

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0905-05

• 流行病学研究 •

湖南汉族人群脂联素基因多态性分布及其与动脉粥样硬化性脑梗死和相关危险因素的关系

杨秀娟^{1,2}, 许宏伟¹, 袁宁¹, 王依宁¹, 唐北沙¹, 张乐¹, 肖波¹, 夏健¹

(1. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008 2 岳阳市第一人民医院神经内科, 湖南省岳阳市 414000)

[关键词] 流行病学; 动脉粥样硬化性脑梗死; 脂联素; 基因多态性; 湖南汉族人群

[摘要] 目的 探讨脂联素基因 45T/G 和 276G/T 多态位点在湖南地区汉族人群中的分布及其与动脉粥样硬化性脑梗死和相关危险因素的关系。方法 收集 163 例正常对照者和 161 例动脉粥样硬化性脑梗死患者的血标本, 聚合酶链反应限制片段多态性分析法检测脂联素基因 45T/G 和 276G/T 多态性在动脉粥样硬化性脑梗死组和正常对照组的基因频率, 同时检测研究对象的血脂和血压水平。结果 中国湖南地区汉族人群脂联素基因 45T/G 和 276G/T 位点等位基因频率分别是 0.783/0.217 和 0.697/0.303。脂联素基因 45T/G 多态位点等位基因和基因型分布频率两组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 动脉粥样硬化性脑梗死组脂联素基因 276G/T 多态位点 TT 基因型频率和 T 等位基因频率明显高于对照组 ($P < 0.05$), 且 TT 基因型亚组甘油三酯水平较 GG 基因型亚组显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 脂联素基因 45T/G 多态性可能与中国湖南汉族人群动脉粥样硬化性脑梗死的发生无关; 276G/T 多态性可能参与中国湖南汉族人群动脉粥样硬化性脑梗死的发生, 且可能影响血脂水平, 276TT 型者可能具有较高水平的甘油三酯。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Relationship Between Adiponectin Gene Polymorphisms and Atherosclerotic Cerebral Infarction As Well As Risk Factors in Chinese Han Population of Hunan Area

YANG Xiu-Juan, XU Hong-Wei, YUAN Ning, WANG Yi-Ning, TANG Bei-Sha, ZHANG Le, XIAO Bo, and XIA Jian
(Department of Neurology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Atherosclerotic Cerebral Infarction; Adiponectin; Gene Polymorphism; Han Population of Hunan Area

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between adiponectin gene polymorphisms and the occurrence of atherosclerotic cerebral infarction (ACI), blood pressure as well as the lipid concentrations in Chinese Han population of Hunan area. **Methods** 163 healthy individuals and 161 ACI patients were recruited in this study. The genotypes of adiponectin were detected with polymerase chain reaction (PCR) and digested by specific restriction enzymes. **Results**

Adiponectin polymorphisms existed in Chinese Han population of Hunan area with the allele frequencies 0.783/0.217 for 45T/G in the whole study population, and 0.697/0.303 for 276G/T, respectively. There was no significant difference of genotype and allele frequency between ACI patients and controls for 45T/G polymorphisms ($P > 0.05$). However, the frequency of T allele and TT genotype in adiponectin 276G/T polymorphisms were significantly higher in ACI group compared with that in control group ($P < 0.05$). Also, T allele carriers had a significantly higher level of triglyceride (TG) than subjects with GG genotype. **Conclusions** 45T/G polymorphism of adiponectin might have no significant correlation with ACI in Chinese Han population of Hunan area, whereas 276G/T polymorphism might be associated with the development of ACI through a participation in the lipid metabolism.

脂联素是脂肪组织分泌的特异性的血浆激素蛋白, 在能量代谢、胰岛素抵抗、抗炎和抗动脉粥样硬化等生理和病理生理过程中发挥重要的调节作用。脂联素蛋白由脂联素基因编码, 基因位于 3q27, 长约 17 kb, 包含 3 个外显子和 2 个内含子。对人脂联

素基因序列分析发现, 正常人脂联素基因中存在相当数量的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。目前已发现 10 余种脂联素常见的 SNP 及一些少见的错义突变, 其中 SNP 45T/G 和 SNP 276G/T 两个多态位点颇受关注。

[收稿日期] 2008-08-01 [修回日期] 2008-10-06

[基金项目] 国家自然科学基金 (30600199)

[作者简介] 杨秀娟, 硕士, 医师, E-mail 为 yangxiu072519@yahoo.com.cn。通讯作者许宏伟, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为脑血管疾病, E-mail 为 xhw_xiangya@sina.com。袁宁, 硕士, 医师, 主要研究方向为脑血管疾病。

1 对象与方法

1.1 研究对象

163 例中南大学湘雅医院健康体检者 (男 108

例,女 55例)被列为对照组,平均年龄 60.2 ± 5.6 岁,均为湖南地区汉族人,无血缘关系。排除有冠心病、脑血管病、心脑血管疾病家族史、肝肾疾病、血液病、自身免疫性疾病、妊娠和半年内有过降脂治疗者。161例中南大学湘雅医院 2005 年 8 月至 2006 年 12 月住院脑梗死病人(男 104 例,女 57 例),平均年龄 61.9 ± 10.1 岁,均为湖南地区汉族人,无血缘关系;161 例均符合全国第四届脑血管疾病会议修订的动脉粥样硬化性脑梗死(atherosclerotic cerebral infarction, ACI)诊断标准,有典型的临床表现,并经头颅 CT 或(和)MRI 确诊。不包括心源性、动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形等原因引起的 ACI 并排除患有严重肝肾疾病、甲状腺疾病、血液病和最近 6 个月服用雌激素患者。

1.2 临床生物化学指标测定

所有研究对象均进行体检、心电图和胸片等检查。采用氧化酶法测定甘油三酯(triglyceride, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC);测定高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)先用沉淀剂沉淀,再用酶法测定上清液中的胆固醇;低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)由公式 $LDLC(\text{mmol/L}) = TC - HDLC - TG/2.2$ 求出;葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖。

1.3 聚合酶链反应限制片长多态性行脂联素基因型分析

采用酚/氯仿法提取外周血 DNA 行 PCR。脂联素基因的 PCR 引物参照文献[1],上游引物为 5'-CTGAGATGGACGGAGTCCTTT3',下游引物为 5'-CCAAATCACTTCAGGTTGCTT3'。反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 40 s \rightarrow 58℃ 退火 60 s \rightarrow 72℃ 延伸 40 s, 35 个循环,最后 72℃ 充分延伸 10 min。最后置于 4℃ 终止反应。上述 PCR 扩增产物分别以内切酶 SmaIv 酶切 8 h, BsmIv 酶切 16 h,然后用 2% 琼脂糖凝胶电泳,经银染和 GIS 凝胶图像处理系统处理后进行基因型判读。

1.4 DNA 序列分析

选取重复两次有异常条带的标本进行 DNA 测序,测序结果在 Genbank 和 SNP 的数据库中进行比较分析。

1.5 统计学分析

采用 HWE 软件检验基因型的 Hardy-Weinberg 平衡吻合度,以基因计数法计算 ACI 组和对照组的基因型和等位基因频率。计数资料用 χ^2 检验。计量资料两组比较用 t 检验,两组以上比较用方差分析,ACI 组 TG 进行对数转换以纠正方差不齐。以

双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 SPSS13.0 的统计软件包作统计学处理。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

由于基因组 DNA 提取物的影响,ACI 组与对照组分别有 6 例和 14 例电泳后没有显影(被剔除)。两组在年龄和性别构成上无统计学差异($P > 0.05$)。ACI 组的体质指数(body mass index, BMI)和吸烟史与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$),而高血压病史和糖尿病史明显高于对照组($P < 0.01$)。与对照组相比,ACI 组血脂中的 TG、TC 和 LDLC 水平显著升高, HDLC 水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);收缩压和舒张压明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$ 表 1)。

表 1 两组临床资料对比

临床资料	ACI 组 ($n = 155$)	对照组 ($n = 149$)
年龄(岁)	61.9 ± 10.1	60.2 ± 5.6
男/女(例)	100/55	103/46
BMI (kg/m^2)	23.10 ± 2.15	22.84 ± 2.62
高血压病史(例)	121 (78.1%) ^a	26 (17.4%)
糖尿病史(例)	33 (21.3%) ^a	6 (4.0%)
吸烟史(例)	45 (29.0%)	37 (24.8%)
TG (mmol/L)	1.75 ± 1.15^a	1.51 ± 0.48
TC (mmol/L)	4.71 ± 1.14^a	4.42 ± 1.19
HDLC (mmol/L)	1.25 ± 0.41^a	1.45 ± 0.38
LDLC (mmol/L)	2.76 ± 0.95^a	2.45 ± 0.86
收缩压 (mmHg)	151 ± 20^a	116 ± 13
舒张压 (mmHg)	89 ± 14^a	73 ± 8

a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比。

2.2 脂联素基因多态性分析

脂联素基因 45 T/G 多态位点可被内切酶 SmaIv 识别,当发生 T \rightarrow G 时,产生酶切位点。限制性片长多态性酶切产物琼脂糖凝胶电泳图像有三种情况:纯合子 TT 型无 SmaIv 酶切位点,在凝胶上只显示一条带为 456 bp;杂合子 TG 型在凝胶上显示有三条带为 456、313 和 143 bp 三个片段;纯合子 GG 型在凝胶上显示有两条带,为 313 bp 和 143 bp 两个片段(图 1)。脂联素基因 276 G/T 多态位点,可被内切酶 BsmIv 识别,当发生 T \rightarrow G 时,产生酶切位点,酶切产物琼脂糖凝胶电泳图像有三种情况:纯合子 TT 型在凝胶上只显示一条带为 456 bp;杂合子

GT型为 456、374 和 82 bp 三个片断, 因 82 bp 已跑出泳带外, 在凝胶上显示只有两条带; 纯合子 GG 型为 374 bp 和 82 bp 两个片断, 在凝胶上显示一条带 (图 2)。

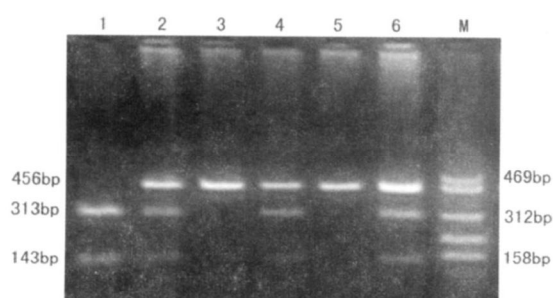


图 1. 45T/G PCR 产物酶切后电泳图 M 为相对分子质量, 1 为纯合子 GG 型, 2、4、6 为杂合子 TG 型, 3 和 5 为纯合子 TT 型。

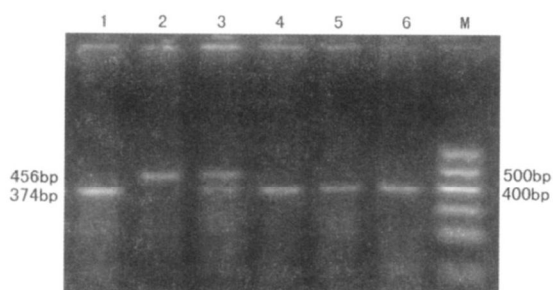


图 2. 276G/T PCR 产物酶切后电泳图 M 为相对分子质量, 1、4、5 和 6 为纯合子 GG 型, 2 为纯合子 TT 型, 3 为杂合子 GT 型。

2.3 脂联素基因 45T/G 和 276G/T 多态位点基因测序结果

45T/G 反向测序证实, 杂合子 TG 型第 45 位点示碱基 T、G 双峰; 276G/T 正向测序证实, 纯合子 GG 型第 276 位点示单一碱基 G 峰 (图 3)。

2.4 脂联素基因 45T/G 位点基因多态性分布

由于 GG 型例数太少 (ACI 组 8 例, 对照组 3 例), 故将 TG 型与 GG 型合并为 G 等位基因携带者组。中国湖南地区汉族人群存在脂联素基因 45T/G 多态性, T/G 等位基因频率在总人群中是 0.783/0.217。ACI 组 TG+GG 基因型频率和 T 等位基因频率分布与对照组相比差异无显著性 ($P=0.214$ 和 0.130 表 2)。

2.5 45TT 亚组与 45TG+GG 亚组血脂和血压对比

ACI 组 45TT 亚组 TG 水平高于 45TG+GG 亚组, 但差异无显著性 ($P=0.29$), 其它血脂指标及收缩压和舒张压在两亚组间差异也无显著性 ($P>0.05$); 对照组血脂和血压在两亚组之间差异均无显著性 ($P>0.05$ 表 3)。

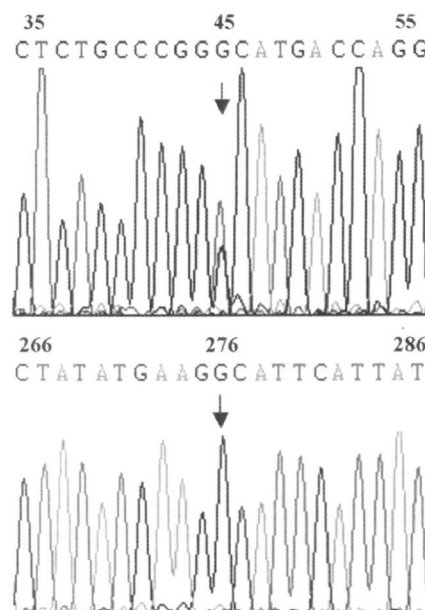


图 3 脂联素基因 45T/G 多态位点 (杂合子 TG 型, 上图) 和 276G/T 多态位点 (纯合子 GG 型, 下图) 基因测序结果

表 2 动脉粥样硬化性脑梗死组与对照组 45T/G 基因型频率和等位基因频率比较

分 组	例数	基因型 (例)		等位基因频率	
		TT	TG + GG	T	G
ACI 组	155	88 (56.8%)	67 (43.2%)	0.758	0.242
对照组	149	95 (63.8%)	54 (36.2%)	0.809	0.191

表 3 两组中 45TT 和 45TG+GG 两亚组间血脂和血压比较 ($\bar{x} \pm s$)

参数	ACI 组		对照组	
	45TT (n=88)	45TG+GG (n=67)	45TT (n=95)	45TG+GG (n=54)
BM I (kg/m ²)	23.36 ± 2.36	22.77 ± 1.80	22.75 ± 2.82	23.00 ± 2.25
TG (mmol/L)	1.83 ± 1.29	1.63 ± 0.92	1.48 ± 0.49	1.55 ± 0.45
TC (mmol/L)	4.67 ± 1.18	4.76 ± 1.10	4.39 ± 1.19	4.47 ± 1.21
HDL C (mmol/L)	1.24 ± 0.45	1.27 ± 0.36	1.45 ± 0.43	1.44 ± 0.29
LDL C (mmol/L)	2.73 ± 0.96	2.79 ± 0.95	2.46 ± 0.88	2.44 ± 0.84
收缩压 (mmHg)	152 ± 20	150 ± 21	115 ± 13	116 ± 12
舒张压 (mmHg)	89 ± 15	89 ± 13	73 ± 7	73 ± 8

2.6 脂联素基因 276G/T 位点基因多态性分布

中国湖南地区汉族人群存在脂联素基因 276G/T 多态性, G/T 等位基因频率在总人群中是 0.697/0.303。ACI 患者与对照组脂联素基因 276G/T 三种基因型分布差异有显著性 ($P<0.05$); ACI 组的 GG 基因型频率明显低于对照组, TT 基因型频率明显高

于对照组 ($P < 0.05$)。ACI组中 T 等位基因频率明显高于对照组 ($P < 0.05$ 表 4)。

表 4 两组 276G/T 基因型频率和等位基因频率比较

分 组	例数	基因型 (例)			等位基因频率	
		GG	GT	TT	G	T
ACI组	155	70 (45.2%)	64 (41.3%)	21 (13.5%) ^a	0.658	0.342 ^a
对照组	149	79 (53.0%)	62 (41.6%)	8 (5.4%)	0.738	0.262

a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比。

2.7 276TT、276GT 和 276GG 三亚组间血脂和血压对比

ACI组 276TT 亚组 TG 水平比 276GG 亚组显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余血脂指标在三亚组间差异无显著性 ($P > 0.05$); 对照组血脂

指标在三亚组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。ACI组 276TT 亚组收缩压和舒张压均较 276GG 亚组升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 对照组三亚组间血压差异无显著性 ($P > 0.05$ 表 5)。

表 5 两组中 276GG、276GT 和 276TT 三亚组间血脂和血压比较 ($\bar{x} \pm s$)

参数	ACI组			对照组		
	276GG	276GT	276TT	276GG	276GT	276TT
例数	70	64	21	79	62	8
BM I (kg/m ²)	22.88 ± 1.97	23.37 ± 2.37	23.00 ± 2.01	22.94 ± 2.76	22.57 ± 2.37	23.94 ± 2.97
TG (mmol/L)	1.54 ± 0.74	1.84 ± 1.42	2.16 ± 1.25 ^a	1.46 ± 0.50	1.53 ± 0.43	1.82 ± 0.50
TC (mmol/L)	4.60 ± 1.13	4.67 ± 1.10	5.18 ± 1.25	4.32 ± 1.20	4.51 ± 1.24	4.62 ± 0.59
HDL C (mmol/L)	1.22 ± 0.35	1.30 ± 0.50	1.20 ± 0.27	1.45 ± 0.44	1.44 ± 0.32	1.44 ± 0.18
LDL C (mmol/L)	2.72 ± 0.97	2.67 ± 0.85	3.13 ± 1.15	2.43 ± 0.84	2.49 ± 0.93	2.47 ± 0.48
收缩压 (mmHg)	150 ± 22	152 ± 18	153 ± 21	117 ± 14	115 ± 11	109 ± 10
舒张压 (mmHg)	87 ± 14	89 ± 15	95 ± 13	74 ± 8	73 ± 7	71 ± 8

a 为 $P < 0.05$ 与本组 276GG 基因型亚组相比。

3 讨论

本研究发现中国湖南汉族人存在脂联素基因 45T/G 多态性, 其中以 TT 基因型最为多见, 等位基因频率的总体人群分布趋势与美国白人^[2]相一致, 与日本人^[3]、韩国人^[4]不同, 推测差异可能与种族和地域等有关。脂联素基因 276G/T 多态性以 GG 基因型最为多见, 其等位基因的分布趋势与国内外报道是一致的^[1-4]。

本研究结果发现 ACI组脂联素基因 45T/G 多态位点基因型和等位基因分布频率与对照组相比差异无显著性; ACI组和对照组中 45TT 亚组与 G 等位基因携带者组相比, 血脂和血压差异均无显著性; 因此我们推测 45T/G 多态性可能与 ACI 血脂和血压之间不存在关联性。H illary 等^[2]在一项病例对照研究中报道美国白人脂联素基因 45T/G 基因多态性与 ACI 的发生无关。Zietz 等^[5]研究发现, 德国人

脂联素基因 45T/G 多态性与 2 型糖尿病患者血脂代谢紊乱相关, G 等位基因是危险基因。初明峰等^[6]报道 45T/G 位点多态性与北京地区人群颈动脉内膜中膜厚度有关, 携带 G 等位基因的糖尿病患者颈动脉内膜中膜厚度增加的危险性增加。

我们发现 ACI患者脂联素基因 276G/T 多态位点 GG 基因型频率明显低于对照组, TT 基因型频率和 T 等位基因频率明显高于对照组。ACI组中 276TT 亚组较 276GG 亚组 TG 水平显著升高 ($P < 0.05$), 而 TC、LDL C、收缩压和舒张压水平虽然升高, 但差异无统计学意义。故我们初步推测 276 位点 TT 基因型可能与较高的 TG 水平有关, T 等位基因可能是通过降低脂联素的水平, 导致与其活性呈负相关的 TG 浓度升高。Jang 等^[7]研究发现与 TT 型纯合子相比, 韩国人 276 位点 G 等位基因携带者 TG、小而致密 LDL 水平显著升高, 脂联素水平显著降低。H illary 等^[2]报道脂联素基因 276G/T 位点多

态性与美国白人 ACI 的发生无关。Berthier 等^[8]报道加拿大内脏型肥胖者中, 276 T 等位基因携带者 LDLC 水平明显高于 GG 型携带者。Mousavinasab 等^[9]对 252 例年轻的健康芬兰男性的血压分析显示, 276TT 基因型携带者的舒张压明显高于其他基因型携带者。

各家研究结果并不一致可能与以下因素有关: 第一, 所有的研究都是基于对存活者 (至少采集血样时是存活者) 基因多态性的分析, 因此我们不得不考虑到存活者偏倚对结果的影响。第二, 脂联素基因多态性分布在不同种族、地区的正常人群中因遗传背景、环境而有很大差异, 甚至改变了其基因产物的表达和 / 或作用的方式, 这种改变在 ACI 人群中更可能因个人素质、高危因素等干预而加剧。最后, 还要考虑到研究方法的因素如取样、样本量大小等, 这些都可使脂联素基因多态性与疾病的关系表现并不一致。

脂联素基因外显子 45T / G 为 Gly15Gly 的无义突变, 276G / T 为内含子区域的突变, 均不影响蛋白质的氨基酸序列。45T / G 位点由于位置靠近外显子和内含子的连接部位, 故认为这一编码区的静止突变可能是通过影响 mRNA 的剪切机制来影响脂联素基因的表达, 从而调节 RNA 水平。而 276G / T 位点可能与影响脂联素功能的外显子区多态位点连锁, 这种连锁不平衡影响 mRNA 转录。同时, 血清脂联素的水平可因环境、饮食等改变。故认为遗传

和环境因素的共同作用可能影响了脂联素基因的表达及其作用。

[参考文献]

- [1] 董艳, 李果, 骆天红, 等. 脂联素基因多态性与 2 型糖尿病的关系 [J]. 上海第二医科大学学报, 2004 **24**: 1 001-003
- [2] Hillary HH, HM in Lee Nancy RC, et al. Association of adiponectin gene variations with risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke a neseted case-control study [J]. *Clinical Chemistry*, 2006 **52**: 2 021-027.
- [3] Hara K, Boutin P, Mori Y, et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population [J]. *Diabetes*, 2002 **51**: 536-540
- [4] Jang Y, Lee JH, Chae JS, et al. Association of the 276G \rightarrow T polymorphism of the adiponectin gene with cardiovascular disease risk factors in non-diabetic Koreans [J]. *Am J Clin Nutr*, 2005 **82**: 760-767.
- [5] Zietz B, Barth N, Scholmerich J, et al. Gly15Gly polymorphism within the human adipocyte-specific apM-1 gene but not Tyr111H is polymorphism is associated with higher levels of cholesterol and LDL-Cholesterol in caucasian patients with type 2 diabetes [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001 **109**: 320-325
- [6] 初明峰, 郭立新, 潘琦, 等. APN 基因多态性与 2 型糖尿病及颈动脉内膜中层厚度有关 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006 **22**: 24-26
- [7] Jang Y, Lee JH, Kim OY, et al. The SNP276G>T polymorphism in the adiponectin (ACDC) gene is more strongly associated with insulin resistance and cardiovascular disease risk than SNP45T>G in nonobese/nondiabetic Korean men independent of abdominal adiposity and circulating plasma adiponectin [J]. *Metabolism*, 2006 **55**: 59-66
- [8] Berthier MT, Houde A, Cote M, et al. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of visceraally obese men [J]. *Lipid Res*, 2005 **46**: 237-244
- [9] Mousavinasab F, Tahtinen T, Jokelainen J, et al. Common polymorphisms (single-nucleotide polymorphisms SNP+ 45 and SNP+ 276) of the adiponectin gene regulate serum adiponectin concentrations and blood pressure in young Finnish men [J]. *Mol Genet Metab*, 2006 **87**: 147-151.

(此文编辑 许雪梅)