

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.010

ERCC1 基因在急性缺血性脑卒中的表达及意义*

邓小冬¹,高琴²,马英³,张波¹,张伟¹,木尔扎尔¹,章丽霞¹,谢英¹,金波¹,刘云^{1△}

(1. 川北医学院法医学系,四川南充 637000;2. 四川省南充市嘉陵区人民医院内科 637500;

3. 川北医学院附属医院神经内科,四川南充 637000)

[摘要] **目的** 检测核酸切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)在急性缺血性脑卒中(CIS)患者的表达,探讨 ERCC1 基因与急性 CIS 的关系。**方法** 收集 64 例急性 CIS 患者(卒中组)和 70 例体检健康者(对照组)外周血样和临床资料。实时荧光定量 PCR 检测 ERCC1 基因 mRNA 在外周血单个核细胞(PBMCs)的相对表达水平,ELISA 检测 ERCC1 蛋白在血浆中的表达水平。**结果** 卒中组 ERCC1 基因 mRNA 表达水平显著低于对照组($P<0.05$),蛋白表达水平显著高于对照组($P<0.05$)。不同卒中类型 ERCC1 基因 mRNA 和蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。ERCC1 基因 mRNA 表达水平与中风史呈负相关($r=-0.409, P=0.013$),其蛋白表达水平与之无明显相关性($P>0.05$)。**结论** ERCC1 基因可能参与急性 CIS 的发生、发展、转归及复发。

[关键词] 卒中;DNA,互补;基因表达;ERCC1**[中图分类号]** R743.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0040-04

ERCC1 expression and its significance in acute cerebral ischemic stroke*

DENG Xiaodong¹,GAO Qin²,MA Ying³,ZHANG Bo¹,ZHANG Wei¹,MUER Cher¹,
ZHANG Lixia¹,XIE Ying¹,JIN Bo¹,LIU Yun^{1△}

(1. Department of Forensic North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Internal Medicine, Jialing District People's Hospital, Nanchong, Sichuan 637500, China; 3. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** The expression level of nucleotide excision repair cross complementing 1 (ERCC1) was detected in acute cerebral ischemic stroke (CIS) patients for discussing the relationship between ERCC1 and acute CIS. **Methods** The peripheral blood samples and clinical data were collected from 64 patients with acute CIS (the stroke group) and 70 healthy controls (the control group). The relative expression level of ERCC1 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was detected by real-time quantitative PCR, and the ERCC1 protein level in plasma was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The relative expression level of ERCC1 mRNA in the stroke group was lower than that in the control group ($P<0.05$). The protein level was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). There was no significant difference on ERCC1 mRNA or protein expression level among different stroke types ($P>0.05$). There was a negative correlation between ERCC1 mRNA and the history of stroke ($r=-0.409, P=0.013$). However, there was no significant correlation between the protein expression level and the history of stroke ($P>0.05$). **Conclusion** ERCC1 might be related to the occurrence, development, prognosis and recrudescence of acute CIS.

[Key words] stroke;DNA,complementary;gene expression;ERCC1

缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS)具有高病死率、高致残率、高复发率等特点,严重影响患者身心健康^[1-2],积极研究 CIS 发病机制,探寻 CIS 的防治策略具有重要意义。研究发现 DNA 损伤修复可

能参与脑卒中等疾病的病理生理过程^[3]。DNA 损伤修复主要由碱基切除修复(base excision repair, BER)系统和核酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)系统完成。目前,有关 DNA 损伤修复在 CIS 的

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81400966);四川省教育厅自然科学基金项目(16ZB0235);四川省科技厅创新苗子工程项目(2017055);四川省南充市市校战略合作科技项目(18SXHZ0172);川北医学院科研发展计划项目(CBY15-A-YB19)。作者简介:邓小冬(1988—),讲师,硕士,主要从事法医学、缺血性疾病研究。△ 通信作者,E-mail:xyun2005@163.com。

关系研究只围绕 BER 修复系统展开^[4],而 NER 修复系统与 CIS 发生、发展的关系尚未引起研究人员的关注。NER 交叉互补基因 1(excision repair cross complementing group 1, ERCC1)是 NER 修复系统的关键酶和限速酶^[5],其功能正常与否可能影响 NER 系统的修复能力或修复效率。因此,本研究拟通过检测 CIS 患者外周血 ERCC1 基因表达水平,初步探讨 ERCC1 基因在 CIS 的作用机制,为 CIS 的分子机制和神经生物学研究提供新的思路和证据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1—12 月川北医学院附属医院神经内科确诊的急性 CIS 患者 64 例为卒中组。纳入标准:符合 2014 年中国急性 CIS 诊治指南,且经影像学检查予以证实。排除标准:脑出血、短暂性脑缺血发作、肿瘤、着色性干皮病及严重影响代谢的其他内科疾病。选取同期体检健康者 70 例为对照组。对照组既往无神经系统疾病史、肿瘤病史、着色性干皮病及严重影响代谢的其他内科疾病。该研究方案经川北医学院伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集

记录研究对象一般情况、既往史[中风、高血压、糖尿病、冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)等]、常规实验室检查结果等,其中实验室检查包括血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(very low-density lipoprotein cholesterol, VLDL-C)、白细胞、红细胞、血小板等。根据 TOAST 分型标准对所有患者进行病因学分型,包括大动脉粥样硬化性脑卒中(large-artery atherosclerosis, LAA)、小动脉闭塞性脑梗死或腔隙性脑梗死(small-artery occlusion, SAO)、心源性脑栓塞(cardioembolism, CE)、其他原因所致的脑梗死(stroke of otherdetermined cause, OC)、不明原因的脑梗死(stroke of undetermined cause, UND)。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 ERCC1 基因 mRNA 表达水平

空腹采集卒中组与对照组晨起静脉血 5 mL[乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝],3 000 r/min 离心 10 min,吸上层血浆-80 °C 保存备检,余血液提取总 RNA。

人外周血淋巴细胞(PBMCs)分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)分离 PBMCs,按 RNAiso Plus(日本 TaKaRa 公司)操作说明书提取总 RNA。NanoDrop 2000 紫外分光光度仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)测定总 RNA 纯度和浓度,经琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 完整性。

选取纯度高、完整性好的总 RNA 按反转录试剂

盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser,日本 TaKaRa 公司)操作说明书分两步反转录合成 cDNA。取 2.0 μL cDNA 按 2×Taq PCR MasterMix 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]操作说明书扩增 ERCC1 和内参 β-actin 基因(ERCC1 引物,正向:5'-GAG CCT CAA GGG AAA GAC TGC-3',反向:5'-TCG CCC TGC TCT ATG CTC TAC T-3',片段长度 132 bp;β-actin 引物,正向:5'-CCA CGA AAC TAC CTT CAA CTC C-3',反向:5'-GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG T-3',片段长度 132 bp),按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]操作说明书纯化 PCR 产物,将纯化后的 PCR 产物(标准品)用纯水 10 倍梯度稀释 6 个浓度,按 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)操作说明书建立 PCR 反应体系和条件,并在 7900 型 RT-qPCR 仪(美国 AB 公司)上制作 ERCC1 和 β-actin 基因的标准曲线。PCR 扩增体系:SYBR Green Mix 10.0 μL, Dye II 0.4 μL,上下游引物(pmol/μL)各 0.8 μL,标准品(PCR 纯化产物)2.0 μL,加 ddH₂O 至 20.0 μL。PCR 扩增条件:95 °C 15 s 预变性;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环;熔解条件:95 °C 15 s,60 °C 30 s,95 °C 15 s,1 个循环。取待测样品的 cDNA 溶液 2.0 μL,加入与标准曲线制作完全相同的 PCR 体系中,与标准品在相同反应条件下进行 PCR 扩增。每个样品复孔 3 个,并设定无 cDNA 样品的空白管作为阴性对照。7900 型实时荧光定量 PCR 仪自动收集荧光信号,得出目的基因(ERCC1 基因)和内参基因(β-actin 基因)的 CT 值及相关曲线,采用 2^{-ΔΔC_t}法计算 ERCC1 基因 mRNA 的相对表达水平。

1.2.3 ELISA 检测 ERCC1 蛋白表达水平

按 Human ERCC1 ELISA 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司)操作说明书在 Benchmark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)上检测并收集待测样品的光密度(optical density, OD)值。以调整后的标准品 OD 值为横坐标(x),以标准品浓度为纵坐标(y),绘制标准曲线并求得拟合曲线方程式,将待测样品的 OD 值代入方程式即可求得血浆中 ERCC1 蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验或单因素方差分析;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

卒中组与对照组年龄、性别比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。卒中组中风史、高血压病史、糖尿病病史比例及白细胞计数、TG 和 VLDL 水平均显著高于对照组(*P* < 0.05),见表 1。

2.2 卒中组与对照组 ERCC1 mRNA 表达水平比较

卒中组 ERCC1 mRNA 在 PBMCs 的相对表达水

平($0.972\ 8 \pm 0.197\ 4$)显著低于对照组($1.257\ 3 \pm 0.159\ 4$),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

表 1 一般临床资料比较

项目	卒中组	对照组	P
性别[n(%)]			0.489
男	38(59.37)	37(52.86)	
女	26(40.63)	33(47.14)	
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	55.600 0 \pm 7.254 8	52.500 0 \pm 10.292 4	0.099
中风史[n(%)]			0.000
是	21(32.81)	0(0)	
否	43(67.19)	70(100.00)	
高血压病史[n(%)]			0.000
是	47(73.44)	10(14.29)	
否	17(26.56)	60(85.71)	
冠心病病史[n(%)]			0.074
是	5(7.81)	1(1.43)	
否	59(92.19)	69(98.57)	
糖尿病病史[n(%)]			0.002
是	18(28.12)	5(7.14)	
否	46(71.88)	65(92.86)	
白细胞($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)	6.699 2 \pm 2.236 1	4.920 4 \pm 1.317 3	0.010
血小板($\bar{x} \pm s, \times 10^{12}/L$)	165.166 7 \pm 45.767 4	162.125 0 \pm 47.420 7	0.805
红细胞($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)	4.469 7 \pm 0.496 3	4.682 9 \pm 0.525 3	0.119
TG($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)	1.445 1 \pm 1.064 9	1.007 5 \pm 0.297 5	0.023
TC($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)	4.543 5 \pm 1.312 6	4.484 5 \pm 0.429 1	0.804
HDLc($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)	1.107 3 \pm 0.650 6	1.482 1 \pm 1.034 8	0.087
LDLc($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)	2.732 2 \pm 1.113 3	2.757 5 \pm 0.447 6	0.902
VLDL($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)	0.807 8 \pm 0.557 6	0.454 2 \pm 0.172 3	0.001
血红蛋白($\bar{x} \pm s, \text{g/L}$)	132.637 1 \pm 25.906 7	138.500 0 \pm 20.943 0	0.361
TOAST 分型[n(%)]			
LAA	37(57.81)	0(0)	
SAO	2(3.12)	0(0)	
CE	5(7.81)	0(0)	
OC	6(9.38)	0(0)	
UND	14(21.88)	0(0)	

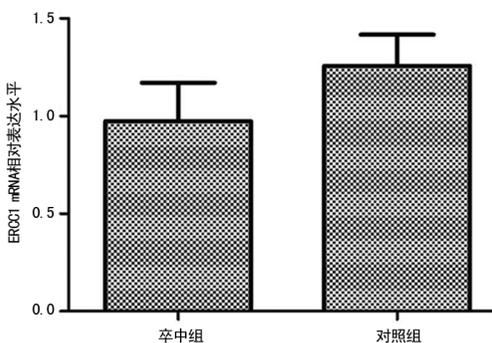


图 1 ERCC1 mRNA 表达水平

2.3 卒中组与对照组 ERCC1 蛋白表达水平比较 ERCC1 蛋白标准曲线拟合优度(R^2)为 0.998 4;曲线拟合方程为 $Y=1.154\ 0X^2+0.523\ 2X+0.188\ 6$ 。经换算后卒中组 ERCC1 蛋白表达水平($0.408\ 1 \pm 0.042\ 3$)显著高于对照组($0.293\ 8 \pm 0.009\ 4$),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

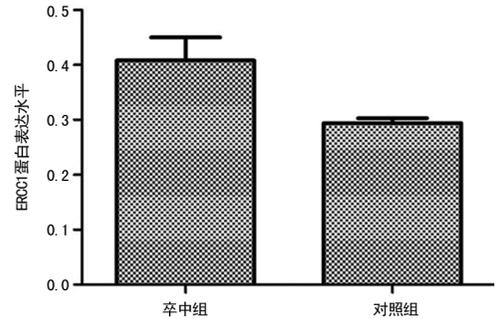


图 2 ERCC1 蛋白表达水平

2.4 不同 TOAST 分型 ERCC1 基因表达水平 不同 TOAST 分型间 ERCC1 基因 mRNA 和蛋白表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 ERCC1 基因表达水平与一般临床资料的相关性 卒中组 ERCC1 基因 mRNA 和蛋白表达水平与年龄、常规实验室指标间无明显相关性($P > 0.05$)。ERCC1 基因 mRNA 表达与中风史呈负相关($r = -0.409, P = 0.013$),与性别、高血压病史、冠心病病史、糖尿病史无明显相关性($P > 0.05$)。ERCC1 蛋白表达与中风史、性别、高血压病史、冠心病病史、糖尿病史均无明显相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究结果显示 CIS 患者 PBMCs 中 ERCC1 基因 mRNA 表达水平显著低于健康对照组,表明急性 CIS 患者机体内 ERCC1 基因 mRNA 处于低表达状态,且缺血或缺氧刺激仍不能诱导或者激活机体表达 ERCC1 基因,显著降低了机体 NER 修复系统的修复能力和修复效率,导致脑损伤区和缺血区大量损伤 DNA 分子堆积,影响基因组稳定性,最终加重脑组织进一步损伤。其次,本研究结果显示 ERCC1 基因 mRNA 表达与中风史呈负相关,说明 ERCC1 基因不但参与 CIS 发生、发展及转归,可能与 CIS 复发或再发密切相关。研究发现 ERCC1 基因序列改变如突变、甲基化,会直接或间接抑制基因表达^[6-7],当机体遭遇急性 CIS 时,尚不能刺激或调动缺陷 ERCC1 基因表达,影响神经细胞内损伤 DNA 分子的修复,最终导致 CIS 反复发作,未来需进一步研究予以明确。

然而,本研究结果显示 CIS 患者血浆中 ERCC1 蛋白表达水平明显高于健康对照组,表明急性 CIS 刺激机体进行 ERCC1 蛋白翻译,参与修复已损伤的 DNA 分子或即将产生的大量损伤 DNA 分子,减小 CIS 面积,加快脑组织损伤修复。ERCC1 基因 mRNA 与蛋白表达规律相反,可能与 ERCC1 蛋白翻译

过程中或翻译后加工及修饰异常有关^[8-9]。当机体发生急性 CIS 时,脑细胞缺血缺氧状态刺激机体快速将 ERCC1 基因 mRNA 水平翻译成蛋白,短时间内提高了 ERCC1 基因的翻译效率,但机体 ERCC1 基因瞬时转录水平有限^[9],不足以修复脑损伤区和缺血区脑细胞内大量已损伤 DNA 分子,尚无法逆转急性 CIS 的发生、发展及转归。

本研究结果显示卒中组白细胞计数显著高于对照组,认为炎性细胞参与 CIS 可能是产生大量损伤 DNA 分子的始动因素,与以往研究结论类似^[10-14]。急性 CIS 发生后,缺血核心区和正常灌注区之间将形成缺血半暗带,炎性细胞浸润缺血核心区及缺血半暗带区,释放氧自由基,与处于休眠状态或半休眠状态神经细胞内的 DNA 结合,引起 DNA 碱基损伤或断裂,造成大量损伤 DNA 分子蓄积,导致神经细胞内酶或功能紊乱,加剧缺血性脑损伤^[15-16]。另外,白细胞易黏附于血管内皮细胞表面,形成细胞栓子,引起微循环障碍,导致脑细胞进一步缺血、缺氧,甚至坏死^[15]。本研究发现,中风史、高血压史、糖尿病史、血脂异常等因素在急性 CIS 的发病中具有重要作用。

本研究存在以下局限:(1)样本量较小,需进一步加大样本量;(2)本研究仅对 ERCC1 基因表达进行了定量检测,未来需建立急性 CIS 动物模型,定位检测 ERCC1 基因表达,同时从体内外实验探讨 ERCC1 基因参与急性 CIS 的作用机制。

参考文献

- [1] LA V D B, DIJKGRAAF M G, BERKHEMER O A, et al. Two-year outcome after endovascular treatment for acute ischemic stroke[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(26): 1341-1349.
- [2] 孙海欣,王文志. 中国脑卒中患病率、发病率和死亡率调查结果发表[J]. *中华神经科杂志*, 2017, 50(5): 337.
- [3] CANUGOVI C, MISIAK M, FERRARELLI L K, et al. The role of DNA repair in brain related disease pathology[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2013, 12(8): 578-587.
- [4] GHOSH S, CANUGOVI C, YOON J S, et al. Partial loss of the DNA repair scaffolding protein, Xrcc1, results in increased brain damage and reduced recovery from ischemic stroke in mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(7): 2319-2330.
- [5] DIJK M, TYPAS D, MULLENDERS L, et al. Insight in the multilevel regulation of NER[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 329(1): 116-123.
- [6] CHEN H, SHAO C, SHI H, et al. Single nucleotide polymorphisms and expression of ERCC1 and ERCC2 vis-a-vis chemotherapy drug cytotoxicity in human glioma[J]. *J Neurooncol*, 2007, 82(3): 257-262.
- [7] LIMA L M, de SOUZA L R, DA S T, et al. DNA repair gene excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in head and neck squamous cell carcinoma: a analysis of methylation and polymorphism (G19007A), protein expression and association with epidemiological and clinicopathological factors[J]. *Histopathology*, 2012, 60(3): 489-496.
- [8] KIMCHI-SARFATY C, OH J M, KIM I W, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity[J]. *Science*, 2007, 315(5811): 525-528.
- [9] TSAI C J, SAUNA Z E, KIMCHI-SARFATY C, et al. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima[J]. *J Mol Biol*, 2008, 383(2): 281-291.
- [10] LIU Y, KONG X, WANG W, et al. Association of peripheral differential leukocyte counts with dyslipidemia risk in Chinese patients with hypertension: insight from the China stroke primary prevention trial[J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(1): 256-266.
- [11] MINIC G A. Leucocyte count indicates carotid plaque instability in stroke patients[J]. *Vojnosanit Pregl*, 2016, 73(6): 515-525.
- [12] CHEN Z, HUANG Y, LI S, et al. Platelet-to-white blood cell ratio: a prognostic predictor for 90-day outcomes in ischemic stroke patients with intravenous thrombolysis[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(10): 2430-2438.
- [13] 张屏,刘长江,周蓐,等. 血白细胞计数与急性缺血性脑卒中患者短期预后的关系[J]. *临床神经病学杂志*, 2014, 27(4): 256-260.
- [14] 吕利英,国钰梅,黄泽宇,等. 入院白细胞水平与急性缺血性脑卒中患者出院结局的关系[J]. *临床神经病学杂志*, 2015, 38(3): 172-176.
- [15] KIM J Y, PARK J, CHANG J Y, et al. Inflammation after ischemic stroke: the role of leukocytes and glial cells[J]. *Exp Neurobiol*, 2016, 25(5): 241-251.
- [16] REGENHARDT R W, DAS A S, STAPLETON C J, et al. Blood pressure and penumbral sustenance in stroke from large vessel occlusion[J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 317.

(收稿日期:2018-05-22 修回日期:2018-08-23)