

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.21.017

ADIPOR2 基因多态性与动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的相关性研究

袁彬,张黎军,李青,王超伟

(新乡医学院第一附属医院神经内二科,河南新乡 453100)

[摘要] **目的** 探讨脂联素受体 2(ADIPOR2)基因多态性与血清脂联素(APN)水平、颈动脉内膜中层厚度(IMT)及动脉粥样硬化性脑梗死风险的相关性。**方法** 采用病例对照研究,选取 2009 年 9 月至 2014 年 9 月该院收治的动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死患者 300 例作为观察组,另选取同期 300 例体检健康者作为对照组。收集所有受试者的临床资料,行颈动脉检查并测量 IMT,检测血清 APN 水平,测定 ADIPOR2 基因 rs12342 多态性,比较组间 ADIPOR2 基因多态性,分析其与血清 APN 和 IMT 的关系。**结果** AA 基因型与 GG 基因型相比,患动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的概率增加,差异有统计学意义($OR=1.903, 95\%CI:1.092\sim 2.703, P=0.011$)。与对照组相比,观察组中各基因型亚组 IMT 值均升高,APN 水平均降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与 GG 基因型相比,AA、AG 基因型 IMT 值均升高,APN 水平均降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** ADIPOR2 基因多态性可能是中国汉族人动脉粥样硬化性脑梗死发病的一个基因位点。

[关键词] 动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死;脂联素;脂联素受体 2;单核苷酸多态性;内膜中层厚度

[中图分类号] R743.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)21-2936-03

Study on correlation between genetic polymorphisms of ADIPOR2 with atherothrombosis cerebral infarction

Yuan Bin, Zhang Lijun, Li Qing, Wang Chaowei

(Second Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453100, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between genetic polymorphisms of ADIPOR2 with serum APN level, intima-media thickness(IMT) and atherothrombosis cerebral infarction risk. **Methods** The case control study was adopted, 300 patients with atherothrombosis cerebral infarction in our hospital from September 2009 to September 2014 were selected as the observation group, meanwhile contemporaneous 300 individuals undergoing the physical examination were selected as the control group. The clinical data in all the subjects were collected and performed the carotid arterial examination, the serum APN level was detected, the rs12342 polymorphism of ADIPOR2 gene was detected. The genetic polymorphisms of ADIPOR2 were compared between the two groups and its relationship with serum APN and IMT was analyzed. **Results** The probability for suffering from atherothrombosis cerebral infarction in the AA genotype was increased compared with the GG genotype, the difference was statistically significant ($OR=1.903, 95\%CI:1.092-2.703, P=0.011$). Compared with the control group, the IMT values in various subgenotype groups of the observation group were elevated, while the APN levels were decreased, the differences were statistically significant ($P<0.01$). Compared with the genotype GG, the IMT values in the genotype AA and AG were increased and APN levels were decreased, the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** Genetic polymorphisms of ADIPOR2 maybe a genetic locus for the pathogenesis of Chinese Han people of atherothrombosis cerebral infarction.

[Key words] atherothrombosis cerebral infarction; adiponectin; adiponectin receptor 2; single nucleotide polymorphism; intima-media thickness

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是脑梗死发病机制中一个重要的病理因素。脂联素(adiponectin, APN)被认为是一个对机体有保护作用的脂肪因子, APN 通过它的特殊受体调节糖和脂类代谢,从而起到抗动脉粥样硬化、抗炎,提高胰岛素敏感性、能量平衡,以及维持糖和脂肪代谢等重要作用。本研究中,笔者选择脂联素受体 2(adiponectin receptor 2, ADIPOR2)的基因 rs12342 来研究 ADIPOR2 的基因多态性与动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的相关性,并分析 ADIPOR2 的基因多态性与血清 APN 及颈动脉内膜中层厚度(intima-media thickness, IMT)之间的关系,旨在探讨 ADIPOR2 与脑梗死发作风险之间的关系及其作用机制,以期对脑梗死的防治提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2009 年 9 月至 2014 年 9 月本院神经内

科收治的发病 24 h 以内入院的脑梗死患者 300 例为观察组,其中男 191 例,女 109 例,年龄 34~83 岁,平均(65.1±11.3)岁;所有患者均符合 2007 年韩国改良版的 TOAST 病因分型中动脉粥样硬化血栓形成型。排除条件:(1)脑栓塞患者;(2)动脉畸形和动脉瘤引起的脑梗死患者;(3)动脉炎、自身免疫性疾病、肿瘤、血液病,肝、肾功能不全及慢性炎症性疾病患者;(4)入院前 30 d 内无输血史,2 周内无服用扩张血管及抗凝药物史,3 周内无急性心肌梗死病史者。另选取同期本院体检健康者 300 例作为对照组,其中男 201 例,女 99 例,年龄 35~87 岁,平均(65.5±11.1)岁,均无脑梗死及短暂脑缺血发作病史,其余排除标准同观察组。纳入的所有研究对象均为河南省汉族人,相互间均无血缘关系,近 3 个月未服用各类降血脂药物。该研究经医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

表 1 两组一般临床资料比较

组别	n	年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)	性别 (男/女,n/n)	吸烟史 [n(%)]	饮酒史 [n(%)]	BMI ($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	高血压 [n(%)]	糖尿病 [n(%)]	高脂血症 [n(%)]
观察组	300	65.1±11.3	191/109	98(32.67)	112(37.33)	25.34±5.08	198(66.00)	178(59.33)	197(65.67)
对照组	300	65.5±11.1	201/99	49(16.33)	54(18.00)	24.79±6.13	137(45.67)	89(29.67)	76(25.33)
P		0.752	0.543	<0.001	<0.001	0.132	<0.001	<0.001	<0.001

1.2 方法

1.2.1 资料收集 询问所有受试者的吸烟、饮酒及既往病史(高血压病、糖尿病、高脂血症),高血压、糖尿病分别遵照《中国高血压防治指南》及《中国糖尿病防治指南》诊断标准,高脂血症遵照 1997 年《血脂异常防治建议》诊断标准。

1.2.2 颈动脉检查及分组 脑梗死患者于入院当日,健康体检者于体检当日在本院 B 超室行颈动脉检查。分别观察双侧颈总动脉起始部,主干及颈动脉分叉部,颈内外动脉主干血管内膜有无斑块,以及斑块性质、数目、大小。同时,观察动脉血管管壁内膜并测量 IMT。

1.2.3 血清 APN 水平测定 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定,严格按说明书进行操作。

1.2.4 ADIPOR2 rs12342 基因多态性检测 采用限制性片段长度多态性 PCR(PCR-RFLP)对 ADIPOR2 基因 rs12342 多态性进行分析。于患者入院次日清晨,用乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na)抗凝管采集肘静脉血 5 mL,取中层白细胞用于基因组 DNA 提取。提取基因组 DNA 后,PCR 扩增出目的基因片段,产物长度为 387 bp,上游引物 5'-CAA GGG CAA GGG AGG AAA-3',下游引物 5'-CAG GGA GTG AGG TAC AAG ACG A-3'。以 DNA 标记物为 DNA 片段长度标记,采用 150 mV 电压电泳 45 min,最终确定目的片段的长度。酶切产物以 2%琼脂糖凝胶电泳。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行各组间同一检验指标的组间比较,采用 LSD 方法进行多重比较;计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验进行比较分析;影响因素采用 Logistic 回归分析,计算 OR 及其 95% 置信区间(CI);检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组一般临床资料比较 两组年龄、性别和体质量指数(BMI)比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);而观察组吸烟、饮酒率,以及高血压、糖尿病、高脂血症发生率均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.001$)。见表 1。

2.2 两组 ADIPOR2 rs12342 基因型和等位基因频率分布比较 经拟合优度 χ^2 检验,基因型和等位基因频率在两组间的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。rs12342 基因型和等位基因频率的分布在两组间比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。观察组 rs12342 AA 基因型频率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),而两组 rs12342 AG、CG 基因型频率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);观察组 A 等位基因频率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

2.3 ADIPOR2 基因多态性与脑梗死的风险分析 与 GG 基因型相比,AA 基因型患动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的风险增高,差异有统计学意义($OR=1.835,95\%CI:1.397\sim$

$2.691,P=0.012$);校正性别、年龄、BMI、吸烟史、饮酒史、糖尿病、高血压,以及其他一些混杂因子的影响,AA 基因型患动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的风险仍然增高,差异有统计学意义($OR=1.903,95\%CI:1.092\sim 2.703,P=0.011$)。提示 rs12342 AA 基因型是动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的独立危险因素,患病风险增加至 1.903 倍。与 GG 基因型相比,AG 基因型患动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的概率无明显上升($OR=1.310,95\%CI:0.698\sim 2.754$),差异无统计学意义($P=0.372$);校正性别、年龄、BMI、吸烟史、饮酒史、糖尿病、高血压,以及其他一些混杂因子的影响,AG 基因型患动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的概率仍无明显上升($OR=1.397,95\%CI:0.746\sim 2.195$),差异无统计学意义($P=0.774$)。见表 3。

表 2 两组 ADIPOR2 rs12342 基因型和等位基因频率分布比较

组别	n	基因型[n(%)]			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
观察组	300	118 (39.33)	128 (42.67)	54 (18.00)	0.607	0.393
对照组	300	92 (30.67)	163 (54.33)	45 (15.00)	0.545	0.455
P		<0.01			<0.01	

表 3 ADIPOR2 基因多态性与脑梗死的风险分析

基因型	校正前		校正后	
	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P
GG	1.00			
AG	1.310(0.698~2.754)	0.372	1.397(0.746~2.195)	0.774
AA	1.835(1.397~2.691)	0.012	1.903(1.092~2.703)	0.011

表 4 观察组及其基因型亚组与对照组 IMT 及 APN 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IMT(mm)	APN(mg/L)
对照组	300	1.04±0.31	10.15±1.97
观察组	300	1.22±0.32*	5.96±1.14*
AA	118	1.30±0.33*	2.38±0.647*
AG	128	1.24±0.32*#	6.14±1.25*#
GG	54	1.12±0.32*#△	8.01±2.32*#△

*: $P<0.01$,与对照组比较;#: $P<0.01$,与 AA 亚组比较;△: $P<0.01$,与 AG 亚组比较。

2.4 观察组及其基因型亚组与对照组 IMT 及 APN 水平比较 观察组 IMT 及 APN 水平与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,观察组中各基因型亚组 IMT

均升高, APN 水平降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 采用方差分析显示, 观察组中各基因型亚组 IMT 及 APN 水平比较, 差异均有统计学意义 (F 值分别为 20.239、163.214, $P < 0.01$); AA、AG 基因型较 GG 基因型 IMT 均增加, APN 水平均降低, 两两比较各基因型间 IMT 及 APN 水平, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 4。

3 讨 论

APN 是脂肪细胞分泌的一个脂肪因子, 是脂肪组织特有的基因 apMI 的产物^[1]。APN 能够干扰动脉粥样硬化的形成, APN 的该项功能经由多种机制抑制血管的炎症反应而实现^[2]。有研究显示, APN 在培养的动脉内皮细胞中, 能够降低血管黏附因子在动脉内皮细胞的表达, 而且该作用呈现剂量依赖性; 同时, APN 可抑制动脉血管泡沫细胞的生成和平滑肌细胞的增殖。因此, 认为 APN 具有抑制动脉粥样硬化形成的作用^[3]。本研究发现, 患者血清 APN 水平与 IMT 呈负相关, 即随着血清 APN 水平下降, 它对动脉粥样硬化的抑制作用减弱。

APN 能够维持糖和脂类代谢, 同时具有抗炎、抗动脉粥样硬化等作用^[4]。本研究结果显示, 动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死患者血清 APN 水平明显下降, 与相关研究报道一致^[4]。APN 的抗炎、抗动脉粥样硬化作用, 通过它的特殊受体调节糖和脂类代谢实现^[4]。脂联素受体是 APN 发挥各种生物效应的关键蛋白, 它们在人体的多种组织和器官中广泛表达^[5-7]。研究发现, 脂联素受体和糖尿病、代谢综合征、冠心病有密切关系^[8], 它们能够影响细胞的代谢和功能, 在疾病的发生、发展中发挥重要作用^[9]。

ADIPOR2 基因编码的 ADIPOR2 蛋白包含 387 个氨基酸^[10]。rs12342 位于 ADIPOR2 基因的 3' 非翻译区 (3' UTR)。在本研究中, 笔者发现 AA 基因型和 A 等位基因携带者动脉粥样硬化血栓形成性脑梗死的患病风险增加。究其原因, 可能是由于 APN 和动脉粥样硬化密切相关。最近的全基因组关联研究发现, 在 ADIPOR2 基因所在的染色体 12p13 有一个部位增加发生动脉粥样硬化性脑梗死的风险^[11]。在关于中国和阿米西人的研究中发现, rs12342 上 A 等位基因和 AA 基因型增加了 2 型糖尿病的发生风险^[12]。Richardson 等^[12] 发现, rs12342 AA 基因型携带者三酰甘油水平比 GG 基因型携带者明显增高, 表明 rs12342 的基因型可能影响脂质代谢。本研究发现, ADIPOR2 rs12342 AA 基因型患者 APN 水平下降, 颈动脉粥样硬化的程度明显增加, 患脑梗死的风险明显增加。

rs12342 的基因多态性与缺血性卒中的发病率相关, 其机制尚未明确, rs12342 多态性位于 ADIPOR2 基因的 3' UTR, 3' UTR 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 不能引起氨基酸顺序的变化, 但是在 mRNA 转录过程的很多方面, 如翻译后修饰、细胞内定位和转运中起到很重要的作用, 以维持和确保 mRNA 翻译有效进行, 若发生变异能够影响一个或多个基因的表达, 从而导致疾病的发生。

这个位点可能通过上述机制影响 ADIPOR2 受体的表达及其功能, 并且影响 APN 发挥其生物效应, 从而促进动脉粥样硬化的形成, 最终增加脑梗死的发病风险。此外, 这个位点可能和其他连锁不平衡的 SNPs 有关, 共同作用引起受体活性的改变。这一推论也需要大样本量的研究来证实。突变的分子机制引起缺血性中风需要更进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 康云平, 孙宝云, 陈松, 等. 冠心病患者治疗前后外周脂脂联素水平分析[J]. 中国预防医学杂志, 2009, 10(6): 539-540.
- [2] Hewitt J, Castilla Guerra L, Fernández-Moreno Mdel C, et al. Diabetes and stroke prevention: a review[J]. Stroke Res Treat, 2012(2012): 673187.
- [3] Baranowska B, Kochanowski J, Grudniak M, et al. Decreased total serum adiponectin and its isoforms in women with acute ischemic stroke[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2011, 32(5): 711-715.
- [4] Carson BP, Del Bas JM, Moreno-Navarrete JM, et al. The rab11 effector protein FIP1 regulates adiponectin trafficking and secretion[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74687.
- [5] Peters KE, Beilby J, Cadby G, et al. A comprehensive investigation of variants in genes encoding adiponectin (ADIPOQ) and its receptors (ADIPOR1/R2), and their association with serum adiponectin, type 2 diabetes, insulin resistance and the metabolic syndrome[J]. BMC Med Genet, 2013(14): 15.
- [6] Ding M, Rzucidlo EM, Davey JC, et al. Adiponectin in the heart and vascular system[J]. Vitam Horm, 2012(90): 289-319.
- [7] Richards JS, Liu Z, Kawai T, et al. Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility, and early embryo development in the mouse and human[J]. Fertil Steril, 2012, 98(2): 471-479.
- [8] Bermúdez VJ, Rojas E, Toledo A, et al. Single-nucleotide polymorphisms in adiponectin, AdipoR1, and AdipoR2 genes; insulin resistance and type 2 diabetes mellitus candidate genes[J]. Am J Ther, 2013, 20(4): 414-421.
- [9] Song W, Huo T, Guo F, et al. Globular adiponectin elicits neuroprotection by inhibiting NADPH oxidase-mediated oxidative damage in ischemic stroke [J]. Neuroscience, 2013(248): 136-144.
- [10] Katakami N, Kaneto H, Matsuoka TA, et al. Adiponectin G276T gene polymorphism is associated with cardiovascular disease in Japanese patients with type 2 diabetes [J]. Atherosclerosis, 2012, 220(2): 437-442.
- [11] Zhang BC, Liu WJ, Che WL, et al. Serum total adiponectin level and risk of cardiovascular disease in Han Chinese populations: a meta-analysis of 17 case-control studies [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2012, 77(3): 370-378.
- [12] Richardson DK, Schneider J, Fourcaudot MJ, et al. Association between variants in the genes for adiponectin and its receptors with insulin resistance syndrome (IRS)-related phenotypes in Mexican Americans[J]. Diabetologia, 2006, 49(10): 2317-2328.