基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1014-04

血管内皮生长因子 936C/T、-460T/C、405G/C 单核苷酸多态性与脑梗死的关系

李天炼,廖小平,文国强,邓益东,黄仕雄
(海南省人民医院神经内科,海口 570311)

【摘 要】目的:研究血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)936C/T、-460T/C、405G/C 单核苷酸多态性(Single nucleuotide polymorphisms,SNP)与脑梗死(Cerebral infarction,CI)的关系。方法:应用病例对照分析和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法对 150 例 CI 患者与 120 例健康对照组的 VEGF936C/T、-460T/C、405G/C 等位基因频率和基因型频率与 CI 之间的关系进行分析。结果:CI 组 VEGF 936C/T SNP T 位点的等位基因频率为 0.366 7,对照组为 0.250 0,2 组比较有统计学意义($P<0.01$);CI 组 VEGF 第 936 位点的基因频率(CC:34.00%,CT:58.67%,TT:7.33%)与对照组的基因型频率(CC:55.83%,CT:38.33%,TT: 5.83%)差异有统计学意义($P=0.001$),其中 CI 组 CT+TT 基因型频率(66.00%)高于对照组(44.17%,$P=0.001$);在高血压分层分析后 CI 组 VEGF 第 936 位点的 T 等位基因频率和 CT +TT 基因型频率与对照组相比有统计学意义,而两组间 -460T/C、405G/C 的基因型和等位基因频率的差异无统计学意义。结论:血管内皮生长因子 VEGF 936C/T 位点与 CI 有关联,可能是 CI 的独立危险因素,-460T/C、405G/C 与 CI 无关联。

【关键词】血管内皮生长因子;单核苷酸多态性;脑梗死
【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-24

Single nucleotide polymorphisms 936C/T, -460T/C, 405G/C in vascular endothelial growth factor gene and their association with cerebral infarction

LI Tian-Lian, et al
(*Department of Neurology, Hainan Provincial People's Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To study the relationship between the single nucleotide polymorphisms (SNP) 936C/T, -460T/C, 405G/C in Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and their association with cerebral infarction (CI). *Methods*: Case-control study was carried out to investigate allelic genotypes and frequency of the three VEGF SNP in 150 subjects with CI and 120 control individuals. Polymerase chain reaction -Restriction fragment lengthpolymorphism, (PCR-RFLP) [U3] and DNA sequencing were used to analyze the polymorphisms.The correlations between VEGF SNPs and CI were evaluated. *Results*: There was a highly significant difference in allele frequency of 936C/T SNP between CI and control subjects, and the T allele frequencies were respectively 0.3667 versus 0.2500 ($P<0.01$). The frequencies of 936C/T SNP genotypes were significantly different ($P=0.001$) between the CI group (CC: 34.00%, CT: 58.67%, TT: 7.33%) and the control group (CC: 55.83%, CT: 38.33%, TT: 5.83%). The frequency (66.00%) of genotype (CT+TT) of 936C/T SNP in CI group were significantly higher than that (44.17%) in the control group ($P=0.001$). The frequencies of allele T and genotype (CT+TT) of VEGF936C/T SNP were still associated with CI after stratification of blood pressure. No difference was found in the genotype and allelic frequencies of VEGF-460T/C, 405G/C alleles between CI group and the control groups. *Conclusion*: Our results demonstrated that VEGF936C/T SNP might be associated with CI and be an independent risk factor of CI. But we did not find that VEGF-460T/C, 405G/C SNP associated with CI.

【Key words】Vascular endothelial growth factor; Single nucleotide polymorphisms; Cerebral infarction

脑梗死(Cerebral infarction,CI)是威胁人类健康与生命的重要原因之一,其发病可能是多种遗传因素与环境因素共同作用的结果。我们于 2004 年 9 月至 2006 年 8 月分析了血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)936C/T、-460T/C、405G/C 单核苷酸多态性与脑梗死的关系以期了解 VEGF SNP 与 CI 的关系,了解不同基因型对 CI 的遗传易患性的影响,为 IC 的防治提供科学的依据。现将结果报道如下。

作者介绍:李天炼(1969-),女,副主任医师,硕士,
研究方向:脑血管病。

1 资料和方法

1.1 研究对象

CI 组：150 例，其中男 102 例，女 58 例，平均年龄为（65±12）岁；均来自海南省人民医院神经内科的住院患者，其诊断标准按照全国第四届脑血管病学术会议修订的脑卒中诊断标准[1]，所有病例均行头颅 CT 扫描以确诊，所有患者肝肾功能正常，无感染和肿瘤等合并症，其中高血压 90 例。健康对照组：120 名，其中男 67 名，女 53 名，平均年龄为（60±13）岁，来自海南省人民医院保健科的健康体检人员，排除了心脏疾病，脑血管病，肝、肾、甲状腺疾病及糖尿病患者。所有个体均为中国汉族人，无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 基因组全血 DNA 提取 参照 Lahiri[2]等的方法，稍作改良以后提取基因组 DNA。

1.2.2 VEGF 936C/T 的检测 按刘国勋等方法进行。-460T/C 的检测按 vant Hooft 等方法进行。VEGF405 位点应用错配 PCR 方法检测。引物序列：936 F 5'-CTGAAATGAAGGAAGAGGAGAC-3'；R5'-TCCCCTCCCAACTCAAGTCCAC-3' 退火温度（56℃）。-460 F 5'-TGTGCGTGTGGGGTTGAGCG-3'；R5'-TACGTGCGGACAGGGCCTGA-3' 退火温度（56℃）。405 F 5'-GCGTGCGAGCAGCGAAGGC-3'；5'-GCGTGCGAGCAGCGAAGGG-3'。405R 5'-GCGAGAACAGCCCAGAAGTTG-3'，退火温度（54℃）。

1.3 核苷酸序列测定

由上海联合基因公司测序。

1.4 统计学方法

所有资料输入 Microsoft Excel 97 建立数据库，用 SAS 6.12 统计软件进行分析处理。应用基因计数方法计算出相对等位基因频率。基因型的 Hardy2Weinberg 平衡检验、各群体间等位基因频率及基因型比较采用 χ^2 检验，检验水平 $\alpha=0.05$。

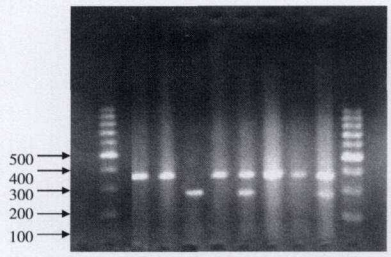
2 结 果

2.1 病例组与对照组均衡性评价结果

随机选择了 150 例确诊的脑梗死患者及 120 例健康对照者进行比较，两组样本比较，其年龄无统计学意义，而性别、血压和 VEGF 浓度则有显著统计学意义（$P<0.01$），进一步进行 logistic 回归分析，结果显示，在 2 组中，性别、年龄不是脑梗死的危险因素，而血压和 VEGF 浓度与脑梗死相关。

2.2 VEGF 936C/T、-460T/C、405G/C 位点的 PCR-RFLP 电泳图

2.2.1 VEGF 936C/T 的 *Nla* Ⅲ酶切结果 936CT：364、249、115 bp 3 个片段；936TT：249、115 bp 2 个片段；936CC：364 bp 1 个片段（图 1）。



M. 标记物；1. 为 TT 基因型；2. 为 TC 基因型；3. 为 CC 基因型

图 1 VEGF 936C/T PCR 产物酶切后凝胶电泳图

2.2.2 VEGF-460T/C 的 *BstU* Ⅰ酶切结果 -460TC：174 bp、156 bp 2 个片段；-460TT：174 bp 1 个片段；-460CC：156 bp 1 个片段（图 2）。

2.2.3 405G/C 等位基因特异性 PCR 产物鉴定 405GG：未突变引物出带，突变引物未出带；405GC：2 条引物均出带；405CC：未突变引物未出带，突变引物出带（图 3）。

2.3 Hardy2Weinberg 平衡检验

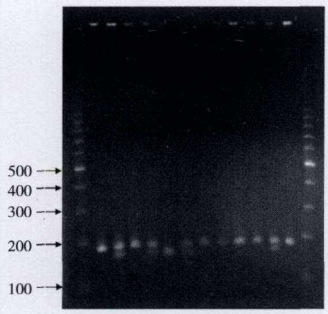
对照组的 VEGF 936C/T、-460T/C、405G/C 位点基因型分布均符合 Hardy2Weinberg 平衡，表明具有群体代表性。

2.4 VEGF 936C/T、-460T/C、405G/C 位点的等位基因频率和基因型分析

VEGF 936C/T 的基因型和等位基因频率在 CI 组与对照组间差异有统计学意义（$P<0.01$），而 -460T/C 的基因型和等位基因频率两组间差异无统计学意义，405G/C 的 3 种基因型的比较及等位基因频率分布差异无统计学意义，但基因型 GG 与基因型（GC+CC）的频率分布差异有统计学意义（$P=0.044$），结果见表 1。

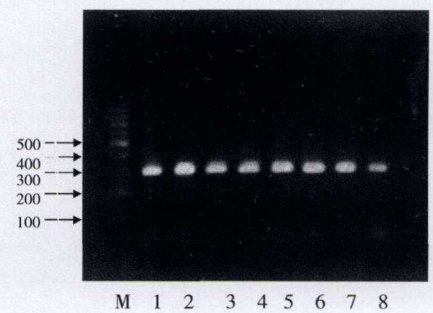
2.5 高血压对 VEGF 936C/T、-460T/C、405G/C 位点与 IS 关联性的影响

用分层分析 CI 组中高血压状态与非高血压状态 VEGF



M 为标记物；1 为 CC 基因型；2 为 TC 基因型；3 为 TT 基因型

图 2 VEGF 460T/C PCR 产物酶切后凝胶电泳图



M. 标记物；1、5、6. GG 基因型；2、7、8. GC 基因型；3、4. CC 基因型

图 3 VEGF405/GC 等位基因特异 PCR 凝胶电泳图

936C/T、-460T/C、405G/C 位点与 IS 关联关系。结果表明，与对照组比较，在伴有高血压和不伴有高血压时，VEGF 936C/T 的基因型和等位基因频率的分布差异均有统计学意义（$P<0.01$），-460T/C 的基因型与等位基因频率的分布差异均无统计学意义，而 405G/C 位点 3 种基因型频率和等位基因频率分布差异无统计学意义，但在高血压组中基因型 GG 与基因型（GC+CC）的频率分布差异有统计学意义（$P=0.046$），结果见表 2、3。

3 讨 论

VEGF 是一类普遍存在于中枢神经系统的生长因子，通过多种机制在脑梗塞发病过程中起作用，研究证实，应用外源性 VEGF 可促进新生血管形成，减少脑梗死面积，缓解脑水肿，并能刺激轴定生长和改善神经细胞的存活，对神经细胞具有直接保护作用[3-6]。人们可以通过加强 VEGF 基因或蛋白的表达来治疗缺血性疾病，称为正性治疗；同时也可以通过抑制 VEGF 基因或蛋白的表达来治疗如视网膜新生血管形成等疾病，称为负性治疗。目前国内外的研究主要针对血管内皮生长因子与缺血性疾病的可行性及相关性技术进行探讨[7]。随着分子生物学的发展，VEGF 基因的研究越来越深入，最近，在北京市人群中也发现 VEGF 936C/T 与 IC 相关[8]。我们分析了的等位基因频率和 VEGF 936C/T 基因型与 IC 间的关系，发现 - VEGF 936C/T 的基因型及等位基因频率在 CI 组与对照组之间差异有统计学意义，而且在高血压状态和非高血压状态下差异均有统计学意义，表明该位点与 CI 关联，是一种独立于高血压的 CI 的危险因素。我们的研究结果未发现 -460T/C SNP 与 IS 关联。目前，国内外尚未见 405G/C SNP 与 IS 相关性的报道。我们的研究结果显示，虽然将 405G/C 位点 GC 基因型与 CC 基因型合并为一组基因型后，CI 组与对照组之间差异有统计学意义，但 CI 组与对照组等位基因频率及 3 种基因型（GG、GC、CC）的基因型频率差异无统计学意义；分层分析的结果显示，在非高血压状态下，CI 组和对照组之间的基因型频率和等位基因频率差异无统计学意义，

表 1 脑梗死组与对照组 VEGF 936C/T、-460T/C、405G/C 位点基因型和等位基因频率

分组		例数	基因型[例(%)]				等位基因频率(%)	
			CC	CT	TT	CT+TT	C	T
936C/T	CI 组	150	51(34.00)	88(58.67)	11(7.33)	99(66.00)	0.633 4	0.366 7
	对照组	120	67(55.83)	46(38.33)	87(5.83)	53(44.17)	0.750 0	0.250 0
	P			0.001		0.001	0.016	
			TT	TC	CC	TC+CC	T	C
-460T/C	CI 组	150	137(91.33)	12(8.00)	1(0.67)	143(8.67)	0.953 3	0.046 7
	对照组	120	103(85.83)	17(14.17)	0	17(14.17)	0.929 2	0.070 9
	P			0.184		0.153	0.228	
			GG	GC	CC	GC+CC	G	C
405G/C	CI 组	150	69(46.00)	69(46.00)	13(8.00)	81(54.00)	0.690 0	0.310 0
	对照组	120	70(58.33)	43(35.83)	7(5.83)	55(42.31)	0.757 7	0.242 3
	P			0.130		0.044	0.068	

表 2 脑梗死组与对照组伴有高血压 VEGF 936C/T、-460T/C、405G/C 位点基因型和等位基因频率

分组		例数	基因型[例(%)]				等位基因频率(%)	
			CC	CT	TT	CT+TT	C	T
936C/T	CI 组	90	34(37.78)	49(54.44)	7(7.78)	56(62.22)	0.650 0	0.350 0
	对照组	120	67(55.83)	46(38.33)	7(5.83)	53(44.17)	0.750 0	0.250 0
	P			0.035		0.010	0.041	
			TT	TC	CC	TC+CC	T	C
-460T/C	CI 组	90	78(86.67)	11(12.22)	1(1.11)	14(8.75)	0.953 1	0.469 0
	对照组	120	103(85.83)	17(14.17)	0	17(14.17)	0.930 8	0.692 0
	P			0.476		0.862	0.720	
			GG	GC	CC	GC+CC	G	C
405G/C	CI 组	90	40(44.44)	43(47.78)	7(7.78)	50(55.56)	0.683 3	0.316 7
	对照组	120	70(58.33)	43(35.83)	7(5.83)	50(41.67)	0.762 5	0.237 5
	P			0.137		0.046	0.068	

表 3 脑梗死组与对照组不伴有高血压 VEGF 936C/T、-460T/C、405G/C 位点基因型和等位基因频率

分组		例数	基因型[例(%)]				等位基因频率(%)	
			CC	CT	TT	CT+TT	C	T
936C/T	CI 组	60	16(26.67)	39(65.00)	5(8.33)	44(73.33)	0.591 7	0.408 3
	对照组	120	67(55.83)	46(38.33)	8(6.15)	53(44.17)	0.750 0	0.250 0
	P			0.001		0.001	0.001	
			TT	TC	CC	TC+CC	T	C
-460T/C	CI 组	60	51(91.25)	9(15.00)	0	9(15.00)	0.953 1	0.469 0
	对照组	120	103(96.15)	17(14.17)	0	17(14.17)	0.930 8	0.692 0
	P			0.881		0.881	0.264	
			GG	GC	CC	GC+CC	G	C
405G/C	CI 组	60	29(48.33)	26(43.33)	5(8.33)	31(51.67)	0.700 0	0.300 0
	对照组	120	70(58.33)	43(35.83)	7(5.83)	50(41.67)	0.712 5	0.287 5
	P			0.430		0.204	0.052	

在高血压状态下，CI 组和对照组的比较结果与未分层分析的结果类似，结果提示 405G/C SNP 与 IS 的关联性较小。因此，根据上述结果，我们认为这 2 个位点在 CI 发生过程中所起作用可能较小。CI 是一种多基因、多因素参与的复杂性疾病，近 30 年的大量流行病学研究显示遗传因素在其发病中起了重要作用[9-11]，VEGF SNP 的作用机制还有待于更深入的研究，这将更有助于从遗传易感性方面解决脑卒中的个体化预防和治疗。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Lahiri D K, Schuabel B. DNA isolation by a rap id method from human blood samp le: effects of $MgCl_2$, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality[J].Biochem Genet, 1993, 32(3): 321-328.

[3] Wang Y, Galvan V, Gorostiza O, et al.Vascular endothelial growth factor improves recovery of sensorim otor and cognitive deficits after focal cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res, 2006, 1115(1): 186-193.

[4] Lee H J, Kim K S, Park I H, et al. Human neural stem cells over expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model[J]. Plos One, 2007, 2(1): 156.

[5] Rosenste in J M, Mani N, Khaibullina A, et al. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons[J]. J Neurosci, 2003, 23(35): 11036-11044.

[6] Jin K, Mao X O, Greenberg D A.Vascular endothelial growth factor stimulates neurite out growth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling[J]. J Neurobiol, 2006, 66(3): 236-242.

[7] Ohnishi Y, Tanaka T, Yamada R, et al. Identification of 187 single nucleotide polymorphisms (SNPs) among 41 candidate genes for ischemic heart diseade in the Japanese population[J].Hum Genet, 2000, 106(3): 288-292.

[8] 刘凤君，戴 悦，刘晓琳，等.VEGF 基因 936C/T 多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的关联研究[J].中国急救复苏与灾害医学杂志，2007，2(2)：135-141.

[9] Yamaguchi S, Yamada Y, MetokiN, et al.Genetic risk for atherothrombotic cerebral infarction in individuals stratified by sex or conventional risk factors for atherosclerosis[J].Int J Mol Med, 2006, 18(5): 871-883.

[10] Eguchi K, Kario K, Hoshide S, et al. Smoking is associated with silent cerebrovascular disease in a high-risk Japanese communitydwelling population[J]. Hypertens Res, 2004, 27(10): 747-745.

[11] Lund H L, Home I, Hjemann I, et al.Risk-factor profile for the incidence of subarachnoid and intracerebral haemorrhage, cerebral infaction, and unspecified stroke during 21 yeas followup in men[J].Scand J Public Health, 2006, 34(6): 589-597.

（责任编辑：关蕴良）