血性脑卒中组,但可能是由于样本量较小而未达到显著性水平。

国外对遗传易感因素的研究主要集中在凝血因子 V Leiden 突变(G1691→A)^[3]和凝血酶基因突变(G20210→A)^[4],认为它们主要与静脉血栓形成有关,而与脑卒中的关系并不确定。有报道该两突变在正常人群中发生率为 3%~5%,而在经过选择的病例中发生率分别达到 40% 和 18%,且它们与口服避孕药具有强烈的协同作用^[11]。国内在这方面的报道不多,因此,为求证这两基因突变对我国妇女发生脑卒中有何影响,我们对 111 例脑卒中妇女全部作了基因多态性分析,然而在保证分析特异性和可靠性的条件下,未见到一例存在基因突变,提示这两个基因突变对我国妇女脑卒中的发生可能并不起作用。但是我们也应该考虑到可能在中国妇女中存在着其他位点突变或其他基因突变与脑卒中有关^[12],这需要作全基因筛选,以达到寻找中国妇女脑卒中遗传危险因素的目的。

本研究结果提示,使用国产避孕 1 号片在停药后与出血性脑卒中的联系高于缺血性脑卒中,并随服用年限的增加而增高,特别是服用 15 年以上这种差异最为显著;在停药后 5 年内差别较为明显。缺血性脑卒中组的 D 型 ACE 等位基因频率高于出血性脑卒中组,但并未达到显著性水平,在所有病例中未能检测到 G1691→A 和 G20210→A 突变,说明这三个遗传基因多态性在服避孕药妇女发生脑卒中过程中所起的作用不大,何种遗传易感因素在起作用以及作用的大小尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Ischaemic stroke and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study. *Lancet*, 1996, 348:498-505.
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 14-19.
- 3 Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein c. *Nature*, 1994, 369:64-67.
- 4 Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 1996, 88:3698-3703.
- 5 Rigat B, Hubert C, Corvol P, et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene. *Nucl Acids Res*, 1992, 20:1433.
- 6 沈稚舟.肥胖症.见:陈灏珠,主编.实用内科学.第 10 版.北京:人民卫生出版社,1997. 872.
- 7 徐德忠,李良寿.绪论.见:徐德忠,主编.分子流行病学.第 1 版.北京:人民军医出版社,1998. 14.
- 8 WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Haemorrhagic stroke, overall stroke risk, and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study. *Lancet*, 1996, 348:505-510.
- 9 Vessey MP. The Jephcott Lecture, 1989. An overview of the benefits and risks of combined oral contraceptives. In: Mann RD, ed. Oral contraceptives and breast cancer. The Implications of the Present Findings for Informed Consent and Informed Choice. Camforth, Lancashire, England: Parthenon Publishing Group, 1990. 121-132.
- 10 Tiret L, Rigat B, Visvikis S, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*, 1992, 51:197-205.
- 11 Martinelli I, Sacchi E, Landi G, et al. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med*, 1998, 338:1793-1797.
- 12 乐玮,于金德,陆林,等.凝血因子 V 多态性、活性与冠心病关系的研究. *中华心血管病杂志*, 2000, 28:22-26.

(收稿日期 2000-10-10)

(本文编辑:张林东)