

脑出血患者抵抗素基因 +299G > A 位点多态性分析

董晓巧 杜 权 俞文华 张祖勇 陈 隽 翁建丰 朱 强 车志豪

摘 要 **目的** 揭示浙江地区汉族脑出血患者抵抗素基因 +299G > A 位点单核苷酸多态性与血浆抵抗素及 C - 反应蛋白水平的相关性。**方法** 选取 344 例高血压性基底节出血患者和 344 例年龄及性别均配对的健康体检者,入院时或体检时抽取外周血提取 DNA,采用聚合酶链反应 - 限制性片段多态性分析基因型,同时采用 ELISA 法检测脑出血患者血浆抵抗素及 C - 反应蛋白浓度,统计分析其相关性。**结果** 酶切后可见抵抗素基因 +299G > A 位点有 GG、GA 和 AA 3 种基因型。健康体检者等位基因 G 和 A 的频率分别为 64.8% 和 35.2%,基因型 GG、GA 和 AA 的频率依次为 41.9%、45.9% 和 12.2%。脑出血患者等位基因 G 和 A 的频率分别为 69.3% 和 30.7%,基因型 GG、GA 和 AA 的频率依次为 49.1%、40.4% 和 10.5%。经 Hardy - Weinberg 遗传平衡定律检验,脑出血患者及健康体检者各基因型频率均符合遗传平衡。经卡方检验,脑出血患者及健康体检者各基因型差异无统计学意义($P=0.159$)。GG、GA 和 AA 基因型脑出血患者血浆抵抗素浓度依次为 (23.9 ± 7.2) ng/ml、 (26.4 ± 7.2) ng/ml 和 (26.9 ± 9.7) ng/ml,血浆 C - 反应蛋白浓度依次为 (7.5 ± 2.2) mg/L、 (8.3 ± 2.7) mg/L 和 (8.4 ± 3.0) mg/L。采用方差检验,GG 基因型患者血浆抵抗素和 C - 反应蛋白浓度均显著低于 GA 和 AA 基因型患者(P 均 <0.05),而 GA 和 AA 基因型患者血浆抵抗素和 C - 反应蛋白浓度差异无统计学意义(P 均 >0.05)。采用多元线性回归分析,脑出血患者入院时血浆抵抗素浓度与 C - 反应蛋白浓度显著正相关($t=7.032$, $P<0.001$)。**结论** 浙江地区汉族脑出血患者抵抗素基因 +299G > A 位点单核苷酸多态性与血浆抵抗素和 C - 反应蛋白浓度显著相关,可能参与脑出血炎症反应。

关键词 抵抗素 基因多态性 脑出血 C - 反应蛋白 炎症反应

+299G > A Polymorphism of Resistin Gene in the Patients with Intracerebral Hemorrhage. Dong Xiaojiao, Du Quan, Yu Wenhua, Zhang Zuyong, Chen Jun, Wen Jianfeng, Zhu Qiang, Che Zhihao. Department of Neurosurgery, The First Hangzhou Municipal People's Hospital, Nanjing Medical University, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective This study aimed to examine the relations of the +299G > A single nucleotide polymorphism of resistin gene to the plasma resistin and C - reactive protein concentrations in intracerebral hemorrhage. **Methods** Totally 344 Chinese Han patients with intracerebral hemorrhage and 344 age - and sex - matched healthy subjects were included in this study. Plasma resistin and C - reactive concentrations were measured in the patients, as well as +299G > A polymorphisms of resistin gene in the healthy subjects and patients were genotyped using PCR - restriction fragment length polymorphism. **Results** The genotypes of the +299G > A polymorphism of resistin gene included GG, GA and AA. The G and A allele frequencies of the healthy subjects were 64.8% and 35.2%, respectively. The genotype GG, GA and AA frequencies of the healthy subjects were 41.9%, 45.9% and 12.2%, respectively. The G and A allele frequencies of the patients were 69.3% and 30.7%, respectively. The genotype GG, GA and AA frequencies of the patients were 49.1%, 40.4% and 10.5%, respectively. The genotype frequencies of the +299G > A polymorphism of resistin gene in the healthy subjects and patients were in the Hardy - Weinberg equilibrium. The genotype frequencies between healthy subjects and patients showed no significant differences ($P=0.159$). Plasma resistin levels of the patients with the genotype GG, GA and AA were (23.9 ± 7.2) ng/ml, (26.4 ± 7.2) ng/ml and (26.9 ± 9.7) ng/ml respectively, as well as their C - reactive protein levels were (7.5 ± 2.2) mg/L, (8.3 ± 2.7) mg/L and (8.4 ± 3.0) mg/L respectively. By analysis of variance, the common homozygote (GG) had the lowest resistin and C - reactive protein plasma concentrations (P all <0.05); the plasma resistin and C - reactive protein concentrations between heterozygote (GA) and rare allele homozygote (AA) did not differ significantly (P all >0.05). Plasma resistin level was significantly associated with plasma C - reactive protein level ($t=7.032$, $P<0.001$) using multivariate linear regression. **Conclusion** Our results implied that the +299G > A single nucleotide polymorphism of resistin gene was associated with plasma resistin and C - reactive protein concentrations and

基金项目:杭州市医药卫生科技计划项目(2010A009)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院神经外科(董晓巧、杜权、俞文华、张祖勇、朱强、车志豪);315315 慈溪市第二人民医院神经外科(陈隽、翁建丰)

通讯作者:朱强,电子信箱:dxqhy@163.com

seemed to be potentially involved in the inflammatory component of intracerebral hemorrhage.

Key words Resistin; Polymorphism; C - reactive protein; Intracerebral hemorrhage; Inflammatory reaction

脑出血发病率高,预后差^[1,2]。炎症反应参与脑出血后继发性脑损伤^[3,4]。抵抗素是一种首先发现由白色脂肪细胞分泌的肽类激素,可表达于脑外伤及脑缺血动物脑皮质,参与炎症反应^[5~8]。我们最近研究发现,脑出血患者血浆抵抗素水平升高,且与预后显著相关^[9]。抵抗素基因内含子 2 区 +299G > A 位点 A 等位基因的存在可以增加血液及组织中抵抗素的表达,从而影响其生物学效应,但其与脑出血相关研究少见报道^[10,11]。本研究运用限制性内切酶方法,对抵抗素基因 +299G > A 位点进行多态性分析,旨在揭示抵抗素基因 +299G > A 位点多态性与脑出血炎症反应的相关性,为脑出血继发性脑损伤研究提供遗传学基础。

资料与方法

1. 一般资料:脑出血病例为 2007 年 1 月~2009 年 12 月杭州市第一人民医院和慈溪市第二人民医院神经外科收治的高血压性基底节出血患者,共 344 例。对照组为同期杭州市第一人民医院健康体检者,共 344 例,年龄及性别均与脑出血病例配对。脑出血患者一般情况及临床资料详见表 1。脑出血患者和对照组均除外既往脑卒中、使用抗凝剂、严重感染、严重心肝肾疾病及严重头颈部外伤史。

2. 指标测定:脑出血患者和对照组静脉血在入院时或体检时获得。脑出血患者血标本立即放入无菌 EDTA 试管中,在 4℃、1500r/min、离心 20min 收集血浆,储存在 -70℃ 环境中待检。ELISA 法测定血浆抵抗素和 C - 反应蛋白浓度,试剂购于美国 R&D systems 公司。

3. 抵抗素基因 +299G > A 位点多态性分析:使用美国 Stratagene 公司生产的 DNA 提取试剂盒提取脑出血患者及对照组外周血 DNA,利用 PCR - RFLP 法分析抵抗素基因 +299G > A 位点基因多态性。根据人抵抗素基因特异序列设计引物:上游引物 5' - GGAAGAAGCCATCAATGAGAGG - 3',下游引物 5' - CCTGTTGTTTGGAGCTAGGTC - 3',扩增片段长度 352bp,由上海生物工程有限公司合成。PCR 扩增试剂盒为美国 MBI fermentas 公司生产,共 20μl,含 0.1mmol/L dNTP、1 U Taq DNA 聚合酶、MgCl₂ 2mmol/L、上下游引物各 0.25μmol/L、DNA 模版约 200ng。PCR 反应条件:95℃ 变性 7min,64℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,共循环 35 次,末次循环后 72℃ 再延伸 10min。取扩增产物 3μl,用限制性内切酶 *Alu I* 酶(为美国 NEB 公司)5U 对 PCR 扩增产物在 37℃ 下酶切 12h。将酶切产物点样于琼脂糖凝胶电泳,紫外线灯下观察结果、摄片,分析基因型。

4. 统计学方法:采用 SPSS 10.0 统计软件分析,计量资料

行正态检验,正态分布数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行方差分析,非正态分布数据以中位数(上四分位数,下四分位数)表示,行 *Kruskal - Wallis H test* 检验,分类资料比较和 *Hardy - Weinberg* 平衡行卡方检验,数据相关性行 *Spearman* 相关分析和多元线性回归分析, $P < 0.05$ 定为差异有统计学意义。

结 果

1. 抵抗素基因 +299G > A 位点多态性分析:脑出血患者及对照组 PCR 产物均可见预期的 352bp 的片段。经限制性内切酶 *Alu I* 对 PCR 扩增产物进行酶切后产物电泳共获得 GG、GA 和 AA 3 种基因型。对照组等位基因 G 和 A 的频率分别为 64.8% 和 35.2%,基因型 GG、GA 和 AA 的频率依次为 41.9%、45.9% 和 12.2%。脑出血患者等位基因 G 和 A 的频率分别为 69.3% 和 30.7%,基因型 GG、GA 和 AA 的频率依次为 49.1%、40.4% 和 10.5%。经 *Hardy - Weinberg* 遗传平衡定律检验,脑出血患者及对照组各基因型频率均已达遗传平衡,具有群体代表性。经卡方检验,脑出血患者及对照组各基因型差异无统计学意义($P = 0.159$)。

2. 抵抗素基因 +299G > A 位点多态性与血浆抵抗素和 C - 反应蛋白水平的相关性分析:经方差分析,GG 基因型患者血浆抵抗素均显著低于 GA 和 AA 基因型患者($P = 0.003$, $P = 0.027$),而 GA 和 AA 基因型患者血浆抵抗素浓度差异无统计学意义($P = 0.714$);GG 基因型患者血浆 C - 反应蛋白浓度均显著低于 GA 和 AA 基因型患者($P = 0.002$, $P = 0.024$),而 GA 和 AA 基因型患者血浆 C - 反应蛋白浓度差异无统计学意义($P = 0.766$)(表 1)。

3. 血浆 C - 反应蛋白与抵抗素浓度的相关分析:*Spearman* 相关分析显示,血浆 C - 反应蛋白浓度与血浆抵抗素浓度($r = 0.514$, $P < 0.001$)、格拉斯哥评分($r = -0.425$, $P < 0.001$)、血糖($r = 0.282$, $P < 0.001$)、血肿体积($r = 0.397$, $P < 0.001$)、血肌酐酶($r = 0.118$, $P = 0.028$)、血纤维蛋白原($r = 0.275$, $P < 0.001$)和 D - 二聚体($r = 0.294$, $P < 0.001$)均呈显著相关性。多元线性回归分析显示,血浆 C - 反应蛋白浓度与血浆抵抗素浓度($t = 7.032$, $P < 0.001$)和格拉斯哥评分($t = -4.845$, $P < 0.001$)仍显著相关性。

表 1 脑出血患者 +299G > A 基因型之间脑出血相关指标的比较

项目	脑出血患者 (n = 344)	G - G 基因型 (n = 169)	G - A 基因型 (n = 139)	A - A 基因型 (n = 36)	P
性别 (男性/女性)	238/106	109/60	102/37	27/9	0.177
年龄 (岁)	62 (57, 67)	61 (57, 73)	62 (60, 65)	63 (55, 71)	0.085
糖尿病	88 (25.6%)	47 (27.8%)	30 (21.6%)	11 (30.6%)	0.354
高胆固醇血症	150 (43.6%)	82 (48.5%)	52 (37.4%)	16 (44.4%)	0.147
体重指数 (kg/m ²)	24.8 ± 2.2	24.8 ± 2.1	24.9 ± 2.2	24.8 ± 2.3	0.904
格拉斯哥评分	9 (7, 12)	10 (8, 12)	9 (7, 12)	9 (6, 12)	0.137
血肿体积 (ml)	40 (23, 58)	40 (25, 54)	40 (23, 60)	50 (30, 68)	0.083
动脉收缩压 (mmHg)	183 (158, 205)	184 (160, 206)	177 (156, 206)	183 (162, 202)	0.746
动脉舒张压 (mmHg)	101 (94, 109)	101 (91, 107)	99 (94, 111)	102 (97, 108)	0.091
平均动脉压 (mmHg)	128 (115, 140)	129 (112, 138)	126 (114, 143)	128 (120, 137)	0.667
血白细胞 (×10 ⁹ /L)	8.4 (5.8, 11.3)	7.8 (5.7, 11.2)	8.7 (6.0, 11.3)	8.2 (5.5, 11.5)	0.282
血糖 (mmol/L)	9.2 (7.8, 10.6)	9.4 (7.9, 10.3)	8.7 (7.3, 12.5)	8.6 (7.8, 10.5)	0.599
血三酰甘油 (mg/dl)	128 (105, 144)	128 (104, 144)	128 (103, 142)	132 (93, 142)	0.859
血总胆固醇 (mg/dl)	181 (159, 234)	192 (163, 234)	178 (152, 237)	170 (152, 229)	0.085
血高密度脂蛋白 (mg/dl)	47 (35, 62)	45 (37, 60)	50 (35, 64)	42 (31, 59)	0.121
血低密度脂蛋白 (mg/dl)	108 (85, 154)	113 (92, 159)	103 (80, 152)	100 (84, 153)	0.075
血肌酸激酶 (U/L)	96 (78, 142)	93 (78, 127)	94 (79, 142)	115 (78, 158)	0.400
血浆抵抗素 (ng/ml)	25.2 ± 7.6	23.9 ± 7.2	26.4 ± 7.2	26.9 ± 9.7	0.005
血浆 C - 反应蛋白 (mg/L)	8.0 ± 2.5	7.5 ± 2.2	8.3 ± 2.7	8.4 ± 3.0	0.006
血浆纤维蛋白原 (g/L)	4.9 ± 1.3	4.7 ± 1.2	4.9 ± 1.3	4.7 ± 1.6	0.447
血浆 D - 二聚体 (mg/L)	1.95 (1.30, 2.47)	1.91 (1.33, 2.40)	2.04 (1.30, 2.45)	2.14 (1.20, 3.24)	0.302

计量资料行正态检验,正态分布数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行方差分析,非正态分布数据以中位数(上四分位数,下四分位数)表示,行 *Kruskal - Wallis H test* 检验,分类资料比较行卡方检验

讨 论

脑出血后继发性脑损伤的病理生理机制复杂,涉及很多方面。炎症反应是脑出血后继发性脑损伤的重要组成部分。脑出血后,补体、凝血酶和纤维蛋白降解产物等可诱发一系列炎症反应,从而白介素-6、白介素-10、肿瘤坏死-α等许多炎症因子浓度升高,血脑屏障通透性增加,脑水肿加重,导致神经细胞凋亡,加重脑损伤^[3, 4]。

抵抗素是一种主要由白色脂肪细胞分泌的肽类激素,与Ⅱ型糖尿病、胰岛素抵抗、高血压、肥胖、脂质代谢异常等有关^[12-14]。近年来研究表明抵抗素在外周血单核细胞中高表达,并与多个炎性标志物相关,提示抵抗素是一种前炎性细胞因子,可能以一种代谢信号的方式表达潜在的炎性作用,引起多系统炎性相关性疾病^[5, 6, 12-14]。在小鼠缺血脑损伤中,损伤同侧大脑皮质和海马区抵抗素表达明显增加^[7]。在大鼠创伤性脑损伤中,损伤同侧和对侧海马区抵抗素 mRNA 水平显著增加^[8]。我们研究发现,脑外伤及脑出血患者血浆抵抗素水平升高,且与预后显著相关^[9, 15]。最近研究发现,脑外伤患者血浆抵抗素浓度和超敏 C - 反应蛋白显著相关。本研究亦发现,

血浆抵抗素浓度与 C - 反应蛋白浓度显著相关。这些提示,抵抗素在脑损伤后炎症反应中具有重要角色。

人抵抗素基因定位于 19p13.2,其 mRNA 含 476 个碱基对,其编码区含有 326 个碱基对,编码 108 个氨基酸。国内外学者通过基因筛查发现抵抗素有 30 个多态性位点,其中内含子区 17 个,启动子区 5 个,外显子区 8 个,其中抵抗素基因内含子 2 区 +299G > A 位点多态性可以影响血液及组织中抵抗素的表达,从而影响其生物学效应,血清抵抗素水平在 AA 基因型表达最高,其次 GA 型,GG 型表达最少^[10, 11]。抵抗素 +299G > A 基因多态性可能与 2 型糖尿病易感性相关^[11]。本研究发现抵抗素基因 +299G > A 位点单核苷酸多态性与脑出血无显著相关性。同时,本研究脑出血患者各基因型组间一般资料、临床资料及常规化验结果等混淆因素差异无统计学意义,进而分析发现抵抗素基因 +299G > A 位点多态性与脑出血患者血浆抵抗素浓度显著相关。有趣的是,我们也发现抵抗素基因 +299G > A 位点单核苷酸多态性与脑出血患者血浆 C - 反应蛋白浓度显著相关。这些提示,抵抗素基因 +299G > A 位点单核苷酸多态性可能参与脑出血后的炎症反应。

参考文献

- 1 Hu YY, Dong XQ, Yu WH, *et al.* Change in plasma S100B level after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage[J]. Shock, 2010, 33(2):134 – 140
- 2 Wang WH, Yu WH, Dong XQ, *et al.* Plasma adiponectin as an independent predictor of early death after acute intracerebral hemorrhage[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(17 – 18): 1626 – 1631
- 3 Huang M, Hu YY, Dong XQ. High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome[J]. Surg Neurol, 2009, 72(5): 481 – 489
- 4 黄曼, 胡悦育, 徐秋萍. 急性脑出血患者血液中微粒促凝活性的变化[J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18(6): 645 – 650
- 5 Silswal N, Singh AK, Aruna B, *et al.* Human resistin stimulates the pro – inflammatory cytokines TNF – alpha and IL – 12 in macrophages by NF – kappa B – dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4):1092 – 1101
- 6 Schaeffler A, Gross P, Buettner R, *et al.* Fatty acid – induced induction of Toll – like receptor – 4/nuclear factor – kappa B pathway in adipocytes links nutritional signaling with innate immunity[J]. Immunology, 2009, 126(2):233 – 245
- 7 Wiesner G, Brown RE, Robertson GS, *et al.* Increased expression of the adipokine genes resistin and fasting – induced adipose factor in hypoxic/ischaemic mouse brain[J]. Neuroreport, 2006, 17(11):1195 – 1198

- 8 Brown R, Thompson HJ, Imran SA, *et al.* Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain[J]. Neurosci Lett, 2008, 432(1):73 – 78
- 9 Dong XQ, Hu YY, Yu WH, *et al.* High concentrations of resistin in the peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome[J]. J Crit Care, 2010, 25(2):243 – 247
- 10 Lau CH, Muniandy S. Adiponectin and resistin gene polymorphisms in association with their respective adipokine levels[J]. Ann Hum Genet, 2011, 75(3):370 – 382
- 11 Suriyaprom K, Phonrat B, Namjuntra P, *et al.* The +299(G > A) resistin gene polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes in Thais[J]. J Clin Biochem Nutr, 2009, 44(1):104 – 110
- 12 陈思娇, 都镇先, 张海燕, 等. 2 型糖尿病患者血清抵抗素水平与血糖和炎症因子的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(2):151 – 153
- 13 徐克群, 沈云志. 抵抗素与急性胰腺炎[J]. 中华胰腺病杂志, 2008, 8(5):350 – 352
- 14 王新锋, 徐永庆. 抵抗素和血栓调节蛋白与急性脑梗死的关系研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(8):929 – 931
- 15 Dong XQ, Yang SB, Zhu FL, *et al.* Resistin is associated with mortality in patients with traumatic brain injury[J]. Crit Care, 2010, 14(5):R190

(收稿:2011 – 08 – 22)

(修回:2011 – 12 – 12)

Per2 和 cyclin D1 在非小细胞肺癌中的表达

池 闯 刘 瑜 林晓铭 孙成超

摘 要 **目的** 研究生物钟基因 Per2 和细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)在非小细胞肺癌中的表达,探讨其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学染色法检测 60 例非小细胞肺癌组织和 20 例正常肺组织中 Per2 和 cyclin D1 的表达并分析其表达与临床病理特征的关系。**结果** 在非小细胞肺癌和正常肺组织中 Per2 的阳性表达率分别为 71.7% 和 95.0% ($P < 0.05$),而 cyclin D1 的阳性表达率分别为 63.3% 和 15.0% ($P < 0.01$)。非小细胞肺癌中 Per2 的表达缺失与分化程度及 TMN 分期相关($P < 0.05$),而 cyclin D1 的阳性表达和 TNM 分期及淋巴结转移相关($P < 0.05$)。**结论** Per2 在非小细胞肺癌中表达降低,而 cyclin D1 则呈高表达,两者可以作为判断非小细胞肺癌发生、发展和预后的指标。

关键词 非小细胞肺癌 生物钟基因 Per2 细胞周期蛋白 D1 免疫组织化学

Expression of Circadian Gene Per2 and Cyclin D1 in NSCLC. Chi Chuang, Liu Yu, Lin Xiaoming, Sun Chengchao. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To detect the expression of Per2 and cyclin D1 in non – small – cell lung cancer (NSCLC), and analyze their relation to clinical pathological data. **Methods** The expression of Per2 and cyclin D1 was measured in 60 NSCLC and 20 normal lung tissue by immunohistochemistry assay, then we analyzed the relation with clinical pathological parameters. **Results** The positive expression rates of Per2 in NSCLC and in normal lung tissue were 71.7% and 95.0% ($P < 0.05$), while the positive expression rates of cy-

基金项目:温州市科技局立项课题(Y20100039)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院心胸外科