

白三烯 A4 水解酶基因多态性与缺血性脑卒中的关联研究

武轶群 李帅 刘括 唐迅 方凯 李娜 李劲 吴涛 陈大方 胡永华

【摘要】 目的 探讨白三烯 A4 水解酶(LTA4H)基因多态性与缺血性脑卒中(IS)及其亚型的关联性。方法 采用表型不一致同胞对研究设计,分析 4 个 LTA4H 基因单核苷酸多态性位点(rs2072512、rs2540489、rs2540500 和 rs6538697)与 IS 及其亚型的关联关系。采用广义估计方程(GEE)进行多因素分析,采用条件 logistic 回归模型和以家系为基础的关联检验(FBAT)进行关联分析。结果 对 234 个家系所组成的 356 对表型不一致同胞对进行分析,发现高血压、糖尿病、高脂血症的患病情况与 IS 的发病风险存在相关。各位点与 IS 的关联分析发现,在加性和隐性模型下,rs2540489 基因型与 IS 的关联具有统计学意义,G 等位基因是保护因素(加性模型 $OR=0.62$, $95\%CI:0.41 \sim 0.94$; 隐性模型 $OR=0.48$, $95\%CI:0.23 \sim 1.02$);rs2540489 基因型与大动脉粥样硬化型(LAA)IS 的关联具有统计学意义,G 等位基因是保护因素(加性模型 $OR=0.48$, $95\%CI:0.24 \sim 0.95$; 隐性模型 $OR=0.25$, $95\%CI:0.07 \sim 0.93$);在调整年龄、性别等其他因素后,以上关联关系仍然存在。结论 LTA4H 基因 rs2540489 位点多态性与大动脉粥样硬化型 IS 存在关联。

【关键词】 脑卒中;缺血性;白三烯 A4 水解酶;单核苷酸多态性;遗传流行病学

Study on the association between leukotriene A4 hydrolase gene polymorphism and ischemic stroke Wu Yiqun¹, Li Shuai¹, Liu Kuo¹, Tang Xun¹, Fang Kai¹, Li Na², Li Jin¹, Wu Tao¹, Chen Dafang¹, Hu Yonghua¹. 1 Department of Epidemiology and Biostatistics, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 2 Fangshan Science and Technology Committee
Corresponding author: Hu Yonghua, Email: yhhu@bjmu.edu.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81172744, No. 81230066) and Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20120001120029).

【Abstract】 **Objective** To investigate the association between polymorphism of leukotriene A4 hydrolase (LTA4H) gene among ischemic stroke patients and the related subtypes in the discordant sib pairs. **Methods** Families including ischemic stroke patients and their siblings were recruited. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) of LTA4H as rs2072512, rs2540489, rs2540500 and rs6538697 were selected. Generalized estimating equation (GEE) was used to adjust for in-family correlation in the analysis of discordant sib pairs. Conditional logistic regression model and family based association test (FBAT) were both used to test the associations of LTA4H gene with ischemic stroke and its subtypes. **Results** In total, data from 356 discordant sib pairs from 234 ischemic stroke patient pedigrees were analyzed. Results of GEE showed that hypertension, diabetes mellitus and hyperlipidemia were associated with ischemic stroke. According to the association test results, rs2540489 G allele was found to be associated with ischemic stroke, both in the additive model ($OR=0.62$, $95\%CI:0.41-0.94$) and in the recessive model ($OR=0.48$, $95\%CI:0.23-1.02$). For two main ischemic stroke subtypes, rs2540489 G allele was found to be associated with large-artery atherosclerosis stroke in the additive model ($OR=0.48$, $95\%CI:0.24-0.95$) and in the recessive model ($OR=0.25$, $95\%CI:0.07-0.93$). After adjusting age, sex and other factors, the associations mentioned above, still existed. **Conclusion** rs2540489 polymorphism in LTA4H gene seemed to be associated with large-artery atherosclerosis stroke.

【Key words】 Ischemic stroke; Leukotriene A4 hydrolase; Single nucleotide polymorphism; Genetic epidemiology

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.08.003

基金项目:国家自然科学基金(81172744, 81230066);教育部博士点基金(20120001120029)

作者单位:100191 北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(武轶群、李帅、刘括、唐迅、方凯、李劲、吴涛、陈大方、胡永华);北京市房山区科学技术委员会(李娜)

通信作者:胡永华, Email: yhhu@bjmu.edu.cn

脑卒中是导致全球人口死亡和伤残调整生命年的第三位原因,在亚洲排名第一^[1]。在发展中国家,由脑卒中死亡和残疾所导致的经济和社会负担尤为严重^[2]。缺血性脑卒中(IS)占全部脑卒中发病的80%^[3],是由环境和遗传因素共同作用所导致的复杂疾病,动脉粥样硬化是其重要危险因素。由白三烯(leukotrienes, LT)介导的各类型炎症反应与动脉粥样硬化密切相关^[4-5]。白三烯A4水解酶(LTA4H)作为LT生成过程中一种重要的限速酶,通过催化白三烯A4转化为白三烯B4,进而提升单核细胞趋化能力,通过参与动脉粥样硬化病变而对IS的发病产生影响。目前有关LTA4H基因与IS关联性研究结果不一,可能与人群分层、表型异质性、样本量及分析方法等诸多因素有关。为此本研究采用表型不一致同胞对(discordant sib pairs, DSP)研究设计,在IS家系中探讨LTA4H基因多态性与IS及其亚型的关系。

对象与方法

1. 研究对象:采用先证者引荐法^[6],以北京市房山区IS病例及其父母或同胞组成的家系为研究对象。先证者入选标准:①年龄 ≥ 18 周岁;②具有明确的IS诊断,且必须经过CT和/或MRI确诊;③至少有一名存活的未患病同胞愿意参加本研究;④先证者及家系成员的血样及调查资料均可得到,并书面签署知情同意书。先证者的排除标准:①仅患有短暂性脑缺血发作、脑出血者;②单基因遗传病(如常染色体显性遗传病合并皮质下梗死和白质脑病、镰状细胞贫血等)者;③伴有严重合并症、不能配合研究者。IS诊断按WHO标准^[7],并需经CT或MRI确诊;非患者需经非卒中状态确证问卷(questionnaire for verifying stroke-free status, QVSFS)^[8]确认。

由统一培训的调查员进行问卷调查(包括一般人口学资料、家族史、既往病史和用药史,以及行为危险因素等);由统一培训有资质的医护人员进行体格检查(包括血压、身高、体重、腰围、臀围等)和采集空腹静脉血样。本研究已通过北京大学生物医学伦理委员会批准。

2. 指标及定义:高血压定义为有明确高血压诊断并正在服用降压药物治疗,或SBP ≥ 140 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),和/或DBP ≥ 90 mmHg;血脂异常定义为TC ≥ 5.72 mmol/L或TG ≥ 1.70 mmol/L或HDL-C ≤ 0.91 mmol/L;吸烟定义为平均每天至少吸1支纸烟(或采用其他吸烟方式消耗相当于1支纸烟的烟草量),并已持续 ≥ 1 年;饮酒定义为平均

每天至少饮用白酒50 ml(或引用其他类型酒精类饮料消耗相当于50 ml白酒的酒精量,白酒酒精度不限),并已持续 ≥ 1 年;体育锻炼定义为近6个月平均每周超过一次,每次平均超过30 min有意识的体育运动,包括散步、跑步、体操等。

3. 单核苷酸多态性(SNP)位点选择及检测:本研究共选取4个LTA4H基因SNP位点,分别为rs2072512、rs2540489、rs2540500和rs6538697。采用异丙醇法提取DNA,通过Sequenom公司的Assay Design 3.1软件进行引物设计。PCR扩增所用仪器为ABI GeneAmp[®] 9700 384 Dual,基因分型采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF)。

4. 统计学分析:采用SAS 9.1软件对数据进行处理和分析。连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分类变量以频数(构成比,%)表示,组间比较采用组间 t 检验或 χ^2 检验。为调整家系内个体间的相关关系,使用广义估计方程(generalized estimate equation, GEE)进行单因素分析,同时控制年龄、性别、吸烟、饮酒等因素后进行多因素分析^[9]。采用条件logistic回归和以家系为单位的关联分析(family based association test, FBAT)^[9],在先证者及其家系成员中分析LTA4H基因多态性与IS相关危险因素、IS及其亚型之间的关联关系。

结 果

1. 一般情况:本研究共涉及234个家系,含272个病例、341个未患病同胞,共613人。可组成356个病例及其未患病同胞的DSP。病例同胞与非病例同胞之间,年龄、性别、生活方式、慢性病史、体检(腰围、SBP、DBP)及血脂指标(TG、HDL-C)之间分布差异均有统计学意义(表1)。

2. 基因型分布:选取的rs2072512、rs2540489、rs2540500和rs6538697位点分别有556人(90.7%)、526人(85.8%)、536人(87.4%)和559人(91.2%)成功检测到基因型。各位点基因型频率分别为rs2072512: AA 32.4%, AT 52.2%, TT 15.5%; rs2540489: AA 37.3%, AG 48.1%, GG 14.6%; rs2540500: AA 22.6%, GG 24.4%, GA 53.0%; rs6538697: CC 8.4%, TT 50.8%, TC 40.8%。Hardy-Weinberg平衡(HWE)检验结果显示,4个SNP位点均符合HWE假设(表2)。

3. IS危险因素:采用GEE分析IS与高血压、糖尿病、血脂异常及BMI、血压、血脂水平间的关联,发

表 1 研究对象一般特征

特 征	非病例同胞 (n=341)	病例同胞 (n=272)	P 值
性别			<0.001
男	164(48.1)	185(68.0)	
女	177(51.9)	87(32.0)	
年龄(岁)	52.4±8.9	56.9±8.9	<0.001
生活方式			
现在吸烟	31(9.1)	52(19.1)	<0.001
现在饮酒	18(5.3)	29(10.7)	0.013
参加体育锻炼	125(36.7)	70(25.7)	0.004
既往病史			
2 型糖尿病	43(12.6)	88(32.4)	<0.001
高血压	160(46.9)	218(80.1)	<0.001
血脂异常	158(46.3)	166(61.0)	<0.001
体检指标			
BMI(kg/m ²)	26.09±3.65	26.34±3.55	0.397
腰围(cm)	87.76±10.15	92.06±8.55	<0.001
SBP(mmHg)	133.00±19.11	144.34±18.31	<0.001
DBP(mmHg)	85.26±11.23	89.75±17.31	<0.001
血脂指标(mmol/L)			
TC	4.68±1.04	4.59±1.18	0.297
TG	1.65±1.14	2.03±1.37	<0.001
HDL-C	1.54±0.54	1.34±0.45	<0.001
LDL-C	2.94±0.83	2.95±0.84	0.861

表 2 研究对象的等位基因分布

基因位点	等位基因	合计		患病同胞		未患病同胞		HWE P 值
		n	%	n	%	n	%	
rs2072512	A	650	58.5	299	61.3	351	56.3	0.082
	T	462	41.5	189	38.7	273	43.8	
rs2540489	A	645	61.3	300	65.2	345	58.3	0.750
	G	407	38.7	160	34.8	247	41.7	
rs2540500	A	526	49.1	229	48.7	297	49.3	0.164
	G	546	50.9	241	51.3	305	50.7	
rs6538697	C	322	28.8	134	27.3	188	29.9	0.897
	T	796	71.2	356	72.7	440	70.1	

现病例的高血压、糖尿病、血脂异常患病率及 TG 水平明显高于对照同胞 ($P < 0.001$), HDL-C 水平明显低于对照同胞 ($P < 0.001$)。在调整了年龄、性别、吸烟、饮酒和体育锻炼后这些差异仍存在 ($P < 0.001$)。

4. LTA4H 基因多态性与 IS 及其亚型的关联: 条件 logistic 回归结果显示, rs2540489 位点在加性模型

下与全部 IS 以及大动脉粥样硬化型 (LAA) 脑卒中 (LAA-IS) 存在关联, 在隐性模型下与 LAA-IS 存在关联, G 等位基因是 IS 的保护因素 (加性模型下, 全部 IS: $OR = 0.620$, 95% CI : 0.409 ~ 0.938, LAA-IS: $OR = 0.477$, 95% CI : 0.238 ~ 0.954; 在隐性模型下, LAA-IS: $OR = 0.25$, 95% CI : 0.068 ~ 0.933)。在调整年龄、性别及其他危险因素后以上关联关系均无统计学意义 (表 3)。

利用 FBAT 进一步分析显示, 在加性和隐性模型下, rs2540489 G 等位基因与 IS 以及 LAA-IS 的关联均有统计学意义。在调整年龄、性别及其他危险因素后, 除在隐性模型下该位点与 IS 的关联关系 P 值达到临界外 ($P = 0.050$), 其他关联关系仍有统计学意义 (表 3)。条件 logistic 回归与 FBAT 分析均显示, rs2072512、rs2540500 和 rs6538697 等位基因与 IS 及其 LAA-IS、小动脉阻塞型 (SAO)-IS 的关联均无统计学意义。

讨 论

LT 是由花生四烯酸 (AA) 产生的一组炎症介导因子, 5-脂氧合酶 (5LO) 及其激活蛋白 (ALOX5AP/FLAP) 催化 AA 生成 LTA₄, 后者在 LTA₄H 和 LTC₄ 合成酶 (LTC₄S) 作用下分别进一步转化为 LTB₄ 和白三烯 C₄ (LTC₄), LTB₄ 与其受体 (BLTR) 结合, 激活中性粒细胞, 产生趋化作用, 增强白细胞与血管内皮的黏附, 最终导致大脑及心脏急性动脉缺血性改变^[10-12]。多年来对 LTA₄H 基因多态性的关注主要集中在哮喘及肿瘤研究方面。

2006 年 Helgadóttir 等^[13]通过全基因组扫描, 在冰岛人群中发现 LTA₄H 基因的一个单倍型 HapK 与心肌梗死发病相关。2008 年 Bevan 等^[14]在英国人群中对 LT 代谢通路相关的多个基因 (FLAP、5LO、LTC₄、LTA₄H、CYSLTR1、CYSLTR2、LTB₄R、LTB₄R2) 与 IS 的关系进行研究, 并未发现 LTA₄H 基因与 IS 及各

表 3 LTA4H 基因多态性 (rs2540489) 与 IS 及其主要亚型的关联分析

调整前/后	logistic 回归分析						FBAT									
	IS		LAA-IS		SAO-IS		IS		LAA-IS		SAO-IS					
	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值	f _{my}	Z 值	P 值	f _{my}	Z 值	P 值				
加性模型	前	0.62(0.41 ~ 0.94)	0.014	0.48(0.24 ~ 0.95)	0.028	0.71(0.43 ~ 1.19)	0.14	73	-2.453	0.014	35	-2.203	0.028	41	-1.471	0.141
	后	0.67(0.38 ~ 1.18)	0.013	0.80(0.29 ~ 2.17)	0.016	0.55(0.25 ~ 1.19)	0.13	88	-2.494	0.013	64	-2.418	0.016	63	-1.620	0.105
显性模型	前	0.63(0.36 ~ 1.10)	0.079	0.62(0.26 ~ 1.46)	0.249	0.67(0.32 ~ 1.38)	0.29	52	-1.757	0.079	23	-1.153	0.249	30	-1.229	0.219
	后	0.55(0.26 ~ 1.18)	0.056	0.75(0.20 ~ 2.73)	0.154	0.44(0.15 ~ 1.28)	0.174	66	-1.907	0.056	45	-1.425	0.154	48	-1.360	0.174
隐性模型	前	0.48(0.23 ~ 1.02)	0.037	0.25(0.07 ~ 0.93)	0.025	0.64(0.26 ~ 1.60)	0.37	32	-2.090	0.037	14	-2.247	0.025	20	-1.104	0.270
	后	0.79(0.30 ~ 2.12)	0.050	0.85(0.15 ~ 4.79)	0.019	0.63(0.18 ~ 2.17)	0.247	39	-1.956	0.050	27	-2.352	0.019	27	-1.157	0.247

注: IS 为全部缺血性脑卒中; LAA-IS 为 LAA 型缺血性脑卒中; SAO-IS 为 SAO 型缺血性脑卒中; f_{my} 为进入分析的有效家庭个数; 调整变量为年龄、性别、吸烟、饮酒、体育锻炼、高血压、糖尿病、血脂异常

类亚型相关。同年,在日本人群中研究也未发现LTA4H基因多态性与伴有代谢综合征的动脉粥样硬化性脑梗死相关^[15];在德国人群的研究也未发现位于LTA4H基因的rs2660899位点多态性与MI相关^[16]。2011年,研究者发现在高加索人群中LTA4H基因HapK单倍型($OR=1.2, 95\%CI: 1.01 \sim 1.4$)及rs2540477多态性($OR=1.2, 95\%CI: 1.1 \sim 1.5$)与冠心病相关,后续的细胞试验发现携带HapK单倍型或rs2540477危险位点的细胞LTB₄产量明显高于未携带者,进一步证实LTB₄是LTA4H催化的直接产物,能够提升单核细胞向炎症中心的趋化能力并参与动脉粥样硬化病变过程。2013年对中国人群的一项研究发现LTA4H基因rs6538697位点CC基因型与IS相关($OR=1.77, 95\%CI: 1.09 \sim 2.89$)^[17]。

由于IS是一种复杂性疾病,存在疾病表型异质性、基因-环境交互作用^[18],故使既往有关LTA4H基因多态性与IS关系的结论不一,但也可能是各项研究其设计不同,以及不同人群遗传背景差异导致的人群分层现象^[19]。本研究利用DSP研究设计,在IS家系中探讨LTA4H基因多态性与IS及其亚型的关联,并分别采用条件logistic回归和FBAT探讨基因多态性位点与疾病的关联关系。FBAT以家系为单位计算统计量并进行检验,与条件logistic回归相比处理以家系为结构的数据其检验效能更高。本研究结果发现在加性和隐性模型下,rs2540489 G等位基因与IS存在关联,但并未发现rs6538697多态性与IS存在关联,不同于Wang等^[17]的报道。可能rs6538697多态性位点还与其他位点或环境因素之间存在交互作用而与IS相关^[20]。

在研究IS的遗传易感性时也应同时关注其不同亚型与易感基因的关系^[21]。为此本研究还分析了IS主要亚型(LAA-IS和SAO-IS)与LTA4H基因几个位点多态性的关系,发现在加性和隐性模型下,rs2540489 G等位基因与LAA-IS的关联有统计学意义,但与SAO-IS无关联。LAA-IS与动脉粥样硬化密切相关,既往研究发现LAA-IS与LT通路相关的ALOX5AP基因存在关联^[21],本研究同样在中国人群印证了LT通路中LTA4H基因与IS的关联关系。

参 考 文 献

- [1] Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(5):448-457.
- [2] Feigin VL. Stroke epidemiology in the developing world [J]. *Lancet*, 2005, 365(9478):2160-2161.
- [3] Matarin M, Singleton A, Hardy J, et al. The genetics of ischaemic stroke [J]. *J Intern Med*, 2010, 267(2):139-155.
- [4] Funk CD. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for

cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(8):664-672.

- [5] Subbarao K, Jala VR, Mathis S, et al. Role of leukotriene B₄ receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2):369-375.
- [6] Liu K, Wang JW, Yu ZP, et al. Association study between PDE4D gene polymorphism and ischemic stroke [J]. *J Peking Univ Health Sci Ed*, 2013, 45(3):359-363. (in Chinese) 刘括,王晋味,余洽平,等. PDE4D基因多态性与缺血性卒中的关联性研究[J]. *北京大学学报:医学版*, 2013, 45(3):359-363.
- [7] The World Health Organization. MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators [J]. *J Clin Epidemiol*, 1988, 41(2):105-114.
- [8] Jones WJ, Williams LS, Meschia JF. Reliability of the questionnaire for verifying stroke-free status [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2004, 17(2/3):218-223.
- [9] Chen DF, Chen CZ. Methods for medical research data management and analysis [M]. Peking: Peking University Medical Press, 2006. (in Chinese) 陈大方,陈常中. 医学科研数据的处理与分析方法[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2006.
- [10] Whatling C, McPheat W, Herslöf M. The potential link between atherosclerosis and the 5-lipoxygenase pathway: investigational agents with new implications for the cardiovascular field [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007, 16(12):1879-1893.
- [11] Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(3):233-239.
- [12] Rådmark O, Samuelsson B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(1):105-110.
- [13] Helgadóttir A, Manolescu A, Helgason A, et al. A variant of the gene encoding leukotriene A₄ hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(1):68-74.
- [14] Bevan S, Dichgans M, Wiechmann HE, et al. Genetic variation in members of the leukotriene biosynthesis pathway confer an increased risk of ischemic stroke: a replication study in two independent populations [J]. *Stroke*, 2008, 39(4):1109-1114.
- [15] Yamada Y, Kato K, Oguri M, et al. Association of genetic variants with atherothrombotic cerebral infarction in Japanese individuals with metabolic syndrome [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(6):801-808.
- [16] Linsel-Nitschke P, Götz A, Medack A, et al. Genetic variation in the arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) is associated with myocardial infarction in the German population [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 115(10):309-315.
- [17] Wang GN, Zhang JS, Cao WJ, et al. Association of ALOX5, LTA4H and LTC4S gene polymorphisms with ischemic stroke risk in a cohort of Chinese in east China [J]. *World J Emerg Med*, 2013, 4(1):32-37.
- [18] Thornton-Wells TA, Moore JH, Haines JL. Haines, Genetics, statistics and human disease: analytical retooling for complexity [J]. *TRENDS in Genetics*, 2004, 20(12):640-647.
- [19] Hopper JL, Bishop DT, Easton DF. Population-based family studies in genetic epidemiology [J]. *Lancet*, 2005, 366(9494):1397-1406.
- [20] Wang G, Zhang J, Sun H, et al. Genetic variation in members of the leukotrienes biosynthesis pathway confers risk of ischemic stroke in Eastern Han Chinese [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2012, 87(6):169-175.
- [21] Munshi A, Das S, Kaul S. Genetic determinants in ischaemic stroke subtypes: seven year findings and a review [J]. *Gene*, 2015, 555(2):250-259.

(收稿日期:2015-01-29)

(本文编辑:张林东)