

水通道蛋白4基因多态性与陕西地区高血压脑出血患者迟发性脑水肿的相关性研究

董发达,马晓虎

摘要 目的:探讨水通道蛋白4(AQP₄)基因多态性与高血压脑出血(HICH)患者迟发性脑水肿的关系。**方法:**137例HICH患者按照是否合并迟发性脑水肿分为病例组42例和对照组95例,采用聚合酶链反应-直接测序分型法检测AQP₄基因rs1058424,rs3763043和rs335931多态性,并收集患者临床资料进行统计学分析。**结果:**与对照组比较,病例组患者年龄较大,糖尿病、持续发热患者比例较高,基线血肿体积较大,基线NIHSS评分较高(均 $P<0.05$)。病例组rs3763043位点TT基因型和T等位基因分布频率较对照组均显著增加(均 $P<0.05$)。回归分析结果显示,对于HICH患者,携带AQP₄基因rs3763043位点T等位基因、发热、血肿体积偏大及NIHSS评分偏高可能是发生迟发型脑水肿的危险因素。**结论:**携带AQP₄基因rs3763043位点T等位基因、发热、血肿体积偏大及NIHSS评分偏高可能是HICH患者发生迟发型脑水肿的危险因素。

关键词 水通道蛋白4;高血压脑出血;迟发性脑水肿;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.sjssgncj.2018.10.004

作者单位

咸阳市第一人民医院
院神经外科

陕西 咸阳 712000

收稿日期

2018-03-17

通讯作者

马晓虎

82788582@qq.com

Association Between Aquaporin 4 Gene Polymorphism and Delayed Cerebral Edema in Patients with Hypertensive Intracerebral Hemorrhage in Shanxi DONG Fa-da, MA Xiao-hu.
Department of external two families, First people's Hospital of Xianyang, Shanxi Xianyang 712000, China

Abstract Objective: To investigate the association between aquaporin 4 (AQP₄) gene polymorphism and delayed cerebral edema in patients with hypertensive intracerebral hemorrhage (HICH) in Shanxi. **Methods:** One hundred and thirty-seven HICH patients in Shanxi were recruited to the study. According to whether combined with delayed cerebral edema, they were divided into the case group (42 cases) and the control group (95 cases). Genotype was determined by polymerase chain reaction- sequence based typing for AQP₄ gene rs1058424, rs3763043, and rs335931 polymorphism. In addition, other clinical data were collected for statistical analysis. **Results:** Compared to the control group, the case group showed higher age, higher ratio of patients with diabetes and persistent fever, greater baseline hematoma volume, and higher baseline National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score (all $P<0.05$). Compared with the control group, frequencies of genotype TT and allele T of rs3763043 in the case group were both significantly increased (both $P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that carrying allele T of AQP₄ gene rs3763043, fever, large hematoma volume, and high NIHSS score were risk factors of delayed cerebral edema for HICH patients. **Conclusion:** For HICH patients in Shanxi, carrying allele T of the AQP₄ gene rs3763043, fever, large hematoma volume, and high NIHSS score were risk factors of delayed cerebral edema.

Key words aquaporin 4; hypertensive intracerebral hemorrhage; delayed cerebral edema; gene polymorphism

脑出血后,脑组织会出现不同程度的脑水肿^[1,2]。多数脑水肿在出血后数分钟内即可出现,3~7 d达到高峰,之后逐渐消退。但有部分患者表现为在出血7 d后脑水肿再次加重,称之为迟发性脑水肿,是该阶段患者病情加重和死亡最常见的原因之一^[3,4]。研究结果显示,水通道蛋白4(aquaporin 4, AQP₄)可能参与脑水肿形成^[5,6]。AQP₄基因中多个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点可能与脑水肿相关^[7,8]。但有关AQP₄基因多态性与迟发性脑水肿的研究报道偏少,且不同地区、不同人

种基因型分布存在差异,可能导致研究结果不同。本研究以陕西地区汉族高血压性脑出血(hypertensive intracerebral hemorrhage, HICH)患者为研究对象,探讨AQP₄基因rs1058424、rs3763043和rs335931这3个SNP位点与HICH后迟发性脑水肿的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

连续性选择2015年1月至2017年10月于我科行内科保守治疗的HICH患者137例纳入研究,其中男78例,女59例,平均年龄

(61.2±11.4)岁。纳入标准:18岁<年龄≤80岁;HICH诊断明确,并经头颅CT/MR检查确认;首次发病,由发病到住院<24 h,在院外未接受治疗;出生并长期生活于陕西地区的汉族人,彼此无血缘关系;一般临床资料完整;患者及家属完全知情同意。排除标准:继发性ICH;病情严重,2周内出现脑疝、死亡或治疗中途转手术治疗;合并硬膜外/下出血,或蛛网膜下腔出血,或出血破入脑室;合并严重肝肾功能障碍、自身免疫疾病、严重感染、恶性肿瘤、严重凝血功能障碍,或近期口服抗血小板、抗凝药物;妊娠期女性。本研究通过本院伦理委员会审核批准。

迟发性脑水肿诊断标准:ICH患者发病1周内病情趋于稳定,发病7~14 d时突然出现病情加重,复查头颅CT提示血肿已有不同程度吸收,但血肿周围水肿体积较入院时明显增加。根据患者临床表现及影像学检查结果,将所有入组患者分为合并迟发性脑水肿的病例组和未合并迟发性脑水肿的对照组。病例组42例,男25例,女17例,平均年龄(63.5±10.2)岁;对照组95例,男53例,女42例,平均年龄(59.1±11.7)岁。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 收集所有入组患者临床资料,主要包括患者性别,年龄,体重指数(body mass index, BMI),糖尿病史,吸烟、饮酒史,有无持续发热(发病1周内发热>3 d),入院时血肿大小,出血部位,入院时基线美国国立卫生研究院卒中量表(National Institutes of Health Stroke Scale,NIHSS)评分。

1.2.2 治疗 参照我国2015年脑出血诊治指南,予以规范的脱水剂降颅压,严格控制血压、血糖,营养神经,预防肺部感染和深静脉血栓形成等内科综合保守治疗和常规护理。

1.2.3 SNP位点筛选 筛选原则:根据HapMap数据库中中国汉族人群的基因型数据库,满足Hardy-Weinberg平衡;最小等位基因频率>0.15;连锁不平衡参数 $r^2>0.8$;优先选择启动子区、3'非编码区、5'非编码区及外显子区的位点。据此,本研究共选取rs1058424, rs3763043和rs335931这3个标签SNP位点。

1.2.4 基因多态性检测 ①基因组DNA提取:采集清晨空腹时外周静脉血,DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取全血基因组DNA。②PCR扩增:上、下游引物各1 μL(见表1,均由上海生工生物技术有限公司合成),dNTP混合物2 μL,TaqDNA聚合酶0.25 μL,模板DNA1 μL,10×Buffer 2.5 μL。反应条件:95℃预变性4 min,然后按照变性95℃20 s、退火

60℃30 s、延伸72℃50 s的顺序循环30周期,最后72℃延伸3 min。③测序:PCR产物采用美国ABI公司配套专用BigDye® Terminator v3.1 Kit试剂盒进行线性扩增,最后采用ABI 3730测序仪进行测序。

表1 PCR扩增引物序列

SNPs	引物序列
rs1058424	F:GCAAGTGTCACTGCTCATCA; R:GATTTGGGAAGGATTTCTGAA
rs3763043	F:TTGCCATTGTAAACTCAG; R:CACGTCTATCAGCTTATTCC
rs335931	F:GCACTTGAAAATGTAGATG; R:CAAGCTAAGAATGTTCTCTAC

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0统计软件处理数据,计量资料结果以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料结果以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡定律检验。将单因素分析 $P<0.05$ 的参数均作为混杂因素,采用二分类多因素Logistic后退逐步回归分析法评价AQP₄基因多态性与HICH患者迟发性脑水肿的相关关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组一般临床资料比较

本研究结果显示,与对照组比较,病例组患者年龄较大,糖尿病、持续发热患者比例较高,基线血肿体积较大,基线NIHSS评分较高(均 $P<0.05$);2组性别、BMI、吸烟、饮酒及出血部位等方面差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表2。

2.2 AQP₄基因多态性与迟发性脑水肿的关系

2组各位点基因型分布频率如表3-5,各位点在病例组和对照组基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡。病例组rs3763043位点TT基因型和T等位基因分布频率较对照组均显著增加,差异具有统计学意义($\chi^2=4.705, 5.994$; 均 $P<0.05$)。2组rs1058424和rs335931位点基因型和等位基因分布频率差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.3 多因素Logistic回归分析

采用二分类多因素Logistic后退逐步回归法分析,结果显示对于HICH患者,携带AQP₄基因rs3763043位点T等位基因、发热、血肿体积偏大及NIHSS评分偏高可能是发生迟发型脑水肿的危险因素,见表6。

表2 2组一般临床资料比较

组别	例数	年龄/(岁, $\bar{x}\pm s$)	男/[例(%)]	BMI/(kg/m ² , $\bar{x}\pm s$)	糖尿病/[例(%)]	吸烟/[例(%)]	饮酒/[例(%)]
对照组	95	59.1±11.7	53(55.8)	24.0±3.9	8(8.4)	30(31.6)	16(16.8)
病例组	42	63.5±10.2	25(59.5)	23.7±4.2	9(21.4)	18(42.9)	8(19.0)
t/χ ² 值		2.108	0.166	0.404	4.534	1.628	0.098
P值		0.037	0.684	0.686	0.033	0.202	0.754

组别	持续发热/[例(%)]	出血部位/[例(%)]		基线血肿体积 /(mL, $\bar{x}\pm s$)	基线NIHSS评分 /(分, $\bar{x}\pm s$)
		脑叶	深部		
对照组	17(17.9)	15(15.8)	80(84.2)	11.0±6.9	7.2±7.5
病例组	15(35.7)	10(23.8)	32(76.2)	16.2±7.4	10.2±8.1
t/χ ² 值	5.166		1.256	3.977	2.044
P值	0.023		0.262	0.001	0.041

表3 AQP₄基因rs1058424位点多态性与迟发性脑水肿的关系[例(%)]

组别	基因型			等位基因	
	AA	AT	TT	A	T
对照组	39(41.1)	49(51.6)	7(7.4)	127(66.8)	63(33.2)
病例组	21(50.0)	17(40.5)	4(9.5)	59(70.2)	25(29.8)
χ ² 值		1.275	0.008		0.308
P值		0.259	0.931		0.579
OR(95%CI)		0.644(0.300~1.385)	1.061(0.278~4.045)		0.854(0.489~1.491)

表4 AQP₄基因rs3763043位点多态性与迟发性脑水肿的关系[例(%)]

组别	基因型			等位基因	
	CC	CT	TT	C	T
对照组	48(50.5)	35(36.8)	12(12.6)	131(68.9)	59(31.1)
病例组	13(31.0)	19(45.2)	10(23.8)	45(53.6)	39(46.4)
χ ² 值		2.745	4.705		5.994
P值		0.098	0.030		0.014
OR(95%CI)		2.004(0.875~4.593)	3.077(1.088~8.698)		1.924(1.135~3.261)

表5 AQP₄基因rs335931位点多态性与迟发性脑水肿的关系[例(%)]

组别	基因型			等位基因	
	AA	AG	GG	A	G
对照组	28(29.5)	57(60.0)	10(10.5)	113(59.5)	77(40.5)
病例组	10(23.8)	27(64.3)	5(11.9)	47(56.0)	37(44.0)
χ ² 值		0.420	0.261		0.297
P值		0.517	0.609		0.586
OR(95%CI)		1.326(0.564~3.119)	1.400(0.384~5.105)		1.155(0.687~1.941)

表6 多因素 Logistic 回归分析结果

变量	B	S.E	Wals	OR	95%CI	P
T等位基因	0.518	0.202	6.581	1.679	(1.168-3.313)	0.017
发热	0.226	0.300	0.565	1.253	(1.014-4.113)	0.033
基线血肿体积	0.634	0.462	1.886	1.886	(1.230-3.049)	0.011
基线NIHSS评分	0.389	0.281	1.920	1.476	(1.061-2.616)	0.021

3 讨论

基因 rs3763043 位点 T 等位基因、发热、血肿体积偏大及本研究结果显示显示,对于 HICH 患者,携带 AQP₄ NIHSS 评分偏高可能是发生迟发型脑水肿的危险因素。
(下转第 519 页)

after-what do we really know?Report of 11 patients and review of the literature[J]. *Dermatology*, 2006, 213: 93-101.

[21] Allen JA, Peterson A, Sufit R, et al. Post-epidemic eosinophilia-myalgia syndrome associated with L-tryptophan[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63: 3633-3639.

[22] Islam MN, Islam MA, Abdal SJ, et al. Eosinophilic fasciitis: what matters in management in a developing country--a case report with two and a half-year follow-up[J]. *J Health Popul Nutr*, 2012, 30: 117-120.

[23] Wright NA, Mazori DR, Patel M, et al. Epidemiology and treatment of eosinophilic fasciitis: an analysis of 63 patients from 3 tertiary care centers[J]. *JAMA Dermatol*, 2016, 152: 97-99.

[24] Pimenta S, Bernardes M, Bernardo A, et al. Intravenous immune globulins to treat eosinophilic fasciitis: a case report[J]. *Joint Bone Spine*, 2009, 76: 572-574.

[25] Khanna D, Agrawal H, Clements PJ. Infliximab may be effective in the treatment of steroid-resistant eosinophilic fasciitis: report of three cases[J]. *Rheumatology*, 2010, 49: 1184-1188.

[26] Horacek E, Sator PG, Gschnait F. 'Venous furrowing': a clue to the diagnosis of eosinophilic fasciitis. A case of eosinophilic fasciitis ultimately treated with oral PUVA therapy[J]. *Dermatology*, 2007, 215: 89-90.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第499页)

脑水肿是脑出血后最常见的并发症,血脑屏障在脑出血后迟发性脑水肿的形成中有重要作用。AQP₄蛋白是水通道蛋白,广泛分布于中枢神经系统星形胶质细胞上,参与组成血脑屏障。AQP₄蛋白可通过多途径、多机制参与脑出血后脑水肿的形成和吸收。在血管源性脑水肿机制中,AQP₄可加速水肿的消退,减轻水肿^[12]。通过敲除、敲低或关闭AQP₄蛋白能明显减轻细胞毒性脑水肿^[12]。AQP₄蛋白在脑水肿病理过程中的作用需要针对不同病因,在不同阶段进行分析。

AQP₄基因位于人类染色体18q11.2与q12.1之间,AQP₄基因多态性与AQP₄蛋白的水渗透功能相关,AQP₄基因存在多个SNP位点可能与创伤性脑损伤后脑水肿相关^[7,8]。本研究筛选了rs1058424,rs3763043和rs335931这3个标签SNP位点,其中rs1058424和rs3763043位于3'非编码区,rs335931位于4,5外显子之间的内含子区域。结果显示AQP₄基因rs3763043多态性与HICH后迟发性脑水肿发生密切相关,T等位基因可能是迟发性脑水肿发生的危险因素。既往有研究结果显示,该位点多态性与创伤性脑损伤后脑水肿及预后密切相关,但其具体生物功能目前仍不明确^[8]。本研究未发现rs1058424和rs335931多态性与HICH后迟发性脑水肿具有相关性,期待后续大样本研究进一步证实。

本研究分析结果显示持续发热、基线出血体积和NIHSS评分也是迟发性脑水肿发生的独立危险因素,提示对于合并持续发热,入院时基线出血体积较大和NIHSS评分较高的HICH患者,需要仔细评估其发生迟发性脑水肿的可能性,选择更合适的治疗方案。

本研究为单中心小样本研究,所得到的结果可能存在偏差;其次,本研究仅选取满足最小等位基因频率>0.15等条件的3个SNP位点,不排除可能存在其他

SNP与迟发性脑水肿相关;最后,ICH后迟发性脑水肿的发病机制十分复杂,不仅与局部复杂多变的病理环境相关,还可能是多基因共同表达的结果,AQP₄基因多态性与其他因素、其他基因相互作用的具体机制也有待进一步展开。

参考文献

[1] Cheripelli BK, Huang X, Macisaac R, et al. Interaction of Recanalization, Intracerebral Hemorrhage, and Cerebral Edema After Intravenous Thrombolysis[J]. *Stroke*, 2016, 47: 1761-1767.

[2] Mccourt R, Gould B, Gioia L, et al. Cerebral perfusion and blood pressure do not affect perihematoma edema growth in acute intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2014, 45: 1292-1298.

[3] Masuda Y, Ishikawa E, Yamamoto T, et al. Early Postoperative Expansion of Parenchymal High-intensity Areas on T2-weighted Imaging Predicts Delayed Cerebral Edema Caused by Carmustine Wafer Implantation in Patients with High-grade Glioma[J]. *Magn Reson Med Sci*, 2015, 15: 299-307.

[4] Kofler M, Schiefficker A, Ferger B, et al. Cerebral Taurine Levels are Associated with Brain Edema and Delayed Cerebral Infarction in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage[J]. *Neurocrit Care*, 2015, 23: 321-329.

[5] Rama Rao KV, Verkman AS, Curtis KM, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces encephalopathy and brain edema in experimental acute liver failure[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 63: 222-228.

[6] Katada R, Nishitani Y, Honmou O, et al. Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180: 17-23.

[7] Kleffner I, Bungeroth M, Schiffbauer H, et al. The role of aquaporin-4 polymorphisms in the development of brain edema after middle cerebral artery occlusion[J]. *Stroke*, 2008, 39: 1333-1335.

[8] Dardiotis E, Paterakis K, Tsiygoulis G, et al. AQP4 tag single nucleotide polymorphisms in patients with traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31: 1920-1926.

[9] 宛丰, 黄梅, 吕衍文, 等. MMP-9与脑出血后迟发性脑水肿的关系研究[J]. *卒中与神经疾病*, 2014, 21: 110-112.

[10] Potapov AA, Iusupova MM, Tenedieva VD, et al. [Clinical and prognostic value of inflammatory genetic markers in traumatic brain injury] [J]. *Zh Vopr Neurokhirur Im N N burdenko*, 2012, 76: 90-95.

[11] 许淑红, 康辰, 陈美灵, 等. 大鼠脑缺血/再灌注后早期AQP4的动态表达及其与脑水肿关系的研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32: 1433-1441.

[12] 张程程, 鲁宏, 陈建强. 大鼠脑挫伤后脑组织水通道蛋白4表达及其与脑水肿的关系[J]. *中华创伤杂志*, 2015, 31: 158-163.

(本文编辑:唐颖馨)