

- glutamate excitotoxicity via activating BDNF/TrkB-dependent ERK pathway in rodent hippocampal neurons. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015, 60: 11-17.
- [13] Zeng Z, Leng T, Feng X, et al. Silencing TRPM7 in Mouse Cortical Astrocytes Impairs Cell Proliferation and Migration via ERK and JNK Signaling Pathways. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0119912.
- [14] Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, et al. Persistent CREB phosphorylation with protection of hippocampal CA1 pyramidal neurons following temporary occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Exp Neurol*, 2000, 161 (2): 462-471.
- [15] Kim SS, Jang SA, Seo SR. CREB-mediated Bcl-2 expression contributes to RCAN1 protection from hydrogen peroxide-induced neuronal death. *J Cell Biochem*, 2013, 114 (5): 1115-1123.

## · 论著 ·

### PPAR $\gamma$ 基因 C1431T 多态性及其与脑出血的关系

袁宁<sup>1,2</sup>, 许宏伟<sup>1</sup>, 刘学军<sup>2</sup>

1. 中南大学湘雅医院老年医学科, 湖南省长沙市 410008

2. 湖南省第二人民医院精神科, 湖南省长沙市 410007

**摘要:** 目的 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 基因 C1431T 多态性在人群中的分布及其与脑出血的关系。方法 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析法检测 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态性在脑出血组和正常对照组的分布情况。结果 PPAR $\gamma$ C1431T 基因型 CC、CT+TT 在脑出血患者组的分布频率分别为 43.8%、56.2%, C 等位基因频率为 70.1%, T 等位基因频率为 29.9%。CC、CT+TT 基因型在正常对照组中的分布频率分别为 62.1%、37.9%, C 等位基因频率为 79.8%, T 等位基因频率为 20.2%。脑出血组 PPAR $\gamma$  基因 C1431 T/X 基因型频率 ( $P=0.000$ ) 和 T 等位基因频率 ( $P=0.000$ ) 均显著高于对照组, 差异有统计学意义。结论 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态性可能与脑出血存在关联, T 等位基因可能与脑出血发病率呈正相关。

**关键词:** 脑出血; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ; 基因; 多态性

#### Relationship between PPAR $\gamma$ gene C1431T single nucleotide polymorphism and cerebral hemorrhage

YUAN Ning, XU Hong-Wei, LIU Xue-Jun. Department of Geriatric Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410016, China

Corresponding author: XU Hong-Wei, Email: xhw\_xiangya@sina.com

**Abstract: Objective** To study the distribution of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) gene C1431T single nucleotide polymorphism (SNP) in a Chinese population and its relationship with cerebral hemorrhage (CH). **Methods** The distribution of PPAR $\gamma$  gene SNP in the CH group and the control group was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Results** In the CH group, the frequencies of PPAR $\gamma$  gene C1431T genotypes, CC and CT+TT, were 43.8% and 56.2%, respectively, while the frequencies of the C allele and the T allele were 70.1% and 29.9%, respectively. In the control group, the frequencies of the genotypes, CC and CT+TT, were 62.1% and 37.9%, respectively, while the frequencies of the C allele and the T allele were 79.8% and 20.2%, respectively. Therefore, the frequencies of PPAR $\gamma$  gene C1431 T/X genotype and the T allele were significantly higher in the CH group than in the control group ( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ). **Conclusions** The PPAR $\gamma$  gene C1431T SNP may be associated with CH, and the C allele may be positively associated with the incidence of CH.

**Key words:** cerebral hemorrhage; peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ ; gene; polymorphism

收稿日期: 2015-04-27; 修回日期: 2015-06-23

作者简介: 袁宁(1982-), 女, 在读博士研究生, 主治医师, 主要从事脑血管疾病及精神疾病遗传学的研究。

通讯作者: 许宏伟, 男, 博士, 教授, 主要从事脑血管病的研究。E-mail: xhw\_xiangya@sina.com。

过氧化物酶体增殖物激活受体( peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR) 是一类由配体激活的核转录因子。目前已经发现的 PPAR 共有 3 种亚型, PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$  和 PPAR $\gamma$ , 近年来研究热点集中在 PPAR $\gamma$  上。最近发现, PPAR $\gamma$  几乎在所有参与动脉粥样硬化的细胞, 如血管内皮细胞( VEC)、血管平滑肌细胞( VSMC)、单核巨噬细胞等均有表达<sup>[1-3]</sup>, 且越是早期动脉粥样硬化斑块, 其表达频率或密度越高, 而在正常血管壁细胞中表达却很弱。Yen 等<sup>[4]</sup> 1997 年报道了 PPAR $\gamma$  的两个常见多态性: C1431T ( 又称为 C161T) 和 Pro12Ala。本文就 C1431T 多态性与脑出血的关系展开研究。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集湖南地区汉族人脑出血病人 162 例, 平均年龄( 60.96  $\pm$  9.17) 岁, 经临床及 CT 和( 或) 磁共振成像( MRI) 确诊为脑出血( 依照第四届全国脑血管病学术会议诊断标准), 排除心律失常、动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤等引起的脑出血; 排除肝、肾疾病、自身免疫性疾病、妊娠者、半年内曾有降脂治疗者。对照组为年龄、性别匹配的健康体检者共 203 例, 平均年龄( 61.27  $\pm$  7.80) 岁, 均为湖南地区汉族人, 无血缘关系。

### 1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态的 PCR 引物参照文献<sup>[5]</sup>, 序列为 PCR1: 上游引物: 5' GCTGAATGTGAAGCCCATTGAAGAC3', 下游 5' GAGCGGTGAAGACTCATGTCTGTC3', 由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 DNA 的制备及 PCR 扩增, 基因型分析

①基因组 DNA 的制备: 采外周静脉血 2~3 mL, 用明胶沉淀红细胞, 提取白细胞后用酚/氯仿法抽提基因组 DNA。②目的基因的 PCR 扩增反应体系组成: ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ l, 上游引物 1.0  $\mu$ l, 下游引物 1.0  $\mu$ l, 2  $\times$  Taq PCR Master Mix, 12.5  $\mu$ l, 模板( gDNA) 1.0  $\mu$ l, 总体积 25.0  $\mu$ l。③PPAR $\gamma$  基因 C1431T 的扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 34 个循环, 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。最后置于 4 $^{\circ}$ C 终止反应。④酶切产物识别: PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态性由内切酶 Nsp I 识别, 37 $^{\circ}$ C 消化 16 h。然后均用琼脂糖凝胶( 含溴化乙啶) 电泳分离, 紫外灯下照相后阅读。

### 1.3 统计学分析

全部资料均用 SPSS 13.0 软件包进行数据处理。研究对象 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度, 基因型和等位基因的组间比较采用  $\chi^2$  检验, 并以比值比( OR) 和 95% 可信区间( CI) 表示相对风险度。计量资料指标均进行正态性检验, 符合正态分布者两组间比较用 *t* 检验, 不符合正态分布数据采用非参数检验。所有的统计检验均为双侧概率检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑出血组与对照组的临床数据比较

将脑出血组患者与对照组进行一般数据的比较, 结果见表 1, 两组在年龄、性别、吸烟史、饮酒史方面差异均无统计学意义(  $P > 0.05$ ), 脑出血组中有高血压病史和糖尿病史者显著高于对照组(  $P < 0.05$ )。

表 1 脑出血组与对照组的一般数据比较 (  $\bar{x} \pm s$  )

一般数据	CH 组	对照组
年龄	60.96 $\pm$ 9.17	61.27 $\pm$ 7.80
BMI	22.63 $\pm$ 2.50	22.83 $\pm$ 2.84
性别( 男/女)	94/68	121/82
高血压病史( 有/无)	96/66*	46/157
糖尿病史( 有/无)	25/137*	12/191
吸烟史( 有/无)	42/120	48/155
饮酒史( 有/无)	29/133	34/169

注: \* 为与对照组相比较, 差异有统计学意义  $P < 0.05$ 。

### 2.2 PPAR $\gamma$ 基因 C1431T 多态位点 PCR 产物

PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态性可被内切酶 Nsp I 识别, PCR 产物被切成 149 bp 和 56 bp 两个片断, 为纯合子 TT 型; 野生 CC 型无酶切位点, 酶切后仅显示 205 bp 一个片断; 杂合子 CT 型显示为 205 bp、148 bp 和 57 bp 三个片断。

### 2.3 PPAR $\gamma$ 基因 C1431T 多态分布

脑出血组和对照组都有 CC、CT、TT 三种基因型, 在研究总人群中( CH 组 + 对照组) 中的频率分别为: 53.97%、43.01% 和 3.01%; 等位基因 C、T 的频率分别为 75.48% 和 24.52%。按 Hardy-Weinberg 平衡定律对研究人群进行了平衡检验(  $P > 0.05$ ), 证明我们选择的总研究人群基因频率能够代表群体的基因分布。

### 2.4 PPAR $\gamma$ 基因 C1431T 多态性与脑出血

将例数较少的 TT 基因型与 CT 基因型合并为 CT + TT 基因型, 记为 T/X 组。组间比较结果: 脑

出血组 PPAR $\gamma$  基因 1431 T/X 基因型频率 ( $\chi^2 = 25.057; P = 0.000$ ) 均显著高于对照组, 差异有统计学意义, 见表 2。

表 2 CH 组与对照组 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数( <i>n</i> )	基因型例数( % )		等位基因频率	
		CC	CT + TT	C	T
脑出血组	162	71( 43.8 )	85 + 6( 56.2 ) ▲	0.701	0.299*
对照组	203	126( 62.1 )	72 + 5( 37.9 )	0.798	0.202

注: \* 为与对照组相比较, 差异有统计学意义  $P = 0.000$ ; ▲ 为与对照组相比, 差异有统计学意义  $P = 0.000$ 。

### 3 讨论

PPAR 名称源于贝特类药物对啮齿类动物肝脏的过氧化物酶体增殖效应。PPAR $\alpha$  主要分布在代谢活性较高的组织中, 如肝、肾、心脏、肌肉组织。PPAR $\beta/\delta$  作用涵盖众多的生理学和病理学过程, 包括生殖、肥大细胞免疫、骨形成、皮肤和脑发育、创伤愈合、肿瘤发生等。PPAR $\gamma$  在脂肪组织、小肠和免疫系统内高度表达, 参与了体内多种生理及病理过程, 与脂肪细胞分化、炎症反应、凋亡、胰岛素抵抗、II 型糖尿病、肿瘤等有着密不可分的关系<sup>[6-7]</sup>。作为脂质和脂蛋白代谢的调节物, PPAR $\gamma$  可以调控血清胆固醇及甘油三酯的水平、促进脂肪细胞分化、影响巨噬细胞内胆固醇的稳态、稳定斑块、抑制血小板聚积从而影响动脉粥样硬化的发生和发展。PPAR $\gamma$  的配体不仅通过脂肪组织再摄取游离脂肪酸改善胰岛素的敏感性, 而且还抑制细胞因子分泌起抗炎作用。目前研究发现 PPAR $\gamma$  在脑缺血缺血性疾病中有对抗炎症介质、抗脂质过氧化反应、对抗神经元的兴奋性毒性等作用<sup>[8]</sup>。国内刘尊敬等<sup>[9]</sup>证实给予 PPAR $\gamma$  激活剂后可以明显减低中性粒细胞在缺血再灌注脑组织中的聚集和浸润程度, 从而减轻中性粒细胞介导的缺血性脑损伤。

本研究发现脑出血组 PPAR $\gamma$  基因 C1431 位点 T/X 基因型频率和 T 等位基因频率均显著高于对照组, 差异有统计学意义。我们推测 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态性可能与中国湖南汉族人群脑出血存在关联, T 等位基因可能与脑出血呈正相关。从结构角度分析, PPAR $\gamma$  基因 1431 位点发生 C $\rightarrow$ T 变异后, 形态可能发生改变, 使其易于和配体结合, 而发挥其在血脂、血糖及动脉粥样硬化中的作用, 继而影响脑出血的发生。目前对 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态的研究结果不尽一致。一些研究显示位点 C1431T 多态是高血压、糖尿病及冠心病的保护因素, 国内张扬等<sup>[10]</sup>等通过研究发现高血压

患者 T 等位基因频率低于对照组, 差异有统计学意义。Liu 等<sup>[11]</sup>证明 C1431T 变异能降低冠心病发病风险且下调血浆炎症介质 MMP-9 和 TNF- $\alpha$ , 这种保护作用独立于其危险因素糖尿病和 BMI, 可能直接参与血管壁的炎症反应。进一步研究证实不管其是否合并有糖尿病, 携带 T 等位基因的人群发生血脂紊乱及罹患冠状动脉粥样硬化性疾病的风险显著低于 CC 纯合子的人群<sup>[12,13]</sup>。本研究是国内首次报道 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态性与脑出血的关系, 研究结果与其他的存在矛盾, 可能因脑出血是一种复杂性疾病, 虽与高血压、糖尿病、冠心病等存在关联, 但病理机制也存在不同; 另外与试验人群的差异包括遗传背景、纳入及排除标准、饮食、环境等因素有关, 此外也与抽样误差、样本量大小等有关联。由于本研究使用样本量较少, 且病例来源仅限于中国湖南地区, 要明确 PPAR $\gamma$  基因 C1431T 多态性与脑出血的关系及其确切机制, 需要在尽量大的范围内进一步大样本多中心深入研究并增加相关指标的检测。

### 参 考 文 献

- [1] Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammatory and resolution. *Prog Lipid Res*, 2011, 50 (1): 35-51.
- [2] 杨大春, 马双陶, 杨永健, 等. 急性心肌梗死患者单核细胞 PPAR $\delta$ 、MCP-1 和 MMP-9 表达及其与冠状动脉病变关系. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2010, 24(11): 1048-1051.
- [3] 陈玲, 岳黎明, 杨辉. 缬沙坦对高血压病患者血清过氧化物酶体增生物激活受体- $\gamma$  及血红素氧合酶-1 水平的影晌及其肾脏保护作用. *临床医学*, 2011, 31(11): 7-9.
- [4] Yen CJ, Beamer BA, Negri C, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Bio-*

- chem Biophys Res Commun, 1997, 241(2): 270-274.
- [5] Arashiro R, Katsuren K, Fukuyama S, et al. Effect of Trp64Arg mutation of the  $\beta 3$ -adrenergic receptor gene and C161T substitution of the peroxisome proliferator activated receptor gene on obesity in Japanese children. *Pediatr Int*, 2003, 45: 135-141.
- [6] Olefsky JM. Find all citations by this author ( default) Or filter your current search Glass CK. Macrophage, inflammation, and insulin resistance. *Ann Rev Physiol*, 2010, 72: 219-246.
- [7] Komatsu A, Node K. Effects of PPAR gamma agonist on dyslipidemia and atherosclerosis. *Nippon Rinsho*, 2010, 68(2): 294-298.
- [8] 王法臣, 袁绍纪, 冯华. 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  及配体在脑缺氧缺血性疾病中的作用. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36(6): 507-510.
- [9] 刘尊敬, 杨期东, 刘运海, 等. 过氧化小体增殖剂激活型受体  $\gamma$  激活剂对缺血再灌注脑组织的保护作用及炎症机制分析. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2007, 34(2): 121-124.
- [10] 张扬, 邹晓驿, 张双月, 等. 过氧化物酶增殖物活化受体  $\gamma$ C161 $\rightarrow$ T 基因多态性与原发性高血压相关研究. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2014, 28(2): 134-136.
- [11] Liu Y, Yuan ZY, Liu Y, et al. PPAR $\gamma$  gene C161T substitution is associated with reduced risk of coronary artery disease and decreased proinflammatory cytokine expression. *Am Heart J*, 2007, 154: 718-724.
- [12] Wu Z, Lou Y, Jin W, et al. The C161T Polymorphism in the peroxisome proliferators-activated receptor gamma gene ( PPAR $\gamma$ ) is associated with risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *Mol Boil Rep*, 2013, 40(4): 3101-3112.
- [13] Yilmaz-Aydogan H, Kurnaz O, Kurt O, et al. Effects of the PPAR $\gamma$  P12A and C161T gene variants on serum lipids in coronary heart disease patients with and without Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem*, 2011, 358(1-2): 355-363.

## 《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于1974年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)”。

《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价13元,全年定价78元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金,保证刊物的健康发展,本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务,并长期向各级医疗单位征集协办单位,具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail地址:jinn@vip.163.com,网址:http://www.jinn.org.cn/。