

海南地区人群动脉硬化性脑梗死与PCK1启动子-232基因多态性的相关性研究

林树楷^a, 陈明磊^b, 高唯一^b, 林康^b

摘要 目的:探讨海南地区人群动脉硬化性脑梗死与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因(PCK1)启动子-232基因多态性的关系。**方法:**选取动脉硬化性脑梗死患者160例为观察组,另选取同期在我院行健康体检的成年人160例为对照组,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法检测PCK1启动子-232基因多态性,采用超声多普勒技术检查颈总动脉内膜中层厚度和颈动脉斑块情况,并监测血糖和血脂情况。**结果:**观察组中GC基因型和GG基因型患者的餐后2h血糖和LDL高于CC基因型($F=12.811, 54.169$, 均 $P<0.001$)。与对照组相比,观察组中GC和GG基因型频率及G等位基因频率明显较高($\chi^2=13.341, 10.807$, 均 $P=0.001$)。在易损斑块中,观察组GC基因型和GG基因型及G等位基因的分布明显大于非易损斑块($\chi^2=5.186, 7.276$, $P=0.023, 0.007$)。2组不同基因型之间两侧颈总动脉内膜中层厚度比较差异无统计学意义($F=0.742, 0.485, 1.139, 0.727$, $P=0.478, 0.617, 0.325, 0.487$)。**结论:**PCK1启动子-232基因多态性与海南地区人群动脉硬化性脑梗死的发生情况有一定相关性,其中以G等位基因较为突出。

关键词 脑梗死;PCK1;启动子;多态性

中图分类号 R741;R741.02;R743.3 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.03.002

林树楷, 陈明磊, 高唯一, 等. 海南地区人群动脉硬化性脑梗死与PCK1启动子-232基因多态性的相关性研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(3): 113-115, 131.

作者单位

海南省第三人民医院 a. 神经外科 b. 神经内科

海南 三亚 572000

收稿日期

2018-06-01

通讯作者

林树楷

xinlqa@163.com

Relationship between Atherosclerotic Cerebral Infarction and Polymorphism of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene Promoter-232 in Hainan Population LIN Shu-ka^a, CHEN Ming-le^a, GAO Wei-yi^b, LIN Kang^b. a. Department of Neurosurgery, b. Department of Neurology, The Third People's Hospital of Hainan Province, Hainan 572000, China

Abstract Objective: To explore the relationship between atherosclerotic cerebral infarction and polymorphism of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (PCK1) promoter-232 in the Hainan population. **Methods:** We recruited 160 patients with atherosclerotic cerebral infarction as the observation group and another 160 healthy adults who received check-ups during the same time as the control group. PCK1 promoter-232 gene polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); the carotid intima-media thickness and carotid artery plaque (CAP) were detected by carotid doppler ultrasonography. The blood glucose and plasma lipids were measured. **Results:** The 2 h postprandial blood glucose and LDL cholesterol levels of the GC and GG genotypes in the observation group were higher than those of the CC genotype ($F=12.811, 54.169$, both $P<0.001$). Compared with that of the control group, the frequencies of GC and GG genotypes and the G allele in the observation group were significantly higher ($\chi^2=13.341, 10.807$, all $P=0.001$). With vulnerable plaques, the distribution of GC and GG genotypes and the G allele in the observation group were significantly larger than that with non-vulnerable plaques ($\chi^2=5.186, 7.276$, $P=0.023, 0.007$). The carotid intima-media thickness of the left and right carotid artery of different genotypes in the two groups were compared and showed no statistical difference ($F=0.742, 0.485, 1.139, 0.727$, $P=0.478, 0.617, 0.325, 0.487$). **Conclusion:** There is a certain connection between PCK1 promoter-232 gene polymorphism and the occurrence of atherosclerotic cerebral infarction in the population of Hainan, and the role of G allele is more prominent.

Key words cerebral infarction; PCK1; promoter; polymorphism

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因(phosphoenolpyruvate carboxykinase gene, PCK1)是位于染色体20q13区域的一个重要候选基因,主要是在胰岛素和胰高血糖素的调控下进行编码。其所编码的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)是糖异生过程中的关键酶之一,可

催化丙酮酸转变为磷酸烯醇式丙酮酸,从而发生进一步反应^[1,2]。PCK1与多种疾病有一定的联系,其基因编码的多态性是直接反映疾病发生发展的一项重要指标^[3]。国外有研究报道,PCK1启动子-232基因的多态性与动脉硬化性脑梗死的发生存在一定的关系,但国内尚缺乏相关文献记录^[4]。因此本研究

以此为依据,通过对比我院动脉硬化性脑梗死患者和正常成年体检者的PCK1启动子-232基因多态性差异,探讨动脉硬化性脑梗死与PCK1启动子-232基因多态性的关系,为临床上预测和预防动脉硬化性脑梗死提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年9月至2016年9月期间我院收治的动脉硬化性脑梗死患者160例为观察组,男75例,女85例;年龄51~85岁,平均 (60.11 ± 10.59) 岁;BMI为 $(26.1 \pm 1.24) \text{ kg/m}^2$;高血压17例,糖尿病21例,冠心病14例。纳入标准^[5]:①有偏瘫、失语等脑局灶性损害症状;②头颅CT和/或头颅MR及MRA诊断明确;③入选前未接受介入或其他手术治疗;④已签订知情同意书。排除标准:处于妊娠或哺乳期间;有严重心、肝、肾等重要器官器质性病变或有精神疾病不能合作。另选取同期在我院体检中心行健康体检的成人160例为对照组,男87例,女73例;年龄49~87岁,平均 (59.36 ± 11.25) 岁;BMI为 $(25.8 \pm 1.12) \text{ kg/m}^2$;高血压12例,糖尿病18例,冠心病16例;均无脑血管病及脑血管病家族史。所有受试者均为海南地区自然人群,无种族、饮食及血缘差异。2组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究通过我院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 采用EDTA抗凝管采集所有研究对象空腹静脉血放置于 -80°C 冰柜冷藏以备用于血基因组DNA提取,另外采用非抗凝管采集所有受试者空腹静脉血,检测其空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)等生化指标,另均于同一天内检测餐后2 h血糖。

1.2.2 颈动脉超声检查 所有受试者均由我院B超室专业医生应用GEVivid7型彩色多普勒超声心动仪(美国产,探头中心频率7.0 MHz)进行双侧颈总动脉、颈总动脉分叉处及颈内动脉颅外段扫描分析,并测量3次颈总动脉近端1 cm、分叉处及颈内动脉起始端1 cm后壁在心室舒张末期的内膜中层厚度,取3次测量的平均值。注意分辨血管内膜斑块(包括形态、大小以及性质等),并根据相关超声诊断标准^[6]将易损斑块及非易损斑块进行分类。

1.2.3 基因组DNA提取 提取500 μL EDTA抗凝管

采集的静脉血,根据说明书采用血液基因组试剂盒对基因组的DNA进行提取后保存至 -20°C ;上、下游引物的合成采用Primer Primer 5.0软件及根据GenBank中序列设计方案^[7]进行。

1.2.4 PCR扩增及纯化 取基因组DNA 2 μL 和上下游引物0.2 μL 进行PCR扩增,提取15 μL 扩增后产物进行纯化,并用15 μL 双蒸水进行溶解。

1.2.5 多态性分析 充分混匀10 μL PCR产物、0.5 μL 内切酶MaeⅢ、2.5 μL Buffer及12 μL ddH₂O,置于56 $^\circ\text{C}$ 水溶箱中进行水溶,2 h后用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件行数据分析,计数资料行 χ^2 检验,计量资料行 t 检验,组间比较使用方差分析,两两比较使用LSD检验,多组间计量资料的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组不同基因型患者的血糖比较

观察组GC型和GG型患者的餐后2 h血糖高于CC型,有显著性差异($F=12.811, P<0.001$),GC型和GG型患者之间的血糖差异无统计学意义($q^2=2.800, P>0.05$),见表1。

2.2 2组不同基因型患者的血脂比较

观察组的GC型和GG型患者的LDL-C水平方面明显高于CC型,有显著性差异($F=54.169, P<0.001$),GC型和GG型患者之间的血糖差异无统计学意义($q^2=2.800, P>0.05$),见表1。

2.3 2组不同基因型患者的颈总动脉中层厚度比较

2组各基因型在双侧颈总动脉中层厚度方面的比较差异无统计学意义($F=0.742、0.485、1.139、0.727, P=0.478、0.617、0.325、0.487$),见表2。

2.4 基因多态性与颈动脉内膜斑块的关系

颈动脉彩超显示,观察组中颈内动脉有斑块119例,易损斑块53例,非易损斑块66例。采用基因计数法计算,即等位基因频率 $= (2 \times \text{纯合子} + \text{杂合子}) / (2 \times \text{受检人数})$ 。与非易损斑块患者相比,易损斑块患者GG型和GC型所占比例明显较高,且G等位基因频率所占比例也明显较高,差异有统计学意义($\chi^2=5.186、7.276, P=0.023、0.007$),见表3。

2.5 基因多态性与脑梗死的关系

与对照组相比,观察组GC型和GG型基因型频率及G等位基因频率均明显较高,CC型基因型频率及C等位基因频率则明显较低,差异有统计学意义($\chi^2=$

13.341、10.807,均 $P=0.001$),见表4。

表1 2组不同基因多态性患者的血糖、血脂比较(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	基因型	例数	空腹血糖	餐后2 h 血糖
对照组	CC型	80	6.31±5.59	7.07±2.13
	GC型	71	6.51±3.98	6.11±2.87
	GG型	9	4.44±0.86	6.69±2.21
	F值		0.751	2.797
	P值		0.474	0.064
观察组	CC型	50	5.85±1.12	6.44±1.02
	GC型	91	5.38±2.87	8.60±2.93 ^a
	GG型	19	5.15±0.55	7.98±2.37 ^a
	F值		0.948	12.811
	P值		0.390	<0.001

组别	基因型	总胆固醇	三酰甘油
对照组	CC型	5.17±1.64	1.58±0.29
	GC型	5.66±1.32	1.39±0.99
	GG型	5.36±1.82	1.85±0.79
	F值	1.967	2.401
	P值	0.143	0.094
观察组	CC型	5.23±0.81	2.38±1.17
	GC型	5.00±1.50	2.36±2.21
	GG型	5.58±1.36	2.89±2.42
	F值	1.719	0.589
	P值	0.183	0.556

组别	基因型	LDL-C	HDL-C
对照组	CC型	2.48±0.31	1.98±0.28
	GC型	2.52±0.36	1.92±0.98
	GG型	2.39±0.32	1.65±0.75
	F值	0.722	0.916
	P值	0.488	0.402
观察组	CC型	2.89±0.09	1.36±0.82
	GC型	3.58±0.11b	1.65±0.79
	GG型	3.98±1.28 ^b	1.38±0.31
	F值	54.169	2.749
	P值	<0.001	0.067

表2 2组不同基因型患者的颈总动脉中层厚度比较(mm, $\bar{x}\pm s$)

组别	基因型	例数	左侧	右侧
对照组	CC型	40	0.91±0.16	0.96±0.21
	GC型	37	0.99±0.35	0.92±0.15
	GG型	4	1.05±0.22	1.01±0.18
	F值		1.139	0.727
	P值		0.325	0.487
观察组	CC型	46	1.22±1.19	1.15±0.33
	GC型	79	1.07±0.19	1.01±0.26
	GG型	35	1.17±0.50	1.16±0.29
	F值		0.742	0.485
	P值		0.478	0.617

表3 基因多态性与颈动脉内膜斑块的关系[例(%)]

类别	例数	基因型		等位基因频率	
		GG+GC	CC	G	C
非易损斑块	66	44(66.67)	22(33.33)	59(44.70)	73(55.30)
易损斑块	53	45(84.91)	8(15.09)	66(62.26)	40(37.74)
χ^2 值		5.186		7.276	
P值		0.023		0.007	

表4 基因多态性与脑梗死的关系[例(%)]

组别	例数	基因型		
		CC	GC	GG
对照组	160	82(51.25)	71(44.38)	7(4.37)
观察组	160	51(31.88)	94(58.75)	15(9.37)
χ^2 值	-	13.341		
P值	-	0.001		

组别	等位基因	
	G	C
对照组	85(26.56)	235(73.44)
观察组	124(38.75)	196(61.25)
χ^2 值	10.807	
P值	0.001	

3 讨论

颈动脉粥样硬化性病变引起颈动脉狭窄是导致大多数缺血性脑血管事件发生的主要原因之一^[8]。临床上主要表现为视物模糊、头昏、头痛、失眠、记忆力减退等脑部缺血症状、神经功能一过性丧失及缺血性脑卒中,部分狭窄程度较轻的患者临床上可无症状表现^[9]。因此,及时对颈动脉狭窄患者发生脑血管事件的危险因素(如血糖、血脂代谢异常及胰岛素抵抗等)进行筛查,有利于及时干预^[10]。临床上诊断动脉硬化性脑梗死的影像学检查方法主要有CTA、B超、超声多普勒、MRI等,但此类检查只能反映已出现脑梗死症状的患者,对于预测和预防动脉硬化性脑梗死的发生仍是临床上面临的巨大挑战。

随着PCR技术的不断深入及基因检查的进一步加强,对于疾病的预防和预测已逐步过渡到基因水平,特别是基因表达的多态性,能有效反映疾病的发生发展过程。目前大多数临床研究发现,PCK1多个基因位点的表达与动脉硬化性脑梗死等脑血管事件的发生可能存在一定的相关性^[11]。Raida等^[12]和Pandi等^[13]通过对加拿大、香港等多个地区的人群进行研究发现,PCK1启动子-232基因位点的G突变为C时肥胖、胰岛素抵抗以及代谢综合征的发生发病率会明显增加。而国内尚缺乏对于PCK1启动子-232基因与动脉硬化性

(下转第131页)

本研究提示 *GJB1* 基因突变的 CMTX1 表现为中间型,且以轴索病变为主,神经电生理及病理结果表现具有一致性。利用电生理及组织病理学检查对腓骨肌萎缩症分型有一定价值,可为筛查基因诊断提供依据。

参考文献

[1] Patzko A, Shy ME. Update on Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2011,11: 78-88.
 [2] Huttner IG, Kennerson ML, Reddel SW, et al. Proof of genetic heterogeneity in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Neurology, 2006, 67: 2016-2021.
 [3] Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II[J]. Brain, 1980,103: 259-280.
 [4] 张如旭,郭鹏,任志军,等. LITAF, RAB7, LMNA 和 MTMR2 基因在中国人腓骨肌萎缩症患者的突变分析[J]. 遗传, 2010, 32: 817-823.
 [5] Capasso M, Di MA, Ferrarini M, et al. Inter-nerves and intra-nerve conduction heterogeneity in CMTX with Arg(15)Gln mutation[J]. Clin Neurophysiol, 2004, 115: 64-70.
 [6] Pareyson D, Scaiola V, Laurà M. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Neuromolecular Med, 2006, 8: 3-22.

[7] Senderek J, Hermanns B, Bergmann C, et al. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical, electrophysiological, and morphological phenotype in four families with different connexin32 mutations(1)[J]. J Neurol Sci, 1999, 167: 90-101.
 [8] Gutierrez A, England JD, Sumner AJ, et al. Unusual electrophysiological findings in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Muscle Nerve, 2000, 23: 182-188.
 [9] Stephanova DI, Daskalova M, Alexandrov AS. Differences in potentials and excitability properties in simulated cases of demyelinating neuropathies. Part I[J]. Clin Neurophysiol, 2005, 116: 1159-1161.
 [10] Fischbeck KH, ar-Rushdi N, Pericak-Vance M, et al. X-linked neuropathy: gene localization with DNA probes[J]. Ann Neurol, 1986, 20: 527-532.
 [11] Madrid R, Bradley WG, Davis CJF. The peroneal muscular atrophy syndrome: Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies part 2. Observations on pathological changes in sural nerve biopsies[J]. J Neurol Sci, 1977, 32: 91-122.
 [12] Hahn AF, Ainsworth PJ, Bolton CF, et al. Pathological findings in the x-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease: a morphometric and ultrastructural analysis[J]. Acta Neuropathol, 2001, 101: 129-139.
 [13] Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients[J]. Brain, 2003, 126: 134-151.

(本文编辑:王晶)

(上接第115页)

脑梗死相关性的研究报告。

本研究以此为研究依据,针对海南地区患有动脉硬化性脑梗死的患者肝脏表达的 PCK1 启动子-232 基因进行筛查,对比正常成年体检者表达的结果,探讨两者之间的相关性。本研究结果显示,脑梗死患者 PCK1 启动子-232 基因表达的 GC、GG 基因型频率及 G 等位基因频率明显高于正常成年人,说明 PCK1 启动子-232 基因的 G 等位基因与脑梗死的发生有关;而脑梗死患者中 GC 型和 GG 型餐后 2 h 血糖、LDL-C 明显高于 CC 型,说明肝脏表达 PCK1 的通过 G 等位基因来调控血糖、血脂水平,从而影响脑梗死的发生^[14]。本研究同时发现,脑梗死患者和正常成年人的双侧颈总动脉内膜中层厚度之间无明显差异,但在脑梗死患者中,存在易损斑块的患者中 GC、GG 基因型频率及 G 等位基因频率明显高于非易损的患者,说明肝脏表达的 PCK1 的 G 等位基因可能是导致易损斑块形成的因素之一^[15]。

综上所述,对海南地区人群的 PCK1 启动子-232 基因的多态性进行筛查可有效预测当地动脉硬化性脑梗死的发生。但本研究仅仅是通过单基因研究得出的结论,且种族差异和研究对象数量受限等可能影响结果准确性,尚需对研究工作进一步的优化。

参考文献

[1] Okoreeh AK, Bake S, Sohrabji F. Astrocyte-specific insulin-like growth factor-1 gene transfer in aging female rats improves stroke outcomes[J]. Glia, 2017, 65: 1043-1058.
 [2] Kumar P, Misra S, Kumar A, et al. Association between Tumor

Necrosis Factor- α (-238G/A and -308G/A) Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-Analysis[J]. Pulse (Basel), 2016, 3: 217-228.
 [3] 焦立影,王新,刘婷婷,等. 纤维肌发育不良致自发性颈动脉夹层并脑梗死一例诊治分析[J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25: 102-105.
 [4] Kumar P, Yadav AK, Kumar A, et al. Association between Interleukin-6 (G174C and G572C) promoter gene polymorphisms and risk of ischaemic stroke: A meta-analysis[J]. Ann Neurosci, 2015, 22: 61-9.
 [5] Huck JH, Freyer D, Böttcher C, et al. De novo expression of dopamine D2 receptors on microglia after stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35: 1804-1811.
 [6] 冯兆章,张远鸿,腾录霞,等. CT 血管造影检查联合 ABCD2 评分对短暂性脑缺血发作后早期脑梗死的预测价值研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2015, 23: 110-112.
 [7] Shahaduzzaman MD, Mehta V, Golden JE, et al. Human umbilical cord blood cells induce neuroprotective change in gene expression profile in neurons after ischemia through activation of Akt pathway[J]. Cell Transplant, 2015, 24: 721-735.
 [8] 李鹏燕,朱雨岚. 进展性腔隙性脑梗死的发病机制研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 429-431.
 [9] 李友,廖锋,崔理立,等. 去整合素金属蛋白酶 10 基因启动子区多态性变化与腔隙性脑梗死发病风险的关系[J]. 山东医药, 2014, 54: 4-7.
 [10] Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, et al. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice[J]. Neuroscience, 2013, 252: 302-319.
 [11] 王婉芬,王凤,朱敏,等. 基质金属蛋白酶 8-799C/T 基因多态性与颈动脉斑块易损性的关联分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29: 60-63.
 [12] Raida Z, Hundahl CA, Nyengaard JR, et al. Neuroglobin over expressing mice: expression pattern and effect on brain ischemic infarct size[J]. PLoS One, 2013, 8: e76565.
 [13] Pandi G, Nakka VP, Dharap A, et al. MicroRNA miR-29c down-regulation leading to de-repression of its target DNA methyltransferase 3a promotes ischemic brain damage[J]. PLoS One, 2013, 8: e58039.
 [14] 李凤,陈明,喻明,等. MMP-2 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死初发及复发相关性研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32: 104-107.
 [15] Pulliam JV, Xu Z, Ford GD, et al. Computational identification of conserved transcription factor binding sites upstream of genes induced in rat brain by transient focal ischemic stroke[J]. Brain Res, 2013, 1495: 76-85.

(本文编辑:王晶)