

汉族人染色体 12p13 上的单核苷酸多态性 rs12425791 与中风中医证型的关联研究

谢娟娟¹ 古 联² 陈 清¹ 吴光亮¹ 严 雁¹ 苏 莉³

摘要 目的 探讨汉族人染色体 12p13 上的单核苷酸多态性 rs12425791 与中风中医证型的相关性。**方法** 采用病例对照研究方法,纳入 148 例汉族中风患者(痰浊证 67 例、血瘀证 81 例),另设 192 名健康人作对照,并采用 TaqMan 基因分型技术对 rs12425791 进行基因分型,分析基因分布及等位基因的分布频率。**结果** 汉族人 rs12425791 的基因型、等位基因在中风痰浊证与对照组之间、中风血瘀证与对照组之间的分布比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 该项研究结果不支持汉族人染色体 12p13 上的 rs12425791 与中风痰浊证、血瘀证的发病相关联。

关键词 rs12425791; 中风; 痰浊证; 血瘀证; 关联研究

Correlation Study on 12p13 Single Nucleotide Polymorphism rs12425791 and Chinese Medical Syndrome Types in Ischemic Stroke Patients of the Han Nationality XIE Juan-juan¹, GU Lian², CHEN Qing¹, WU Guang-liang¹, YAN Yan¹, and SU Li³ 1 College of Graduates, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530001), China; 2 Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530023), China; 3 Department of Epidemics and Health Statistics, College of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning (530021), China

ABSTRACT Objective To explore the correlation between 12p13 single nucleotide polymorphism (SNP) rs12425791 and Chinese medical syndrome types of ischemic stroke patients of the Han nationality. **Methods** A case-control study was used. Recruited were 148 ischemic stroke patients of the Han nationality (67 patients of phlegm syndrome and 81 patients of blood stasis syndrome). Another 192 healthy subjects were recruited as the control group. The genotypes of rs12425791 were performed by TaqMan SNP genotyping assays to analyze the distribution of genes and the distribution frequency of alleles. **Results** There was no statistical difference in the genotype and alleles of rs12425791 between the ischemic stroke patients of phlegm syndrome and the control group, or between the ischemic stroke patients of blood stasis syndrome and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Our results did not support that 12p13 common variant rs12425791 was correlated with the pathogenesises of ischemic stroke patients of phlegm syndrome and ischemic stroke patients of blood stasis syndrome.

KEYWORDS rs12425791; stroke; phlegm syndrome; blood stasis syndrome; correlation study

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)属中医学“中风”范畴,由于其高发病率、高致残率、高病死率和高复发率等特点而备受关注。近年来,人类基因组学

的发展也给中医证候研究的深入发展提供了新的思路^[1],有学者认为“证候-基因”结合是 IS 中西医结合研究的交汇点。2009 年 Ikram MA 等^[2]全基因组关联研究(genome wide association studies, GWAS)发现高加索人染色体 12p13 上 NINJ2 基因附近的 rs12425791 与 IS 之间的关联达到了全基因组关联显著性水准,并在后继黑人、白人的病例-对照样本中重复出了这种关联。本研究采用 TaqMan 基因分型技术对汉族人 rs12425791 进行基因分型,以探讨 rs12425791 是否与汉族人中风痰浊阻络证(简称痰浊证)、阴虚血瘀证(简称血瘀证)相关联。

基金项目:广西壮族自治区卫生厅重点课题资助项目(No. 200933);广西教育厅立项课题资助项目(No. 200911LX203);广西中医药科技专项资助项目(No. GZKZ1107);广西研究生教育创新计划资助项目(No. 2011106001006M15)

作者单位:1.广西中医药大学研究生学院(南宁 530001);2.广西中医药大学第一附属医院神经内科(南宁 530023);3.广西医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室(南宁 530021)

通讯作者:古 联, Tel:13878109205, E-mail: gulian7062@163.com

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证分型标准 IS 诊断参照 1995 年中华医学会第四次全国脑血管病学术会议修订的《各类脑血管疾病诊断要点》^[3] 中相关标准。中医辨证分型标准参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[4]。

2 纳入及排除标准 纳入标准:(1)符合诊断标准,且所有患者均经 CT 和(或)MRI 检查确诊为 IS;(2)中医辨证分型属痰浊证或血瘀证;(3)签署知情同意书者。排除标准:Alzheimer's 病、痴呆、Parkinson 病、脑动脉瘤等神经精神疾病患者。

3 一般资料 (1)中风组:选择 2009 年 7 月—2011 年 6 月期间,在广西中医药大学第一附属医院神经内科住院治疗的中风急性期且符合纳入标准的患者,共计 148 例,其中痰浊证 67 例(痰浊证组),血瘀证 81 例(血瘀证组)。(2)健康对照组:选取同期在该医院体检中心进行健康体检的健康人作对照,共计 192 名。采用自行设计的统一问卷,对研究对象或其家属进行询问,内容包括研究对象的一般情况、既往史、吸烟史及饮酒史等行为生活方式等。340 名研究对象均为广西汉族人,且均无亲缘关系。中风痰浊证组、血瘀证组与健康对照组在性别、年龄上的分布比较(表 1),差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 中风痰浊证、血瘀证和健康对照组的性别、年龄比较

组别	例数	性别[例(%)]		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)
		男性	女性	
痰浊证	67	42(62.69)	25(37.31)	66.69 $\pm$ 11.52
血瘀证	81	47(58.02)	34(41.98)	69.16 $\pm$ 11.04
健康对照	192	132(68.75)	60(31.25)	69.53 $\pm$ 7.07

4 观察指标及检测方法

4.1 标本采集 于清晨空腹抽取研究对象的外周血液标本 2 mL,抗凝备测。

4.2 基因分型

4.2.1 基因组 DNA 提取 采用天根科技(北京)有限公司生产的血液基因组 DNA 提取试剂盒[TIANa-mp Blood DNA Kit(离心柱形),目录号:DP318DNA],严格按照产品说明书提取血液基因组 DNA。将提取后的 DNA 分装为 3 管,于 -20°C 保存以备用。

4.2.2 基因分型 使用美国应用生物系统(ABI)公司生产的 ABI7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪以及 TaqMan SNP 基因分型试剂盒[试剂盒包括 2 $\times$ 通用 PCR 预混试剂 Universal PCR Master mix

(无 AmpErase UNG 酶), 40 $\times$ SNP 基因分型试剂 Genotyping Assay Mix],采用 TaqMan MGB 探针等位基因分型技术对 rs12425791 进行基因分型。PCR 反应体系的总体积为 10 μL ,包含:2 $\times$ TaqMan Universal PCR Mix, 5.00 μL ; Assay-on-Demand SNP Genotyping Assay Mix(40 $\times$), 0.25 μL ; 无核酸 H_2O , 3.75 μL ; 基因组 DNA, 1.00 μL 。PCR 反应条件:预变性 95°C 10 min,变性 92°C 15 s、退火 60°C 1 min,变性以及退火程序循环 43 次。并采取以下措施进行基因分型实验的质量控制:对实验操作者施盲,使其进行基因分型时未了解标本的病例/对照状态;每次 96 孔 PCR 反应板均设置 2 个空白对照以及 3 个随机重复样本作为阳性对照;随机抽取 5% 的样本做盲法重复测定,检测结果一致率为 100%。

5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。采用直接计数法计算基因型频率,等位基因频率从基因型频率推算;采用拟合优度 χ^2 检验分析病例组与对照组基因型频率的分布是否符合 Hardy-Weinberg Equilibrium;采用 χ^2 检验进行计数资料的组间比较;采用方差分析进行计量资料的组间比较;以比值比(odds ratio, OR)及其 95% 可信区间(confidence interval, CI)表示相对危险度,采用单因素非条件 Logistic 回归模型估算基因型、等位基因与中风痰浊证、血瘀证发生风险的 OR 及 OR 95% CI。所有的统计学检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组样本 Hardy-Weinberg 平衡的拟合优度 χ^2 检验(表 2) 拟合优度 χ^2 检验结果显示,分别在中风痰浊证、血瘀证、健康对照组中,汉族人 rs12425791 基因型的频数分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P > 0.05$),说明本研究所应用的抽样群体适合于遗传分析。

2 各组 rs12425791 基因型分布比较(表 3) 中风痰浊证组、血瘀证组与健康对照组之间的 rs12425791 基因型分布比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组 rs12425791 等位基因分布频率及其与中风发病风险的关联分析(表 4) 中风患者痰浊证组、血瘀证组与健康对照组之间 rs12425791 等位基因的分布比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),即 rs12425791 等位基因分布频率与中风两中医证型的发病风险无关联。

表 2 各组样本 Hardy-Weinberg 平衡的拟优度 χ^2 检验 (例)

组别	例数	实际			实际			χ^2	P
		G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A		
痰浊证	67	39	23	5	38	25	4	0.380	0.538
血瘀证	81	55	23	3	55	23	3	0.093	0.760
健康对照	192	112	65	15	109	71	12	1.586	0.208

表 3 各组 rs12425791 基因型分布比较 [例(%)]

组别	例数	GG	GA	AA	χ^2	P	G/A + A/A	OR(OR95%CI)
痰浊证	67	39(58.2)	23(34.3)	5(7.5)	0.011	0.994	28(41.8)	1.005(0.572 – 1.767)
血瘀证	81	55(67.9)	23(28.4)	3(3.7)	2.838	0.242	26(32.1)	0.662(0.383 – 1.144)
健康对照	192	112(58.3)	65(33.8)	15(7.8)	1.283	0.527	80(41.7)	0.804(0.518 – 1.250)

表 4 各组 rs12425791 等位基因的分布比较 [例(%)]

组别	例数	G	A	χ^2	P	OR(OR95%CI)
痰浊证	67	62(92.5)	5(7.5)	0.009	0.926	0.952(0.332 – 2.727)
血瘀证	81	78(96.3)	3(3.7)	1.562	0.211	0.454(0.128 – 1.613)
健康对照	192	177(92.2)	15(7.8)	0.768	0.381	0.674(0.278 – 1.636)

讨 论

IS 属中医学“中风”范畴。在急性期,目前一致认为其病机是本虚标实,“本虚”指的是五脏虚损、气血亏虚;“标实”指的是风、火、痰、瘀。中风的基础病因是“故邪痰瘀”^[5]。痰浊、血瘀是病因,也是一种病理产物。近几年有研究者对中风痰浊证、血瘀证与基因多态性相关性进行了研究,通过研究认为某些证候与某些基因有一定相关性,某些基因型可能是某些证候的危险因素;表达相同证候的不同患者可能存在有某种程度的遗传相似性,而遗传基因的不同可能是某些证候的遗传易感因素。如贾妮等^[6]探讨 ACE 基因多态性与急性缺血性中风始发证候的相关性,认为 D 等位基因与痰证、I 等位基因与气虚证的发生可能存在相关性;胡木林等^[7]通过对缺血性中风血瘀证患者 MTHFR 基因多态性研究,发现 MTHFR 基因 TT 型可能是缺血性中风病血瘀证发病的易感危险因素之一。以上研究提示,易感基因遗传多态性可能在中风病证型的发病机制中有重要作用。而“证候—基因”的研究也为传统的中医证型研究提供了分子生物学依据和新的思路。

在 IS 的发病机制中,遗传因素向来被认为具有重要作用,但既往连锁研究以及候选基因研究常常得到不一致的结果^[8]。GWAS 被认为是一种能鉴别复杂疾病遗传风险的易感变异的有效方法^[9, 10]。但对于 IS,目前发现的达到 GWAS 显著性水平的遗传

变异还很少。令人振奋的是, Ikram MA 等^[2]的 GWAS 发现高加索人染色体 12p13 上 NINJ2 基因附近的 rs12425791 和与 IS 之间的关联达到了 GWAS 显著性水准。但国际卒中遗传学委员会和威廉信托基金会病例对照委员会在 2010 年的一篇报道中提出, rs12425791 与 IS 发生风险升高显著关联的原因仍未清楚。因该位点邻近 NINJ2 基因,而 NINJ2 基因编码的 ninjurin2 蛋白是一种嗜同种的与基质金属蛋白酶相互作用的细胞-黏附分子^[11]。尽管目前 NINJ2 基因对 IS 的功能作用在很大程度上仍不清楚,但有研究认为 NINJ2 基因可能同样与缺血损伤反应有关^[12]。本研究并未发现汉族人 rs12425791 基因型、等位基因在中风中医证型与健康对照组之间的分布差异有统计学意义,这也与 Ding H 等^[13]、Tong Y 等^[14]在中国汉族人中的研究结果一致。在 HapMap 数据中,rs12425791 的小等位基因频率(minor allele frequency, MAF),在高加索人中为 0.177,在日本人中为 0.314、在中国汉族人中为 0.244,表明该单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)在健康人中的分布存在一定的种族差异,提示 rs12425791 对 IS 发病风险的作用可能存在种族差异。目前尚未见其他关于汉族人 rs12425791 与中风中医证型的关联研究报道,故仍需要更多、更大样本量的同类研究来明确 GWAS 支持的遗传变异 rs12425791 对中风及其中医证型发病机制的作用。

参 考 文 献

- [1] 王平.中医证候研究几个问题的思考[J].湖北中医学院学报, 2004, 6(4): 71-72.
- [2] Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, et al. Genome-wide association studies of stroke[J]. N Engl J Med, 2009, 360(17): 1718-1728.
- [3] 陈清棠.各类脑血管疾病诊断要点[J].中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-381.
- [4] 郑筱萸主编.中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:101.
- [5] 张久亮,柳翼,史载祥,等.缺血性脑卒中的中医病因病机再认识[J].中医杂志, 2008, 49(6): 569-571.
- [6] 贾妮,尤劲松,黄培新.ACE 基因多态性与急性缺血性中风始发证候相关性的研究[J].辽宁中医杂志, 2008, 35(4): 481-483.
- [7] 胡木林,王忠,李涛,等.缺血性中风血瘀证患者 MTHFR 基因多态性研究[J].中国中医药信息杂志, 2009, 16(3): 16-18.
- [8] Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(2): 149-161.
- [9] Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants[J]. Nat Genet, 2009, 41(3): 334-341.
- [10] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease[J]. Science, 2007, 316(5830): 1488-1491.
- [11] Zhang S, Dailey GM, Kwan E, et al. An MMP liberates the Ninjurin A ectodomain to signal a loss of cell adhesion[J]. Genes Dev, 2006, 20(14): 1899-1910.
- [12] 陈廓,肖占森,侯淑琴,等.NINJ2 基因多态性与房山区汉族脑卒中易感强相关[J].北京大学学报, 2010, 42(5): 498-502.
- [13] Ding H, Tu X, Xu YJ, et al. No evidence for association of 12p13 SNPs rs11833579 and rs12425791 within NINJ2 gene with ischemic stroke in Chinese Han population[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(2): 381-382.
- [14] Tong Y, Zhang Y, Zhang R, et al. Association between two key SNPs on chromosome 12p13 and ischemic stroke in Chinese Han population[J]. Pharmacogenet Genomics, 2011, 21(9): 572-578.

(收稿:2011-12-23 修回:2012-09-04)

加强科技期刊科学道德规范

科技期刊应尊重作者权益,对存在署名有争议、引用他人著述未注明出处、不诚信地一稿多投、抄袭、剽窃、弄虚作假等学术不端行为的文章,坚决拒绝刊登。一经发现,由本刊或联合中国科协所属相关科技期刊视情节轻重给予书面警告、拒绝刊登有其署名的稿件、通知其所在单位等处理;轻者给予3~5年不允许刊发其论文的处罚,情节严重者,将以适当方式予以公布,终生不刊用该作者的论文,通报国家基金资助部门,并转请有关部门进行处理。若一个单位屡次出现学术不端行为,科技期刊将要求该单位对所投稿件作学术预审,并将只受理经过单位预审的来稿。当学术不端行为涉及单位负责人时,将通报上一级单位。如发现已发表的论文存在弄虚作假、抄袭剽窃或严重差错等问题,应在最短的时间内,通过及时发布撤稿声明、更正启事或公开致歉等方式进行纠正,并通知收录有关文章的数据库予以撤稿。如发现审稿人利用审稿谋取私利乃至剽窃所审稿内容时,将根据情节轻重分别予以警告、终生禁止其审稿乃至公开披露等处分。所有论文署名作者均应对论文工作做出实质性贡献,并对文章负责。论文投稿前,所有署名作者均须对稿件的全部研究内容进行审查,确保结果准确可靠,确保不存在学术不端行为,并同意署名及共同作者的署名排序。署名作者应对为此项研究做出过某种贡献的合作人员和机构予以感谢。论文的作者应明确说明使用过或引用过他人的工作,如果发现已投递或发表的文章中存有问题,应有责任和义务及时予以修正或提出撤回。

中国科协欢迎其他部门科技期刊共同努力,加强学术道德建设,强化科研诚信,营造良好的学术氛围,共同推动科技事业的健康发展和社会进步。

摘自《加强科技期刊科学道德规范营造良好学术氛围的联合声明》