

文章编号:1003-2754(2019)08-0697-04

# NOS3 基因多态性与血脂、缺血性脑卒中的相关性研究

朱 殊, 江顺福, 曹铭华, 吴明超, 毛元潮

**摘要:** 目的 为了探索 NOS3 基因 G894T 多态性与缺血性脑卒中的关联,以及和血脂的关系。方法 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP),琼脂糖凝胶电泳检测 100 例缺血性脑卒中患者和对照组 80 例健康志愿者的 NOS3 基因 G894T 多态性。自动生化分析仪检测血脂指标。结果 (1)卒中组与对照组相比 GT (27/100 和 22/120)和 TT(7/100 和 2/120)基因型分布频率较高( $P < 0.05$ )。T 等位基因分布在卒中组(20.5%)也显著高于对照组(10.83%)( $P < 0.01$ );(2)卒中组中 TT 基因型携带者血脂水平 TC 和 LDL-C 显著高于 GG 和 GT 基因型患者,而其他血脂水平无显著差异;(3)关联分析显示 TT 基因型与卒中患病风险具有相关性( $P < 0.05$ )。结论 NOS3 基因多态性与缺血性脑卒中发病存在关联,TT 基因型携带者患病风险高于 GG 基因型携带者。

**关键词:** 缺血性脑卒中; NOS3; 基因多态性; 血脂

中图分类号:R743.3 文献标识码:A

**The relationship among the polymorphism of NOS3 gene, ischemic stroke and blood lipids** SHU Zhu, JIANG Shun-fu, CAO Minghua, et al. (Department of Neurology, Jingdezhen First People's Hospital, Jingdezhen 333000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the association among the G894T polymorphism of NOS3 gene, ischemic stroke and blood lipids. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and agarose gel electrophoresis were used to detect the G894T polymorphism of NOS3 gene in 100 patients with ischemic stroke and 80 healthy volunteers. We use automatic biochemical analyzer to detect blood lipid levels. **Results** The frequency of GT (27/100 and 22/120) and TT (7/100 and 2/120) genotypes was higher in the stroke group than in the control group ( $P < 0.05$ ). The distribution of T allele was significantly higher in the stroke group (20.5%) than in the control group (10.83%) ( $P < 0.01$ ). In the stroke group, the TT genotype carriers had significantly higher levels of TC and LDL-C than the GG and GT genotype patients, and other blood lipid levels were not significantly different; Correlation analysis showed that TT genotype was associated with stroke risk ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The NOS3 gene polymorphism is associated with the onset of ischemic stroke, and the risk of TT genotype carriers is higher than that of GG genotype carriers.

**Key words:** Ischemic stroke; NOS3; Gene polymorphism; Blood lipid

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)又称脑梗死,是卒中最常见的类型。缺血性脑卒中作为全球人类死亡及致残的主要原因之一,严重威胁着人类的健康和社会经济的发展。随着医学的发展,卒中治疗手段虽然取得了一定进步,但研究显示,与1990年相比,2016年全球人群卒中终身风险却从22.8%上升至24.9%,相对增加8.9%<sup>[1]</sup>。作为卒中高发国家,我国每年因卒中引发上百万人死亡,数百万患者丧失劳动力,不仅给患者家庭带来巨大打击,还给国家造成一定损失。因此卒中防治工作,任重道远。近年来机制研究发现,NO参与调节血压、

血管生成以及抑制血小板聚集和白细胞粘附<sup>[2]</sup>,在卒中发病过程中具有重要保护意义,因而靶向NO治疗被给予厚望。NO的生成由一氧化氮合酶(NOS)调节,在3种NOS中,NOS3,又称内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS),因调节作用和表达分布广泛而备受关注。NOS3基因的多态性,如7号外显子

收稿日期:2019-06-12;修订日期:2019-08-01

基金项目:本研究隶属于江西省卫生计生委科技计划(No. 20184049)

作者单位:(景德镇市第一人民医院神经内科,江西景德镇333000)

通讯作者:曹铭华, E-mail:xiangfushui@126.com

G894T(rs1799983)将导致 NOS3 功能受损,NO 产生减少<sup>[3]</sup>,参与冠心病、心肌梗死以及卒中的发生发展<sup>[4-6]</sup>。然而,关于 NOS3 基因多态性与脑卒中的关联知之甚少,仍需深入探索。本研究利用临床样本,旨在应用基因检测技术,探讨 NOS3 多态性与缺血性脑卒中的相关性,为缺血性脑卒中中的一级预防以及治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 病例组:2017 年 10 月 - 2018 年 9 月期间在江西省景德镇市第一人民医院神经内科住院进行治疗的缺血性脑卒中患者 100 例。a. 纳入标准:2017 年 10 月 - 2018 年 9 月期间在江西省景德镇市第一人民医院神经内科进行住院治疗;经头部 CT 或 MRI 检测,满足缺血性脑卒中诊断标准,且病历信息完整。b. 排除标准:存在相似症状及体征疾病,如脑出血、瘤卒中、短暂性脑缺血发作和蛛网膜下腔出血,或先天残疾者如脊髓灰质炎、脑瘫患者等。对照组:同期本院所招募的健康志愿者 80 例,其年龄和性别比例与病例组相匹配。

1.2 血脂指标检测 受试者空腹后抽取静脉血,所有的血脂水平及载脂蛋白水平的检测工作均在江西省景德镇市第一人民医院临床检验中心完成,使用全自动生化分析仪进行血脂检测,该中心血脂测定质控合格。检测指标包括血总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、以及载脂蛋白 A1、B(ApoA1、ApoB)和脂蛋白 a[Lp(a)]。其中,血清 TC 和 TG 的检测采用酶法,HDL-C 和 LDL-C 采用酶联免疫一步法测定,ApoA1 和 ApoB 及 Lp(a)采用免疫透射比浊法。

1.3 DNA 提取及基因型检测 采集研究对象空腹静脉血 2 ml 于 EDTA 无菌抗凝管中,混匀, - 20 °C 冻存待提基因组 DNA,使用传统的酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。通过 PCR-RFLP 技术对 SNPs 基因型进行鉴定。引物序列:上游引物:5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3',下游引物:5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3',由 Invitrogen 公司合成。扩增体系为:PCR Mix(Thermo) 10 μl,引物 0.1 μmol 各 1 μl,DNA 模板 25-50 ng,用 ddH<sub>2</sub>O 补加至 20 μl。扩增条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,66 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环后,

再在 72 °C 下延伸 10 min。PCR 产物经 Dpn II 酶切后进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,其中 GG 等位基因因不被切割产生 248 bp 的一个片段,而 TT 等位基因可产生 160 bp 和 88 bp 的两个片段。

1.4 统计学方法 本研究利用 SPSS 21.0 软件做数据处理。对观察对象进行基因型和等位基因频率计算,确认其符合 Hardy-Weinberg 平衡( $\chi^2 = 5.09$ ,自由度为 2, $P > 0.05$ ),即该样本可作为遗传平衡群体的代表。数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )呈现,计量资料组间差异采用独立样本 *t* 检验,计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验,相关性分析利用 Logistics 回归分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 入组人群一般信息及生化指标分析 对照组与卒中组在年龄和性别上相匹配,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),而在血脂水平上,脑卒中组 TC、TG、HDL-C、以及 ApoB、Lp(a) 则显著高于对照组( $P < 0.05$  或 0.01),LDL-C、ApoA1 较对照组又显著降低( $P < 0.01$ )(见表 1)。表明缺血性脑卒中患者血脂水平存在异常变化。

2.2 NOS3 基因 rs1799983 位点基因型多态性分布 3 种基因型 GG、GT 和 TT,在对照组的人数分别是 64(80%)、15(18.75%)、1(1.25%),在卒中组 3 种基因型人数分别是 66(66%)、27(27%)、7(7%)。3 种基因型分布在两组之间有显著差异( $\chi^2 = 7.234$ ,df = 2, $P = 0.027$ )。等位基因 G 和 T,在对照组的人数分别是 143(89.375%)、17(10.625%)。在卒中组人数分别是 159(79.5%)、41(20.5%)。两组之间有差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.17$ ,df = 2, $P = 0.007$ )(见表 2)。该结果显示,NOS3 基因 rs1799983 位点基因型多态性可能与缺血性脑卒中患病相关,T 等位基因的携带,可能预示着患病风险的增加。

2.3 缺血性脑卒中患者 NOS3 不同基因型血脂指标 在缺血性脑卒中组中,TT 基因型患者外周血中 TC 含量显著高于 GG 和 GT 基因型患者( $P < 0.01$ ),且 GT 基因型患者较 GG 基因型外周血 TC 含量也有显著升高( $P < 0.05$ )。与 GG 和 GT 基因型患者比较,LDL-C 在 TT 基因型患者中也显著升高( $P < 0.01$ ),而在 GG 和 GT 基因型患者中无差

异。但是,携带不同基因型的患者,其外周血中 TG、HDL-C、ApoA1、ApoB、Lp(a) 含量之间无差异(见表3)。所以在不同基因型的缺血性脑卒中患者中,血脂指标 TC 和 LDL-C 之间有显著差异,其他指标无差异。此结果表明 NOS3 基因多态性可能与血脂中 TC 和 LDL-C 的含量有着关联。

表1 入组人群一般信息

临床特征	对照组	卒中组
例数	80	100
性别(男/女)	64/16	84/16
年龄	59.51 ± 6.39	60.05 ± 6.48
TC(mmol/L)	5.39 ± 0.56	5.96 ± 0.70*
TG(mmol/L)	1.25 ± 0.48	1.52 ± 0.81#
LDL-C(mmol/L)	3.05 ± 0.35	4.04 ± 0.26#
HDL-C(mmol/L)	0.99 ± 0.13	0.89 ± 0.14#
ApoA1(g/L)	1.43 ± 0.27	1.15 ± 0.09#
ApoB(g/L)	0.87 ± 0.25	1.46 ± 0.08#
Lp(a)(g/L)	136.41 ± 77.08	325.75 ± 14.98#

与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , # $P < 0.01$

表2 NOS3 基因 rs1799983 位点基因型多态性分布

组别	基因型 n(%)			差异*	等位基因频率 n(%)		差异#
	GG	GT	TT		G	T	
对照组	64	15(18.75)	1		214(89.375)	26(10.625)	
	-80		-1.25				
卒中组	66	27	7		159	41	
	-66	-27	-7		-79.5	-20.5	

注: \*  $P < 0.05$ , # $P < 0.01$

表3 缺血性脑卒中患者 NOS3 不同基因型血脂指标

血脂指标	基因型		
	GG	GT	TT
TC	5.80 ± 0.58	6.19 ± 0.71*	6.63 ± 1.16#&
TG	1.57 ± 0.78	1.44 ± 0.86	1.35 ± 0.87
LDL-C	3.98 ± 0.21	4.07 ± 0.30	4.40 ± 0.28#&
HDL-C	0.91 ± 0.11	0.85 ± 0.18	0.81 ± 0.18
ApoA1	1.15 ± 0.10	1.14 ± 0.09	1.14 ± 0.07
ApoB	1.46 ± 0.08	1.48 ± 0.09	1.44 ± 0.10
Lp(a)	324.6 ± 15.09	327.66 ± 15.31	329.70 ± 13.11

与 GG 组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 GG 组比较# $P < 0.01$ ; 与 GT 组比较& $P < 0.01$

2.4 NOS3 基因型多态性与缺血性脑卒中发病关联分析 与 NOS3 的 GG 纯合基因型相比较, TT 纯合基因携带者的卒中风险显著升高 ( $OR = 5.091$ , 95% 置信区间为 1.025 ~ 25.276,  $P = 0.047$ ); 而 GT 杂合基因携带者患卒中的风险较对照组有升高趋势, 但差异未达到显著性意义(见表4)。所以, NOS3 基因 SNP + G894T(rs1799983) 与缺血性脑卒中的患病风险存在阳性关联(见表4)。

表4 NOS3 基因型多态性与缺血性脑卒中发病关联分析

基因型	对照组 n(%)	卒中组 n(%)	OR	95% CI	P 值
GG	96(80)	66(66)	1		1.00(对照)
GT	22(18.3)	27(27)	1.785	(0.937 ~ 3.400)	0.078#
TT	2(1.7)	7(7)	5.091	(1.025 ~ 25.276)	0.047*

注: \*  $P < 0.05$ , # $P < 0.01$

### 3 讨论

目前研究认为 NOS3 功能性多态性位点有 3 个: T786C/rs2070744、eNOS 4a/b 和 G894T/rs1799983。其中, 外显子 G894T 和内含子 4a/b 多态性被认为在缺血性脑卒中的发病中具有重要倾向<sup>[4]</sup>。最近的荟萃研究显示, 亚洲人群的 4a/b 多态性的确与卒中患病相关, 然而 G894T 在不同分类情况下, 结果不一致, 仍存在分歧<sup>[7]</sup>。

所以, 本研究着手于 NOS3 的多肽位点 G894T/rs1799983。研究发现 NOS3 基因 rs1799983 的多态性, 与人群缺血性脑卒中的易感性相关: 与 GG 基因型携带者相比, GT 基因型换缺血性脑卒中概率有升高趋势, 而 TT 基因型携带者的易感度更是增加了 5.091 倍。此外, 我们还发现该基因的多态性变化, 还与缺血性脑卒中患者外周血 TC 和 LDL-C 这两种血脂指标的升高存在关联。

近几年研究发现 NOS3 多态性位点 G894T 中的 TT 基因型相对 GG 基因型, 可使 eNOS 表达下调, 主要因 eNOS 蛋白在 Caveolae (如 Cav-1) 上的定位改变, 导致其剪切依赖反应减弱, 活性发生改变, 使得 NO 产生减少<sup>[8]</sup>。因此, 研究者开始进一步深入研究 eNOS 的调节周期。最近研究发现, 在台湾汉族

人群中 eNOS G894T 和 Cav-1 14713A/29107A 的多态性与患缺血性脑卒中的危险性增加具有相关性<sup>[9]</sup>。此外,在印度人群中,研究者也发现 G894T 位点多态性与缺血性脑卒中具有关联<sup>[4]</sup>。上述两个研究均与本研究结果一致。

本研究首次报道 eNOS G894T 基因的多态性变化,还与缺血性脑卒中患者外周血 TC 和 LDL-C 这两种血脂指标的升高相关。血脂水平的升高作为动脉粥样硬化的重要危险因素,可能在一定程度上表明 G894T 位点的突变通过引起血脂中 TC 和 LDL-C 的升高,使得脑卒中发病危险系数增加,但其具体机制还有待进一步探索。关于血脂水平的变化,我们数据显示卒中患者血脂水平显著高于正常人,与有些研究者结果一致<sup>[10]</sup>。但也有早前研究结果报道卒中患者 HDL 显著降低,而 TC/HDL 显著升高<sup>[11]</sup>。

我们分析原因可能为:(1)所入选人群的饮食习惯具有差异,较之较早的研究,我们研究延迟十多年。在这十多年中,人们生活水平大幅提高,更加注重饮食;(2)与他人研究相比(516 例缺血性脑卒中患者,131 例非卒中患者),我们的研究人群样本较小。这也是本研究的主要局限之处;(3)吴征瑜的研究对照组为与病例组同期神经内科收治的非卒中患者,来自临床患者,而我们的对照组采集的是健康志愿者血脂信息。此外,有研究发现载脂蛋白 E 基因的多态性可影响血脂水平,可能是缺血性脑卒中的易感因子和危险因素<sup>[12]</sup>。受限研究对象数目,本研究未能进行亚组分析,比如性别和年龄段,以及卒中危险因素抽烟、饮酒等。因此,NOS3 多态性与缺血性脑卒中之间关联的确切结论,仍需后续开展多中心合作,大样本深入研究。

综上,该研究在一定程度上证明 eNOS G894T 突变的确与缺血性脑卒中的发生具有关联,且该位点的 TT 纯合突变,还引起血脂中 TC 和 LDL-C 的升高。联合其他研究,将有助于临床实践的指导,如利

用遗传多态性的检测预测缺血性脑卒中易感人群,进而达到精准医疗的个体化预防和治疗的目的。

### [参考文献]

- [1] Feigin VL, Nguyen G, Cercy K, et al. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016 [J]. *NEJM*, 2018, 379:2429-2437.
- [2] Endres M, Laufs U, Liao JK, et al. Targeting eNOS for stroke protection [J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27:283-289.
- [3] Oliveira-Paula GH, Riccardo L, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms [J]. *Gene*, 2016, 575 (3): 584-599.
- [4] 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, 75:339-350.
- [5] Saidi S, Mallat SG, Almawi WY, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T > C gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke [J]. *Acta Neurol Scand*, 2010, 121:114-119.
- [6] Kumar GR, Spurthi KM, Kumar GK, et al. Genetic polymorphisms of eNOS (-786T/C, intron 4b/4a & 894G/T) and its association with asymptomatic first degree relatives of coronary heart disease patients [J]. *Nitric Oxide*, 2016, 60:40-49.
- [7] Wang M, Jiang X, Wu W, et al. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in Asian population: a meta-analysis [J]. *Plos One*, 2012, 8(3): e60472.
- [8] McDonald DM, Alp NJ, Channon KM. Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial cells [J]. *Pharmacogenetics*, 2004, 14(12): 831-839.
- [9] Hann-Yeh S, Ming-Hua C, Yi-Hsien H, et al. Association of eNOS and Cav-1 gene polymorphisms with susceptibility risk of large artery atherosclerotic stroke [J]. *Plos One*, 2017, 12(3): e0174110.
- [10] 孙红光. 血脂异常对脑卒中发生的影响 [J]. *中国冶金工业医学杂志*, 2017, 1: 90-91.
- [11] 吴征瑜, 王亮, 张扬, 等. 缺血性脑卒中与血脂水平关系的初步分析 [J]. *中华脑血管病杂志*, 2009, 3(2): 14-19.
- [12] 韩瑞玲, 万自成, 孙思, 等. 武汉地区大动脉粥样硬化型缺血性脑卒中患者载脂蛋白 E 基因多态性分析 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2018, 13(10): 10-12.