

·论著·

ADRB2 基因多态性与 aSAH 迟发性脑血管痉挛的 关联性研究

董发达¹, 马晓虎¹, 田冰锋²

作者单位
1. 咸阳市第一人民医院
医院神经外科
陕西 咸阳 712000
2. 汉中市中心医院
神经外科
陕西 汉中 723000
收稿日期
2017-06-13
通讯作者
马晓虎
82788582@qq.com

摘要 目的:探讨中国北方汉族人群中,动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)后迟发性脑血管痉挛(DCVS)与β2肾上腺素能受体(ADRB2)基因多态性的关系。**方法:**aSAH患者206例纳入研究,按照是否合并DCVS分为DCVS组128例和无DCVS组78例,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测ADRB2基因A46G位点和C79G位点多态性。**结果:**单因素分析结果显示ADRB2基因A46G位点等位基因模型(A vs. G)和显性基因模型(A/A vs. A/G + G/G)均与DCVS发生相关;多因素Logistics回归分析结果显示ADRB2基因+46位点等位基因G和基因型(A/G + G/G)与aSAH患者发生DCVS的危险因素($OR=1.414, 95\%CI: 1.142\sim 4.817, P=0.039$; $OR=1.337, 95\%CI: 1.076\sim 3.191, P=0.045$);C79G位点各基因模型与DCVS相关性均无统计学意义。**结论:**对于中国北方汉族aSAH患者,ADRB2基因A46G位点多态性与DCVS发生相关。
关键词 β2肾上腺素能受体;动脉瘤性蛛网膜下腔出血;迟发性脑血管痉挛;基因多态性
中图分类号 R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssngcj.2018.01.002

Association between Polymorphism of Beta-2 Adrenergic Receptor and Delayed Cerebral Vasospasm in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage DONG Fa-da¹, MA Xiao-hu¹, TIAN Bing-feng². 1. Department of Neurosurgery, First people's Hospital of Xianyang, Shanxi, 712000, China 2. Department of Neurosurgery, Hanzhong central hospital, Shanxi 723000, China

Abstract Objective: To investigate the genetic association between Beta-2 Adrenergic Receptor (ADRB2) gene polymorphism and delayed cerebral vasospasm (DCVS) in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH) in the Han descent population in North of China. **Methods:** Two hundred and six aSAH patients were recruited. According to whether DCVS occurred, cases were divided into the DCVS group (n=128) and the non-DCVS group (n=78). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism combined with DNA direct sequencing technique were used to determine the polymorphism of the ADRB2 gene. **Results:** Univariate analysis showed independent association between allele model (A vs. G) and the dominant model (A/A vs. A/G + G/G) of ADRB2 gene A46G polymorphism and DCVS. Multivariate Logistic regression analysis showed that ADRB2 gene +46 position allele G and genotype (A/G + G/G) were risk factors of DCVS for aSAH patients ($OR=1.414, 95\%CI: 1.142\sim 4.817, P=0.039$; $OR=1.337, 95\%CI: 1.076\sim 3.191, P=0.045$). However, there was no significant difference in the frequencies of genotype and allele of C79G polymorphism between the DCVS group and the non-DCVS group. **Conclusion:** For aSAH patients in the Han descent population in the North of China, A46G polymorphism of ADRB2 gene may closely related to DCVS.
Key words Beta-2 adrenergic receptor; aneurysmal subarachnoid hemorrhage; delayed cerebral vasospasm; gene polymorphism

动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aneurysmal subarachnoid hemorrhage, aSAH)是非创伤性SAH最常见的类型^[1]。脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是SAH常见的并发症,导致神经功能缺损加重,病残率和死亡率增高^[2,3]。CVS分为急性和迟发性2种,急性CVS发生于SAH发病48 h内,主要机制在于血性脑脊液对脑血管的刺激引发应激性反应;迟发性脑血管痉挛(delayed cerebral vasospasm, DCVS)在SAH发病48 h后出现,机制复杂,可能涉及炎症反应、血管舒张/收缩因子失衡、血管壁结构变化及基因易感性等

多方面^[2-4]。临床常见不同个体发生DCVS的时机、严重程度及预后存在较大差异,提示基因多态性可能在其中发挥一定作用。
β2肾上腺素能受体(Beta-2 adrenergic receptor, ADRB2)是G蛋白偶联受体家族的一员,广泛分布于血管平滑肌等平滑肌组织,参与血管舒张。ADRB2基因多态性与高血压、缺血性卒中等心脑血管疾病相关^[5]。推测ADRB2基因多态性可能也与aSAH后继发DCVS相关。本研究拟观察中国北方汉族aSAH患者ADRB2基因多态性及其在DCVS中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2014年1月至2016年6月我院神经外科治疗的aSAH患者206例,男124例,女82例;平均年龄(49.2 ± 10.7)岁。纳入标准:年龄 >18 岁但 ≤ 80 岁;出生并长期生活于中国北方地区的汉族人;aSAH诊断符合2012年美国动脉瘤性蛛网膜下腔出血诊治指南^[1],并经脑血管造影和(或)脑血管CTA检查确认。排除标准:合并可疑颅脑外伤;发病3 d内出现脑疝、死亡;既往合并卒中、颅内肿瘤等严重神经疾病;肝、肾等重要脏器严重器质性病变或功能障碍。本研究通过本院伦理委员会审核批准,所有入组患者充分知情同意。

国内外对aSAH后DCVS诊断尚无统一标准,本研究采纳目前广泛使用的DCVS诊断依据^[9]:①临床症状经治疗好转或稳定后再次恶化或进行性加重,伴发热、血象升高,且无感染迹象;②出现意识障碍,或原来意识障碍程度加重;③突然或逐渐出现的神经定位体征,包括失语、失认、偏瘫及偏身麻木等;④出现头痛、呕吐及视乳头水肿等颅内压增高表现;⑤DSA、MRA或CTA等影像学检查提示CVS;⑥经颅多普勒(transcranial doppler, TCD)检查大脑中动脉峰值平均血流速度(peak mean flow velocity, PMFV) ≥ 140 cm/s,或大脑后动脉PMFV ≥ 90 cm/s。患者在发病3 d~2周内,符合上述诊断依据至少1条,且排除再出血、脑积水和电解质紊乱等因素后可诊断为DCVS。按此标准将患者分为DCVS组128例和无SDCVS组78例。

1.2 方法

aSAH患者治疗原则符合2012年美国动脉瘤性蛛网膜下腔出血诊治指南^[1],血压控制在90~140/50~80 mmHg,常规给予尼莫地平抗血管痉挛,根据患者病情选择合适手术方式及手术时机,并记录。

采集清晨空腹时外周静脉血3 mL,提取基因组DNA,聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测ADRB2基因A46G多态性和C79G多态性。引物由上海生共生物有限公司合成,其中A46G位点,上游引物:5'-CTTCTTGCTGGCAGCAAT-3',下游引物:5'-CCAGTGAAGTGATGAAGTAGTTGG-3';C79G位点,上游引物:5'-GCCTTCTTGCTGGCACCCCAT-3',下游引物:5'-CAGACGCTCGAAGTTGGCCATG-3'。反应条件:95℃预变性4 min,然后按照95℃20 s、55℃30 s、72℃30 s顺序循环30周期,最后72℃延长3 min。扩增产物分别使用限制性内切酶BsrD I和Bbv I进行酶切,37℃16 h,然后65℃10 min终止反

应。取酶切产物进行电泳,紫外灯下观察并摄片。

1.3 统计学处理

采用SPSS19.0统计软件处理数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示, t 检验;计数资料以率表示, χ^2 检验。基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡定律检验。多因素Logistic回归分析法评价ADRB2基因多态性与aSAH患者DCVS的相关关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组一般资料比较

2组在入院时体温升高、Hunt-Hess分级和Fisher分级差异具有统计学意义(均 $P<0.05$),其他方面差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表1。

2.2 基因分型及Hardy-Weinberg遗传平衡检验结果

人群中ADRB2基因A46G多态包括3种基因型:纯合野生型(A/A)、杂合突变型(A/G)及纯合突变型(G/G);C79G多态也存在3种基因型:纯合野生型(C/C)、杂合突变型(C/G)及纯合突变型(G/G)。本研究基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡,其基因频率已达到遗传平衡,具有群体代表性,见表2。

2.3 ADRB2各基因模型与DCVS的相关性

单变量分析结果显示,ADRB2基因A46G等位基因模型、显性基因模型均与aSAH患者发生DCVS相关,2组隐性基因模型差异无统计学意义。ADRB2基因C79G等位基因模型、显性基因模型和隐性基因模型均与aSAH患者发生DCVS无关,见表3。

2.4 多因素Logistic回归分析

对于aSAH患者,发热、Hunt-Hess分级、Fisher分级,ADRB2基因+46位点等位基因G和基因型(A/G+G/G)均是发生DCVS的独立危险因素,见表4。

3 讨论

DCVS是aSAH患者最常见的并发症之一,会加重患者神经功能缺损和意识状态恶化,关于DCVS发作的机制是该领域的研究重点^[4,7]。研究显示,多种基因遗传多态性与DCVS发作相关,其中包括儿茶酚胺氧化甲基转移酶基因、内皮型一氧化氮合成酶基因、触珠结合蛋白基因、载脂蛋白E基因、纤溶酶原激活物抑制剂-1基因、兰尼碱受体基因、胱硫醚 β -合酶基因和血管内皮生长因子基因等^[5,8,9]。虽然部分研究结果存在差异,甚至相互矛盾,但这些研究不仅有助于对易发人群给予积极预防,还可能为DCVS的治疗提供新思路。

ADRB2激动后可引起平滑肌舒张,在血管舒张反

表1 2组患者基本临床资料

组别	例数	年龄/(岁, $\bar{x}\pm s$)	男性/[例(%)]	吸烟/[例(%)]	体重指数/(kg/m ² , $\bar{x}\pm s$)	高血压/[例(%)]
DCVS组	128	49.5±11.3	80(62.5)	63(49.2)	23.1±3.7	39(30.5)
无DCVS组	78	48.7±10.3	44(56.4)	43(55.1)	24.0±4.3	21(26.9)
<i>t</i> / χ^2 值		0.497	0.750	0.678	1.587	0.295
<i>P</i> 值		0.620	0.386	0.410	0.114	0.587

组别	糖尿病/[例(%)]	血脂异常/[例(%)]	收缩压/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)	舒张压/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)	空腹血糖/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)
DCVS组	14(10.9)	44(34.4)	123.7±10.3	76.5±8.8	5.0±1.6
无DCVS组	6(7.7)	29(37.2)	124.2±11.8	77.2±9.2	4.8±1.5
<i>t</i> / χ^2 值	0.582	0.167	0.319	0.536	0.948
<i>P</i> 值	0.445	0.683	0.750	0.593	0.343

组别	甘油三酯/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	总胆固醇/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	LDL-C/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	HDL-C/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	白细胞计数/(×10 ⁹ /L, $\bar{x}\pm s$)	体温≥37.4℃/[例(%)]
DCVS组	1.5±0.6	3.9±1.1	2.3±0.9	1.1±0.3	7.1±2.3	29(22.7)
无DCVS组	1.4±0.6	3.8±0.9	2.2±0.8	1.1±0.2	6.7±2.2	8(10.3)
<i>t</i> / χ^2 值	1.263	0.739	0.794	0.744	1.258	5.057
<i>P</i> 值	0.208	0.461	0.428	0.458	0.210	0.025

组别	手术方式/[例(%)]		手术时机/[例(%)]			Hunt-Hess 分级/[例(%)]		Fisher 分级/[例(%)]	
	血管内介入治疗	外科治疗	急性期内 ($<3\text{ d}$)	血管痉挛期 ($4\text{ d}\sim 2\text{ w}$)	延期 ($>2\text{ w}$)	I + II	Ⅲ+Ⅳ+Ⅴ	I + II	Ⅲ+Ⅳ
DCVS组	30(23.4)	98(76.6)	92(71.9)	11(8.6)	25(19.5)	90(70.3)	38(29.7)	70(54.7)	58(45.3)
无DCVS组	16(20.5)	62(79.5)	59(75.6)	3(3.8)	16(20.5)	66(84.6)	12(15.4)	54(69.2)	24(30.8)
<i>t</i> / χ^2 值	0.239		1.725			5.394		4.278	
<i>P</i> 值	0.625		0.422			0.020		0.039	

注:低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)

表2 ADRB2基因Hardy-Weinberg遗传平衡检验

SNPs	实际例数				H-W 理论例数				χ^2 值	P值
	基因型				基因型					
A46G	A/A	A/G	G/G	总计	A/A	A/G	G/G	总计		
DCVS 组	34	64	30	128	34.0	64.0	30.0	128	0.000	1.000
无DCVS 组	32	36	10	78	32.0	35.9	10.1	78	0.000	1.000
C79G	C/C	C/G	G/G	总计	C/C	C/G	G/G	总计		
DCVS 组	96	30	2	128	96.3	29.5	2.3	128	0.039	0.981
无DCVS 组	62	14	2	78	61.0	15.9	1.0	78	1.138	0.566

表3 ADRB2各基因模型与DCVS的相关性

SNPs	χ^2 值	<i>P</i> 值
A46G		
等位基因模型(A vs G)	6.196	0.013
显性基因模型(A/A vs A/G + G/G)	4.656	0.031
隐性基因模型(A/A + A/G vs G/G)	3.491	0.062
C79G		
等位基因模型(C vs G)	0.267	0.605
显性基因模型(C/C vs C/G + G/G)	0.546	0.460
隐性基因模型(C/C + C/G vs G/G)	0.255	0.613

表4 多因素Logistic回归分析结果

变量	<i>B</i>	<i>S.E</i>	<i>Wals</i>	<i>OR</i>	95%CI	<i>P</i> 值
入院时体温 $\geq 37.4^{\circ}\text{C}$	0.486	0.392	1.534	1.625	(1.163~3.165)	0.031
Hunt-Hess 分级	0.905	0.787	1.321	3.471	(1.917~7.327)	0.027
Fisher 分级	0.242	0.311	0.606	2.274	(1.018~5.310)	0.022
46G 等位基因	0.346	0.208	2.774	1.414	(1.142~4.817)	0.039
(A/G + G/G)基 因型	0.290	0.319	0.829	1.337	(1.076~3.191)	0.045

应的调节中具有关键作用。一旦ADRB2表达和分布发生变化,血管舒张反应受限或障碍,尤其当局部合并炎症反应时,可导致血管持续收缩^[10],这种现象发生在aSAH患者,即容易诱导DCVS发作。另外,还有研究

发现ADRB2在血管对激动剂脱敏中也具有重要意义^[11],再次表明ADRB2参与血管舒张反应的调节,并起到关键性作用。

人类ADRB2基因位于5q31~32,存在多个位点突变,包括启动子区的-47和-20位点,和N末端的+46,
(下转第12页)

强调戒烟和控制血糖对缺血性卒中防治的意义。

综上所述,本研究发现高血压患者 RYR-3 基因 rs2229116 多态性与 LAA 相关,提示对于高血压患者,如基因检测发现 RYR-3 基因 rs2229116 位点基因型为 AA,合理应用钙离子拮抗剂降压可能有助于 LAA 预防。当然,目前研究发现缺血性卒中可能与多基因共同表达相关,RYR-3 基因与其他基因相互作用的具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Sabanayagam C, Shankar A. Serum calcium levels and hypertension among U.S. adults [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2011, 13: 716-721.
- [2] Hazari MA, Arifuddin MS, Muzzakar S, et al. Serum Calcium Level in Hypertension[J]. *N Am J Med Sci*, 2012, 4: 569-572.
- [3] Shrestha S, Irvin MR, Grunfeld C, et al. HIV, inflammation, and calcium in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34: 244-250.
- [4] Kalampogias A, Siasos G, Oikonomou E, et al. Basic Mechanisms in Atherosclerosis: The Role of Calcium[J]. *Med Chem*, 2016, 12: 103-113.
- [5] Zhao C, Ikeda S, Arai T, et al. Association of the RYR3 gene polymorphisms with atherosclerosis in elderly Japanese population[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014, 14: 6.
- [6] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39: 579-616.

- [7] Adams HP Jr, Biller J. Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification[J]. *Stroke*, 2015, 46: 114-117.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2010 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2012, 20: 1227-1245.
- [9] Lee HB, Kim Y, Yoo H, et al. Blood genomic profiling in extracranial and intracranial atherosclerosis in ischemic stroke patients[J]. *Thromb Res*, 2014, 134: 686-692.
- [10] Shin S, Chang HJ, Kim KJ, et al. Impacts of serum calcium and phosphate on coronary atherosclerosis detected by cardiac computed tomography[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33: 2873-2881.
- [11] Montalcini T, Gorgone G, Pujia A. Serum calcium level is related to both intima-media thickness and carotid atherosclerosis: a neglect risk factor in obese/overweight subjects[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 114.
- [12] Montalcini T, Terracciano R, Romeo S, et al. Postmenopausal women with carotid atherosclerosis: potential role of the serum calcium levels[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2013, 23: 1141-1146.
- [13] 安增梅, 陆颖理, 宣应芬. 老年 2 型糖尿病合并高血压伴同型半胱氨酸升高患者高敏 C 反应蛋白与颈动脉硬化和血钙、磷的关系[J]. *中国糖尿病杂志*, 2015: 426-429.
- [14] Zhang L, Liu Y, Song F, et al. Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 13653-8.
- [15] Shrestha S, Yan Q, Joseph G, et al. Replication of RYR3 gene polymorphism association with cIMT among HIV-infected whites[J]. *AIDS*, 2012, 26: 1571-1573.
- [16] Baran I, Ganea C. RyR3 in situ, regulation by Ca(2+), and quercetin and the RyR3-mediated Ca(2+), release flux in intact Jurkat cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 540: 145-159.
- [17] 吴资波. RYR3 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的相关性研究[D]. 中南大学, 2014.

(本文编辑:王晶)

(上接第 8 页)

+79 等位点,其中 A46G 和 C79G 是目前研究较多,且与多种疾病相关性较确切的 2 个多态性位点^[5,12]。近年来,国内外相继有临床研究在不同人种中,发现 ADRB2 基因多态性与高血压的发生发展密切相关^[5,10],还有研究发现在血压正常的人群中,不同 ADRB2 基因型可表现为对激动剂反应显著差异^[13],表明 ADRB2 基因多态性可影响血管生理反应。因此,笔者认为有理由推测 ADRB2 基因多态性也与 aSAH 后继发 DCVS 相关。

研究结果显示 46G 等位基因与 DCVS 密切相关,且显性基因模型(A/G + G/G)与 DCVS 相关性具有统计学意义,提示 46G 基因突变在体内显性表达,突变杂合子和突变纯合子均可能增加 DCVS 发生的危险度。但是,研究结果显示 C79G 位点基因多态性与 DCVS 无明显相关性,不排除种族和入组人群临床特征差异造成的影响。另外,单因素和多因素分析结果显示发热、高 Hunt-Hess 等级和高 Fisher 等级与 aSAH 患者发生 DCVS 密切相关,提示对于 aSAH 患者需要更加全面了解病情,以便准确评估患者发生 DCVS 危险性,选择更合适的治疗方案。

本研究也存在不足之处,DCVS 发病机制十分复杂,不仅与局部复杂多变病理生理状况相关,还可能是多基因共同表达的结果,ADRB2 基因多态性与其他因素、其他基因相互作用的机制也仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Jr CE, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for health-care professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2012, 43: 1711-1737.
- [2] Pepa GMD, Scerrati A, Albanese A, et al. Protective effect of external ventricular drainage on cerebral vasospasm. A retrospective study on aneurysmal SAH treated endovascularly[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2014, 124: 97-101.
- [3] Kühn AL, Balami JS, Grunwald IQ. Current management and treatment of cerebral vasospasm complicating SAH[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12: 233-241.
- [4] 王玉妹, 唐思魏, 石广志. 蛛网膜下腔出血后迟发性脑血管痉挛的发病机制和治疗进展[J]. *中国卒中杂志*, 2016, 11: 494-500.
- [5] Lou Y, Liu J, Li Y, et al. Association study of the β_2 -adrenergic receptor gene polymorphisms and hypertension in the Northern Han Chinese[J]. *Plos One*, 2011, 6: 1934-1937.
- [6] 刘艳, 朱明秋, 林丽晴, 等. 尼莫地平防治蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的疗效分析[J]. *神经损伤与功能重建*, 2014, 9: 249-250.
- [7] 吴政俊, 蒋永祥, 程远, 等. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血致迟发性脑血管痉挛危险因素的 Meta 分析[J]. *重庆医学*, 2014, 43: 1718-1720.
- [8] He Z, Sun X, Guo Z, et al. The correlation between COMT gene polymorphism and early cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110: 233-238.
- [9] Rueffert H, Gumplinger A, Renner C, et al. Search for genetic variants in the ryanodine receptor 1 gene in patients with symptomatic cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurocrit Care*, 2011, 15: 410-415.
- [10] Tang Z, Li X, Liao D. Associations of polymorphisms in the β_2 -adrenergic receptor gene with essential hypertension in Han Chinese population[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 9339-9345.
- [11] Manzini S, Pinna C, Busnelli M, et al. Beta2-adrenergic activity modulates vascular tone regulation in lecithin:cholesterol acyltransferase knock-out mice[J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74: 114-121.
- [12] 王莉莉, 张远, 贺茂林. β_2 肾上腺素能受体基因多态性对伴发其他自身免疫性疾病的重症肌无力预后的影响[J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48: 390-394.
- [13] Sanders VM. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: Do we understand it yet[J]? *Brain Behav Immun*, 2012, 26: 195-200.

(本文编辑:唐颖馨)