

## 脂联素基因多态性与南京汉族高血压脑出血易感性关系研究

陆飞宇<sup>1</sup>, 王文宏<sup>2\*</sup>, 王 宏<sup>2</sup>, 万 兴<sup>3</sup>, 陈陆魁<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南通大学附属南京江北人民医院神经外科, 江苏 南京 210048; <sup>2</sup>东南大学附属中大医院神经外科, 江苏 南京 210023; <sup>3</sup>金华市中心医院神经外科, 浙江 金华 321000)

**[摘要]** 目的: 探讨人脂联素(adiponectin, APN)基因单核苷酸多态性与中国南京地区人群高血压脑出血(hypertensive intracerebral hemorrhage, HICH)的相关性。方法: 利用 SNaPshot 法检测 APN 中 rs2241766、rs1501299、rs17300539 和 rs266729 的基因型及等位基因在 150 例 HICH 患者及 150 例正常健康人中的分布特征。结果: ①rs266729 位点的 GG 基因型和 G 等位基因在病例组和对照组的分布频率具有明显统计学差异( $P < 0.05$ ); ②rs266729 位点的 GG 基因型的 HICH 病危险度是 CC 基因型的 2.623 倍(95%CI: 1.282~5.366;  $P=0.008$ ), 校正后仍为 HICH 的危险因素; ③rs2241766、rs1501299、rs17300539 位点与 HICH 的发病风险均没有关联。结论: ADIPOQ 基因的 rs266729 基因多态性与南京地区汉族人群 HICH 的易感性相关; rs266729 位点的 GG 基因型和 G 等位基因可能增加南京地区汉族人群 HICH 的发病风险。

**[关键词]** 高血压脑出血; 脂联素基因; 单核苷酸; 多态性

**[中图分类号]** R544.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)02-212-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170216

## Adiponectin gene polymorphisms in the susceptibility of hypertensive cerebral hemorrhage

Lu Feiyu<sup>1</sup>, Wang Wenhong<sup>2\*</sup>, Wang Hong<sup>2</sup>, Wan Xing<sup>3</sup>, Chen Lukui<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, the Affiliated Nanjing Jiangbei People's Hospital of Nantong University, Nanjing 210048; <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009; <sup>3</sup>Department of Neurosurgery, Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China)

**[Abstract]** **Objective:** Some adiponectin gene polymorphisms were associated with the risk of many inflammatory diseases. This study was designed to investigate the relationship between single nucleotide polymorphisms in adiponectin genes and hypertensive intracerebral hemorrhage in a Chinese population. **Methods:** SNaPshot was adopted to detect the adiponectin genotypes and allele distributions of rs2241766, rs1501299, rs17300539 and rs266729 in 150 patients with hypertensive intracerebral hemorrhage and 150 healthy controls. **Results:** The frequency distributions of GG genotype and G allele of rs266729 locus were statistically significantly different between the patients and the controls. The hypertensive intracerebral hemorrhage risk of GG genotype of rs266729 locus was 2.623 times higher than that of CC genotype (95% confidence interval, 1.282-5.366;  $P=0.008$ ). This difference retained significant using a logistic regression after multivariate adjustment for the other possible confounders. However, the risk of hypertensive intracerebral hemorrhage was not associated with rs2241766, rs1501299 and rs17300539 locus. **Conclusion:** Rs266729 gene polymorphism of adiponectin gene is related to hypertensive intracerebral hemorrhage. GG genotype and G allele of rs266729 locus may increase the risk of hypertensive cerebral hemorrhage in a Chinese population.

**[Key words]** HICH; adiponectin gene; single nucleotide; polymorphism

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02):212-216]

高血压脑出血 (hypertensive intracerebral hem-

orrhage, HICH) 是高血压病的一种严重并发症, 其病死率和致残率都很高的。根据流行病学调查, 我国 HICH 年发病率为 50.6/10 万~80.7/10 万人口。脂联素(adiponectin, APN) 是新发现的由脂肪细胞特异性分泌、有类似胶原结构的蛋白, 在调节脂类、糖类代

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金资助(BK2010419)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangwenhong@hotmail.com

谢、胰岛素抵抗、抗动脉粥样硬化和抗炎等过程中起着非常重要的作用,是人体保护因子。Wang 等<sup>[1]</sup>研究表明,脑出血患者血浆 APN 浓度和脑损害的严重程度及早期病死率存在一定关系。随着脑卒中患者神经功能缺损程度的增加及梗死灶体积的增大,血清 APN 水平呈下降趋势。血清 APN 水平越高,神经功能缺损程度越轻<sup>[2]</sup>。Efstathiou 等<sup>[3]</sup>研究表明 APN 水平与脑卒中的 5 年存活率相关,也从侧面表明 APN 与脑卒中的相关性。对于 APN 启动子单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)与 HICH 是否有相关性,目前为止相关研究报道不足。为此,本研究以中国南京汉族人为研究,选取 ADIPOQ 基因启动子区的 rs2241766 (+45T/G)、rs1501299 (+276G/T)、rs17300539 (-11391G/A) 和 rs266729 (-11377C/G)位点,探讨各位点与 HICH 发病的相关性。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

脑出血组:选取 2013 年 7 月—2014 年 11 月在东南大学附属中大医院住院的 HICH 首发病例为病例组,均为南京地区汉族人,无血缘关系。诊断标准参照全国第四届脑血管病学术会议制定的各类脑血管病诊断标准,并由 2 名神经外科医师根据临床神经功能缺损表现和头部 CT(MRI)检查确诊。脑出血组共 150 例,年龄 45~85 岁,平均 64 岁,男 107 例,女 43 例。正常对照组:与病例组同种族来自相同地区的体检健康者,均为南京地区汉族人,无血缘关系,均排除糖尿病、肝肾病、心脑血管疾病家族史、高血压患病史、全身性感染、血液系统疾病、恶性肿瘤等的患者。对照组共 150 例,年龄 45~85 岁,平均 62 岁,男 102 例,女 48 例。两组性别、年龄的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。收集临床相关资料,包括年龄、性别、文化程度、体重指数(BMI)、腰臀比、高血压史、糖尿病史、心脏病史、吸烟史、饮酒史、饮茶史、参加体育锻炼、发生负性生活事件、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等。

### 1.2 方法

运用成组病例对照研究设计方案,用自制的调查问卷对人选的研究对象进行调查,调查内容主要包括:研究对象的人口学资料、既往病史及家族史、个人行为危险因素、环境暴露史及心理危险因素等;本研究经院伦理委员会批准,所有研究对象均

签署知情同意书,并有专人负责数据质控。

实验室检查:①血液样本:受检者空腹 12~15 h 于次日晨 8:00 时抽取外周静脉血 2 mL,置于 EDTA 抗凝管中,用于提取 DNA;②全基因组 DNA 提取:用康为世纪生物科技有限公司的血液基因组非柱式提取试剂盒抽提 DNA,其后用核酸检测仪检测其浓度和纯度,DNA 样本存放于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱;③ PCR 扩增:参考 GeneBank 中脂联素基因序列设计脂联素基因 +45T/G、+276G/T、-11391G/A 和 -11377C/G 单核苷酸多态性引物序列,由上海捷瑞生物工程有限公司合成,rs2241766 的 PCR 引物序列为 5'-GCTGTTGCTGGGAGCTGTTCT-3',5'-GATGAGGTTGAAGATGGGAAA-3',片段长度为 464 bp;rs1501299 的 PCR 引物序列为 5'-GCTGTTGCTGGGAGCTGTTCT-3',5'-GATGAGGTTGAAGATGGGAAA-3',片段长度为 464 bp;rs17300539 的 PCR 引物序列为 5'-ATGTCTTGTGAAGTTGGTGCTG-3',5'-GCCTAGAAGCAGCCTGGAGAA-3',片段长度为 226 bp;rs266729 的 PCR 引物序列为 5'-ATGTCTTGTGAAGTTGGTGCTG-3',5'-GCCTAGAAGCAGCCTGGAGAA-3',片段长度为 226 bp,PCR 反应体系及反应条件见参考文献<sup>[4]</sup>;④ SNaPshot 法检测 SNP:rs2241766 延伸引物序列为 TTTTTTTTTTTTTGAGTCGTGGTTTCCTGGTCATG,多态性为 G/T;rs17300539 延伸引物序列为 GAATGTGTGGCTTGAAGAACC,多态性为 A/G;rs1501299 延伸引物序列为 AGGCCTTAGTTAATAATGAATG 多态性为 A/C;rs266729 延伸引物序列为 TTTTTTCGCTCATGTTTTGTTTTGAAG,多态性为 C/G,具体步骤见参考文献<sup>[5]</sup>。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件分析,均数的比较采用  $t$  检验,率和构成比的检验采用  $\chi^2$  检验。利用  $\chi^2$  拟合优度检验病例组和对照组的基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg(H-W)平衡。基因型和等位基因频率的比较采用  $\chi^2$  检验。利用非条件 Logistic 回归分析脂联素基因多态性与 HICH 的关系, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

入选样本人群中男女两组性别比无差异。病例组中高血压、糖尿病患病率高于对照组,组间差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.001$ )。但在心脏病方面病例

与对照组间患病情况的差异无统计学意义( $P=0.75$ )。两组间文化水平、腰臀比、饮茶、参加体育锻炼、TG 水平及 LDL-C 差异均存在统计学意义(表 1)。

表 1 两组一般临床资料的比较

变量	病例组( $n=150$ )	对照组( $n=150$ )
年龄(岁)	64.18 ± 12.41*	62.01 ± 13.23
性别(男)	107/43	102/48
文化程度(初中及以上)	110*	129
BMI( $\geq 25$ kg/m <sup>2</sup> )	55	65
腰臀比(男 $\geq 0.9$ ,女 $\geq 0.8$ )	121*	136
有高血压病史	78*	50
有糖尿病病史	24*	13
有心脏病病史	26	19
吸烟	30	38
饮酒	31	24
饮茶	21*	65
参加体育锻炼	49*	65
发生负性生活事件	78	50
TG(mmol/L)	2.04 ± 1.50*	1.60 ± 1.07
TC(mmol/L)	4.81 ± 1.49	5.06 ± 0.87
LDL-C(mmol/L)	3.03 ± 1.20*	2.51 ± 0.58

与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

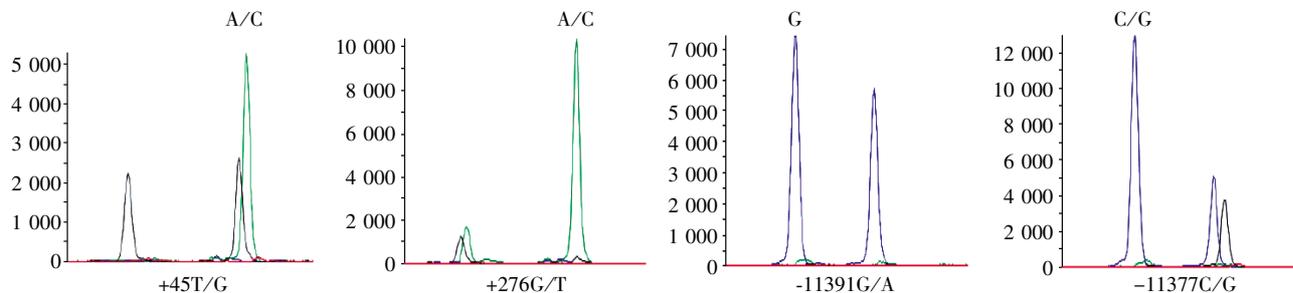


图 1 脂联素基因测序图

Figure 1 The sequencing result of the APN gene

TG、GG;位点 rs1501299 的基因型为 CC、CA、AA;位点 rs266729 的基因型则为 CC、CG、GG。在病例与对照组中各位点的 3 种基因型都存在,各基因型分布频率见表 2。对各位点基因型频率进行趋势检验,ADIPOQ 基因 rs2241766 位点的基因型( $P=0.486$ )和等位基因( $P=0.280$ )频率在病例组和对照组无统计学意义;rs1501299 位点的基因型( $P=0.849$ )和等位基因( $P=0.660$ )频率在病例组和对照组也无统计学意义。相反,发现 rs266729 位点的基因型和等位基因在病例组和对照组的分布频率具有明显统计学差异( $P < 0.05$ )。

### 2.5 rs266729 位点与 HICH 发病危险性的分析

通过单变量非条件性 Logistic 回归分析计算

### 2.2 脂联素基因测序图

脂联素基因 SNaPshot 法测序结果图 1。

### 2.3 遗传平衡检验

对 rs2241766、rs1501299 及 rs266729 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果分别为对照组( $\chi^2=1.989, P=0.158$ )、对照组( $\chi^2=0.002, P=0.967$ )、对照组( $\chi^2=0.147, P=0.701$ ),其基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P > 0.05$ )。结果说明本研究所选样的样本具有群体代表性。

连锁不平衡指的是一个群体内不同位点等位基因之间的非随机关联。应用 SHEsis 在线分析软件对两两间进行 LD 分析,计算出参数  $D'$  和  $r^2$ (取值范围 0~1)。 $D'=1$ ,说明 2 个 SNPs 之间完全连锁不平衡。 $D'=0$ ,说明 2 个 SNPs 之间无连锁不平衡。结果发现;rs2241766、rs1501299、rs17300539 和 rs266729 两两位点存在连锁不平衡( $D'=1$ )。

### 2.4 多态位点基因型及频率分布

在人群中 ADIPOQ 基因基因多态性位点 rs17300539 位点 GG 基因型频率和 G 等位基因频率全部为 100%,说明此位点在本研究人群中高度保守,不存在多态性。位点 rs2241766 的基因型为 TT、

rs266729 与 HICH 发病危险性的校正前 OR 值,rs266729 位点的 GG 基因型的 HICH 发病危险度是 CC 基因型的 2.623 倍(95% CI:1.282~5.366; $P=0.008$ ),然后通过多变量非条件 Logistic 回归分析对 HICH 发病的各种混杂因素(如性别、年龄、吸烟史、饮酒史、糖尿病和高脂血症)进行校正,计算这些位点和 HICH 发病危险性的校正后 OR 值,发病危险度为 2.604(95% CI:1.260~5.382),仍具有统计学差异( $P=0.010$ )。

### 3 讨论

APN 基因位于人类 3q27,DNA 全长约 16 kb,包含 3 个外显子和 2 个内含子。目前已经研究表明脂联

表 2 脂联素多态位点的基因型及等位基因分布频率  
Table 2 The genotype and allele frequencies of APN gene polymorphisms [n(%)]

基因	病例组	对照组	$\chi^2$ 值	P 值
rs2241766 基因型			1.443	0.486
TT	88(58.67)	98(65.33)		
TG	52(34.67)	43(28.67)		
GG	10(6.67)	9(6.00)		
rs2241766 等位基因			1.169	0.280
T	228(76.00)	239(79.67)		
G	72(24.00)	61(20.33)		
rs1501299 基因型			0.326	0.849
CC	70(46.67)	72(48.00)		
CA	63(42.00)	64(42.67)		
AA	17(11.33)	14(9.33)		
rs1501299 等位基因			0.193	0.660
C	203(67.67)	208(69.33)		
A	97(32.33)	92(30.67)		
rs266729 基因型			7.260	0.027
CC	66(44.00)	84(56.00)		
CG	63(42.00)	57(38.00)		
GG	21(14.00)	9(6.00)		
rs266729 等位基因			7.143	0.008
C	195(65%)	75(25.00)		
G	105(35%)	225(75.00)		

素编码基因 ADIPOQ 多态性与 APN 水平相关<sup>[6]</sup>。很多研究探讨了 ADIPOQ 基因的多个多态性位点与美国、澳大利亚、日本、中国等不同种族人群的缺血性脑卒中、原发性高血压的易感性相关,但是结果不尽相同<sup>[7-13]</sup>。ADIPOQ 基因已经被广泛用于研究胰岛素抵抗、2 型糖尿病、糖尿病肾病、缺血性脑卒中及原发性高血压的候选基因,然而很少用于研究探索与 HICH 之间的遗传变异关系。

以往众多研究表明 rs2241766 等位基因 T/G 与中国北方汉族人群缺血性脑卒中易感性存在显著相关<sup>[14]</sup>,rs1501299 纯合子携带者冠心病和脑血管意外的发生率低于其他基因型<sup>[8]</sup>,rs17300539 的 G/A 突变能导致 APN 的表达异常,增加代谢综合征发病的风险<sup>[15]</sup>。而何平等<sup>[16]</sup>研究表明,rs2241766 与 HICH 的关联无统计学显著性,rs1501299 的 TT 基因型及 T 等位基因的变异可能和出血性脑卒中易感性相关。El-Shal 等<sup>[17]</sup>研究发现,rs17300539 多态性与 2 型糖尿病显著相关,Liu 等<sup>[18]</sup>研究显示 rs266729 的基因型 GG 和等位基因 G 使中国汉族缺血性脑卒中发病风险显著增加。然而,我们的研究结果与先前报道不完全一致。本研究检测位点 rs2241766、rs1501299、rs17300539 的基因型和等位基因与

HICH 的发病危险性均无统计学显著性,而 rs266729 位点的基因型 GG 和等位基因 G 与南京地区汉族人 HICH 易感性存在显著相关,在调整 HICH 发病的各种混杂因素(性别、年龄、吸烟史、饮酒史、饮茶、糖尿病、文化水平、腰臀同比、参加体育锻炼、TG 水平及 LDL-C)进行校正后,这显著的相关性仍然存在。与以往研究结果的差异性可能由于不同种族背景的差异性以及研究对象的选择标准,以及样本量不同。

关于 rs266729 与 HICH 发病相关的分子机制尚不清楚,此位点位于 ADIPOQ 基因启动子区,其等位基因 C/G 突变可能会降低启动子活性而减少 APN 的表达<sup>[19]</sup>。Zhang 等<sup>[20]</sup>研究已确定,APN 基因启动子区有 4 个转录因子(transcriptional stimulatory protein,SP1)结合位点,rs266729 位点的等位基因 G 改变了其中 1 个位于 g.1764 的 SP1 结合位点的 DNA 序列,从而影响 SP1 的结合力,降低了 ADIPOQ 基因的转录活性,抑制了 ADIPOQ 基因的表达。

综上所述,本研究揭示 ADIPOQ 基因 rs266729 位点多态性与 HICH 患者的风险有相关性,GG 基因型和 G 等位基因可能是 HICH 发生的危险因素,是 HICH 发病的遗传学基础之一。发生机制可能是由于 rs266729 位点的 G 等位基因降低 APN 基因的转录活性抑制 APN 基因表达,APN 蛋白合成下降,导致血浆 APN 水平下降,最终导致 HICH 的发生。因此,对携带有 APN G 易感基因的人群加强一级预防可一定程度上减少 HICH 的发病率,同时可指导临床治疗。研究 APN 单核苷酸多态性与 HICH 的相关性,为 HICH 发生风险、治疗提供了一定的理论基础。

本研究也存在一定的局限性,未对研究对象的 APN 水平、APN 基因表达水平进行检测,以及患者预后、死亡情况进行分析,因此不能明确 ADIPOQ 基因多态性与 APN 浓度、预后及死亡与 HICH 的遗传学相关性。所以还需要大量 HICH 预后、死亡患者的血液样本来进一步研究。

[参考文献]

[1] Wang WH, Yu WH, Dong XQ, et al. Plasma adiponectin as an independent predictor of early death after acute intracerebral hemorrhage[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412 (17-18): 1626-1631  
[2] 刘世英,王丽荣,丁兆日. 进展性脑卒中患者血清脂联素水平检测及其意义[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33

- (17):4262-4263
- [3] Efstathiou SP, Tsioulos DI, Tsiakou AG, et al. Plasma adiponectin levels and five-years survival after first-ever ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2005, 36(9):1915-1919
- [4] Xu X, Liang X, Hu G, et al. Renal function and klotho gene polymorphisms among uygur and kazak populations in Xinjiang, China[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21:44-51
- [5] Han D, Ma J, Zhang X, et al. Correlation of PCSK9 gene polymorphism with cerebral ischemic stroke in Xinjiang Han and uygur populations[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20:1758-1767
- [6] Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease[J]. *Diabetes*, 2007, 56(5):1198-1209
- [7] Hoefl G, Muendlein A, Saely CH, et al. The -11377C>G promote variant of the adiponectin gene, prevalence of coronary atherosclerosis, and incidence of vascular events in men[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(3):451-457
- [8] Qi L, Li T, Rimm E. The +276 polymorphism of the APM1 gene, plasma adiponectin concentration, and cardiovascular risk in diabetic men[J]. *Diabetes*, 2005, 54(5):1607-1610
- [9] Shen D, Xing S, Chen C. Adiponectin gene polymorphisms contributes to ischemic stroke risk; A meta-analysis[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2014, 16 (1):178-184
- [10] Leu HB, Chung CM, Chuang SY, et al. Genetic variants of connexin37 are associated with carotid intima-medial thickness and future onset of ischemic stroke[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1):101-106
- [11] 李晓霞, 关红军, 郭毓鹏. 脂联素基因多态性与缺血性脑卒中关系 [J]. *中国公共卫生*, 2009, 25 (11):1341-1343
- [12] Ong KL, Li M, Tso AW, et al. Association of genetic variants in the adiponectin genewith adiponectin level and hypertension in Hong Kong Chinese [J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 163(2):251-257
- [13] 张予波, 于丽军, 杨康鹏, 等. 延边朝鲜族和汉族脂联素启动子 SNPs 与原发性高血压的相关性 [J]. *遗传*, 2011, 33(1):54-59
- [14] 陈小良, 程锦泉, 张仁利, 等. 脂联素基因多态性与北方汉族人群缺血性脑卒中易感性关系研究 [J]. *中国流行病学杂志*, 2010, 31(2):129-132
- [15] Goyenechea E1, Collins LJ, Parra D, et al. The-11391G/A polymorphism of the adiponectin gene promoter is associated with metabolic syndrome traits and the outcome of an energy-restricted diet in obese subjects [J]. *Horm Metab Res*, 2009, 41(1):55-61
- [16] 何平, 丁毅鹏, 陈晓玲. 出血性脑卒中与 APM-1 基因 45T/G 和 276G/T 多态性的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 8(13):3592-3594
- [17] El-Shal AS, Zidan HE, Rashad NM. Adiponectin gene polymorphisms in Egyptian type 2 diabetes mellitus patients with and without diabetic nephropathy [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(4):2287-2298
- [18] Liu F, He Z, Deng S, et al. Association of adiponectin gene polymorphisms with the risk of ischemic stroke in a Chinese Han population [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(3):1983-1988
- [19] Hoefle G, Muendlein A, Saely CH, et al. The -11377 C>G promoter variant of the adiponectin gene, prevalence of coronary atherosclerosis, and incidence of vascular events in men [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(3):451-457
- [20] Zhang DI, Ma J, Brismar K, et al. A single nucleotide polymorphism alters the sequence of SP1 binding site in the adiponectin promoter region and is associated with diabetic nephropathy among type 1 diabetic patients in the genetics of kidneys in diabetes study [J]. *J Diabetes Complications*, 2009, 23(4):265-272

[收稿日期] 2016-03-23