

转化生长因子 β_1 及转化生长因子 β 受体基因多态性与脑动静脉畸形患者脑出血的关系研究

魏健强, 李健, 薛婷婷, 马剑

【摘要】 目的 探讨转化生长因子 β_1 (TGF β_1) 及转化生长因子 β 受体 (TGF β R2) 基因多态性与脑动静脉畸形患者脑出血的关系。方法 选取 2012 年 4 月—2015 年 4 月延安大学附属医院收治的脑动静脉畸形患者 106 例, 根据脑出血发生情况分为脑出血组 46 例与非脑出血组 60 例。采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术 (PCR-RFLP) 检测 TGF β_1 、TGF β R2 基因多态性, 脑动静脉畸形患者脑出血发生风险的分析采用多因素 logistic 回归分析。结果 两组患者 TGF β_1 基因型及等位基因频率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组患者 TGF β R2 基因型比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 脑出血组患者 TGF β R2 基因 G 等位基因频率高于非脑出血组 ($P < 0.05$)。多因素 logistic 回归分析结果显示, 携带 TGF β R2 基因 G 等位基因的脑动静脉畸形患者脑出血发生风险是非携带者的 3.312 倍 [$RR = 3.312, 95\% CI (1.476, 7.624), P < 0.05$]。结论 携带 TGF β R2 基因 G 等位基因的脑动静脉畸形患者脑出血发生风险增高, 但不受 TGF β_1 基因多态性的影响

【关键词】 颅内动静脉畸形; 转化生长因子 β_1 ; 受体, 转化生长因子 β ; 多态性, 单核苷酸; 脑出血

【中图分类号】 R 743.4 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2016.08.010

魏健强, 李健, 薛婷婷, 等. 转化生长因子 β_1 及转化生长因子 β 受体基因多态性与脑动静脉畸形患者脑出血的关系研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2016, 24 (8): 39-41. [www.syxnf.net]

WEI J Q, LI J, XUE T T, et al. Relationship between gene polymorphism of TGF β_1 , TGF β R2 and cerebral hemorrhage in patients with intracranial arteriovenous malformations [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2016, 24 (8): 39-41.

Relationship between Gene Polymorphism of TGF β_1 , TGF β R2 and Cerebral Hemorrhage in Patients with Intracranial Arteriovenous Malformations WEI Jian - qiang, LI Jian, XUE Ting - ting, MA Jian. Department of Cardiac - cerebral Vascular Disease, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China

Corresponding author: LI Jian, Department of Cardiac - cerebral Vascular Disease, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China; E-mail: 2059025965@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between gene polymorphism of TGF β_1 , TGF β R2 and cerebral hemorrhage in patients with intracranial arteriovenous malformations. **Methods** A total of 106 patients with intracranial arteriovenous malformations were selected in the Affiliated Hospital of Yan'an University from April 2012 to April 2015, and they were divided into A group (complicated with cerebral hemorrhage, $n = 46$) and B group (did not complicate with cerebral hemorrhage, $n = 60$) according to the incidence of cerebral hemorrhage. PCR-RFLP was used to detect the gene polymorphism of TGF β_1 and TGF β R2, and multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk of cerebral hemorrhage in patients with intracranial arteriovenous malformations. **Results** No statistically significant differences of genotype or allele frequency of TGF β_1 was found between the two groups, nor was genotype of TGF β R2 ($P > 0.05$); while G allele frequency of TGF β R2 of A group was statistically significantly higher than that of B group ($P < 0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that, occurrence risk of cerebral hemorrhage of intracranial arteriovenous malformations patients with G allele of TGF β R2 was 3.312 times of patients without G allele of TGF β R2 [$RR = 3.312, 95\% CI (1.476, 7.624), P < 0.05$]. **Conclusion** G allele of TGF β R2 can increase the occurrence risk of intracranial arteriovenous malformations, while it is not affected by gene polymorphism of TGF β_1 .

【Key words】 Intracranial arteriovenous malformations; Transforming growth factor beta1; Receptors, transforming growth factor beta; Polymorphism, single nucleotide; Cerebral hemorrhage

基金项目: 国家自然科学基金 (81341112)

作者单位: 716000 陕西省延安市, 延安大学附属医院心脑血管专科病区

通信作者: 李健, 716000 陕西省延安市, 延安大学附属医院心脑血管专科病区; E-mail: 2059025965@qq.com

目前, 临床通常采用病灶切除术治疗脑动静脉畸形, 但患者术后脑出血发生率较高, 有学者认为脑动静脉畸形病灶中过度的血管重建是导致脑出血的重要原因^[1], 准确评估脑动静脉畸形患者预后及脑出血发生风险具有重要的临床意义^[2]。转化生长因子 β_1 (TGF β_1)

是一种促血管生成因子, 近年研究表明, TGFβ₁ 及转化生长因子 β 受体 (TGFβR2) 基因多态性是多种遗传性脑血管疾病及出血性疾病的危险因素^[3], 但目前其对脑动静脉畸形患者脑出血的影响尚不明确。本研究旨在探讨 TGFβ₁ 及 TGFβR2 基因多态性与脑动静脉畸形患者脑出血的关系, 以期从遗传学角度为脑动静脉畸形患者脑出血的防治提供参考, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 4 月—2015 年 4 月延安大学附属医院收治的脑动静脉畸形患者 106 例, 均依据临床表现、颅脑 CT 或 MRI 检查确诊, 并对本研究知情同意; 排除有脑出血家族史、肝肾疾病、心血管疾病病史患者等。根据脑出血发生情况将所有患者分为脑出血组 46 例与非脑出血组 60 例。两组患者性别、年龄、吸烟率及 Spetzler - Martin 分级比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 见表 1), 具有可比性。

表 1 两组患者一般资料比较

Table 1 Comparison of general information between the two groups. Table with columns for Group, Number, Gender, Age, Smoking, and Spetzler-Martin grade (I-V).

注: * 为 t 值

1.2 方法

1.2.1 标本采集方法 采集两组患者空腹外周静脉血 2 ml, 采用二水乙二胺四乙酸抗凝并置于 -80 °C 环境中备用、待测。

1.2.2 引物合成方法 采用德国 Qiagen 公司生产的全血 DNA 试剂盒提取 DNA, 采用美国 ABI 公司生产的 7300PCR 仪进行扩增, 以 β-actin 为内参照 (基因库序列号: AY128650)。采用 Primer 5.0 软件进行引物设计, 通过 http://www.ncbi.nlm.nih.gov GeneBank 检索发现 TGFβ₁ 基因、TGFβR2 基因多态性位点分别为 rs1800469、rs3087465, 分别位于上游 509 bp、875 bp 处。采用上海生工生物工程技术有限公司合成的正向引物作为测序引物, 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术 (PCR-RFLP) 检测 TGFβ₁、TGFβR2 基因多态性, TGFβ₁、TGFβR2 基因上下游引物及扩增片段见表 2。

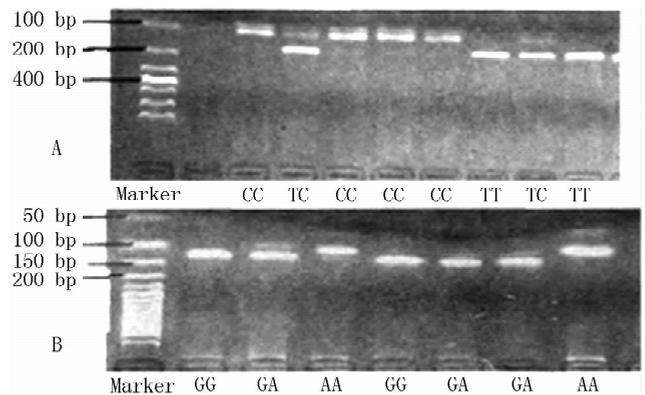
1.2.3 聚合酶链式反应 (PCR) 采用 25 μl 反应体系, 包含 1 U/μl Tag 酶 1 μl 和 200 ng DNA 模板。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, TGFβ₁、TGFβR2 分别在 60 °C、58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 共进行 38 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min; 提取 PCR 扩增产物 6 μl, 160 V 电压下在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳

10 min; 采用限制性内切酶 Bsu361 酶切 TGFβ₁ 的 PCR 产物, 采用限制性内切酶 RsaI 酶切 TGFβR2 的 PCR 产物; 提取 PCR 酶切产物 10 μl, 150V 电压下在 3.0% 琼脂糖凝胶上电泳 20 min; 采用凝胶成像系统拍摄存图后观察电泳条带位置及数目。TGFβ₁、TGFβR2 扩增产物分别有 3 个片段, 前者分别为 150 bp、89 bp、61 bp, 后者分别为 124 bp、99 bp、25 bp (见图 1); 前者基因型分别为 TT、TC、CC, 后者基因型分别为 GG、GA、AA; 前者碱基包括 T 和 C, 后者碱基包括 G 和 A。

表 2 TGFβ₁、TGFβR2 上下游引物及扩增片段

Table 2 Designed and synthesized primer of TGFβ₁ and TGFβR2. Table with columns for Gene, Upstream primer, Downstream primer, and Amplification fragment (bp).

注: TGFβ₁ = 转化生长因子 β₁, TGFβR2 = 转化生长因子 β 受体



注: A 为 TGFβ₁, B 为 TGFβR2; TGFβ₁ = 转化生长因子 β₁, TGFβR2 = 转化生长因子 β 受体

图 1 TGFβ₁、TGFβR2 PCR 扩增及电泳结果

Figure 1 PCR amplification and electrophoretic results of TGFβ₁ and TGFβR2

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 (x̄ ± s) 表示, 采用两独立样本 t 检验; 计数资料采用 χ² 检验; 脑动静脉畸形患者脑出血发生风险的分析采用多因素 logistic 回归分析, 以 RR 及其 95% CI 表示。检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 TGFβ₁ 基因型及等位基因频率 两组患者 TGFβ₁ 基因型及等位基因频率比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05, 见表 3)。

2.2 TGFβR2 基因型及等位基因分布 两组患者 TGFβR2 基因型比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); 脑出血组患者 TGFβR2 基因 G 等位基因频率高于非脑出血组, 差异有统计学意义 (P < 0.05, 见表 4)。多因素

logistic 回归分析结果显示, 携带 TGF β 2 基因 G 等位基因的脑动静脉畸形患者脑出血发生风险是非携带者的 3.312 倍 [RR = 3.312, 95% CI (1.476, 7.624), $P < 0.05$]。

表 3 两组患者 TGF β 1 基因型及等位基因频率比较 (%)

Table 3 Comparison of genotype and allele frequency of TGF β 1 between the two groups

组别	例数	基因型			等位基因	
		TT	TC	CC	T	C
脑出血组	46	86	86	26	130	50
非脑出血组	60	88	104	8	140	60
χ^2 值		2.71			4.61	
P 值		>0.05			>0.05	

表 4 两组患者 TGF β 2 基因型及等位基因频率比较 (%)

Table 4 Comparison of genotype and allele frequency of TGF β 2 between the two groups

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	GA	GG	A	G
脑出血组	46	6	26	166	20	180
非脑出血组	60	26	18	156	34	166
χ^2 值		5.35			11.14	
P 值		>0.05			<0.05	

3 讨论

TGF β 1 是转化生长因子 β (TGF β) 的异构体, 位于染色体 19q13.1.2 上, 全长 23.56 kbp, 包含 6 个内含子和 7 个外显子。TGF β 1 包含多个基因多态性位点, 而位于启动子区上游的 TGF β 1 位点基因多态性可影响 TGF β 1 的表达, 进而参与脑出血的发生、发展及转归。但目前 TGF β 1 基因多态性导致脑出血的作用机制尚不明确, 尤其是在脑动静脉畸形患者中^[4-6]。TGF β 2 是 TGF β 的主要受体, 位于启动子区上游的 TGF β 2 位点基因多态性可提高其转录活性, 进而影响 TGF β 2 的表达, 而 TGF β 2 表达水平可影响 TGF β 1 功能^[7-12]。本研究从遗传学角度探讨 TGF β 1 及 TGF β 2 基因多态性与脑动静脉畸形患者脑出血的关系, 旨在为脑动静脉畸形患者脑出血的有效防治提供参考。

本研究结果显示, 两组患者 TGF β 1 基因型及等位基因频率间、TGF β 2 基因型间无明显差异, 而脑出血组患者 TGF β 2 基因 G 等位频率高于非脑出血组; 多因素 logistic 回归分析结果, 携带 TGF β 2 基因 G 等位基因的脑动静脉畸形患者脑出血发生风险是非携带者的 3.312 倍, 提示携带 TGF β 2 基因 G 等位基因的脑动静脉畸形患者脑出血发生风险增高, 但不受 TGF β 1 基因多态性影响。但目前有关 TGF β 1 及 TGF β 2 基因多态性与脑动静脉畸形患者脑出血关系的研究报道较为少见, 本研究纳入的样本量及观察指标有限, 限于临床条件未进行相关因素的校正, 仍需在今后的研究中进一步完善。

综上所述, 本研究从遗传学角度探讨了 TGF β 1 及 TGF β 2 基因多态性与脑动静脉畸形患者脑出血的关系, 发现携带 TGF β 2 基因 G 等位基因的脑动静脉畸形患者脑出血发生风险增高, 但不受 TGF β 1 基因多态性影响, 应引起临床重视。但考虑到基因多态性的种群、地区差异及脑出血危险因素多样性, 本研究所得结果及结论仍需进一步验证, 而 TGF β 1 及 TGF β 2 基因多态性导致脑动静脉畸形患者脑出血的具体作用机制也需深入探讨。

作者贡献: 魏健强进行实验设计与实施、资料收集整理、撰写论文、成文并对文章负责; 李健、薛婷婷进行实验实施、评估、资料收集; 马剑进行质量控制及审校。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 樊骏. 低级别幕上脑动静脉畸形的临床治疗方式选择及疗效比较 [J]. 中外医疗, 2015, 34 (28): 87-88.
- [2] 李志平, 黄小山. 脑动静脉畸形栓塞术后颅内出血影响因素的多元回归分析 [J]. 河南外科学杂志, 2015, 4 (4): 3-6.
- [3] 陈研修, 张斌, 陈德哲, 等. 脑动静脉畸形患者癫痫发作的相关因素分析 [J]. 卒中与神经疾病, 2015, 10 (6): 328-331.
- [4] 曾涛, 陈衍城, 秦智勇, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对人脑动静脉畸形血管平滑肌细胞增殖和表达骨桥蛋白的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24 (2): 382-383, 387.
- [5] 郑海军, 姜晓辉, 王朝晖, 等. 介入栓塞术对于脑动静脉畸形患者病灶部位相关细胞因子的影响研究 [J]. 浙江创伤外科, 2015, 20 (5): 841-843.
- [6] 李雪松, 江楠, 郭少雷, 等. 脑动静脉畸形显微手术后周围脑组织血流变化及病理特征 [J]. 中华显微外科杂志, 2009, 32 (2): 130-132, 插 7.
- [7] 山常国, 蔡林波, 洪伟平, 等. 立体定向放射外科治疗脑动静脉畸形的效果观察 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2014, 22 (6): 86-87.
- [8] 秦梓良. 三维数字减影血管造影与磁共振成像图像融合对脑动静脉畸形术的评估价值 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2013, 21 (7): 69-70.
- [9] ALARAJ A, SHAKUR S F, Amin - Hanjani S, et al. Changes in wall shear stress of cerebral arteriovenous malformation feeder arteries after embolization and surgery [J]. Stroke, 2015, 46 (5): 1216-1220.
- [10] SHAKUR S F, AMIN - HANJANI S, MOSTAFA H, et al. Hemodynamic characteristics of cerebral arteriovenous malformation feeder vessels with and without aneurysms [J]. Stroke, 2015, 46 (7): 1997-1999.
- [11] KHAGHANI S A, DENYER M C T, YOUSEFFI M. Effect of Transforming Growth Factor - β 1 in Biological Regulation of Primary Chondrocyte [J]. American Journal of Biomedical Engineering, 2012, 2 (1): 1-8.
- [12] AHMADIAFSHAR A, TAYMOURZADEH B, SHEIKHI A, et al. Evaluation of IL10, TGF - B and Specific IgE and IgG Levels during Sublingual Rye Grass Immunotherapy Executive Editors Allergy & Therapy [J]. Allergy & Therapy, 2013, 4 (2): 1-4.

(收稿日期: 2016-04-05; 修回日期: 2016-07-20)

(本文编辑: 鹿飞飞)