

· 论 著 ·

SELS、LRRFIP1 基因多态性与缺血性脑卒中易感性研究

关红军¹, 鲁俊华², 郭毓鹏¹, 董晶¹, 荣胜忠¹, 牛莹莹¹, 姚立岩¹, 靳革¹, 李晓霞¹

1. 牡丹江医学院公共卫生学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院护理学院, 黑龙江 牡丹江 157011

摘要: **目的** 探讨硒蛋白 S (SELS) 基因、富含亮氨酸重复序列相互作用蛋白 1 (LRRFIP1) 基因多态性与缺血性脑卒中的关系。**方法** 选择 2003 年 9 月至 2013 年 6 月 239 例缺血性脑卒中新发病例(病例组)及 240 例健康对照(对照组)为研究对象。利用荧光定量 PCR 的 Taqman 探针法检测 SELS 基因(rs34713741、rs4965814)、LRRFIP1 基因(rs3769053)多态位点的基因型,并采用病例对照研究方法分析其与缺血性脑卒中的相关性。**结果** SELS 基因 rs34713741 C/T 多态性($OR = 1.236, 95\% CI: 0.862 \sim 1.772$)与缺血性脑卒中的发生无关;rs4965814 T/C 多态性($OR = 1.537, 95\% CI: 1.038 \sim 2.276$)与缺血性脑卒中的发生有关。LRRFIP1 基因 rs3769053 T/C 多态性($OR = 1.177, 95\% CI: 0.817 \sim 1.695$)与缺血性脑卒中的发生无关。调整年龄、高血压史、糖尿病史、吸烟、饮茶、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血糖因素后,SELS 基因 rs4965814 位点 T/C 多态性($OR = 1.825, 95\% CI: 1.056 \sim 3.155$)仍与缺血性脑卒中有关,即 T/C 多态性增加缺血性脑卒中的发生风险,未见 SELS 基因 rs34713741、LRRFIP1 基因 rs3769053 多态性与缺血性脑卒中有关联。**结论** SELS 基因 rs4965814T/C 多态性与我国东北汉族人群缺血性脑卒中的发病相关,可能是其发病的危险因素。

关键词: 缺血性脑卒中; 基因多态性; 硒蛋白 S; 富含亮氨酸重复序列相互作用蛋白 1

中图分类号: R 743.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)01-0005-04

Association of gene polymorphism of SELS and LRRFIP1 with susceptibility of ischemic stroke

GUAN Hong-jun*, LU Jun-hua, GUO Yu-peng, DONG Jing, RONG Sheng-zhong,

NIU Ying-ying, YAO Li-yan, JIN Ge, LI Xiao-xia

* School of Public Health, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China

Corresponding author: LI Xiao-xia, E-mail: li_xx1963@126.com

Abstract: Objective To investigate the association of gene polymorphism of selenoprotein S (SELS) gene and leucine-rich repeat (in FLII) interacting protein 1 (LRRFIP1) gene with ischemic stroke. **Methods** A total of 239 new cases of ischemic stroke (case group) and 240 healthy subjects (control group) from September 2003 to June 2013 were selected as research objects. Taqman probe fluorescent quantitative PCR method was used to detect genotypes of polymorphic loci of SELS gene (rs34713741, rs4965814) and LRRFIP1 gene (rs3769053). Using case-control study method, the correlation of the genotypes with ischemic stroke was analyzed. **Results** There was no association between rs34713741 C/T polymorphism of SELS gene and the occurrence of ischemic stroke ($OR = 1.236, 95\% CI: 0.862 - 1.772$). There was a significant association between rs4965814 T/C polymorphism of SELS gene and the occurrence of ischemic stroke ($OR = 1.537, 95\% CI: 1.038 - 2.267$). There was no association between rs3769053 T/C polymorphism of LRRFIP1 gene and the occurrence of ischemic stroke ($OR = 1.177, 95\% CI: 0.817 - 1.695$). After adjusting age, history of hypertension, history of diabetes, smoking, tea drinking, low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and blood sugar, rs4965814 T/C polymorphism of SELS gene was still associated with ischemic stroke ($OR = 1.825, 95\% CI: 1.056 - 3.155$), namely, rs4965814 T/C polymorphism increases the risk of ischemic stroke. The associations of rs34713741 polymorphism of SELS gene and rs3769053 polymorphism of LRRFIP1 gene with ischemic stroke were not found. **Conclusion** SELS gene rs4965814 T/C

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2018.01.002

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072370, 81273162); 黑龙江省卫生计生委科研项目 (2014-216); 牡丹江医学院科研项目 (ZS201320); 黑龙江省大学生创新创业重点项目 (201410229049)

通讯作者: 李晓霞, E-mail: li_xx1963@126.com

polymorphism was correlated with occurrence of ischemic stroke in the Han population in Northeast of China, and its T/C polymorphism may be a risk factor of ischemic stroke occurrence.

Key words: Ischemic stroke; Gene polymorphism; Selenoprotein S; Leucine-rich repeat (in FLII) interacting protein 1

脑卒中具有高发病率、高病死率和高致残率的特点,给社会和众多家庭造成沉重的负担和巨大的痛苦,现已成为世界第二大死因和致残的首要原因^[1]。研究表明,炎症反应在缺血性脑卒中的发生、发展过程中发挥重要作用^[2]。硒蛋白 S (selenoprotein S, SELS) 是一种新发现的炎症负调控因子,可以保护细胞免受氧化损伤,参与炎症和免疫反应^[3]。富含亮氨酸重复序列相互作用蛋白 1 [leucine-rich repeat (in FLII) interacting protein 1, LRRFIP1] 基因作为 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 信号通路的一个调节器发挥着重要的作用,参与许多生物过程调节炎症反应^[4]。目前已发现多种炎症因子,如 C 反应蛋白 (CRP)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 与脑卒中发病风险增高密切相关^[5]。研究表明 SELS 基因多态性影响循环促炎、抗炎因子水平^[6-7],LRRFIP1 基因变异参与调节肥胖患者血浆 CRP、IL-6 表达水平^[8]。目前国内外鲜有关于 SELS 基因、LRRFIP1 基因多态性与缺血性脑卒中关联的报道,本研究旨在探讨中国东北汉族人群中缺血性脑卒中患者和健康人群中 SELS 基因、LRRFIP1 基因的多态性,并分析其与缺血性脑卒中的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2003 年 9 月至 2013 年 6 月在牡丹江医学院附属红旗医院、牡丹江市第一人民医院住院的新发脑卒中患者 239 例作为病例组,每例患者均由两位神经科医生根据临床神经功能缺损表现及头部 CT 或磁共振 (MRI) 检查确诊,均无严重肝肾疾病、脑血管畸形或动脉瘤。收集同期来源于上述两所医院的健康体检者 240 例作为对照组,且均无脑卒中史。两组研究对象均为在本地区居住 5 年以上的汉族人群。应用脑卒中个案调查问卷及体检人群健康

状况调查问卷分别获取两组对象的一般情况、既往史、家族史、环境因素、心理因素等资料。

1.2 方法 在知情同意原则的基础上采集研究对象空腹外周静脉血 5 ml,置于含有 2% 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 抗凝的试管中。应用 QIAGEN 基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,存放于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。采用荧光定量 PCR 的 Taqman 探针法检测 SELS 基因 (rs34713741、rs4965814)、LRRFIP1 基因 (rs3769053) 多态位点的基因型,反应在 ABI7500 上进行并由系统软件根据荧光强度自动分辨所检测位点的基因型。引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成。序列如表 1 所示。

1.3 统计学分析 应用 Epidata 3.0 建立数据库,采用 SPSS 18.0 统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用成组 t 检验,方差不齐则采用非参数检验;计数资料比较运用 χ^2 检验;采用 Logistic 回归分析 SELS、LRRFIP1 基因多态性与缺血性脑卒中的关系;双尾检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 本研究共纳入病例组 239 例,男 147 例,女 92 例;年龄 (55.45 ± 10.17) 岁;对照组 240 例,男 147 例,女 93 例;年龄 (52.18 ± 8.99) 岁。年龄、高血压史、糖尿病史、吸烟、饮茶、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、血糖水平在两组间存在差异 ($P < 0.05, P < 0.01$),其他因素在两组间无差异 (P 均 > 0.05)。见表 2。

2.2 基因型分布 人群中 SELS 基因 rs34713741 多态位点存在 CC、TC 和 TT 三种基因型,rs4965814 多态位点存在 TT、TC 和 CC 三种基因型;LRRFIP1 基因 rs3769053 多态位点存在 CC、TC 和 TT 三种基因型。

2.3 SELS、LRRFIP1 基因多态性与缺血性脑卒中关系 SELS 基因 [rs34713741:哈迪-温伯格平衡 P 值

表 1 SELS、LRRFIP1 基因引物及探针序列

基因	探针序列(5'→3')	引物序列(5'→3')
SELS 基因		
rs34713741	FAM-TGGCTTGACTcGGG-MGB	GTGGGAACGTTCTGTGCTATCTC
	HEX-TGGCTTGACTtGGG-MGB	CGGTAAGAAATCCGTGAACGA
rs4965814	FAM-TGGCTTGACTcGGG-MGB	AGCAGGGCCACAGACTTG
	HEX-TGGCTTGACTtGGG-MGB	GCCAGGTTTACTCTTCTGACACAAA
LRRFIP1 基因		
rs3769053	FAM-AAATTACTtGAAAGCTGC-MGB	GACCTTGAGGCTGCATTCTCTAAA
	HEX-AAATTACTcGAAAGCTG-MGB	CCACTCTCACTTCTCAATGAACAA

(HWP) = 0. 978,rs4965814:HWP = 0. 559]、LRRFIP1 基因(rs3769053:HWP = 0. 778) 基因型分布在人群中符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,表明样本具有群体代表性。(1)SELS 基因 rs34713741 位点:以 CC 基因型作为参考,TC 基因型(*OR* = 1. 394,95% *CI*: 0. 952 ~ 2. 042)、TT 基因型(*OR* = 0. 775,95% *CI*: 0. 423 ~ 1. 419)与缺血性脑卒中的发生无关;即 SELS 基因 rs34713741 C/T 多态性(*OR* = 1. 236,95% *CI*: 0. 862 ~ 1. 772) 与缺血性脑卒中的发生无关。(2)rs4965814位点:以 TT 基因型作为参考,TC 基因型(*OR* = 1. 653,95% *CI*:1. 092 ~ 2. 502) 与缺血性脑卒中的发生有关联;CC 基因型(*OR* = 1. 268,95% *CI*: 0. 750 ~ 2. 146) 与缺血性脑卒中的发生无关;即 rs4965814 T/C 多态性(*OR* = 1. 537,95% *CI*:1. 038 ~ 2. 276)与缺血性脑卒中的发生有关。(3) LRRFIP1 基因 rs3769053 位点:以 TT 基因型作为参考,TC 基因型(*OR* = 1. 175,95% *CI*:0. 807 ~ 1. 712)、CC 基因型(*OR* = 1. 192,95% *CI*:0. 470 ~ 3. 022) 与缺血性脑卒中的发生无关;即 LRRFIP1 基因 rs3769053 T/C 多态性(*OR* = 1. 177,95% *CI*:0. 817 ~ 1. 695) 与缺血性脑卒中的发生无关。(4)调整年龄、高血压史、糖尿病史、吸烟、饮茶、LDL-C、血糖因素后:SELS 基因

rs4965814 位点 T/C 多态性(*OR* = 1. 825,95% *CI*: 1. 056 ~ 3. 155) 仍与缺血性脑卒中有关,T/C 多态性增加缺血性脑卒中的发生风险,未见 SELS 基因 rs34713741、LRRFIP1 基因 rs3769053 多态性与缺血性脑卒中有关联。见表 3。

表 2 两组一般资料情况比较

项目	病例组 (<i>n</i> = 239)	对照组 (<i>n</i> = 240)	χ^2/t 值	<i>P</i> 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	55. 45 ± 10. 17	52. 18 ± 8. 99	3. 709	0. 000
男/女(例)	147/92	147/93	0. 003	0. 954
BMI(例)				
≥25	146	143	0. 113	0. 736
<25	93	97		
高血压史(例)	110	78	5. 471	0. 019
糖尿病史(例)	33	14	8. 605	0. 003
心脏病史(例)	33	26	0. 981	0. 322
吸烟(例)	95	72	5. 012	0. 025
饮酒(例)	87	87	0. 001	0. 972
饮茶(例)	50	105	28. 514	0. 000
甘油三酯(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2. 11 ± 2. 03	1. 94 ± 0. 97	1. 182	0. 238
胆固醇(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	5. 06 ± 1. 87	5. 15 ± 0. 81	0. 710	0. 478
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1. 42 ± 0. 80	1. 43 ± 0. 37	0. 274	0. 785
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2. 91 ± 0. 92	2. 47 ± 0. 98	6. 147	0. 000
血糖(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	6. 50 ± 4. 02	5. 86 ± 0. 98	2. 393	0. 017

注:BMI:体质指数;HDL-C:高密度脂蛋白胆固醇。

表 3 两组中 SELS、LRRFIP1 基因型分布情况 (例)

基因型	病例组 (<i>n</i> = 239)	对照组 (<i>n</i> = 240)	χ^2 值	<i>P</i> 值	OR(95% <i>CI</i>)	χ^2 值	<i>P</i> 值	* 调整 OR(95% <i>CI</i>)
SELS								
rs34713741								
CC	102	115	1. 000					
TC	115	93	2. 916	0. 088	1. 394(0. 952 ~ 2. 042)	2. 191	0. 117	1. 413(0. 894 ~ 2. 232)
TT	22	32	0. 684	0. 408	0. 775(0. 423 ~ 1. 419)	0. 683	0. 409	0. 827(0. 527 ~ 1. 297)
TC + TT	137	125	1. 326	0. 249	1. 236(0. 862 ~ 1. 772)	0. 450	0. 734	1. 352(0. 560 ~ 2. 259)
rs4965814								
TT	62	84	1. 000					
TC	133	109	5. 685	0. 017	1. 653(1. 092 ~ 2. 502)	5. 680	0. 017	1. 941(1. 125 ~ 3. 348)
CC	44	47	0. 786	0. 375	1. 268(0. 750 ~ 2. 146)	0. 767	0. 384	1. 559(0. 577 ~ 4. 161)
TC + CC	177	156	4. 637	0. 031	1. 537(1. 038 ~ 2. 276)	4. 645	0. 031	1. 825(1. 056 ~ 3. 155)
LRRFIP1								
rs3769053								
TT	137	147	1. 000					
TC	92	84	0. 707	0. 400	1. 175(0. 807 ~ 1. 712)	0. 708	0. 399	1. 328(0. 686 ~ 2. 573)
CC	10	9	0. 138	0. 711	1. 192(0. 470 ~ 3. 022)	0. 138	0. 711	1. 346(0. 281 ~ 6. 455)
TC + CC	102	93	0. 765	0. 382	1. 177(0. 817 ~ 1. 695)	0. 766	0. 382	1. 329(0. 703 ~ 2. 514)

注: * 指调整年龄、高血压史、糖尿病史、吸烟、饮茶、LDL-C、血糖因素后。

3 讨 论

脑卒中发病前没有明显征兆,但病死率和致残率极高。研究表明,脑卒中是受遗传和环境因素共同影响的疾病,且炎症反应在脑卒中的发生、发展过程中发挥重要作用。SELS 蛋白是一种在内质网和细胞膜

滞留的硒蛋白,是一种新发现的炎症负调控因子,可以保护细胞免受氧化损伤,参与炎症和免疫反应^[3]。LRRFIP1 蛋白是一种转录抑制因子,参与 TLR 信号通路调控,参与许多生物过程调节炎症反应^[4]。它们编码的基因变异与肿瘤、心血管疾病、缺血性卒中和先兆子痫等疾病的发生风险相关。Martínez 等^[9]

研究发现 SELS 基因 rs4965814T/C 多态性与糖尿病、风湿性关节炎、炎性肠疾病等多种慢性炎症性疾病有关。Cox 等^[10]研究发现 SELS 基因 rs4965814T/C 多态性增加二型糖尿病患者心血管病发生的风险。Curran 等^[6]研究发现 SELS 基因 rs4965814T/C 多态性、rs28665122G/A 多态性与炎症因子之间存在关联,并影响炎症因子的表达,而 rs34713741G/A 多态性与炎症无关联。Sutherland 等^[11]、Méplán 等^[12]研究发现 SELS 基因 rs34713741G/A 多态性与与结肠癌发生有关联。Plourde 等^[8]研究表明 LRRFIP1 基因 rs3769053T/C 多态性与肥胖、血浆炎症因子水平有关。本研究结果表明,SELS 基因 rs4965814 T/C 多态性与缺血性脑卒中有关,T/C 多态性增加缺血性脑卒中的发生风险,而 SELS 基因 rs34713741C/T 多态性、LRRFIP1 基因 rs3769053T/C 多态性可能与缺血性脑卒中发生无关联。

SELS 是近年来新发现的负性炎症调控因子,具有参与炎症反应、处理和降解内质网相关蛋白等生物学功能。SELS 通过与血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA) 相互作用调节炎症反应,而 SAA 是一种急性期炎症反应蛋白,是被公认的炎性标志物^[13],通过激活核转录因子 (NF)- κ B 的方式介导和调节炎症细胞因子 (如 IL-1、TNF- α 、IL-6) 的表达^[14]。SELS 基因 rs4965814T/C 变异导致 SELS 蛋白表达抑制,SELS 不能结合到内质网非硒蛋白 Derlin-1 上,从而无法将未折叠与错误折叠蛋白进行降解,进而引发炎症反应^[15]。研究表明,中脑动脉闭塞的大鼠 LRRFIP1 异常表达^[16],而 LRRFIP1 可与负性调节因子 FliiH 竞争 MyD88 与 TLRs 的结合部位,削弱 FliiH 对 TLR 信号的抑制作用,启动 NF- κ B 激活途径^[4],从而参与脑卒中的炎症反应。本研究首次发现 SELS 基因 rs4965814T/C 多态性与缺血性脑卒中有关,T/C 多态性增加缺血性脑卒中的发生风险,SELS 基因 rs34713741C/T 多态性、LRRFIP1 基因 rs3769053T/C 多态性可能与缺血性脑卒中发生无关。但本研究局限于中国北方汉族人群,且研究样本量有限,因此还需要用更大的研究样本在不同人群中进行验证。

参考文献

[1] Schmidt A, Heroum C, Caumette D, et al. Acute Ischemic Stroke (AIS) patient management in French stroke units and impact estimation of thrombolysis on care pathways and associated costs[J].

Cerebrovasc Dis, 2015, 39(2):94-101.

- [2] Li XX, Guan HJ, Liu JP, et al. Association of selenoprotein S gene polymorphism with ischemic stroke in a Chinese case-control study[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2015, 26(2):131-135.
- [3] 陈小丹, 张小爱, 吴志豪, 等. 硒蛋白 S 基因多态性研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(5):411-414.
- [4] Dai P, Jeong SY, Yu Y, et al. Modulation of TLR signaling by multiple MyD88-interacting partners including leucine-rich repeat Fli-I-interacting proteins[J]. J Immunol, 2009, 182(6):3450-3460.
- [5] Paffen E, DeMaat MP. C-reactive protein in atherosclerosis: a causal factor[J]. Cardiovasc Res, 2006, 71(1):30-39.
- [6] Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, et al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response[J]. Nat Genet, 2005, 37(11):1234-1241.
- [7] Bos SD, Kloppenburg M, Suchiman E, et al. The role of plasma cytokine levels, CRP and Selenoprotein S gene variation in OA[J]. Osteoarthritis Cartil, 2009, 17(5):621-626.
- [8] Plourde M, Vohl MC, Bellis C, et al. A variant in the LRRFIP1 gene is associated with adiposity and inflammation[J]. Obesity (Silver Spring), 2013, 21(1):185-192.
- [9] Martínez A, Santiago JL, Varadé J, et al. Polymorphisms in the selenoprotein S gene: lack of association with autoimmune inflammatory diseases[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1):329.
- [10] Cox AJ, Lehtinen AB, Xu J, et al. Polymorphisms in the Selenoprotein S gene and subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study[J]. Acta Diabetol, 2013, 50(3):391-399.
- [11] Sutherland A, Kim DH, Relton C, et al. Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer[J]. Genes Nutr, 2010, 5(3):215-223.
- [12] Méplán C, Hughes DJ, Pardini B, et al. Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(6):1074-1079.
- [13] Mayer JM, Raraty M, Slavin J, et al. Serum amyloid A is a better early predictor of severity than C-reactive protein in acute pancreatitis[J]. Br J Surg, 2002, 89(2):163-171.
- [14] Csizsar A, Labinskyy N, Jo H, et al. Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(2):H569-H577.
- [15] Gao Y, Feng HC, Walder K, et al. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress-SelS is a novel glucose-regulated protein[J]. FEBS Letters, 2004, 563(1):185-190.
- [16] Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, et al. A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke[J]. J Exp Med, 2006, 203(3):711-717.

收稿日期:2017-07-30 修回日期:2017-08-11 编辑:周永彬