

磷酸二酯酶 4D 基因多态性与动脉粥样硬化血栓形成性脑卒中的关系

王汉旻 陈晓丽 叶好好 毕涌 潘东波 徐丽英 吴建波 黄海波

摘要 目的 采用病例对照研究探讨中国汉族人群磷酸二酯酶 4D (phosphodiesterase 4D, PDE4D) 基因与动脉粥样硬化血栓形成性脑卒中 (atherothrombosis ischemic stroke, AIS) 的关系。方法 应用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性方法, 检测 235 例浙南地区汉族人群 AIS 患者和 105 例非脑卒中对照组 PDE4D 基因 SNP83、32 酶切多态性。结果 AIS 患者 PDE4D 基因 SNP83 C 等位基因频率明显高于对照组, 是 AIS 的危险因素 ($OR = 1.718, 95\% CI: 1.120 \sim 2.633; P = 0.012$); CC + CT 基因型亦明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ($OR = 1.875, 95\% CI = 1.137 \sim 3.092$); 调整糖尿病、HDL-C 等危险因素后, 差异仍存在 ($OR = 2.023, 95\% CI: 1.207 \sim 3.391$)。PDE4D 基因 SNP32 位点在两组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 对于中国汉族人群, PDE4D 基因 SNP83 是 AIS 的危险因素, 而 SNP32 与 AIS 无关联。

关键词 磷酸二酯酶 4D 单核苷酸多态性 脑梗死 遗传

Association of Phosphodiesterase 4D Gene with Atherothrombosis Ischemic Stroke. Wang Hanmin, Chen Xiaoli, Ye Haohao, Bi Yong, Pan Dongbo, Xu Liying, Wu Jianbo, Huang Haibo. Department of Cerebrovascular Disease, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the association between 2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the phosphodiesterase 4D (PDE4D) gene and atherothrombosis ischemic stroke (AIS) in the Han population in China. **Methods** Two polymorphisms SNP83 and SNP 32 in PDE4D gene were analyzed in 235 patients of AIS and 105 non-cerebral infarction controls from south of Zhejiang Province using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method in a case-control study. **Results** The C allele frequency of SNP83 in cases was higher than controls. The C allele was a risk factor for AIS ($OR = 1.718, 95\% CI: 1.120 \sim 2.633; P = 0.012$). Genotype frequencies between cases and controls at SNP83 showed significant differences. The (CC + CT) genotypes had an OR of 2.023 ($P = 0.008$) for cases compared with the TT genotype. No association of the SNP32 in PDE4D with AIS was observed in our study. **Conclusion** SNP83 in the PDE4D gene is associated with AIS in the Chinese Han population.

Key words Phosphodiesterase 4D; Single nucleotide polymorphism; Ischemic stroke; Genetics

目前脑卒中已成为我国首位的致残和死亡原因, 其中约 70% 为缺血性脑卒中。缺血性卒中是环境和遗传因素共同导致的复杂疾病。冰岛 deCODE 研究组发现, 在冰岛人群中磷酸二酯酶 4D (phosphodiesterase 4D, PDE4D) 基因是大动脉和心源性缺血性卒中的一种新的危险因素, 如能在其他人群中证实这个结论, 将有助于卒中预防和治疗^[1]。之后在不同的种族, 进行了很多相关研究, 但结果很不一致^[2~6]。为验证 PDE4D 基因与缺血性卒中相关性, 笔者选择

冰岛 deCODE 研究组结果中 PDE4D 基因与卒中关系最强的 2 个位点, 即 SNP83、32; 研究浙南地区汉族人群中 PDE4D 基因与动脉粥样硬化血栓形成性脑卒中 (atherothrombosis ischemic stroke, AIS) 的关系。

对象与方法

1. 研究对象: (1) 病例组: 收集 2006 年 4 月~2009 年 6 月期间在温州医学院附属第一医院脑血管科或神经内科病房住院的 AIS 患者 235 例 (其中男性 148 例, 女性 87 例)。患者年龄 41~90 岁, 平均年龄 61.31 ± 10.11 岁。(2) 无卒中病史的对照组: 系同期来笔者医院体检者, 共 105 例 (其中男性 60 例、女性 45 例), 均行神经查体、头颅 MRI/A 及血管超声检查, 排除既往卒中、TIA、血管狭窄。年龄 41~84 岁, 平均年龄 60.04 ± 9.41 岁。两组均为浙南地区汉族人, 无血缘关系, 无迁移家史。两组研究人群的临床资料见表 1。(3) 入选标准: ① 脑血管检查 (DSA/CTA/MRA/血管超声) 证实颅内外动脉存在狭窄 $\geq 50\%$ 或闭塞; ② 有与病变侧血管供血区明确相关

基金项目: 温州市科技计划资助项目 (Y20060266, Y20100149); 鹿城区科技局科技文化项目 (S090208)

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院脑血管科 (王汉旻、徐丽英、黄海波); 神经内科 (陈晓丽、叶好好、毕涌); 温州市第八人民医院 (潘东波); 龙湾医科所 (吴建波)

通讯作者: 吴建波, 电子信箱: wujianbo@msn.com

的临床症状和体征;③发病后 DWI 证实存在病变侧血管供血区新发生的脑梗死;④ 患者存在脑血管动脉粥样硬化的危险因素。(4) 排除标准:①存在心源性栓子来源,如心脏瓣膜病变、心律失常、急性心肌梗死等;②其他非动脉粥样硬化性颈动脉病变,如颈动脉夹层、血管炎等;③存在其他可能导致脑梗死的因素,如红细胞增多征、系统性红斑狼疮等。

2. 血标本生化检测和临床资料收集:抽取空腹血标本,在笔者医院检验科利用自动生化仪,常规检测血脂、血糖、血电解质、肝肾功能等项目。并且详细询问病史,包括高血压、糖尿病、烟酒史等。按照 WHO 标准,SBP > 140mmHg 和(或)DBP > 90mmHg 诊断为高血压。

3. 实验方法:采用 DNA fast2000 试剂盒(上海博迈生物技术有限公司)从全血中抽提基因组 DNA。SNP32 位点序列上游引物:5'-GCTAAATGATGAGTTAATGG-3',下游引物:5'-CATAGCAAGAACCTGACC-3'。SNP83 位点序列上游引物:上游引物:5'-TTGTTTCTAGTGTTAGCCTTG-3',下游引物:5'-ATTTGGCCTTGCAATATAC-3'。以 200ngDNA 为模板,在 25μl 体系内进行 PCR 扩增(ABI. 9700PCR 仪)。先 95℃ 变性 2min,然后进入循环,循环条件是 94℃ 30s,62.5℃ 30s,72℃ 30s,一共进行 43 个循环,循环结束后,72℃ 延伸反应 5min。取扩增产物 5μl 于 15μl 酶切反应体系中进行酶切,内切酶分别为 Msp A II 和 Mae II(分别购自 NEB、Fermentas 公司)。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶图像分析系统下分析基因型。SNP32 缺乏相应酶切位点为 A 型(305bp 1 条带),存在相应酶切位点为 G 型(96bp,209bp,2 条带);SNP83 缺乏相应酶切位点为 T 型(492bp,1 条带),存在相应酶切位点为 C 型(288bp,204bp,2 条带)。

4. 统计学方法:所有数据统计均由 SPSS 16.0 统计软件包完成。等位基因计数采用直接计数法,并计算基因型频率。基因型频率的分布经 Hardy-Weinberg 平衡检验,当 $P > 0.05$ 时,说明群体基因遗传平衡,数据来自同一蒙德尔群体。计量资料比较采用 t 检验,病例组与对照组间不同基因型及等位基因分布频率比较采用 χ^2 检验,多因素分析采用 Logistic 回归。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

1. 病例组和对照组临床资料的比较:病例组和对照组在年龄、性别、高血压、吸烟、饮酒、TC、LDL-C、TG 等方面无明显差异;病例组糖尿病患者比例明显高于对照组($P < 0.01$);且病例组 HDL-C 明显低于对照组($P < 0.01$),详见表 1。

2. PDE4D 基因 SNP83 在两组中频率分布:电泳图片见图 1。PDE4D 基因 SNP83 在病例组和对照组中的分布均符合 Hardy-Weinberg 定律。病例组 C 等位基因频率(24.26%)高于对照组(15.71%)($P = 0.012$;OR = 1.718;95% CI:1.120 ~ 2.633)详见表 2。3 种不同基因型之间存在统计学差异, $P = 0.044$;

表 1 病例组和对照组临床资料的比较		
临床特征	对照组 (<i>n</i> = 105)	病例组 (<i>n</i> = 235)
年龄(岁)	60.04 ± 9.41	61.31 ± 10.11
男性(<i>n</i>)	60	143
高血压(<i>n</i>)	65	134
糖尿病(<i>n</i>)	51	150 *
TC (mmol/L)	4.68 ± 1.25	4.95 ± 1.33
HDL-C (mmol/L)	1.18 ± 0.33	1.07 ± 0.24 *
LDL-C (mmol/L)	3.01 ± 0.77	3.08 ± 0.86
TG (mmol/L)	1.61 ± 0.52	1.61 ± 0.54
吸烟	45	91
饮酒	38	88

与对照组相比, * $P < 0.05$

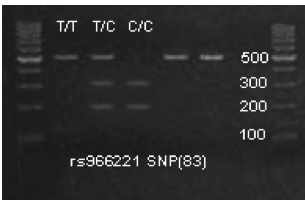


图 1 PDE4D 基因 SNP83 多态性 PCR-RFLP 结果

表 2 SNP83 位点基因型和等位基因在两组中的分布频率及与卒中相关性[<i>n</i> (%)]				
基因	病例组 (<i>n</i> = 235)	对照组 (<i>n</i> = 105)	OR(95% CI)	<i>P</i>
等位基因				
C	114(24.26)	33(15.71)	1.718(1.12 ~ 2.633)	0.012
T	356(75.74)	177(84.29)		
基因型				
CC	16(6.81)	4(3.81)		0.044
CT	82(34.89)	25(23.81)		
TT	137(58.3)	76(72.38)		
显性模式				
CC + CT	98(41.7)	29(27.62)	1.875(1.137 ~ 3.092)	0.013
TT	137(58.3)	76(72.38)	2.023(1.207 ~ 3.391) ^Δ	0.008 ^Δ

^Δ 为调整糖尿病、HDL-C 后,调整 OR 值和 P 值

进一步利用优势模型分析,病例组 CC + CT 基因型明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$), (OR = 1.875; 95% CI:1.137 ~ 3.092);调整糖尿病、HDL-C 等危险因素后,差异仍存在 (OR = 2.023; 95% CI:1.207 ~ 3.391)。

3. PDE4D 基因 SNP32 在两组中频率分布:电泳图片见图 2。PDE4D 基因 SNP32 在两组中的分布均符合 Hardy-Weinberg 定律。SNP32 等位基因频率在两组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 3。



图2 PDE4D 基因 SNP32 多态性 PCR-RFLP 结果

表3 PDE4D 基因 SNP32 在两组中频率分布[$n(\%)$]

基因	对照组 ($n = 105$)	病例组 ($n = 235$)	P
等位基因			
A	173 (82.38)	386 (82.13)	0.936
G	37 (17.62)	84 (17.87)	
基因型			
AA	71 (67.62)	161 (68.51)	
AG	31 (29.52)	64 (27.23)	
GG	3 (2.86)	10 (4.26)	

讨 论

本研究结果表明病例组 PDE4D 基因 SNP83C 等位基因频率明显高于对照组,且差异有统计学意义,说明 C 等位基因为 AIS 的致病风险基因;进一步利用优势模型分析,病例组 CC + CT 基因型明显高于对照组,差异也有统计学意义,CC 或 CT 基因型发病概率为 TT 型的 2 倍;结果提示 SNP83 是 AIS 的遗传危险因素。我们的结果与 deCODE 研究组结论一致^[1]。在巴基斯坦人、澳大利亚人群中,也同样发现 SNP83 与缺血性卒中相关^[7,8]。Sun 等^[9-11]人分别在中国不同地区汉族人群中证实了 SNP83 是缺血性卒中,尤其是 AIS 的遗传危险因子。然而在日本人群中却未发现这种相关性,这可能与研究群体差异及缺血性卒中本身是多因素疾病等有关^[5]。我们的研究结论同中国几位学者结果完全一致,更加支持 PDE4D (SNP83) 基因是中国汉族人群 AIS 的致病基因。但本研究未发现 SNP32 与卒中的相关性,这同 Brophy 等^[2,7]人研究结果一致,提示 SNP32 位点可能仅在冰岛特定人群中与卒中有关。

PDE4D 基因位于人类染色体 5q12 上,全长约 1.6Mb,含有 24 个外显子。该基因的蛋白产物有 9 种异构体。PDE4D 在体内广泛表达,分布于各种炎症性细胞内,包括肥大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等^[12];同时在血管及神经元中亦有表达。PDE4D 基因编码的 PDE4D 能特异性水解细胞内环磷酸腺苷(cAMP),cAMP 浓度主要由 PDE4D 的活性决定。在动脉粥样硬化形成过程中,cAMP 起着关键作用,它具有多种生物学作用,参与调控哺乳类动物的血小板聚集、血管细

胞的增殖和移行、免疫反应等。体外和在体试验均证实,高浓度的 cAMP 可抑制血管平滑肌细胞的增殖和移行;抑制炎症反应和血小板活化,减轻动脉粥样硬化程度。推测 PDE4D 通过影响细胞内 cAMP 水平参与动脉粥样硬化进程,进而影响卒中的发生。

颈动脉中内膜增厚和斑块代表动脉粥样硬化不同病程,能独立预测血管事件的发生^[13]。英国有项研究表明 PDE4D 基因与颈动脉中内膜厚度和斑块无相关性,提示该基因不是通过动脉粥样硬化机制发挥作用^[6]。然而,台湾学者发现对于男性患者,PDE4D 基因与颈总动脉动脉中内膜厚度及斑块相关,而且进一步分析发现该基因对斑块的影响远甚于中内膜厚度,表明该基因参与动脉粥样硬化的形成。虽然临床证据关于 PDE4D 基因与动脉粥样硬化的关系结果不甚一致,但基础研究发现抑制 PDE4D 基因表达,可以阻止鼠主动脉平滑肌细胞增殖和迁移,支持 PDE4D 基因是致动脉粥样硬化因素。临床研究的结果不一致可能与实验设计差别、样本量小、不同人种等因素有关。

PDE4D 在神经元中含量也和血管中一样丰富^[18]。有研究报道 cAMP, PDE4D 的作用底物,在神经元存活和神经发生中具有一定作用。PDE4D 敲除鼠和特异性 PDE4D 抑制剂,均可通过升高 cAMP 含量,增强记忆力、促进海马区神经发生。这些研究表明 PDE4D 基因可能还有神经元保护机制。

总之,本研究为 PDE4D 基因 SNP83 是中国汉族人群 AIS 的一个危险基因提供了新证据。目前实验证据虽不太一致,但学者们普遍认为 PDE4D 基因既参与动脉粥样硬化进程,又具有神经保护作用。未来尚需进一步研究该基因与卒中相关的确切机制,及将基因筛查应用于临床实践和发展有效的神经保护剂,以便能检出高危人群,有利于卒中的预防和治疗。

参考文献

- Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, *et al.* The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke[J]. *Nat Genet*, 2003, 35(2): 131-138
- Brophy VH, Ro SK, Rhees BK, *et al.* Association of phosphodiesterase 4D polymorphisms with ischemic stroke in a US population stratified by hypertension status[J]. *Stroke*, 2006, 37(6): 1385-1390
- Meschia JF, Brott TG, Brown RD Jr, *et al.* Phosphodiesterase 4D and 5-lipoxygenase activating protein in ischemic stroke[J]. *Ann. Neurol*, 2005, 58(3): 351-361
- Nilsson - Ardnor S, Wiklund PG, Lindgren P, *et al.* Linkage of ischemic stroke to the PDE4D region on 5q in a Swedish population[J]. *Stroke*, 2005, 36(8): 1666-1671

- 5 Nakayama T, Asai S, Sato N, *et al.* Genotype and haplotype association study of the strk1 region on 5q12 among Japanese: a case - control study[J]. *Stroke*, 2006, 37(1): 69 - 76
- 6 Bevan S, Porteous L, Sitzer M, *et al.* Phosphodiesterase 4D gene, ischemic stroke, and asymptomatic carotid atherosclerosis[J]. *Stroke*, 2005, 36(5): 949 - 953
- 7 Saleheen D, Bukhari S, Haider SR, *et al.* Association of phosphodiesterase 4D gene with ischemic stroke in a pakistani population[J]. *Stroke*, 2005, 36(10): 2270 - 2277
- 8 Staton JM, Sayer MS, Hankey GJ, *et al.* Association between phosphodiesterase 4D gene and ischaemic stroke[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006, 77(9): 1067 - 1069
- 9 Sun Y, Huang Y, Chen X, *et al.* Association between the PDE4D gene and ischaemic stroke in the Chinese Han population[J]. *Clinical Science*, 2009, 117(7): 265 - 272
- 10 Xue H, Wang H, Song X, *et al.* Phosphodiesterase 4D gene polymorphism is associated with ischaemic and haemorrhagic stroke[J]. *Clinical Science*, 2009, 116(4): 335 - 340
- 11 Li N, He Z, Xu J, *et al.* Association of PDE4D and IL - 1 gene polymorphism with ischemic stroke in a Han Chinese population [J]. *Brain Res Bull* 81, 2010, 81(1): 38 - 42
- 12 Landells LJ, Szilagy CM, Jones NA, *et al.* Identification and quantification of phosphodiesterase 4 subtypes in CD4 and CD8 lymphocytes from healthy and asthmatic subjects[J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 133(5): 722 - 729
- 13 Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, *et al.* Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima - media thickness: a systematic review and meta - analysis[J]. *Circulation*, 2007, 115(4): 459 - 467

(收稿: 2011 - 10 - 28)

(修回: 2011 - 11 - 17)

选择性动脉插管灌注⁸⁹ 锶治疗骨肿瘤

范义湘 罗荣城 卢 伟 吕 海

摘 要 **目的** 探讨动脉插管灌注⁸⁹ 锶(⁸⁹Sr)及化疗药物对骨肿瘤的疗效。**方法** 骨肿瘤患者 69 例,化疗组(46 例)选择性动脉插管灌注化疗药物,综合组(23 例)灌注化疗药物同时灌注⁸⁹Sr 4mCi。介入治疗后 57 例进行手术治疗,其中化疗组 38 例,综合组 19 例。观察:①治疗后疼痛缓解程度;②肿瘤细胞坏死率;③患者有无胃肠道症状及血象改变。**结果** (1)综合组 20 例局部疼痛明显减轻或消失,总有效率为 86.9% (20/23);化疗组 36 例疼痛缓解,总有效率为 78.3% (36/46),两组有效率无显著性差异($\chi^2 = 0.76, P > 0.05$)。综合组缓解疼痛的显效率为 35%,明显高于化疗组(9%) ($\chi^2 = 7.26, P < 0.01$)。(2)以肿瘤坏死 I 级 + II 级视为无效,III 级 + IV 级为有效,化疗组与综合组肿瘤坏死的有效率分别为 68.4% (26/38)、84.2% (16/19),二者无明显差别($\chi^2 = 2.04, P > 0.05$)。以介入治疗 3 周后统计,综合组有效率为 100% (12/12),明显高于($P = 0.03$)化疗组 66.7% (14/21)。(3)化疗组出现胃肠道症状 7 例(15.2%),综合组 4 例(17.4%)。化疗组白细胞、血小板降幅分别为 10.8%、12.9%,综合组降幅分别为 13.1%、14.8%。**结论** 选择性动脉灌注⁸⁹Sr 及化疗药物治疗骨肿瘤,对止痛及肿瘤细胞坏死的效果优于单纯灌注化疗,对消化系统与骨髓的不良反应与单纯灌注化疗无显著性差异。

关键词 骨肿瘤 锶 - 89 内照射治疗

Intraarterial Infusion of Strontium - 89 for Therapy of Bone Tumor. Fan Yixiang, Luo Rongcheng, Lu Wei, Lü Hai. Department of Nuclear Medicine, The Second People's Hospital of Guangdong, Guangdong 510317, China

Abstract Objective To investigate the therapeutic effects on bone tumor with intraarterial infusion of strontium - 89 and and chemotherapeutic agent. **Methods** Among 69 patients with bone tumor, 46 cases received strontium - 89 and chemotherapy by intraarterial infusion (combined treatment group), and the rest 23 cases received simple chemotherapy. All patients were followed up regularly. **Results** In combined treatment group, pain relieved in 20 patients and the total effective analgesic rate was 86.9% (20/23). In chemotherapy group, it was 78.3% (36/46), which showed no significant difference ($\chi^2 = 0.76, P > 0.05$). But the complete response rate in combined group (35%) was obviously higher than that in chemotherapy group ($\chi^2 = 7.26, P < 0.01$). Three weeks after inventional treatment, combined therapy caused III or IV degree necrosis in 100% patients (12/12), which was remarkably higher than 66.7% (14/21) in chemotherapy group ($P = 0.03$). In chemotherapy group, gastrointestinal discomfort such as nausea, vomiting occurred in 7 cases (15.2%) and 4 cases (17.4%) in combined group. WBC and PLT showed no significant decrease in two groups. **Conclusion** For bone tumor, selectively

作者单位: 510317 广州, 广东省第二人民医院核医学科(范义湘); 510515 广州, 南方医科大学南方医院肿瘤科、脊柱骨病科(罗荣城、卢伟、吕海)