

海南脑卒中人群遗传易感性 与 CD40-1C/T 基因多态性的研究

刘 娇¹ 孙鑫垚¹ 王艺锦² 张文鑫³ 林桃舅^{4*}

(1. 海南医学院儿科学院 海南 海口 571199)

(2. 海南医学院急诊创伤学院 海南 海口 571199)

(3. 海南医学院基础医学与生命科学学院 海南 海口 571199)

(4. 海南医学院临床技能实验教学中心 海南 海口 571199)

【摘要】目的探究 CD40-1C/T(rs1883832) 基因多态性与海南人缺血性脑卒中 (IS) 遗传易感的相关性。方法应用 SNaPshot 技术以及对比分析法对海南 IS 患者及健康者的 rs1883832 基因分别进行基因分型与优势等位基因频率的计算。结果 CD40-1C/T 基因在两组基因型与等位基因频率的分布比较均无显著差异 ($P>0.05$)。结论 CD40-1C/T 基因多态性与海南 IS 易感性无相关性。

【关键词】缺血性脑卒中 (IS); CD40-1C/T 基因; 基因多态性

The genetic susceptibility and CD40-1C / T gene polymorphism in Hainan stroke population

Jiao Liu¹ Xinyao Sun¹ Yijin Wang² Wenxin Zhang³ Taojiu Lin^{4*}

(1. Academy of Pediatrics, Hainan Medical College, Haikou, Hainan, 571199)

(2. College of Emergency Trauma, Hainan Medical College, Haikou, Hainan, 571199)

(3. School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, 571199)

(4. Clinical Skills Experimental Teaching Center of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, 571199)

[Abstract] Objective To explore the correlation between genetic polymorphism of CD40-1C / T (rs1883832) and genetic predisposition of ischemic stroke (IS) in Hainan people. Methods rs1883832 genotyping and dominant allele frequency of IS patients and healthy patients were calculated by SNaPshot technology and comparative analysis. Results The difference between genotype and allele frequencies of CD40-1C / T genes ($P> 0.05$). Conclusion There is no correlation between CD40-1C / T gene polymorphism and IS susceptibility in Hainan.

[Key words] Ischemic stroke (IS); CD40-1C / T gene; Gene polymorphism

缺血性脑卒中是由于各种致病原因引起的脑供血动脉狭窄或闭塞,致使脑供血不足,缺血组织出现相应区域神经功能缺损症状的临床表现的一种疾病。该病在老年人中好发,男性发病率高于女性。^[1]缺血性卒中为其中最常见的一种,至少占所有卒中的80%^[2],其特征是大脑特定区域的血流突然丧失,是永久性残疾的主要原因,已成为全球死亡的主要原因之一^[3]。同时,环境和遗传因素与此病密切相关,二者共同作用于此病,所以其作为一种复杂性的多基因遗传病^[4-5]。近年来,IS与易感基因多态性的关系已被国内外许多研究证实^[6-8]。CD40-1C/T单核苷酸多态性(rs1883832)是CD40基因Kozak序列中常见的多态性(-1C/T),有证据表明rs1883832是CD40表达的中心性调控因子^[9],有研究证实CD40-1C/T单核苷酸多态性可能通过调控CD40/CD40L系统及血清sCD40L的表达影响缺血性脑卒中的疾病易感性^[10]。CD40-1C/

T(rs1883832)基因的分布与流行特征在国内外已多次被研究,然而却未在海南地区开展研究,为了探讨CD40-1C/T(rs1883832)基因与海南IS人群发病之间的关系,我们对其CD40-1C/T(rs1883832)基因位点进行检测后对比与分析,进一步对海南IS人群的治疗与预防提供一定指导依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

样本来源于海南地区的各大附属医院心脑血管内科收治的IS患者102例,对照组来源于与IS患者同一时间段医院的体检中心,总计99例。

1.2 纳入与排除标准

符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》^[11]标准而筛选。

纳入标准:

①脑CT/MRI排除脑出血;

②借助数字减影血管造影 (DSA) 颈动脉双功能超声、经颅多普勒 (TCD)、磁共振脑血管造影 (MRA)、CT 血管造影 (CTA) 等检查技术排除非血管性病因;

③体征和症状持续超过 24 h 为时间界限 (无法得到影像学责任病灶证据), 神经影像学显示责任缺血病灶时, 无论症状和体征持续时间长短都可诊断脑梗死;

④局灶神经功能缺损 (一侧面部或肢体无力或麻木, 语言障碍等), 少数为全面神经功能缺损。

排除标准:

排除脑外伤、高血压脑病、中毒、脑炎、癫痫后状态、瘤卒中、血糖异常及心肝肾等躯体重要脏器功能严重障碍等引起的脑部病变; 以及不配合检查的患者。

1.3 研究方法

1.3.1 临床资料收集

采集每位纳入对象的姓名、年龄、性别、种族、家族史、既往史等一般信息; 血尿酸 (UA)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 等生化指标; 头颅 CT 及 MIR 扫描、DSA、TCD 等其中至少一项影像学资料。

1.3.2 外周血基因组 DNA 的提取

利用肝素对采集 5ml 的外周静脉血抗凝, 采用酚抽提法提取后用无水乙醇浓缩沉淀后提取到基因组 DNA。

1.3.3 外周血基因组 DNA 检测

1.3.3.1 凝胶电泳检测

取 2uL DNA 样本添加 2uL6×Loading Buffer, 检测参数为: 琼脂糖凝胶浓度 1%, 电压 120v, 电泳时间: 20min。点样并作参照, 跑完电泳后进行凝胶成像, 保存成成像胶图。

1.3.3.2 吸光度检测

取 2uL DNA 样本, 用 NanoDROPO 8000 超微量分光光度计进行检测核酸浓度和纯度检测。将浓度 (ng/ul) ≥ 30ng/ul, A260/A280=1.8 ~ 2.0 的高纯度 DNA 用于后续实验的测定。

1.3.4 分型引物合成

根据 SNP 位点序列信息, 使用引物设计软件 PrimerPlex 2 设计 PCR 反应引物, 使用 primer3plus 在线设计单碱基延伸引物, 并交由引物部合成。具体引物信息如下表:

1.3.5 分型实验

对高纯度 DNA 依次通过 PCR 扩增反应、产物碱性磷酸酶处理、单碱基延伸反应, 最后取 2uLSNaPshot

表 1 病例组生化指标对比

各项指标	基因型	Median (Interquartile Range)/M ± SD	P
FBG	CC	5.04 (1.46)	0.490
	CT	5.49 (2.56)	
	TT	5.21 (4.27)	
Crea	CC	66.80 (25.20)	0.410
	CT	73.70 (31.50)	
	TT	72.75 (41.70)	
UA*	CC	308.58 ± 83.06	0.635
	CT	335.37 ± 110.28	
	TT	333.27 ± 134.90	
TC*	CC	4.70 ± 1.27	0.872
	CT	4.84 ± 1.15	
	TT	4.66 ± 1.35	
TG	CC	1.30 (1.16)	0.824
	CT	1.10 (0.90)	
	TT	1.25 (1.16)	
HDL	CC	1.35 (0.60)	0.167
	CT	1.20 (0.60)	
	TT	1.10 (0.30)	
LDL*	CC	2.92 ± 0.99	0.733
	CT	3.12 ± 0.85	
	TT	3.10 ± 1.15	

*: 服从正态分布, 使用两独立样本 t 检验

反应产物加入 8uL 含有 0.8%LIZ120 的去离子甲酰胺中, 95℃变性 5 分钟, 然后放 -20℃骤冷, 然后上 3730XL 测序。

1.3.6 统计学处理

所有数据的统计分析均采用 SPSS 26.0 统计学软件, 计数资料的组间比较采用检验; 计量资料以均数 ± 标准差表示, 采用 t 检验和方差分析比较, 以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

病例组的生化指标比较见表 1, 病例组患者

位点名称	正向扩增引物	反向扩增引物	产物大小	延伸引物	方向
rs1883832	AAGATGCGTCCCTAAACTCC	GCAAAAACAACCTCACAGCGG	288	GactTGcAGAGGCAGACGAACCAT	R

FBG、Crea、UA、TC、TG、HDL、LDL 生化指标均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 健康组和病例组中基因型分布及等位基因频率 rs1883832 位点基因型频数在病例组和对照组间的分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 基因型和等位基因在病例组和对照组中的分布

组别	对照组	病例组	p	
CC	34 (32.7)	22 (23.3)	0.285	0.867
CT	48 (49.7)	37 (35.3)		
TT	18 (17.5)	12 (12.5)		

3 讨论

高发病率、高致残率、高复发率、高致死率已成为脑卒中的主要特点，其中缺血性脑卒中患者占比 60% ~ 80%^[12]。其发病快速且凶险，预后不良，对患者生命健康造成严重威胁^[13]，CD40 基因单核苷酸的 rs1883832C/T 基因型多态性与缺血性脑卒中病情发生发展密切相关^[14]，同时已有研究者证实携带 CD40rs1883832 T 等位的 PBMCs 在接受 Hcy 处理后表现出更为显著的损伤效果^[15]，这充分表明 CD40 基因单核苷酸 rs1883832C/T 中 T 等位基因在 IS 患者中更易表达，与缺血性脑卒中的发病关联性较强。

本实验通过两组 CD40-1C/T(rs1883832) 基因多态性，分析其在海南人群的基因型分布差异均无统计学意义 ($P < 0.05$)，同时在 FBG、Crea、UA、TC、TG、HDL、LDL 生化指标均无统计学意义 ($P > 0.05$)。该研究表明 CD40-1C/T(rs1883832) 基因可能并非海南人群中缺血性脑卒中相关发病基因。本研究仍存在一定局限性，样本数目相对较少对研究结果造成偏倚，仍需进一步扩大样本，选取可代表海南省区市进一步划分，多中心跨地域收集，使数据更具有代表性。

参考文献：

[1] 张玉东; 吴仁愿; 赵怡; 腾飞; 何毅; 陈冲; 王亮; 王忠诚. 基于网络药理学探讨红花治疗缺血性脑卒中的机制 [J]. 中国老年学杂志, 2023,(04):792-797.

[2] Meschia JF, Worrall BB, Rich SS. Genetic susceptibility to ischemic stroke[J]. Nat Rev Neurol. 2011,7(7):369-78.

[3] Farina M, Vieira LE, Buttari B, Profumo E, Saso L. The Nrf2 Pathway in Ischemic Stroke: A Review[J]. Molecules. 2021,26(16):5001.

[4] Mostafa MA, El-Nabiel LM, Fahmy NA, et al.

ACE Gene in Egyptian Ischemic Stroke Patients[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016;25(9):2167-2171.

[5] Kaur K, Uppal A, Kaur A. An exonic G894T variant of endothelial nitric oxide synthase gene as a risk factor for ischemic stroke in North Indians[J]. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2015;75(4):339-350.

[6] Akinyemi R, Tiwari HK, Arnett DK, et al. APOL1, CDKN2A/CDKN2B, and HDAC9 polymorphisms and small vessel ischemic stroke[J]. Acta Neurol Scand. 2018;137(1):133-141.

[7] Diakite B, Hamzi K, Slassi I, et al. G894T endothelial nitric oxide synthase polymorphism and ischemic stroke in Morocco[J]. Meta Gene. 2014;2:349-357.

[8] Lee BY, Chon J, Kim HS, et al. Association Between a Polymorphism in CASP3 and CASP9 Genes and Ischemic Stroke[J]. Ann Rehabil Med. 2017;41(2):197-203.

[9] TIANCXQINWC, LIL, et al. A common polymorphism in CD40K ozaksequence(1c/T) associated with acute coronary syndrome[J]. Biomed Pharmacother, 2010,64 (3) : 191-194.

[10] 段文慧, 李东芳, 张静雯等. CD40-1C/T 单核苷酸多态性与缺血性脑卒中易感性的研究进展 [G]. 中华临床医师杂志, 2018, 12 (2) : 123-126.

[11] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. 中华神经科杂志, 2015,48(4):246-257.

[12] 耿洪娇; 高阳; 姜俊杰; 谢雁鸣. 缺血性脑卒中复发风险评估工具及预测模型研究概述 [J]. 当代医学, 2022,28(19):186-190.

[13] 夏旺旭, 张明, 何永芳, 等. 缺血性脑卒中患者预后不良的影响因素及其风险预测列线图模型构建 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2022,30(10):51-56.

[14] 邓焱坤; 杨杰; 何柳平; 赵洪. CD40 基因型及血清水平与缺血性脑卒中易感性之间的关系研究探讨 [J]. 中国优生与志, 2017,(09):13-15.

[15] 张毕奎. CD40/CD40L 系统在脑梗死疾病发生发展中的作用及机制研究 [C]. 中南大学, 2013.

课题名称：2022 年海南医学院大学生创新创业训练项目。

项目名称：CD40-1C/T 基因多态性与海南汉族及黎族人群脑卒中遗传易感性研究。

项目编号：X202211810160。