论著

文章编号:1000-5404(2005)21-2160-04

E-选择素基因多态性与广西壮族人缺血性脑卒中的遗传易感性的关系

韦叶生[1],徐群清[1],蒙兰青[2],梁 峰[1] (右江民族医学院附属医院:[1]检验中心,[2]神经内科,百色 533000)

提 要:目的 探讨E-选择素(E-selectin)基因多态性与广西地区壮族人缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)和DNA序列测定法检测205例IS及210例对照组E-selectin基因第2外显子G98T、第4外显子A561C(S128R)多态性,同时采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测IS和对照者血清E-selectin水平。**结果** IS组E-selectin水平显著高于对照组($P<0.01$),E-selectin基因S128R基因型频率和等位基因频率在IS组和对照组比较差异有显著性($P<0.05$),基因型频率的相对风险分析发现,SR基因型携带者患IS的风险是SS基因型的2.008倍($OR=2.008$,95% CI:1.144~3.524),SR基因型携带者的E-selectin血清水平显著高于SS基因型[(58.72±16.23) ng/ml *vs* (50.35±13.76) ng/ml, $P<0.01$]。E-selectin基因G98T基因型频率和等位基因频率在IS组和对照组之间比较差异无显著性($P>0.05$)。**结论** E-selectin基因S128R多态性与IS的发病具有相关性,R等位基因可能是广西地区壮族人IS发病的遗传易感基因,携带SR基因型的个体可能通过促进E-selectin的高度表达进而增加IS的发病风险。

关键词:E-选择素;脑缺血;基因;多态现象(遗传学)

中图法分类号:R341.32; R392.2; R743.310.2 **文献标识码**:A

Polymorphisms of E-selectin gene and genetic susceptibility of ischemic stroke in Zhuang nationality of Guangxi province

WEI Ye-sheng[1], XU Qun-qing[1], MENG Lan-qing[2], LIANG Feng[1] ([1]Department of Clinical Laboratory Center, [2]Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, China)

Abstract: Objective To study the relationship between polymorphisms of E-selectin gene and ischemic stroke (IS) in Zhuang nationality of Guangxi province. **Methods** The G98T polymorphism in the exon 2 and the S128R polymorphism in the exon 4 of E-selectin gene were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis and DNA sequencing among 205 patients with IS of Zhuang nationality in Guangxi and 210 healthy controls. The serum level of E-selectin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** IS group showed significantly higher serum levels of E-selectin than control group ($P<0.01$). There was significant difference in frequencies of allele and genotype in S128R polymorphism between IS and control groups respectively. The relative risk suffered from IS of SS genotype was 2.008 times of the SR genotype ($OR=2.008$, 95% CI: 1.144 - 3.524). The serum E-selectin level was significantly higher among carriers of SR genotype as compared with non-carriers (SS genotype) [(58.72 ± 16.23) ng/ml *vs* (50.35 ± 13.76) ng/ml, $P<0.01$]. There was no significant difference in genotype distribution for the E-selectin gene G98T genotype between IS and control groups ($P>0.05$). **Conclusion** E-selectin S128R polymorphism was associated with IS, and R allele may be a genetic risk factor of IS among Guangxi Zhuang natioalities, in whom the E-selectin SR genotype carriers maybe increase the risk of ischemic stroke by enhancing the E-selectin expression.

Key words: E-selectin; cerebral ischemia; gene; polymorphism

基金项目:广西卫生厅基金资助项目(Z2004037);广西壮族自治区右江民族医学院科研基金资助项目(yy2003001)

Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Public Health Department of Guangxi Province (Z2004037) and the Scientific Research Foundation of Youjiang Medical College for Nationalities of Guangxi Province (yy2003001)

作者简介:韦叶生(1969-),男,广西壮族自治区桂林市人,硕士,讲师,主要从事分子生物学及免疫学方面的研究。电话:(0776)2853067

收稿日期:2004-08-04;**修回日期**:2004-11-01

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是严重危害人类健康的疾病，然其病因和发病机制尚未阐明，目前，大量的流行病学研究结果提示缺血性脑卒中的发生和发展与感染性炎症及细胞因子和细胞因子间的网络调控有一定的关系[1,2]。E-选择素(E-selectin)是新近发现的一种炎症细胞因子，它与高血压、血脂代谢紊乱、凝血机制异常、动脉粥样硬化形成等脑卒中危险因素密切相关。E-selectin 基因存在着基因变异及基因多态性，这种基因多态性与多种疾病存在相关性。目前，对于 E-selectin 基因多态性与脑卒中关系的研究国内外尚少见报道，我们应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术和 DNA 序列测定法，检测了广西地区壮族人脑卒中的 E-selectin 基因多态性，旨在探索 E-selectin 基因多态性与脑卒中的关系，为脑卒中的遗传易感性及发病机制研究提供科学依据。

1　资料与方法

1.1　对象

1.1.1　脑卒中组　　共 205 例，来自 2002 年 10 月至 2004 年 3 月我院神经内科病房收治的患者，诊断符合全国第四届脑血管病诊断标准[3]，全部病例均经临床及头颅 CT 或 MRI 扫描确诊，不包括心源性、动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤等引起的脑卒中。脑出血(cerebral hemorrhage, CH)组共 99 例，男 69 例，女 30 例，年龄(63.7 ± 11.2)岁；脑梗死(cerebral infarction, CI)组共 106 例，男 74 例，女 32 例，年龄(64.8 ± 12.1)岁。

1.1.2　对照组　　共 210 例，其中男 135 例、女 75 例，年龄(61.5 ± 10.3)岁，均为健康查体者，无脑卒中、肝、肾、血液病、自身免疫性疾病、甲状腺病、妊娠和脑血管病史。全部研究对象均来自广西地区壮族人群，且无血缘关系。

1.2　方法

1.2.1　引物设计与合成　　参照文献[4,5]设计两对引物，由北京赛百盛有限公司合成。用于特异性扩增 E-selectin 基因包含 128 位点的一段 DNA 引物序列为 P_1：5′-AGTAATAGTC CTC-CTCATCATG-3′，P_2：5′-ACCATCTCAAGTGAAG-AAAGAG-3′；用于特异性扩增 E-selectin 基因包含 98 位点的一段 DNA 引物序列为 P_1：5′-TGCCCAAAATCTTAGGATGC-3′，P_2：5′-AAGC-CCAGGGAAGAACACAT-3′。

1.2.2　人类基因组 DNA 提取　　采用改良碘化钠法。

1.2.3　PCR 扩增条件　　E-selectin 的 PCR 扩增反应体系均为 25 μl，其中含 10 × PCR Buffer 2.5 μl，2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μl，引物 P1、P2 各 20 pmol，模板 DNA 5.0 μl，TaqDNA 聚合酶 1.25 U，不足体积用灭菌双蒸水补足至 25 μl。置热循环仪(TC-48/H 型)中 94 ℃预变性 5 min；再按下列程序循环 35 次，即 94 ℃变性 30 s，59 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min；末次循环后，72 ℃延伸 5 min。

1.2.4　扩增产物的限制性酶切　　分别取 PCR 扩增产物 10 μl，用 10 U 限制性内切酶 *Pst* Ⅰ(宝生物公司)酶切 E-selectin 基因 S128R 位点；用 2U 限制性内切酶 *Hph* Ⅰ(英国 Biolabs 公司)酶切 E-selectin 基因 G98T 位点，37 ℃孵育 3 h，反应终止后，消化片段在 3% 琼脂糖凝胶上电泳，EB 染色，染色后通过法国 VL 凝胶成像系统判断结果。

1.2.5　血脂、脂蛋白及载脂蛋白水平测定　　酶法测定血清总胆固醇和甘油三酯；遮蔽法直接测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)；apoA、apoB 用双波长免疫透射比浊法测定。以上测定均在 Olympus1000 型(日本产)全自动生化分析仪上进行，每次测定均选用高、中、低 3 种质控样品进行质控，以上项目检测质控均符合英国 RIQAS 国际质控标准。

1.2.6　血清 E-selectin 水平的检测　　采用酶联免疫吸附实验测定 E-selectin 血清水平(VIDAS 型酶标仪)，试剂盒由美国 GeneMay 公司提供，每次测定均严格按说明书操作。

1.3　统计学分析

用 SPSS 11.5 软件包进行分析。基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算，各组间基因型及等位基因频率比较采用四格表 χ^2，R × C 列联表，χ^2 检验，并以比值比(*OR*)及其 95% 可信区间(*CI*)表示相对风险度。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间数据的比较依据资料的性质，用 t 检验、方差分析。

2　结果

2.1　脑卒中组与对照组一般临床资料和血清 E-selectin 水平的比较

两组在性别和年龄上进行了匹配。脑梗死组 TC、TG、和 E-selectin 水平均显著高于对照组($P < 0.05$)；SBP(收缩压)、DBP(舒张压)、HDL-C、LDL-C、apoA、apoB 在两组间比较差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。

表 1　脑卒中组与对照组一般临床资料和血清 E-selectin 水平比较
($\bar{x} \pm s$)

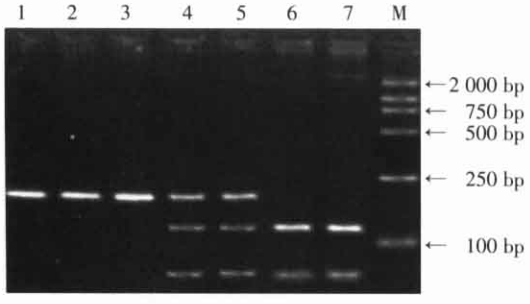
Tab 1　Clinical data and comparison of E-selectin levels in stroke patients and controls($\bar{x} \pm s$)

	Stroke patients	Control	*P*
Number (male/female)	187(125/62)	210(135/75)	0.592
Average age (year)	62.9 ± 10.7	61.5 ± 10.3	0.743
SBP (mmHg)	132.5 ± 13.7	128.5 ± 9.9	0.061
DBP (mmHg)	84.9 ± 9.8	81.6 ± 8.7	0.075
TC (mmol/L)	5.07 ± 1.21	4.28 ± 0.97	0.001
TG (mmol/L)	1.83 ± 1.05	1.15 ± 0.89	0.001
HDL-C (mmol/L)	1.19 ± 0.33	1.24 ± 0.31	0.063
LDL-C (mmol/L)	2.41 ± 0.89	2.35 ± 0.78	0.087
apoA (g/L)	1.18 ± 0.25	1.19 ± 0.24	0.256
apoB (g/L)	1.12 ± 0.32	1.01 ± 0.31	0.097
E-selectin (ng/ml)	51.23 ± 14.56	27.65 ± 10.82	0.001

2.2　E-selectin 基因型分析

E-selectin S128R 基因多态性，PCR 扩增产物片段大小为

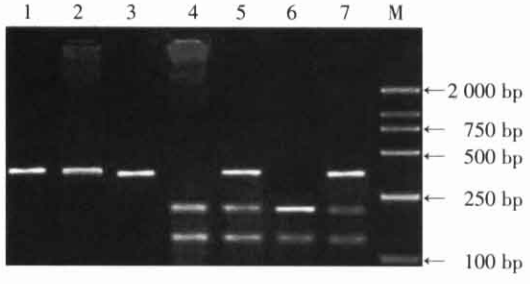
186 bp,根据限制性内切酶 *Pst* Ⅰ酶切片段的情况,基因型有3种,SS型(123 bp,63 bp 2条带),SR型(186 bp,123 bp,63 bp 3条带),RR型(186 bp 1条带,本研究未检测到);E-selectin G98T基因多态性,PCR扩增产物片段大小为332 bp,根据限制性内切酶 *Hph* Ⅰ酶切片段的情况,基因型有3种,GG型(194 bp,138 bp 2条带),GT型(332 bp,194 bp,138 bp 3条带),TT型(332bp 1条带,本研究未检测到)(图1、2);为进一步验证结果,我们采用DNA基因测序法:E-selectin G98T基因产物测序结果为5′-AGCCTAAACCTTTGGGTGAAAAGAACTCTTGAAGTC-ATGATTGCT-3′,与GenBank accession: M58017一致;E-selectin A561C(S128R)基因产物测序结果为5′-ACATTCACCGTGGC-CACTGCAGGATGTATTGGTACAGGCAGCTACG-3′,与GenBank accession: M24736一致。



M: DL2000 marker; 1-3: PCR products; 4, 5: Genotype SR; 6, 7: Genotype SS

图1 E-selectin基因S128R多态性3%琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Electrophoretic results of E-selectin gene S128R polymorphism on 3% agarose gel



M: DL2000 marker; 1-3: PCR products; 4, 6: Genotype GG; 5, 7: Genotype GT

图2 E-selectin基因G98T多态性3%琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 2 Electrophoretic results of E-selectin gene G98T polymorphism on 3% agarose gel

2.3 E-selectin基因型与脑卒中的相关性分析

E-selectin S128R基因型在两组中的分布差异有显著性($\chi^2=6.046$, $P<0.05$),基因型频率的相对风险分析,SR基因型患脑卒中的风险是SS基因型的2.008倍($OR=2.008$, 95% CI: 1.144~3.524);等位基因频率在两组中也存在着显著性差异($\chi^2=5.566$, $P<0.05$, $OR=1.902$, 95% CI: 1.107~3.268);E-selectin G98T基因型及等位基因频率在两组中的分布差异均无显著性($P>0.05$)(表2)。

表2 脑卒中组和对照组E-selectin基因多态性分布(%)

Tab 2 Distribution of E-selectin gene polymorphism between stroke and controls (%)

Genotype or allele	Controls ($n=210$)	Stroke patients ($n=205$)	χ^2	P	OR(95% CI)
S128R					
SS	188(89.5)	166(81.0)	6.046	0.014	1.0
SR	22(10.5)	39(19.0)			2.008(1.144-3.524)
S	398(94.8)	371(90.5)	5.566	0.018	1.0
R	22(5.2)	39(9.5)			1.902(1.107-3.268)
G98T					
GG	191(91.0)	182(88.8)	0.538	0.463	1.0
GT	19(9.0)	23(11.2)			1.270(0.669-2.411)
G	401(95.5)	387(94.4)	0.509	0.475	1.0
T	19(4.5)	23(5.6)			1.254(0.672-2.340)

2.4 脑卒中组基因型间E-selectin血清水平比较

SR基因型携带者的E-selectin血清水平显著高于SS基因型[(58.72±16.23) ng/ml *vs* (50.35±13.76) ng/ml, ($P<0.01$)];E-selectin血清水平在GT性(53.79±15.95) ng/ml与GG(50.98±13.26) ng/ml基因型之间比较差异无显著($P>0.05$)。

3 讨论

脑卒中是由多种因素共同作用而导致的一类极其复杂的疾病,脑卒中的流行病学研究表明,遗传基因在脑卒中发病中可能起了重要作用[6],除了某些特殊的遗传性脑血管病的致病基因已被发现,引起脑卒中的分子机制迄今仍不明确,对脑卒中易感基因的研究是近年来脑卒中遗传机制研究的重点和热点。E-选择素是粘附分子选择素家族主要成员之一,为细胞表面糖蛋白,分子质量为115×10^3,由589个氨基酸残基构成,仅表达于细胞因子活化的内皮细胞表面,它是体内的一种促炎细胞因子,参与多种白细胞(包括粒细胞、巨噬细胞、单核细胞等)的粘附与聚集;同时还可参与脂类代谢,影响胆固醇、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白等的水平。它在炎症反应、动脉粥样硬化及血栓形成、脑卒中等病理过程中起着重要作用[7]。E-selectin基因位于第1号染色体长臂上,为一段长13 kb的DNA序列,含14个外显子和13个内含子。有研究证实E-selectin基因第2、4外显子分别存在G/T和S/R多态性,这两种多态性可影响E-selectin基因表达,并影响E-selectin相关疾病的发生、发展和转归。

炎性反应在脑卒中的形成中起着关键作用,作为炎性反应的标志物E-selectin已被用来探测脑卒中的危险性指标[8]。有研究证实E-selectin介导的白细胞粘附是脑血管动脉粥样硬化的发病机制因素之一[9]。但关于E-selectin基因多态性与脑卒中之间是否存在相关性,是否通过影响血清可溶性E-selectin水平的表

达而影响脑卒中的病程等，截止目前，国内外少见文献报道。为明确 E-selectin 基因多态性与广西壮族人脑卒中的关系，我们采用 PCR-RFLP 分子生物学技术检测了 205 例脑卒中患者和 210 名正常人 E-selectin 基因型，结果显示脑卒中患者 E-selectin 基因 S128R 多态性分布与正常人比较差异具有显著性（$P<0.05$），其中携带 SR 基因型个体患脑卒中的风险约是 SS 基因型的 2.008 倍（$OR=2.008$，95% CI：1.144 ~ 3.524），提示 R 等位基因可能是广西壮族人脑卒中的遗传易感基因；为了进一步探讨 E-selectin 基因多态性与其血清水平的关系，我们同时采用 ELISA 免疫学技术检测了脑卒中患者和对照者可溶性 E-selectin 的血清水平，结果显示脑卒中患者 E-selectin 血清水平显著高于对照者，与国外文献[8]报道一致。出现这一结果的可能原因是，在炎症作用下脑卒中患者脑血管内皮受损，高表达的 E-selectin 迅速产生，导致体内 E-selectin 水平的升高。同时我们分析发现 E-selectin 基因 S128R 多态性可影响其血清 E-selectin 水平，携带 SR 基因型的脑卒中患者血清 E-selectin 水平显著高于不携带者（$P<0.01$），故认为：在病理条件下，携带 R 等位基因的个体可能是通过影响 E-selectin 在内皮细胞上的表达、基因结构的改变可能带来蛋白质功能的变化进而可促进 E-selectin 的高度表达而增加脑卒中的发病风险，这与 Mlekusch 等[10]发现 E-selectin 基因型可影响血清 E-selectin 水平的结论相一致。E-selectin 基因 G98T 多态性与脑卒中的发病无相关性，对血清 E-selectin 水平也无影响，研究认为这种基因多态性可能在脑卒中的发生、发展过程中不起直接的重要作用。

综上所述，脑卒中是一种多因素参与的常见病，除环境因素影响之外，遗传因素在其中也起着更为重要的作用，通过我们的研究可以发现，E-selectin 基因 S128R 多态性与脑卒中具有相关性，其中 R 等位基因可能是广西壮族人脑卒中的遗传易感基因，携带 R 等位基因的个体可促进 E-selectin 的高度表达进而增加脑卒中的发病风险。E-selectin 基因多态性与脑卒中的研究才刚起步，还有待进行大样本、多地域、多民族广泛深入的协同研究，将有可能为脑卒中的风险预测、防治和治疗提供一条新的线索和途径。

参考文献：

[1] Alvaro Gonzalez L C, Freijo Guerrero M M, Sadaba Garay F. Inflammatory mechanisms, arteriosclerosis and ischemic stroke: clinical data and perspectives[J]. Rev Neurol, 2002, 35(5): 452 - 462.

[2] Lefer A M, Weyrich A S, Buerke M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury[J]. Cardiovas Res, 1994, 28(3): 289 - 294.

[3] 中华神经科学会、中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379 - 380.

[4] Zheng F, Chevalier J A, Zhang L Q, *et al*. An HphI polymorphism in the E-selectin gene is associated with premature coronary artery disease[J]. Clin Genet, 2001, 59(1): 58 - 64.

[5] Rauchhaus M, Gross M, Schulz S, *et al*. The E-selectin SER128ARG gene polymorphism and restenosis after successful coronary angioplasty[J]. Int J Cardiol, 2002, 83(3): 249 - 257.

[6] Catto A J. Genetic aspects of the hemostatic system in cerebrovascular disease[J]. Neurology, 2001, 57(5 Suppl 2): S24 - S30.

[7] Tilton R G, Berens K L. Functional role for selectins in the pathogenesis of cerebral ischemia[J]. Drug News Perspect, 2002, 15(6): 351 - 357.

[8] Blann A, Kumar P, Krupinski J, *et al*. Soluble intercelluar adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 1999, 10(5): 277 - 284.

[9] Mizia Stec K, Mandecki T, Zahorska Markiewicz B, *et al*. P-selectin and E-selectin in serum of patients with coronary artery disease[J]. Pol Arch Med Wewn, 2001, 106(6): 1137 - 1144.

[10] Mlekusch W, Exner M, Schillinger M, *et al*. E-selectin and restenosis after femoropopliteal angioplasty: prognostic impact of the Ser128Arg genotype and plasma levels[J]. Thromb Haemost, 2004, 91(1): 171 - 179.

（编辑　薛国文）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库（database）、计算机程序（computer program）及电子公告（electronic bulletin board）等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部