

【临床研究】

通信作者:卢红(1955-),女,河南新乡人,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,主要从事脑血管病研究;E-mail:speakme@126.com。

目前研究表明,脑梗死的病因较多,高血压、糖尿病、遗传、炎症反应等因素在脑梗死的发生、发展中均起重要作用^[1]。动物及临床实验发现,脑梗死的病理生理过程中有大量炎症细胞因子的出现^[2],其中白细胞早期浸润和脑组织水肿是缺血所致炎症的重要特征^[3]。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)作为具有多种生物效应的促炎性因子,其基因多态性在脑梗死发生、发展中的意义尚存争论^[4-5]。本研究旨在探讨 IL-1 β 、TNF- α 基因多态性在豫北地区急性脑梗死患者发病中的作用及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年4月至2017年8月新乡医学院第二附属医院神经内科收治的86例脑梗死患者为研究对象(脑梗死组)。另选择同期健康体检者92例作为对照组。研究对象均为汉族,祖籍河南省豫北地区,彼此无亲缘关系。脑梗死组:男45例,女41例,年龄55~80(65.15 \pm 11.90)岁;对照组:男52例,女40例,年龄55~80(62.96 \pm 9.17)岁。2组受试者性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会审核批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 纳入标准与排除标准 纳入标准^[6]:(1)有明确的突发性神经功能障碍病史;(2)头颅CT或核磁共振成像证实为脑梗死。排除标准:(1)心源性、脑血管畸形或动脉瘤、动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤引起的脑梗死患者;(2)伴有支气管哮喘、Graves病、糖尿病、炎症性肠病、多发性硬化、严重肝肾疾病的脑梗死患者。

1.3 主要试剂与仪器 全血基因组提取试剂盒、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物购自北京天根生化科技有限公司, TaqDNA聚合酶、限制性内切酶、DNAmaker、脱氧核糖核苷三磷酸购自上海生工生物工程股份有限公司;实时荧光定量PCR仪购自上海枫岭生物技术有限公司, WIX-EP300电泳仪购自中元和生物技术有限公司, 凝胶图像分析系统(GAS7001B)购自英国UVI公司。

1.4 实验方法

1.4.1 基因组DNA提取 采集2组受试者肘静脉血2 mL, 乙二胺四乙酸二钾抗凝, -70℃保存。采用血液基因组DNA小量抽提试剂盒提取DNA, -20℃冰箱保存, 备用;操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.4.2 IL-1 β (-511)和TNF- α (-238)位点的引物设计 在单核苷酸多态性数据库中查得2个位点

的核酸序列,用Primer 5.0软件设计引物,用Oligo 6.0软件进行检验,引物由北京天根生化科技有限公司合成。IL-1 β (-511)上游引物序列为5'-TG-GCATTGATCTGGTTCATC-3',下游引物序列为5'-GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3'。TNF- α (-238)等位基因特异型PCR(allelic specificity PCR, ASPCR)引物:上游引物序列为5'-TTCCTGCATCCTGTCTG-GAAGTTAGAA-3';下游引物有2条,1条引物序列为5'-AGGATACCCCTCACACTCCCCATCCTCCCTGCTCC-3'(Pg),3'端碱基为C,用于G等位基因扩增,另1条引物序列为5'-AGGATACCCCTCACACTCCCCATC-CTCCCTGCTCT-3'(P),3'端碱基为T,用于A等位基因扩增。内对照PCR引物的上游引物序列(β 1)为5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3',下游引物序列(β 2)为5'-CAACTTCATCCACGTCC-3'。

1.4.3 IL-1 β (-511)位点基因型检测 参考文献[7]进行操作。取适量DNA行PCR扩增,94℃预变性4 min,94℃变性1 min,50℃复性1 min,72℃延伸1 min,32个循环;72℃延伸4 min,温度降至4℃;PCR产物10 μ L,限制性内切酶Ava I 4 U, 10 \times 酶切反应缓冲液1.5 μ L,反应体系在37℃水浴保温16~18 h过夜,转到65℃水浴保温10 min终止酶切反应;将酶切反应产物置于质量分数2.0%琼脂糖凝胶中电泳,在Unvitec凝胶成像系统中成像。

1.4.4 TNF- α (-238)位点基因型检测 参考文献[8]进行操作。取适量DNA行ASPCR扩增,95℃预变性5 min,95℃变性1 min,67℃复性1 min,72℃延伸1 min,5个循环;95℃变性1 min,62℃复性1 min,72℃延伸1 min,20个循环;95℃变性1 min,58℃复性1 min,72℃延伸1 min,5个循环;72℃再延伸10 min,降至4℃恒温;PCR扩增产物在质量分数2.0%琼脂糖凝胶中电泳,在Unvitec凝胶成像系统中成像。

1.5 统计学处理 应用SPSS25.0软件进行统计分析。基因型和等位基因频率采用直接计数法。Hardy-Weinberg平衡检测采用 χ^2 检验,组间基因型和等位基因频率的差异采用 χ^2 检验。采用比值比(odds ratio, OR)及95%可信区间(confidence interval, CI)评估脑梗死发病风险。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg平衡检验 2组受试者IL-1 β (-511)位点基因型频率和TNF- α (-238)位点基因型频率均符合Hardy-Weinberg遗传平

衡定律($P>0.05$),证实 2 组受试者均为遗传平衡群体。

2.2 IL-1β(-511) 和 TNF-α(-238) 位点基因型分析 结果见图 1 和图 2。IL-1β(-511) 共有 3 种基因型:CC(190 bp)、TT(304 bp) 和 CT(304、190、114 bp)。TNF-α(-238) 共有 2 种基因型:GG(192、268 bp) 和 GA(268 bp)。

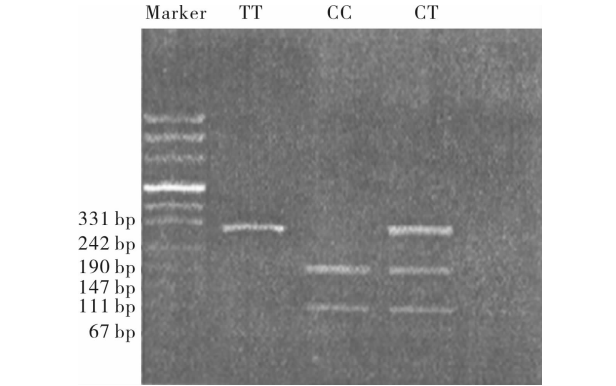


图 1 IL-1β PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig.1 Electrophoresis of agarose gel of IL-1β produced by PCR

表 1 2 组受试者 IL-1β(-511) 位点基因型及等位基因频率比较

Tab.1 Comparison of IL-1β (- 511) genotypic and allelic frequencies between the two groups

组别	n	基因型/例(%)			等位基因/例(%)	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	92	30(32.6)	39(42.4)	23(25.0)	99(53.8)	85(46.2)
脑梗死组	86	17(19.8)	34(39.5)	35(40.7)	68(39.5)	104(60.5)
OR		0.509	0.889	2.059	0.486	1.964
95% CI		0.256 ~ 1.012	0.489 ~ 1.616	1.087 ~ 3.899	0.256 ~ 0.920	0.988 ~ 3.903
P		0.052	0.699	0.026	0.026	0.052

2.4 2 组受试者 TNF-α(-238) 位点基因型及等位基因频率比较 结果见表 2。2 组受试者 TNF-α(-238) 位点基因型频率和等位基因频率比较差异

表 2 2 组受试者 TNF-α(-238) 位点基因型及等位基因频率比较

Tab.2 Comparison of TNF-α(-238) genotypic and allelic frequencies between the two groups

组别	n	基因型/例(%)			等位基因/例(%)	
		GG	GA	AA	G	A
对照组	92	78(84.8)	14(15.2)	0(0.0)	170(92.4)	14(7.6)
脑梗死组	86	75(87.2)	11(12.8)	0(0.0)	161(93.6)	11(6.4)
OR		1.224	0.817	—	—	0.817
95% CI		0.256 ~ 1.012	0.489 ~ 1.616	—	—	0.349 ~ 1.914
P		0.052	0.699	—	—	0.641

注:“—”表示无数据。

3 讨论

通过对 IL-1β(-511) 多态性与脑梗死相关性的研究,国内外学者有不同的结论。REZK 等^[9] 针对埃及人群研究发现,携带 IL-1β(-511T/T) 及 IL-1β(-511C/T) 基因型的患者,脑梗死后 7 d 和 1 个月神经功能损伤有加重倾向。而在韩国人群、波

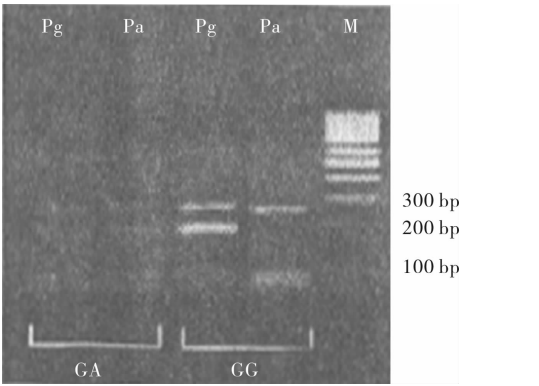


图 2 TNF-α AS-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig.2 Electrophoresis of agarose gel of TNF-α produced by AS-PCR

2.3 2 组受试者 IL-1β(-511) 位点基因型及等位基因频率比较 结果见表 1。脑梗死组患者 IL-1β(-511) 位点 TT 基因型频率高于对照组,差异有统计学意义($OR=2.059$, 95% CI:1.087 ~ 3.899, $P<0.05$);脑梗死组患者 IL-1β(-511) 位点 C 等位基因频率低于对照组,差异有统计学意义($OR=0.486$, 95% CI:0.256 ~ 0.920, $P<0.05$)。

无统计学意义($P>0.05$)。AA 基因型在全部研究对象中未检出,G 等位基因见于全部研究对象。

兰人群、意大利人群中未发现 IL-1β(-511) 多态性与脑梗死有关^[10]。YANG 等^[11] 通过对 45 岁以下脑梗死患者的研究发现,IL-1β(-511) TT/CC 基因型通过影响核因子 κB (nuclear factor kappa B, NF-κB)、诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 及基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 发挥作用,是年轻脑梗

死患者的独立危险因素。而 LAI 等^[12]研究发现,脑梗死患者 IL-1β(- 511) 基因型及等位基因分布与正常对照比较无明显差异。

研究认为,IL-1β(- 511) 等位基因频率在不同种族、不同地域人群中的分布不一致^[13]。本研究中,豫北地区汉族正常人群 IL-1β(- 511) C 等位基因频率为 0. 538、T 等位基因频率为 0. 462,T 等位基因频率稍低于韩国人(0. 51)^[14],而美国和意大利白种人 T 等位基因频率分别为 0. 19、0. 35^[15]。这种差异可能是不同地区和不同种族人群所处环境不同,造成人类基因发生突变或飘移,使同一基因座的基因型和等位基因频率在不同种族和不同地区的人群中分布特点不一致^[16]。这种差异可能造成疾病关联分析的结论不一致。

本研究发现,脑梗死组患者 C 等位基因频率低于对照组;TT 基因型频率高于对照组,表明 TT 纯和型与脑梗死的发病有相关性,携带 TT 基因型比例越高其脑梗死发病风险越高。脑梗死组患者 CC、CT 基因型频率与对照组比较差异无统计学意义,提示其与脑梗死的发病无相关性。

IL-1β(- 511) C/T 多态性影响脑梗死易感性的机制可能与 IL-1β(- 511) T 等位基因影响 IL-1β、IL-1RNA 转录进而增加 IL-1β 的产生有关^[5]。此外,也存在 IL-1β(- 511) T 等位基因与 2 号染色体上其他脑梗死易感基因连锁不平衡引起脑梗死发病风险增高的可能性^[14]。

国外尚未见 TNF-α(- 238) 多态性与脑梗死相关性研究的报道。国内刘丹等^[17]对内蒙古人群的研究发现,TNF-α 基因 T1031C 的 CC 基因型有增加动脉粥样硬化性脑梗死的发病风险,认为 C 等位基因是脑梗死的遗传易感基因之一。而本研究未发现 TNF-α(- 238) 等位基因频率和基因型频率分布在脑梗死组和对照组之间有显著性差异,因此推测 TNF-α(- 238) G/A 多态性可能与脑梗死无相关性。

脑梗死是一种多因素疾病,本研究仅探讨了 IL-1β(- 511) 和 TNF-α(- 238) 基因多态性与急性脑梗死的相关性,认为 IL-1β(- 511) C/T 多态性与脑梗死有关,TNF-α(- 238) G/A 多态性可能与脑梗死无关。

参考文献:

[1] POWERS W J,RABINSTEIN A A,ACKERSON T,et al. 2018 Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke;a guideline for healthcare professionals from the American

Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*,2018,49(3):e46-e110.

[2] HUSAIN K,HERNANDEZ W,ANSARI R A,et al. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis[J]. *World J Biol Chem*,2015,6(3):209-217.

[3] BOEHME A K,ESENWA C,ELKIND M S. Stroke risk factors, genetics, and prevention[J]. *Circ Res*,2017,120(3):472-495.

[4] 周晓艳,徐艳丽,牛安林,等. 急性前循环梗死患者血清中单核细胞趋化蛋白-1 和血管内皮细胞钙黏蛋白水平变化及其临床意义[J]. *新乡医学院学报*,2018,35(11):1026-1029.

[5] 腾海英,曹丽霞,赵丽娟. TNF-α、hs-CRP、LDL-c 与老年急性脑梗死的相关性研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*,2016,19(24):61-63.

[6] 中华医学会神经病学分会. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. *中华神经科杂志*,2015,48(4):246-258.

[7] UM J Y,MOON K S,LEE K M,et al. Association of interleukin-1 alpha gene polymorphism with cerebral infarction[J]. *Brain Res Mol Brain Res*,2003,115(1):50-54.

[8] ERDEMLI B,OZBEK E A,BASARID K,et al. Proinflammatory biomarkers' level and functional genetic polymorphisms in periprosthetic joint infection[J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*,2018,52(2):143-147.

[9] REZK N A,MOHAMAD H S. Influence of interleukin-1 gene cluster polymorphisms on the susceptibility and outcomes of acute stroke in Egyptian patients[J]. *Cell Biochem Biophys*,2015,71(2):637-647.

[10] AL-MUFTI F,ALKANAQ A,AMULURU K,et al. Genetic insights into cerebrovascular disorders;a comprehensive review[J]. *J Vasc Interv Neurol*,2017,9(5):21-32.

[11] YANG B,ZHAO H,WANG Y B,et al. Influence of interleukin-1 beta gene polymorphisms on the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age *in vivo* and *in vitro*[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(11):13806-13813.

[12] LAI J,ZHOU D,XIA S,et al. Association of interleukin-1 gene cluster polymorphisms with ischemic stroke in a Chinese population[J]. *Neurol India*,2006,54(4):366-369.

[13] ZOU L,ZHAO H,GONG X,et al. The association between three promoter polymorphisms of IL-1 and stroke;a meta-analysis[J]. *Gene*,2015,567(1):36-44.

[14] HACHIYA T,KAMATANI Y,TAKAHASHI,et al. Genetic predisposition to ischemic stroke;a polygenic risk score[J]. *Stroke*,2017,48(2):253-258.

[15] CHAUHAN G,DEBETTE S. Genetic risk factors for ischemic and hemorrhagic stroke[J]. *Curr Cardiol Rep*,2016,18(12):124.

[16] BLUHER A,DEVAN W J,HOLLIDAY E G,et al. Heritability of young and old-onset ischemic stroke[J]. *Eur J Neurol*,2015,22(11):1488-1491.

[17] 刘丹,张伟,孙洪英,等. 肿瘤坏死因子-α 基因多态性及其血清水平与脑梗死的相关性[J]. *中国老年学杂志*,2016,36(20):5002-5004.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)