

# 缺血性脑卒中主要候选基因关联分析研究进展

胡木林 王忠

【关键词】 缺血性脑卒中; 基因; 多态性; 关联研究; Meta 分析

【中图分类号】 R743 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-8925(2009)03-0307-03

**Association study of the major candidate genes related to ischemic stroke: an update** HU Mu-lin, WANG Zhong. Institute of Basic Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

【Key words】 Ischemic stroke; Genes; Polymorphism; Association study; Meta analysis

脑卒中是一种高致死、高致残的神经系统疾病,已经成为威胁人类健康的主要杀手之一,大约 80%的脑卒中是缺血性的。缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)按照 TOAST 分类法又可分为 5 种亚型:(1) 大动脉粥样硬化型(large-artery atherosclerosis, LAA); (2) 心源性栓塞型(cardiogenic embolism, CE); (3) 小动脉闭塞型(small-artery occlusion, SAA); (4) 其他明确病因型(stroke of other determined etiology, SOE); (5) 不明原因型(stroke of undetermined etiology, SUE)。已有研究指出不同的 IS 亚型可能有不同的遗传机制<sup>[1]</sup>。不可改变的危险因素(年龄、非洲和亚洲人种、男性)和可获得的危险因素(高血压、吸烟、糖尿病、房颤和肥胖)大约只可以解释 50%的中风危险性,而其他危险因子包括遗传因素,可能更为重要<sup>[2]</sup>。脑卒中有由单基因引起的,这部分中风遗传机制目前研究得较为清楚,如伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传脑动脉病(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy, CADASIL)是由于 *Notch3* 基因突变引起;大部分 IS 由多个易感基因和环境因素共同作用引发,对这部分知道的还很少。本文重点介绍近年研究较多的中风候选基因多态性与多因素 IS 的关联分析研究进展,为人群脑卒中发病预测和防治提供依据。

## 一、载脂蛋白 E(apolipoprotein E, Apo E)基因

*Apo E* 基因位于第 19 号染色体上,该染色体上还编码 *Apo C1*、*Apo C2* 和 LDL 受体的基因。*Apo E* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成,其中大部分蛋白编码序列都位于第 4 外显子区域。*Apo E* 是一种包含 299 个氨基酸的磷脂糖蛋白,主要存在于乳糜颗粒、极低密度脂蛋白(VLDL)、中密度脂蛋白和部分高密度脂蛋白(HDL)中,参与机体脂蛋白的代谢和胆固醇平衡的调节,影响成人血脂浓度,且还具有重要的神经生

物学作用。*Apo E* 有三种异构体 *Apo E2*、*Apo E3*、*Apo E4*, 分别由 *Apo E* 基因常见的 3 种等位基因  $\epsilon_2$ 、 $\epsilon_3$ 、 $\epsilon_4$  编码,其中 *Apo E3* 是人群中最常见的异构体,称为“野生型”。*Apo E* 基因上的两个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点位于第 4 外显子的 3937(T/C)和 4075 (C/T),导致了 *Apo E* 多态性,使其分子第 112 位和第 158 位上半胱氨酸(Cys)和精氨酸(Arg)互换。*Apo E3* 的第 112 位是 Cys,第 158 位是 Arg;*Apo E2* 在第 112 位和第 158 位均是 Cys; 而 *Apo E4* 在这两个位点都是 Arg。此种多态性导致人群中存在 6 种不同的 *Apo E* 表型,包括 3 种纯合体(*E2/E2*、*E3/E3*、*E4/E4*), 3 种杂合体(*E2/E3*、*E3/E4*、*E2/E4*)。Sudlow 等<sup>[3]</sup>检索 Medline 和 Embase 数据库从 1966 年到 2004 年底的相关研究,选择其中 26 个研究(5 018 例病例和 16 921 例对照),这些研究来自几个欧洲国家、美国、巴西、中国、日本、韩国和孟加拉国,经 Meta 分析显示:(1) $\epsilon_4+$ ( $\epsilon_4$  allele-containing)基因型与 IS 有关联(OR=1.11;95% CI=1.01~1.22);(2) $\epsilon_4+$  基因型与 LAA 型 IS 的相关性显著(OR=1.33;95% CI=0.99~1.78),无证据显示与其它亚型有关联;(3) $\epsilon_4+$  基因型与 IS 的关联性在亚洲人种强于白种人和其他人种;(4)但如果仅对病例数大于 200 的研究的做 Meta 分析,结果显示  $\epsilon_4+$  与 IS 无关联(>200 例; OR=0.99;95% CI=0.88~1.11);(5)仅对无对照选择偏倚的研究做 Meta 分析也显示无关联(OR=0.99;95% CI=0.85~1.17);(6)结果显示  $\epsilon_2+$ ( $\epsilon_2$  allele-containing)基因型与 IS 无相关性(OR=0.99;95% CI=0.87~1.13)。Ariyaratnam 等<sup>[4]</sup>的 Meta 分析也显示 *APOE* 基因多态性与 IS 的相关性在中国人群中相对较大(OR=2.18;95% CI=1.52~3.13),但考虑这种结果有可能是小样本量带来的偏倚所致。

另外 *Apo E* 基因多态性可能影响各种脑损伤的结局,但它与 IS 长期结局的关联性一直存在争议。其中有研究报道 *Apo E* 基因多态性与 IS 的结局无明显相关性,波兰最近的一项研究显示 *Apo E* 基因型对 IS 患者一年之内的死亡率或不良结局没影响<sup>[5]</sup>。但也有研究报道 *Apo E* 的  $\epsilon_4$  等位基因显示出有益于生存率的趋势<sup>[6]</sup>, $\epsilon_2$  等位基因有益于患者神经功能

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.03.026

基金项目:国家自然科学基金(30672577)

作者单位:100700 北京,中国中医科学院中医临床基础医学研究所

状态的恢复<sup>[7]</sup>。

### 二、亚甲基四氢叶酸还原酶(homocysteine, Hcy)基因

血浆中 Hcy 水平过高会引发动脉粥样硬化型脑血管病,是脑卒中的独立危险因素。由于 Hcy 再甲基化反应需亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)作为关键酶参与,因而 MTHFR 基因的遗传变异可通过改变血浆同型半胱氨酸的水平,从而改变机体对某些疾病的易感性,特别是血清叶酸水平较低及维生素 B6 摄入较少者。丹麦最近一项研究显示 Hcy 浓度受遗传因素影响很大,遗传度随着年龄的增大而降低,其中 MTHFR 的变异几乎占据了全部,只有很少一部分影响由其他变异导致<sup>[8]</sup>。人 MTHFR 基因定位于常染色体 1p36.3 上,包括 11 个外显子和 10 个内含子,cDNA 全长 2.2 kb。其中第 4 外显子的 C677T(A1a→Val)碱基突变最为常见,变异可产生 *Hinf* I 限制酶切位点,使 MTHFR 热敏感性改变而致酶活性改变,突变纯合子酶活性只有正常的 30%,杂合子酶活性为正常的 65%。有 Meta 分析显示 MTHFR C677T 与缺血性中风发生相关(CT/TT 基因型,OR=1.18,95%CI=1.09~1.29;TT 基因型,OR=1.48,95%CI=1.22~1.8)<sup>[9]</sup>。土耳其的一项研究报道 MTHFR T677T 基因型和 T677T/A1298A 复合基因型与出血性中风显著相关(T677T 基因型,OR=3.120,P=0.014,T677T/A1298A 复合基因型,OR=4.211;P=0.002),而 MTHFR C1298C 基因型和 C677C/C1298C 复合基因型与缺血性中风显著相关(C1298C 基因型,OR=2.950,P=0.001;C677C/C1298C 复合基因型,OR=3.463,P=0.0001),当然这可能是统计效能不足,种族差异或此人群的叶酸水平不同所致。了解 MTHFR 677C→T 多态的机制,还有利于指导临床治疗,有报道显示补充核黄素可以使 TT 基因型者的 Hcy 下降 22%,但不能使 CC 或 CT 基因型者的 Hcy 水平显著下降<sup>[10]</sup>。但总的来说针对降低 Hcy 浓度的治疗是否会减少中风的危险性还不明确<sup>[11]</sup>。

### 三、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system,RAAS)基因

RAAS 的主要生理功能是调节体液平衡、摄盐和血压,有证据表明 RAAS 的遗传变异对 IS 发生的危险性影响很大,该系统的基因多态性研究也备受关注。

1. 血管紧张素转换酶基因:血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme,ACE)基因的插入/缺失(insertion/deletion,I/D)多态性是其中研究很广泛的一个。ACE 是将血管紧张素 I 转换为血管紧张素 II 的关键酶,可促进缓激肽的分解,从而增加血管张力和促进血管平滑肌细胞的增殖。血清 ACE 的活性受 ACE 基因型影响,DD 型人的 ACE 活性浓度是 II 型的两倍。一项针对白种人的 Meta 分析报道 DD 基因型对 IS 的发生有但显著性的危险性(OR=1.21;95%CI=1.08~1.35)<sup>[12]</sup>,最近一项 Meta 分析显示 ACE I/D 多态与中国人(OR=1.90;95%CI=1.23~2.93)和日本人(OR=1.74;95%CI=0.88~3.42)的 IS 有相关性<sup>[13]</sup>。ACE DD 基因型可能与 IS 的 SVD 亚型相关性大,但波兰一项研究显示 ACE I/D 多态与 IS 各亚型没有相关性<sup>[13]</sup>。至于对于 ACE I/D

多态是否对中风治疗的疗效有影响还没有定论<sup>[14]</sup>。

2. 血管紧张素 II 1 型受体基因:有报道血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II type-1-receptor,AT1)基因变异在 IS 的发展中显示易感性相关性,特别是在高血压患者继发 IS 起主要影响作用,但另一研究经调准危险因素后,AT1 A1166C 多态作用消失<sup>[15]</sup>。

3. 血管紧张素原基因:血管紧张素原(angiotensinogen,AGT)作为血管紧张素前体,唯一的肾素作用底物,其与心脑血管疾病的关系正日益受到人们的重视。AGT 基因多态与 IS 的关联还存在争议,其多态位点主要涉及启动子区域和第二外显子区域。有报道 AGT 启动子区域的单体型与脑的小血管病变相关<sup>[16]</sup>,丹麦的一项大型针对 AGT 基因 M235T 和 T174M 多态的研究,对其多态作用与缺血性心脏病、心肌梗塞、缺血性脑血管病的关联得出了不一致的结论<sup>[17]</sup>。随后丹麦的另一研究报道 AGT 基因启动子区域的 SNP 或单体型与 IS 无关联,-6AA,174TT,或 235TT 的个体与血浆 AGT 水平相关但与 IS 的发生危险性无关<sup>[18]</sup>。有报道称 AGT 基因 235M 可能是日本男性发生腔隙性梗死的危险因素,且相关性独立于高血压<sup>[19]</sup>。

同时在药物基因组学研究方面,荷兰一项最新研究报道服用 β-阻滞剂或 ACE 抑制剂的高血压患者发生动脉粥样硬化的危险性不受 ACE I/D,AGT M235T 和 AT1 573C/T 三个多态中的任意一个影响<sup>[20]</sup>。

### 四、磷酸二酯酶 4D(phosphodiesterase 4D,PDE4D)基因

PDE4D 特异性降解 cAMP,后者是多种细胞(包括血管内皮细胞,血管平滑肌细胞及炎症细胞)的一种关键信号转导分子,其基因在人类染色体中定位于 5q12 (STRK1)。当 PDE4D 表达增加时,引起第二信使 cAMP 降解,导致血管平滑肌增生,免疫功能增强并引起局部炎症反应,促使动脉粥样硬化形成。2003 年冰岛的 deCODE 遗传学研究组发现,编码 PDE4D 的基因多态可使 IS 的危险性增高,其中与颈动脉粥样硬化性和心源性卒中的关系最为密切,由微卫星 AC008818- 和 SNP45 组成的危险单体型与这两种卒中亚型发生的相对危险度大约是 1.5<sup>[21]</sup>。荷兰报道 PDE4D 基因多态与小动脉阻塞型中风显著相关<sup>[22]</sup>。同时,也有报告称未发现其与 IS 的发生相关联。尽管 PDE4D 基因多态与 IS 的关联性还没达到一致性的认识,但越来越多的证据表明两者存在关联。

### 五、C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)基因

动脉粥样硬化是一个慢性炎症过程,炎症反应在动脉粥样硬化的发生、发展过程中起重要作用,而动脉粥样硬化是 IS 发生的一个重要原因。CRP 被认为是心血管疾病的炎症危险因素标志之一。人类 CRP 基因定位于染色体 1q21-1q23,大约 19 kb 大小,包含 2 个外显子。有报道称 CRP 基因多态性跟 CRP 水平相关,但跟各 IS 亚型没有显示相关性<sup>[23]</sup>。日本报道 CRP 基因上的沉默突变 rs1800947 SNP 和 C-C-C 单体型(由 rs1341665,rs1800947,和 rs113086 构成)是 IS 的预测标志<sup>[24]</sup>。

## 六、其他相关基因

此外,还发现大量的候选基因,在此不一一列举,但大部分都缺乏足够的资料证实与 IS 的相关性。

## 七、小结与展望

从基因多态性与 IS 的关联分析着手,来深层次探讨 IS 发生发展机制及防治已经取得了不少进步,但同时也存在不少问题:(1)现有不少研究存在未进行人群分层、统计效能低、样本量过小等缺点,研究人员需要在不同的人群中重复实验、严格的病例对照配对以及适当增加样本量来减少混杂因素对结果的影响,对现有的大量可用研究结果有待通过 Meta 分析进一步量化效应指标;(2)由于脑卒中的不同亚型可能有不同的遗传机制,研究设计应先对脑卒中中进行正确分型,再研究各亚型和易感基因的关系;(3)现有研究设计大部分只涉及一个或少数个基因变异与 IS 的关联,鲜少考虑基因之间及其与环境因素的交互作用,随着高通量基因型测定技术和生物统计学的进步,可以进行新的研究设计,如全基因组关联分析,且有必要进行多学科多中心合作,应用更高级的分析方法发现更多的潜在相互作用,如蒙特卡罗逻辑回归等。

## 参 考 文 献

- [1] Jood K, Ladenvall C, Rosengren A, et al. Family history in ischemic stroke before 70 years of age: the Sahlgrenska Academy Study on Ischemic Stroke[J]. *Stroke*, 2005, 36(7): 1383-1387.
- [2] Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council [J]. *Stroke*, 2006, 37(6): 1583-1633.
- [3] Sudlow C, Martinez Gonzalez NA, Kim J, et al. Does apolipoprotein E genotype influence the risk of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage? Systematic review and meta-analyses of 31 studies among 5961 cases and 17,965 controls [J]. *Stroke*, 2006, 37(2): 364-370.
- [4] Ariyaratnam R, Casas JP, Whittaker J, et al. Genetics of ischaemic stroke among persons of non-European descent: a meta-analysis of eight genes involving approximately 32,500 individuals [J]. *PLoS Med*, 2007, 4(4): e131.
- [5] Sarzynska-Dlugosz I, Gromadzka G, Baranska-Gieruszczak M, et al. APOE does not predict poor outcome 1 year after ischemic stroke[J]. *Neurol Res*, 2007, 29(1): 64-69.
- [6] Weir CJ, McCarron MO, Muir KW, et al. Apolipoprotein E genotype, coagulation, and survival following acute stroke [J]. *Neurology*, 2001, 57(6): 1097-1100.
- [7] McCarron MO, Muir KW, Nicoll JA, et al. Prospective study of apolipoprotein E genotype and functional outcome following ischemic stroke[J]. *Arch Neurol*, 2000, 57(10): 1480-1484.
- [8] Bathum L, Petersen I, Christiansen L, et al. Genetic and environmental influences on plasma homocysteine: results from a Danish twin study[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(5): 971-979.
- [9] Cronin S, Furie KL, Kelly PJ. Dose-related association of MTHFR 677T allele with risk of ischemic stroke: evidence from a cumulative meta-analysis[J]. *Stroke*, 2005, 36(7): 1581-1587.
- [10] McNulty H, Doweley le RC, Strain JJ, et al. Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C->T polymorphism[J]. *Circulation*, 2006, 113(1): 74-80.
- [11] Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(15): 1567-1577.
- [12] Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, et al. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls [J]. *Arch Neurol*, 2004, 61(11): 1652-1661.
- [13] Pera J, Slowik A, Dziedzic T, et al. ACE I/D polymorphism in different etiologies of ischemic stroke[J]. *Acta Neurol Scand*, 2006, 114(5): 320-322.
- [14] Slowik A, Dziedzic T, Pera J, et al. ACE Genotype, risk and causal relationship to stroke: implications for treatment[J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2007, 9(3): 198-204.
- [15] Brenner D, Labreuche J, Poirier O, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system in brain infarction and vascular death [J]. *Ann Neurol*, 2005, 58(1): 131-138.
- [16] Schmidt H, Fazekas F, Kostner GM, et al. Angiotensinogen gene promoter haplotype and microangiopathy-related cerebral damage: results of the Austrian Stroke Prevention Study[J]. *Stroke*, 2001, 32(2): 405-412.
- [17] Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Gronholdt ML, et al. Angiotensinogen mutations and risk for ischemic heart disease, myocardial infarction, and ischemic cerebrovascular disease. Six case-control studies from the Copenhagen City Heart Study[J]. *Ann Intern Med*, 2001, 134(10): 941-954.
- [18] Sethi AA, Nordestgaard BG, Gronholdt ML, et al. Angiotensinogen single nucleotide polymorphisms, elevated blood pressure, and risk of cardiovascular disease [J]. *Hypertension*, 2003, 41(6): 1202-1211.
- [19] Nakase T, Mizuno T, Harada S, et al. Angiotensinogen gene polymorphism as a risk factor for ischemic stroke [J]. *J Clin Neurosci*, 2007, 14(10): 943-947.
- [20] Schelleman H, Klungel OH, Wittman JC, et al. Pharmacogenetic interactions of three candidate gene polymorphisms with ACE-inhibitors or beta-blockers and the risk of atherosclerosis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64(1): 57-66.
- [21] 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.
- [22] van Rijn MJ, Slooter AJ, Schut AF, et al. Familial aggregation, the PDE4D gene, and ischemic stroke in a genetically isolated population[J]. *Neurology*, 2005, 65(8): 1203-1209.
- [23] Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, et al. Serum C-reactive protein concentration and genotype in relation to ischemic stroke subtype [J]. *Stroke*, 2006, 37(8): 2018-2023.
- [24] Morita A, Nakayama T, Soma M. Association study between C-reactive protein genes and ischemic stroke in Japanese subjects [J]. *Am J Hypertens*, 2006, 19(6): 593-600.

(收稿日期:2008-10-12)

(本文编辑:卢丽玉)