

胱硫醚 β 合成酶基因多态性与脑卒中相关性的研究

方乐 郭巍 郭英全

【摘要】目的 研究胱硫醚 β 合成酶(CBS)基因 T27796C 多态性与脑卒中的遗传相关性。**方法** 采用限制性内切酶片段长度多态性方法(PCR-RFLP),对 59 例脑卒中患者和 65 例健康人 CBS 基因 T27796C 多态性位点进行检测。**结果** 病例组 C 等位基因占 56.8%,T 等位基因占 43.2%;正常对照组 C 等位基因占 51.5%,T 等位基因占 48.5%;CBS 基因 T27796C 多态性位点与脑卒中无明显相关($P>0.05$)。脑卒中组与正常对照组之间 3 种等位基因型分布频率亦均无明显差异,其中 CC 为 35.6%比 24.6%;CT 为 42.4%比 53.8%;TT 为 22.0%比 21.5%; $P>0.05$ 。缺血性卒中和出血性卒中组间 C、T 等位基因及 3 种等位基因型分布频率也均无显著性差异(P 均 >0.05)。**结论** CBS 基因 T27796C 多态性位点与脑卒中无明显相关;T27796C 多态性位点与脑卒中的类型(缺血性或出血性)也无明显相关。

【关键词】 胱硫醚 β 合成酶; 基因多态性; 脑卒中

中图分类号: Q343.12;R743.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)03-0161-04

Relationship between polymorphisms of cystathionine beta - synthase gene and stroke FANG Le*, WU Wei, WU Ying - quan. * Department of Neurology, China - Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130031, Jilin, China

【Abstract】Objective To determine whether the T27796C mutation in cystathionine beta - synthase (CBS) gene is associated with stroke in Chinese. **Methods** The T27796C mutation in CBS gene of 59 cases with stroke and 65 health controls were detected by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphisms (PCR - RFLP). **Results** As this investigation shown, the frequencies of two alleles of T27796C mutation were followed: C was 56.8%, T was 43.2% in cases and C was 51.5%, T was 48.5% in controls. T27796C mutation had no obvious relativity to the stroke ($P>0.05$). There was no significant difference in frequency of alleles of this mutation between cases and controls (CC: 35.6% vs. 24.6%; CT: 42.4% vs. 53.8%; TT: 22.0% vs. 21.5%; all $P>0.05$). There was not obvious difference in frequency of alleles of this mutation between hemorrhagic patients and ischemic stroke patients (all $P>0.05$). **Conclusion** T27796C mutation in CBS is not obviously correlated with stroke and this mutation is not associated with categories of stroke.

【Key words】 cystathionine beta - synthase; polymorphism; stroke

CLC number: Q343.12;R743.3 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)03-0161-04

近年来,随着分子生物学技术的发展,寻求脑卒中易感基因的研究逐步深入。研究表明,约 20%~50% 的脑卒中患者有不同程度的同型半胱氨酸血症^[1];高同型半胱氨酸血症(homocystinuria)作为脑卒中的独立危险因素得到了广泛的重视^[2]。以分子生物学手段探讨同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢过程中关键物质的基因多态性与脑卒中有无相关性成为必要。胱硫醚 β 合成酶(cystathionine beta - synthase, CBS)是 Hcy 代谢中的关键酶。基因多态性可使酶活性下降或含量降低,引起 Hcy 在体内蓄积,导致高 Hcy 血症。现有的资料表明,

CBS 基因上存在着近百个单核苷酸多态性位点,但是关于 CBS 基因与脑卒中的关系国内尚未见报道。本研究拟采用限制性内切酶片段长度多态性方法(PCR-RFLP),在对 CBS T27796C 多态性位点与脑卒中的相关性进行研究的同时,进一步探讨它与脑梗死、脑出血之间的联系。

1 资料与方法

1.1 研究对象:

1.1.1 病例组:1999 年 1 月—2001 年 1 月,从在我科住院的患者中随机选取无 3 级以内血缘关系的脑卒中患者 59 例,其中男 40 例,女 19 例;平均年龄(59.91 ± 13.24)岁;缺血性卒中(IS)36 例,出血性卒中(HS)23 例。脑卒中的诊断经临床和头颅 CT 证实;排除肝、肾疾病及糖尿病、甲状腺疾病和恶性肿瘤等。

1.1.2 对照组:选取与病例组性别、年龄相匹配的

基金项目:吉林省卫生厅医学科研基金资助项目(2000-038)

作者单位:130031 长春,吉林大学中日联谊医院神经内科(方乐,郭英全);130021 长春,吉林大学第一医院神经外科(郭巍)

作者简介:方乐(1975-),女(汉族),吉林省人,博士研究生,主要从事急性脑卒中易感基因研究。

健康人 65 例;其中男 43 例,女 22 例;平均年龄 (59.44±9.23)岁。

1.2 研究方法:抽取受试者清晨空腹外周静脉血 2 ml,枸橼酸钠抗凝。常规酚氯仿抽提法提取 DNA。设计相应的 CBS 引物,上游序列为 5'-TCC ATT TAT ATG AAA TGT CC-3'(上海生工生物工程公司合成)。常规配制 25 μ l 反应体系(10 \times buffer 2.5 μ l,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l,10 mmol/L dNTP 1 μ l,10 pm 引物 1 μ l,TaqI 聚合酶 1 U,模板 DNA 60~80 ng)。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min, \times 38 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。质量分数为 2%的琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物,于扩增产物中加入 MspI 12 U,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中 3 h。内切酶消化产物,琼脂糖凝胶电泳,紫外线灯下判断酶切结果。

1.3 统计学方法:采用 SPSS 统计软件对相关数据进行 χ^2 检验及风险度分析;计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;以 $P<0.05$ 为显著性标准。

2 结果

2.1 CBS 基因 PCR-RFLP 分析结果:CBS 基因 PCR 片段长 323 bp(见图 1)。CBS 基因扩增片段经 MspI 限制性内切酶消化后,发生 T \rightarrow C 突变的基因片段将被切成两条片段(见图 2)。

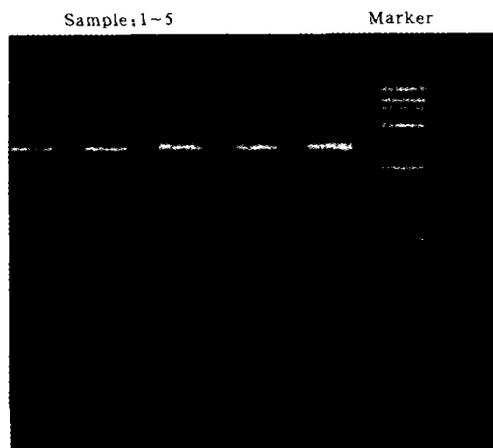


图 1 CBS 基因 PCR 结果电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis image of CBS gene

2.2 CBS 基因分析:

2.2.1 病例组与对照组 CBS 等位基因及基因型分布频率无明显差异(表 1)。CBS 突变型纯合子 CC 较未突变纯合子 TT,罹患脑卒中的相对风险度为 1.41,95%的可信区间(CI)为 0.52~3.83。CT 较未 TT 罹患脑卒中的相对风险度为 0.77,95%的 CI 为 0.31~1.94。CC 较 CT 罹患脑卒中的相对风险度为 1.84,95%的 CI 为 0.81~4.21。

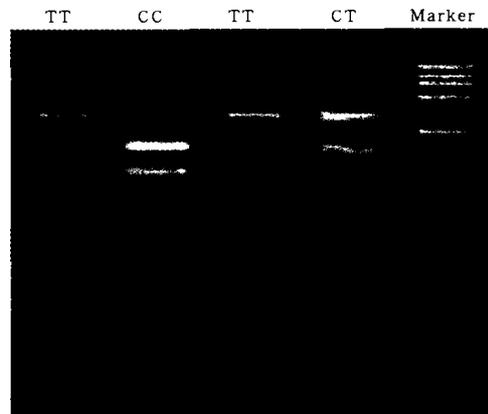


图 2 CBS 基因 PCR-RFLP 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis image of CBS gene with MspI digestion

表 1 病例组与正常对照组 CBS 等位基因型及等位基因频率的分布

Tab. 1 Frequencies of CBS gene in stroke and control groups 例(%)

组别	例数 (例)	CBS 等位基因型			CBS 等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
病例组	59	21(35.6)	25(42.4)	13(22.0)	67(56.8)	51(43.2)
正常对照组	65	16(24.6)	35(53.8)	14(21.5)	67(51.5)	63(48.5)
χ^2 值			2.10			0.68
P 值			>0.05			>0.05

2.2.2 IS 组与 HS 组 CBS 等位基因型及等位基因分布频率无明显差异(表 2)。

表 2 IS 组与 HS 组 CBS 等位基因型及等位基因频率的分布

Tab. 2 Frequencies of CBS gene in IS and HS groups 例(%)

组别	例数 (例)	等位基因型			CBS 等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
IS 组	36	13(36.1)	14(38.9)	9(25.0)	40(55.6)	32(44.4)
HS 组	23	8(34.8)	11(47.8)	4(17.4)	27(58.7)	19(41.3)
χ^2 值			0.64			0.11
P 值			>0.05			>0.05

3 讨论

自 1969 年 McCully 首先提出了高 Hcy 引起动脉硬化的理论^[3]之后,医务界开展了大量 Hcy 和血管疾病的相关性的研究。1998 年 Giles 等^[4]调查了 4 534 例美国成人中血浆 Hcy 水平和脑卒中的关系,得出高 Hcy 血症是血管疾病的独立危险因素。同年 Yoo 等^[5]进行了一项病例-对照研究,同样证明轻度高 Hcy 血症是脑梗死的独立危险因素,并提示了脑梗死患者的动脉粥样硬化严重程度。目前高 Hcy 血症引起血管损害的机制尚未完全阐明,但研究表明高 Hcy 血症具有细胞毒和基因毒作用:血浆 Hcy 水平增高可使内皮细胞片状脱落;Hcy 的巯基

促进过氧化氢的形成并抑制前列环素的合成;Hcy 可影响自由基,引起血管损害并加速动脉粥样硬化的过程;Hcy 增加血小板的消耗,血小板裂解后释放血小板源性的生长因子和别的物质促进病变进一步发展^[6-9]。Hcy 还能改变多个基因的表达,而促进动脉粥样硬化^[10,11]。Hcy 通过抑制前列环素生成并活化血栓前素而促进血栓形成;加强凝血因子 V 的活性,活化血栓素;抑制蛋白 C 的活化,而蛋白 C 能抑制内皮细胞相关的凝血因子 Va;Hcy 在体外能诱导组织因子的活化^[12-14]。

CBS 是同型半胱氨酸代谢过程中的关键酶。人类 CBS 基因位于 21 q 22.3 上,全长 28 046 bp,可编码 551 个氨基酸。Kraus 等^[15]通过基因组序列分析发现人类 CBS 基因含有 23 个外显子,片断长度从 42 bp 到 299 bp 不等。人类组织中可以提取 5 种长度不同的 CBS mRNA,序列研究认为,这 5 种 mRNA 仅在 5' 非翻译区上有差异。目前已发现 CBS 基因上至少存在着 80 个位点突变,多分布于第 3 和第 8 外显子上。本研究所选择的 T27796C 多态性位点位于 3'UTR 上,该位点由 C 取代 T 后产生了一个 MspI 限制性酶切位点。

CBS 基因所编码的蛋白 CBS 是人体内 Hcy 代谢中关键酶。人体内约一半 Hcy 通过 CBS 和胱硫醚 γ 裂解酶不可逆地生成半胱氨酸;另一半则通过再甲基化形成蛋氨酸^[16]。此外,Hcy 可与半胱氨酸形成二硫化物,使 Hcy 释放于细胞外,主要受 CBS 的影响^[17]。CBS 是一种分子质量为 63 ku 的同源四聚体,同时也是一种吡哆醛磷酸(pyridoxal phosphate, PLP)依赖性酶^[18,19]。CBS 基因的某些变异可以影响 CBS 的酶活性,如 CBS T833C 位点的突变使其编码的异亮氨酸代替了苏氨酸,导致酶蛋白分子中 PLP 结合位点的构像变化,从而影响酶与 PLP 结合。在临床上表现为对维生素 B₆ 治疗不敏感;G919A 突变使甘氨酸代替了丝氨酸,同样可影响酶的活性;第 4 外显子中的 22 bp 碱基丢失引起的无意突变可使酶活性完全丧失。因此,如果明确 CBS 基因的变异位点,就可以为高 Hcy 血症及相关的血管疾病的药物治疗提供靶向。

迄今为止,尚无充分证据表明 CBS 基因的某一突变位点与脑卒中密切相关。曾有人报道 CBS 基因的 T833C 位点和 C919A 突变位点与脑卒中相关^[6],并指出 MTHFR 基因与 CBS 基因突变和酶活性的降低,可能是高 Hcy 血症的产生和诱发脑卒中的一个重要原因。虽然 Kraus 等^[15]于 1998 年就提

出 3'UTR 上的一些位点突变或片断插入/缺失,可能使基因对某些有害序列易感。但本研究就 CBS 基因的 T27796C 突变位点进行的研究,结果显示无证据表明此突变位点与脑卒中密切相关。分析原因为本研究所选择的位点位于 3'UTR,其变异未能影响遗传信息的转录与表达,也就没有影响蛋白质的活性。

因 CBS 基因上有数十个突变位点,因此不能否认 CBS 为脑卒中的易感基因,尚需进一步研究。

参考文献:

- 1 Boushey C J, Beresford S A, Omenn G S, *et al*. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease, probable benefits of increasing folic acid intakes [J]. *J Am Med Assoc*, 1995, 274: 1049 - 1057.
- 2 Perry I J, Refsum H, Morris R W, *et al*. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle aged British men [J]. *Lancet*, 1995, 346: 1395 - 1398.
- 3 McCully K S. Vascular pathology of homocysteinemia; implications for the pathogenesis of arteriosclerosis [J]. *Am J Pathol*, 1969, 56: 111 - 128.
- 4 Giles W H, Croft J B, Greenlund K J, *et al*. Total homocyst(e)ine concentration and the likelihood of nonfatal stroke: results from the third national health and nutrition examination survey, 1988 - 1994 [J]. *Stroke*, 1998, 29: 2473 - 2477.
- 5 Yoo J H, Chung C S, Kang S S. Relation of plasma homocyst(e)ine to cerebral infarction and cerebral atherosclerosis [J]. *Stroke*, 1998, 29: 2478 - 2483.
- 6 Harker L A, Slichter S J, Scott C R, *et al*. Homocysteinemia vascular injury and arterial thrombosis [J]. *N Engl J Med*, 1974, 291: 537 - 543.
- 7 Sakai A, Yajima M, Nishio S. Cytoprotective effect of TRK - 100, a prostacyclin analogue, against chemical injuries in cultured human vascular endothelial cells [J]. *Life Sci*, 1990, 47: 711 - 719.
- 8 Wang J, Dudman N P, Wilcken D E, *et al*. Homocysteine catabolism: levels of 3 enzymes in cultured human vascular endothelial and their relevance to vascular disease [J]. *Arteriosclerosis*, 1992, 97: 97 - 106.
- 9 Stamler J S, Osborne J A, Jaraki O, *et al*. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium - derived relaxing factor and related oxides of nitrogen [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91: 308 - 318.
- 10 Miyata T, Kokame K, Agarwala K L, *et al*. Analysis of gene expression in homocysteine - injured vascular endothelial cells: demonstration of GRP78/BiP expression, cloning and characterization of a novel reducing agent - tunicamycin regulated gene [J]. *Semin Thromb Hemost*, 1998, 24(3): 285 - 291.
- 11 Kokame K, Kato H, Miyata T. Nonradioactive differential display cloning of genes induced by homocysteine in vascular endothelial cells [J]. *Methods*, 1998, 16: 434 - 443.
- 12 Rodgers G M, Kane W H. Activation of endogenous factor V by a homocysteine - induced vascular endothelial cell activator [J]. *J Clin Invest*, 1986, 77: 1909 - 1916.
- 13 Rodgers G M, Conn M T. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells [J]. *Blood*, 1990, 75: 895 - 901.

- 14 Fryer R H, Wilson B D, Gubler D B, *et al.* Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13: 1327 - 1333.
- 15 Kraus J P, Oliveriusova J, Sokolova J, *et al.* The human cystathionine beta - synthase (CBS) gene; complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms [J]. *Genomics*, 1998, 52: 312 - 324.
- 16 Finkelstein J D, Martin J J. Methionine metabolism in mammals; distribution of homocysteine between competing pathways [J]. *J Biol Chem*, 1984, 259: 9508 - 9513.
- 17 Storch K J, Wagner D A, Burke J F, *et al.* (1 - 13C; methyl - 2H3) - Methionine kinetics in humans; methionine conservation and cystine sparing [J]. *Am J Physiol*, 1990, 258: 790 - 798.
- 18 Camp V M, Chipponi J, Faraj B A, *et al.* Radioenzymatic assay for direct measurement of plasma pyridoxal 5' - phosphate [J]. *Clin Chem*, 1983, 29(4): 642 - 644.
- 19 Kery V, Bukovaskat G, Kraus J P, *et al.* Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5' - phosphate [J]. *J Bio Chem*, 1994, 269(41): 283 - 288.

(收稿日期: 2003 - 06 - 03 修回日期: 2004 - 02 - 22)

(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

开搏通舌下含服与乌拉地尔静脉用药治疗高血压急症对比分析

杨泽民 李宁榕 朱小玲

【关键词】 高血压急症; 开搏通; 乌拉地尔

中图分类号: R544.1 文献标识码: B 文章编号: 1003 - 0603(2004)03 - 0164 - 01

高血压急症病情严重, 致残或致死率高, 及时有效地治疗可以减少对心脑血管的损害, 降低脑出血和心力衰竭的发生率。为进一步探讨高血压急症患者在院前及急诊时方便、有效、安全的降压治疗, 我们于 1999 年 6 月—2002 年 8 月应用开搏通舌下含服与乌拉地尔静脉注射(静注)治疗高血压急症 90 例, 现将结果报告如下。

1 临床资料

1.1 病例情况: 90 例患者中男 58 例, 女 32 例; 年龄 35~66 岁, 平均(58.1±1.6)岁; 49 例为首发高血压病, 41 例为病史 2~20 年、病情剧烈变化的高血压患者; 诱因为自行停药降压药、精神创伤以及过度劳累等。全部患者收缩压 ≥ 180 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 舒张压 ≥ 120 mm Hg。

1.2 治疗方法: 90 例患者被随机分为 A、B 两组, 每组各 45 例, 两组的年龄、性别、病史、就诊时收缩压和舒张压进行比较, 均无显著差异 (P 均 > 0.05), 具有可比性。A 组为开搏通组, 舌下含服开搏通 12.5 mg。B 组为乌拉地尔组: 给予乌拉地尔 12.5~25.0 mg 静注, 再用乌拉地尔 50 mg 加入质量分数为 5% 的葡萄糖

液 500 ml (糖尿病患者用生理盐水) 以 4~6 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度静滴。记录治疗前及治疗后 15、30 min 的心率、血压、心电图及症状、体征的变化。

1.3 疗效标准: ①显效: 头痛、胸闷、心悸症状消失, 舒张压下降 ≥ 20 mm Hg; ②有效: 头痛、胸闷、心悸症状减轻, 舒张压下降 10~19 mm Hg; ③无效: 未达上述标准。显效加有效为总有效率。

1.4 统计学处理: 测定值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学分析方法采用 χ^2 检验和 t 检验。

2 结果

A 组治疗后 15 min 显效 10 例, 有效 18 例, 总有效 28 例 (62.2%); 治疗后 30 min 显效 22 例, 有效 20 例, 总有效 42 例 (93.3%)。B 组治疗后 15 min 显效 17 例, 有效 20 例, 总有效 37 例 (82.2%); 治疗后 30 min 显效 28 例, 有效 16 例, 总有效 44 例 (97.7%)。两组比较, 治疗后 15 min 总有效率虽有差异 ($P < 0.05$), 而治疗后 30 min 总有效率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

开搏通为血管紧张素转换酶抑制剂, 广泛用于高血压病的治疗, 因其起效快, 可通过舌下含服, 对高血压急症较其它同类药物有不可比拟的优越性。45 例用开搏通治疗后 15 和 30 min 总有效率分别为 62.2% 和 93.3%。乌拉地尔是一种新型的 α 肾上腺素能受体阻滞剂, 在

外周主要通过选择性抑制突触后 α_1 受体而扩张血管, 在中枢则可激活 5-羟色胺 1_A 受体抑制心血管运动中枢的交感反馈调节而扩张血管, 具有双重扩张血管作用而达到有效降压效果^[1]。45 例用乌拉地尔治疗后 15 和 30 min 总有效率分别为 82.2% 和 97.7%。说明开搏通舌下含服和乌拉地尔静注均能有效降低高血压急症的血压。开搏通舌下含服治疗后 15 min 效果虽比乌拉地尔稍差, 但治疗后 30 min 总有效率与乌拉地尔相比无显著性差异, 为院前急救、转诊、急诊未能及时建立静脉通路的高血压急症患者提供了一个有效给药途径^[2]。文献报道卡托普利舌下含服会受唾液不足致吸收障碍的影响^[3]。本研究选用开搏通舌下含服, 生物利用度较高, 用时药片湿润, 促进更快吸收, 效果更好。

参考文献:

- 叶海宁, 邓应宏. 压宁定在高血压急症中的应用 [J]. *临床医学*, 2000, 26(5): 55.
- 吴端源, 施群力, 吴奕真, 等. 卡托普利及地尔硫草含服治疗高血压急症的疗效观察 [J]. *中国危重病急救医学*, 1996, 8(6): 360 - 361.
- 薛文清, 乔玉奇, 齐献忠. 静脉用卡托普利治疗高血压急症患者 26 例疗效观察 [J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(1): 28.

(收稿日期: 2004 - 01 - 21)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 518049 广东省深圳市福田区梅林医院(杨泽民); 515041 广东省汕头市龙湖人民医院(李宁榕, 朱小玲)

作者简介: 杨泽民 (1959 -), 男 (汉族), 广东省汕头市人, 副主任医师。