

云南地区彝族哈尼族人群 *NINJ2* 基因多态性与脑卒中的相关性研究

张蕾, 孙浩, 赵忠, 梅茸, 刘江, 董曼丽

作者单位: 650032 云南省昆明市, 云南省第一人民医院神经内科(张蕾, 赵忠, 梅茸, 刘江, 董曼丽); 中国医学科学院医学生物学研究所(孙浩)

【摘要】目的 探讨云南地区彝族、哈尼族人群*NINJ2*基因多态性与脑卒中的相关性。**方法** 选择云南地区彝族脑卒中患者9例、健康对照者37例及哈尼族脑卒中患者7例、健康对照者89例, 采用聚合酶链式反应—限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测*NINJ2*基因两个SNP位点(rs12425791、rs11833579)的基因型, 比较各组间的基因型及等位基因分布频率是否存在差异。**结果** 彝族人群中两组比较, 基因型及等位基因频率无差异。哈尼族人群中两组比较, rs11833579等位基因(A, G)频率存在差异($p<0.05$), 基因型无差异, rs12425791基因型及等位基因频率均无差异。**结论** *NINJ2*基因的rs11833579位点的等位基因(A, G)频率与哈尼族人群脑卒中存在相关性, 其基因型以及rs12425791位点的等位基因频率及基因型与哈尼人群脑卒中无相关性。*NINJ2*基因两个SNP位点(rs12425791、rs11833579)与彝族人群的脑卒中无相关性。

【关键词】脑卒中; 基因多态性; 少数民族

Correlation between the *NINJ2* gene polymorphism and stroke in the Yi and Hani Nationality of Yunnan Province

ZHANG Lei*, SUN Hao, ZHAO Zhong, MEI Rong, LIU Jiang, DONG Man-li

*Department of Neurology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunan 650032, China

Abstract: Objective To explore the association between the *NINJ2* gene polymorphism and stroke in the Yi and Hani nationality of Yunnan region. Methods: We selected 9 cases of stroke and 37 healthy controls from the Yi nationality as well as 7 cases of stroke and 89 healthy controls from the Hani nationality in Yunnan Province. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to detect the genotypes of the 2 single nucleotide polymorphism (SPN) sites (rs12425791 and rs11833579) in *NINJ2* gene. The differences of genotypes and alleles frequencies of the 2 SNP sites between each 2 different groups were analyzed and compared. Results: There was no statistically significant deviation about the genotypes and allele frequencies of the 2 SPNs between healthy controls and stroke patients in the Yi nationality. There were statistically significant differences in the allele frequencies (A and G) of rs11833579 site between healthy controls and stroke patients in the Hani nationality ($P<0.05$), but no statistically significant difference was found in the genotypes of rs11833579 site as

【中图分类号】 R743.3; R741.02 **【文献标识码】** A

通讯作者: 张蕾, 650032 云南省昆明市, 云南省第一人民医院神经内科; 电话: 13759176858; E-mail: zlinda97@126.com

本课题由云南省卫生科技内设研究机构基金资助(基金编号: 2011WS0014)

well as the genotypes and allele frequencies of rs12425791 site between the above-mentioned two groups. Conclusions: The allele frequencies (A, G) of rs11833579 site in NINJ2 gene are correlated with stroke in the Hani nationality of Yunnan Province, whereas the genotypes of rs11833579 site as well as the allele frequencies and genotypes of rs12425791 site are not associated with stroke in the Yi nationality of Yunnan Province. There is no correlation between the SPN sites (rs12425791 and rs11833579) in NINJ2 gene and stroke in the Yi nationality of Yunnan Province.

Key words: Stroke; Gene polymorphism; Minority

脑卒中已经成为我国重要的致死致残疾病, 给社会带来极大的经济负担, 其预防显得尤为重要。从基因水平研究脑卒中相关基因或位点, 将对脑卒中易感患者的筛查与预防起到关键作用。研究发现, 位于 12 号染色体旁侧的 *NINJ2* 和 *WINK1* 基因间两个单核苷酸多态位点(single nucleotide polymorphisms, SNP)rs12425791 和 rs11833579 与白种人脑梗死有关联, 尤其与大动脉粥样硬化型脑梗死显著关联^[1]。在北美黑人、荷兰白种人和日本人群中进行的重复验证研究提示 rs12425791 位点可能是多种族动脉粥样硬化型脑梗死的遗传标记。国内陈廓等报道 rs11833579 位点与中国房山地区汉族人脑梗死易患性相关, 但与国外研究结论并不一致^[2]。尚贤金等报告, rs12425791 位点可能是福建汉族人动脉粥样硬化型脑梗死的遗传风险标记^[3]。现有的研究表明, *NINJ2* 与脑卒中的关系因种群不同而异。我们选取云南地区彝族及哈尼族人群进行相关研究, 旨在分析该基因的种群特性, 为我国少数民族人群的相关研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2013年1-6月分别在云南省石林县医院、墨江县医院收集彝族及哈尼族脑卒中患者, 对照组为同期体检的同一民族健康人群。其中, 彝族脑卒中患者9例, 男性7例, 女性2例, 年龄42~89岁, 平均60.3岁, 健康对照者37例, 男性29例, 女性8例, 年龄39~81岁, 平均60.5岁; 哈尼族脑卒中患者7例, 男性4例, 女性3例, 年龄62~78岁, 平均71.9岁, 健康对照者89例, 男性47例, 女性42例, 年龄39~78岁, 平均62.5岁。排除患有冠心病、周围血管病、血液系统疾病、肝肾功能异常、甲状腺疾病、严重感染、恶性肿瘤、糖尿病、慢性胃肠道疾病、妊娠者。研究均取得患者及健康对照者知情同意。

1.2 测量指标与方法 取研究对象清晨空腹血5ml入抗凝管, 离心后放入-20℃冰箱保持以供提取DNA用。聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析检测

SNPs基因型：利用Tiangen™血液基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA，引物合成均由上海捷瑞生物工程有限公司合成：(1)rs11833579多态性检测：上游引物5'-ACTTTCTGGAAAACCTTATTTTC-3'，下游引物5'-CTCTATTTCAGCCAGATGTATC-3'。[A/G]多态性反向延伸产物为CT,长度为36，延伸引物为TTTTTTTTTTTTTTATAGTTAATATTTTGCTTCTGG。PCR试剂来自TaKaRa公司（中国）。扩增条件为：DNA样本20ng, MgCl₂(25mM): 1.2μL; dNTP (2.5mM): 1.6μL; 正反向引物(5μM)各1μL; Taq酶(55U/μL): 0.16μL; 10×PCR Buffer: 2.5μL; 加水至总体积25μL。扩增条件为：94℃15秒，60℃30秒，72℃15秒，至第一步重复30个循环，72℃10分钟。对PCR产物进行纯化，用核酸外切酶ExoI（Fermentas，美国）及FastAP热敏磷酸酶（Fermentas，美国）去除剩余引物及dNTP。反应体系为PCR产物3ul; ExoI(20U/μL), 0.2μL; FastAP(1U/μL), 0.8μL; ExoI Buffer, 0.7μL; 加水补至7μL。反应条件为：37℃, 15min; 80℃, 15min。纯化产物根据SNaPshot® Multiplex Kit（Life technologies, 美国）试剂盒使用说明，加入各位点对应延伸引物进行单碱基测序反应。并在ABI3130（Life technologies, 美国）进行电泳，结果用GeneMapper软件（Life technologies, 美国）进行分析。(2)rs12425791多态性检测：上游引物5'-TGTCTGCATTCATAGTGAAGT-3'，下游引物5'-GAAGGCATCAGGGCTGGAGAA-3'。[A/G]多态性正向延伸产物为AG,长度为29，延伸引物为TTTTTTTTCTCTCTGAAGGATCCAGCCCC。其余测量过程同rs11833579。

1.3 统计方法 应用SPSS 16.0统计学软件进行分析卡方检验比较各组基因型频率和等位基因频率，位点基因型Hardy-Weinberg遗传平衡检验采用卡方检验。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 彝族脑卒中患者与对照组NINJ2基因多态性比较。彝族脑卒中患者与健康对照者NINJ2基因两个SNP位点(rs11833579、rs12425791)的等位基因（A/G）频率比较无显著差异（表1）；各基因型（A/A,A/G,G/G）频率比较无显著差异（表2）。病例组rs11833579位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检验 $\chi^2=0.111, p=0.739$ ，对照组rs11833579位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检

验 $\chi^2=0.826, p=0.363$ 。病例组rs12425791位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检验 $\chi^2=1.103, p=0.294$ ，对照组rs12425791位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检验 $\chi^2=0.026, p=0.873$ 。均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律。

表1 彝族脑卒中患者与对照组NINJ2基因多态性比较(等位基因频率)

| | rs11833579 | | rs12425791 | |
|----------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | A (freq) | G (freq) | A (freq) | G (freq) |
| 病例组 (2n=18) | 9 (0.500) | 9 (0.500) | 10 (0.556) | 8 (0.444) |
| 对照组 (2n=74) | 29 (0.392) | 45 (0.608) | 38 (0.514) | 36 (0.486) |
| 统计值 | $\chi^2=0.698$ $p=0.403$ | | $\chi^2=0.103$ $p=0.749$ | |

表2 彝族脑卒中患者与对照组NINJ2基因多态性比较(基因型)

| | rs11833579 | | | rs12425791 | | |
|---------------|-----------------------------|------------|------------|-----------------------------|-----------|-----------|
| | A/A (freq) | A/G (freq) | G/G (freq) | A/A(freq) | A/G(freq) | G/G(freq) |
| 病例组 (n=9) | 2(0.222) | 5(0.556) | 2(0.222) | 2(0.222) | 6(0.667) | 1(0.111) |
| 对照组 (n=37) | 7(0.189) | 15(0.405) | 15(0.405) | 10(0.270) | 18(0.486) | 9(0.243) |
| 统计值 | $\chi^2=1.073$ $p=0.586$ | | | $\chi^2=1.096$ $p=0.578$ | | |

2.2哈尼族脑卒中患者与对照组NINJ2基因多态性比较。哈尼族人群中脑卒中患者与健康对照者两组比较，rs11833579等位基因（A/G）频率存在差异（ $\chi^2=4.499, p=0.034$ ），病例组中G的频率大于A，（表3）；rs12425791基因型及等位基因频率均无差异（表4）。病例组rs11833579位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检验 $\chi^2=0.194, p=0.659$ ，对照组rs11833579位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检验 $\chi^2=0.022, p=0.881$ 。病例组rs12425791位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检验 $\chi^2=0.521, p=0.471$ ，对照组rs12425791位点基因型频率Hardy-Weinberg遗传平衡检验 $\chi^2=0.004, p=0.952$ 。均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律。

表3 哈尼族脑卒中患者与对照组NINJ2基因多态性比较(等位基因频率)

Table 3 Polymorphism (allele frequency) of NINJ2 of stroke and control in Hani nationality

| | rs11833579 | rs12425791 |
|--|------------|------------|
|--|------------|------------|

| | A (freq) | G (freq) | A (freq) | G (freq) |
|-----------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|------------|
| 病例组 (2n=7) | 2 (0.143) | 12 (0.857) | 11 (0.786) | 3 (0.214) |
| 对照组 (2n=178) | 77 (0.433) | 101 (0.567) | 113 (0.635) | 65 (0.365) |
| 统计值 | $\chi^2=4.499$ $p=0.034$ | | $\chi^2=1.292$ $p=0.256$ | |

表4 哈尼族脑卒中患者与对照组*NINJ2*基因多态性比较(基因型)

Table 4 Polymorphism (genotype) of *NINJ2* of stroke and control in Hani nationality

| | rs11833579 | | | rs12425791 | | |
|---------------|-----------------------------|------------|------------|-----------------------------|-----------|-----------|
| | A/A (freq) | A/G (freq) | G/G (freq) | A/A(freq) | A/G(freq) | G/G(freq) |
| 病例组 (n=7) | 0(0.000) | 2(0.286) | 5(0.714) | 4(0.571) | 3(0.429) | 0(0.000) |
| 对照组 (n=89) | 17(0.191) | 43(0.483) | 29(0.326) | 31(0.404) | 41(0.461) | 12(0.135) |
| 统计值 | $\chi^2=4.642$ $p=0.098$ | | | $\chi^2=1.392$ $p=0.499$ | | |

3 讨论

Hardy-Weinberg遗传平衡是指在符合下列条件时,即种群足够大,随机交配,没有突变、选择、迁移,没有遗传漂变时,群体内的一个位点上的基因型频率及基因频率将保持代代不变,处于遗传平衡状态。本研究进行Hardy-Weinberg遗传平衡检验, p 值均大于0.05,说明本研究对象对两位点基本为一连锁平衡群体,对照组具有群体代表性。

*NINJ2*基因编码的蛋白为膜蛋白:神经损伤诱导蛋白2(nerve injury induced protein 2, ninjurin2),介导细胞的黏附。*NINJ2*在外周神经损伤后再修复的过程中起着引导神经再生的作用^[4]。还有研究提示该蛋白表达水平可能影响中枢神经系统对缺血损伤的耐受机制^[5]。该基因作为脑卒中相关基因被许多学者重视,但现有的研究结果不尽一致。前述研究发现*NINJ2*基因2个SNP位点(rs12425791、rs11833579)与卒中发病相关,其小频率等位基因的存在将增加罹患卒中的风险,特别是增加罹患动脉粥样硬化性血栓性脑梗死亚型的风险^[1]。但该研究仅限于欧美白人及黑人中,未在其他人种中进行。我国台湾人群研究发现rs12425791及rs11833579位点是脑卒中相关死亡率及卒中复发的独立预测因子^[6]。另外的一项rs12425791及rs11833579位点基因多态性与缺血性脑卒中的Meta分析表明,在亚洲人群中,rs12425791基因多态性与缺血性卒中相关,rs11833579基因多态性与卒

中无相关性^[7]。我国的研究显示：中国汉族人群中*NINJ2*基因SNP位点rs12425791与卒中发病显著相关。其A等位基因增加罹患该病的风险。SNP位点rs11833579与卒中发病没有显著关系^[8]。但也有证据表明，在中国汉族人群中，上述两基因位点多态性与缺血性卒中无相关性^[9]。

我们选取了云南地区彝族及哈尼族脑卒中患者进行类似研究发现，仅rs11833579位点的等位基因（A<G）频率与哈尼族人群脑卒中存在相关性，其基因型与脑卒中无相关性。在彝族人群中则未发现上述两基因位点多态性与脑卒中的相关性。这一结果与前述亚洲人群以及汉族人群的研究结果不一致。造成这种不一致的原因是多方面的，第一，各研究对脑卒中的分类标准及对照的选择不一致；第二，实验设计及方法不一致；第三，种族和地域的差异；第四，*NINJ2*基因多态性可能只是脑卒中的生物学标志之一，致病基因与其多态性存在连锁不平衡，需要进一步研究其致病机制。可以肯定的是，*NINJ2*基因SNP位点多态性与脑卒中关系存在普遍的种群差异。另外还可能存地域的差异。正如许多疾病都是多因素（包括环境、地域、性别、遗传等）造成的^[10]，脑卒中也是一个多基因多因素疾病，基因和环境还可能相互作用。目前的报道大多从单一基因研究得出结论，一定存在偏颇。本文样本量亦较小，证据说服力不够强。还需要进一步扩大样本量，并综合遗传流行病学、分子流行病学研究，进行多基因-多环境因素以及基因环境相互作用的研究，以便更好地发现脑卒中的危险因素，指导脑卒中的预防和治疗。

参考文献

- [1] Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, et al. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med*, 2009, 360: 1718-1728.
- [2] 陈廓, 肖占森, 侯淑琴, 等. *NINJ2*基因多态性与房山地区汉族脑卒中易感强相关. *北京大学学报(医学版)*, 2010, 42: 498-502.
- [3] 尚贤金, 林毅, 方玲, 等. 染色体12p13两基因间多态与脑梗死的关系. *中华神经科杂志*, 2011, 44 (9): 613-618.
- [4] Araki T, Milbrandt J. *NXII*urin2, a novel homophilie adhesion molecule, is expressed in mature sensory and enteric neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci*, 2000, 20(1): 187-195.

- [5] Dimou L, Schnell L, Montani L, et al. Nogo-A-deficient mice reveal strain-dependent differences in axonal regeneration. *J Neurosci*, 2006, 26: 5591-5603.
- [6] Yi-Chen Hsieh, Sudha Seshadri, Wen-Ting Chung, et al. Association between genetic variant on chromosome 12p13 and stroke survival and recurrence: a one year prospective study in Taiwan. *Journal of Biomedical Science*, 2012, 19:1-8.
- [7] Gu Lian, Yan Yan, Long Jianxiong, et al. The rs11833579 and rs12425791 polymorphisms and risk of ischemic stroke in an Asian population: A meta-analysis. *Thrombosis Research*, 2012, 130: e95–e102.
- [8] 王欣, 张颖冬, 张宙. *NINJ2* 基因多态性及相关血清因子与卒中的相关性研究. *中华神经医学杂志*, 2011, 10 (2): 115-121.
- [9] Hu Dinga, Xin Tub, Yujun Xua, et al. No evidence for association of 12p13 SNPs rs11833579 and rs12425791 within *NINJ2* gene with ischemic stroke in Chinese Han population. *Atherosclerosis*, 2011, 216: 381–382.
- [10] 左描绘, 胡婷秀, 杨土保. 乳腺癌影响因素研究进展. *实用预防医学*, 2013, 20 (9): 1150-1153.