

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.012

miR-146aC>G, miR-149 T>C 基因多态性与缺血性脑卒中 易感性的研究*

胡亚梅 李书剑 姜晓峰 李 刚 张弥兰 张钱林 向 莉

(郑州大学人民医院(河南省人民医院)神经内科 河南 郑州 450003)

摘要 目的: 探讨中国汉族人群中 miR-146aC>G, miR-149 T>C 基因多态性与缺血性脑卒中易感性的关系。**方法:** 利用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 的方法检测 196 例缺血性脑卒中患者和 205 例健康对照中 miR-146aC>G, miR-149T>C 的基因型, 统计学方法比较两组间基因型及等位基因分布差异。**结果:** miR-146aC>G 位点各基因型在病例组和对照组分布无明显差异, 但等位基因 G 会增加缺血性脑卒中的患病风险; miR-149T>C 位点各基因型在病例组和对照组分布无明显差异。在分层分析中, miR-146aC>G 会增加女性和非高血压患者缺血性脑卒中的患病风险, miR-149T>C 会增加非高血压患者缺血性脑卒中的患病风险。**结论:** miR-146aG 等位基因, miR-149C 等位基因与汉族人群缺血性脑卒中易感性有一定的相关性。

关键词: 缺血性脑卒中; miR-146aC>G; miR-149 T>C; 易感性

中图分类号: R743.3 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)29-5648-03

Study on the Association of miR-146aC>G, miR-149 T>C Polymorphism with Susceptibility to Ischemic Stroke*

HU Ya-mei, LI Shu-jian, JIANG Xiao-feng, LI Gang, ZHANG Mi-lan, ZHANG Qian-lin, XIANG Li

(Neurology Department, People's Hospital of Zhengzhou University (Henan Provincial People's Hospital), Zhengzhou, 450003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between miR-146aC>G, miR-149 T>C and susceptibility to ischemic stroke in a Chinese population. **Methods:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) were used to determine the genotype of 196 ischemic stroke patients and 205 healthy controls. Statistical analyses were used to compare the distribution of the genotypes and alleles between cases and controls. **Results:** There were no significant differences of the miR-146aC>G, miR-149 T>C genotype between the cases and controls, but allele G of miR-146a can increase the risk of ischemic stroke. In the stratified analyses, miR-146aCG+GG showed a significantly increased risk of ischemic stroke compared with the CC genotype of the female and normotensive subgroups; miR-149TC+CC was connected to ischemic stroke in the normotensive subgroup. **Conclusion:** miR-146a allele G, miR-149 allele C were associated with an increased risk of ischemic stroke in Chinese.

Key words: Ischemic stroke; MiR-146aC>G; MiR-149 T>C; Susceptibility

Chinese Library Classification: R743.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5648-03

引言

脑血管疾病是中老年人群的常见病和多发病, 以高发病率, 高死亡率, 高致残率等特点给人类健康和生命造成巨大的威胁。目前我国约有脑血管病患者 700 余万人, 其中缺血性脑卒中患者约占 70%^[1]。由于当前对缺血性脑卒中治疗尚无特效药物, 因此对该疾病的预防成为控制发病率的有效措施。在缺血性脑卒中发病过程中, 遗传因素及环境因素均发挥了重要的作用, 对脑卒中遗传易感性的研究可为脑卒中的预防以及新药治疗提供依据^[2], 具有重大意义。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长度约为 21-25nt 的内源性

小分子非编码 RNA。成熟的 miRNA 通过组装入 RNA 诱导沉默复合体, 与靶 mRNA 的 3'-UTR 互补配对, 根据互补程度的不同, 降解或沉默靶基因, 影响靶基因的翻译和稳定性, 进而调控基因表达^[3]。目前只有小部分 miRNAs 的生物学功能得到阐明, 这些 miRNAs 参与调节众多生物学进程, 如细胞的分化增殖, 胰岛素的分泌, 肿瘤的发生发展等等^[4-6]。在脑组织中, 也有一些特定的 miRNA 高度表达, 参与脑组织发育, 神经元分化, 血管新生等过程^[7-9]。研究表明 miRNA 上存在的单核苷酸多态性位点会使 miRNA 异常表达, 导致疾病的发生。因此对 miRNA 及其多态性位点的研究有助于筛选新的疾病标志物。miR-146a 是一类与炎症密切相关的微小 RNA^[10], 其多态性位

* 基金项目: 河南省科技厅重点科技攻关计划项目 (122102310094)

作者简介: 胡亚梅 (1962-), 女, 主任医师, 主要研究方向: 脑血管病, 痴呆, 癫痫, 电话: 0371-65580714, E-mail: dhuyamei2013@163.com

(收稿日期: 2014-03-05 接受日期: 2014-03-29)

点 rs2910164 (miR-146aC>G) 会影响 miR-146a 的加工成熟。miR-149 参与调解叶酸还原酶 MTHFR 的表达^[1],其多态性位点 rs2292832(miR-149 T>C)与肝癌,乳腺癌,胃肠癌^[12-14]等的发生相关。在缺血性脑卒中,关于这两个位点的研究较少^[15,16],因此本文旨在探讨 miR-146aC>G,miR-149 T>C 位点与缺血性脑卒中易感性的关系,为缺血性脑卒中的预防和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

病例组包括 2009 年至 2013 年河南省人民医院神经内科收住的 196 例缺血性脑卒中患者,所有患者经两位以上神经内科医生及头部 CT 确诊,对照组选择与病例组年龄性别相匹配的同期健康体检人群 205 例,所有的受试者都为郑州或周围地区的汉族人群。

1.2 DNA 提取

抽取 5 mL 外周血于含 EDTA 的抗凝管中,一周内按照基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工)的说明方法提取基因组 DNA,分装后冻存在 -20℃ 备用。

1.3 基因型检测

利用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法检测 miR-146aC>G 和 miR-149T>C 位点的基因型。PCR 反应体系包括:100 ng 的基因组 DNA,0.1 mM dNTPs,2.0 mM MgCl₂,10pM 引物,1.25U Taq 酶(上海生工)。引物序列:miR-146aC>G^[15],正链 5'-CATGGGTTGTGTCAGT-GTCAGAGCT-3',负链 5'-TGCCTTCTGTCTCCAGTCTTC-CAA-3';miR-149T>C^[17],正链 5'-TGTCTTCACTCCCGT-GCTTGTC-3',负链 5'-TGAGGCCCGAAACACCCGTA-3'。PCR 反应参数为:95℃ 预变性 5 分钟,然后进入扩增阶段,95℃ 变性 60 秒,58℃ 退火 45 秒,72℃ 延伸 1 分钟,循环 35 次,最后 72℃ 延伸 10 分钟。miR-146aC>G PCR 产物长度为 147 bp,经 SacI 酶切后可产生 147 bp,122 bp,25 bp 的小片段,miR-149T>C PCR 产物长度为 254 bp,经 PvuII 酶切后可产生 254 bp,194 bp,60 bp 的小片段。酶切产物在 3%的琼脂糖凝

胶上电泳,经溴乙锭染色后在紫外光下拍照进行基因型鉴定。随机选取 10%的样本进行复查,符合率达 100%。

1.4 统计学处理

所有数据应用 SPSS17.0 统计软件进行分析。采用 χ^2 检验或 t 检验对病例组和对照组基本信息及 miR-146aC>G,miR-149T>C 基因型分布情况进行比较。应用拟合优度检验分析病例组和对照组的基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。OR 值及其 95%可信区间(95%CI)来表示相对风险度。所有统计检验均为双侧概率检验。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

病例组与对照组的人口学特征见表 1。结果显示,病例组与对照组在年龄,性别上是匹配的(P>0.05)。而高血压,高血脂,糖尿病和吸烟则是缺血性脑卒中发病的危险因素(P 值均小于 0.05)。

表 1 研究人群特点

Table 1 Characteristics of the study population variables			
Variables	Controls	Cases	P value
Age(mean± SD)	63± 10.5	64± 11.7	0.752
Male(n,%)	95(46.3%)	94(48.0%)	0.746
Hypertension(n,%)	97(47.3%)	119(60.7%)	0.007
Hyperlipidemia(n,%)	25(13.8%)	48(24.5%)	0.001
Diabetes mellitus(n,%)	14(6.8%)	32(16.3%)	0.003
Smoking(n,%)	48(23.4%)	74(37.8%)	0.002

经 person 卡方检验,miR-146aC>G,miR-149T>C 位点基因型频率分别为 1.354,3.741,P 值均大于 0.05,满足 Hardy-Weinberg 平衡定律,表明该群体是一遗传平衡群体(表 2)。miR-146aC>G 位点各基因型在病例组(CC,38.3%;CG,44.4%;GG,17.3%)和对照组(CC,47.3%;CG,40.0%;GG,12.7%)的分布无明显差异,但突变型等位基因 G 会增加缺血性脑卒中的患病风险(OR,1.34,95%CI,1.009-1.799,P=0.043)。miR-149T>C 位点各基因型在病例组(TT,40.3%;TC,38.8%;CC,20.9%)和对照组(TT,39.0%;TC,43.4%;CC,17.6%)分布无明显差异(表2)。

表 2 miR-146aC>G,miR-149T>C 位点基因型与等位基因频率分布

Table 2 Distribution of the miR-146aC>G,miR-149T>C Genotype and alle frequencies

Groups	Controls (n=205),n(%)	Cases (n=196), n(%)	Adjusted OR(95%CI)	P value
miR-146aC>G				
Genotype				
CC	97(47.3%)	75(38.3%)	1	
CG	82(40.0%)	87(44.4%)	1.372(0.896-2.102)	0.145
GG	26(12.7%)	34(17.3%)	1.691(0.935-3.06)	0.081
Alle				
C	276(67.3%)	237(60.5%)	1	
G	134(32.7%)	155(39.5%)	1.34(1.009-1.799)	0.043
miR-149T>C				
Genotype				
TT	80(39.0%)	79(40.3%)	1	
TC	89(43.4%)	76(38.8%)	0.865(0.559-1.338)	0.514
CC	36(17.6%)	41(20.9%)	1.153(0.669-1.989)	0.608
Alle				
T	249	234	1	
C	161	158	1.044(0.787-1.386)	0.764

本研究进一步对年龄,性别,高血压,高脂血症,糖尿病进行了分组分析,结果显示,和 CC 基因型相比,miR-146aC>G 位点 CG+GG 基因型会增加女性(CC vs CG+GG;OR,1.823,95% CI 1.039-3.198, P=0.035) 及无高血压组 (CC vs CG+GG;OR, 1.861,95%CI,1.013-3.42,P=0.044) 缺血性脑卒中的患病风险。miR-149T>C 位点 TC+CC 基因型会增加无高血压组 (TT vs TC+CC;OR,1.959,95%CI,1.035-3.708,P=0.044) 患缺血性脑卒中的风险(见表 3)。

表 3 miR-146aC>G,miR-149 T>C 基因多态性分组分析
Table 3 Stratified analyses of miR-146aC>G,miR-149 T>C polymorphism

Groups	Mir-146a CG+GG		Mir-149 TC+CC	
	Adjusted OR (95%CI)	P value	Adjusted OR (95%CI)	P value
Age				
<63	1.164(0.649-2.09)	0.61	1.221(0.676-2.207)	0.154
>63	1.543(0.897-2.655)	0.116	1.484(0.861-2.558)	0.508
Gender				
Male	1.161(0.656-2.056)	0.608	1.071(0.601-1.907)	0.816
Female	1.823(1.039-3.198)	0.035	0.851(0.488-1.487)	0.571
Hypertension				
No	1.861(1.013-3.42)	0.044	1.959(1.035-3.708)	0.037
Yes	1.244(0.726-2.135)	0.426	0.066(0.347-1.037)	0.066
Hyperlipidemia				
No	1.42(0.913-2.206)	0.119	1.064(0.682-1.662)	0.784
Yes	1.433(0.534-3.843)	0.474	0.556(0.202-1.533)	0.254
Diabetes mellitus				
No	1.49(0.979-2.289)	0.062	0.942(0.614-1.445)	0.785
Yes	1.25(0.348-4.486)	0.732	1.286(0.365-4.529)	0.695

3 讨论

脑卒中是由多基因和多种危险因素参与发生的复杂性疾病,如能对一些危险因素进行积极有效地预测和干预,则可降低脑卒中的发病率和死亡率。SNPs 在人类基因组中分布广泛,覆盖密度大,在复杂疾病基因的定位研究中有着独特的优越性,而 miRNA 是一类广泛存在的小分子调控因子,人体内约 90%的基因表达都受其调控。通过检测血液中的 miRNA 上的多态性位点的变化来检测疾病的发生、发展和预后,可能会给人类疾病的治疗提供一种新的手段^[18]。

研究表明,SD 大鼠大脑局部缺血再灌注会引起多种 miRNAs 表达发生改变,且随着再灌注时间的不同,表达的 miRNAs 也不同^[19]。而 Tan KS 等通过检测缺血性脑卒中病人和正常对照血液样本中 miRNA 表达谱,发现有 138 个 miRNA 表达升高^[20],如 miR-126,miR-181a 等,19 个 miRNA 表达下降,如 miR-602,miR-186 等。Zeng 等发现 miR-210 在缺血性脑卒中患者中的表达明显下降^[21]。种种研究表明 miRNA 有望成为一种新的脑血管疾病分子标志物。

缺血性脑卒中会直接引起脑部神经炎症反应,而 miR-146a 是一个炎症相关基因,其启动子区存在多个 NF-kB 结合位点,致炎症因子 LPS、IL-1 等均以 NF-kB 依赖的方式促进 miR-146a 表达^[10]。Mir-149 能与 MTHFR 的 3' 非翻译区结合,参与调节其表达,而 MTHFR 基因与缺血性脑卒中密切相关^[11]。本研究则表明 miR-146aC>G 会增加汉族人群中女性和非高血压人群缺血性脑卒中的患病风险,miR-149T>C 会增加汉族人群中非高血压人群患缺血性脑卒中的风险。由于本研究

样本量有限且来源较为集中,所以该结果需要进一步扩大样本量及在其他人群中验证。

参考文献(References)

- [1] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组缺血性脑卒中二级预防指南撰写组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2010 [J]. 中国神经科杂志, 2010, 43: 154-160
The Secondary Prevention Guideline of Ischemic Stroke Writing Team, Cerebrovascular Disease Group, Chinese Society of Neurology. The Secondary Prevention Guideline of Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack in China 2010 [J]. Chinese Journal of Neuroscience, 2010, 43: 154-160
- [2] Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke [J]. Stroke, 2004, 35(1): 212-227
- [3] Yan H, Fang M, Liu XY. Role of microRNAs in Stroke and Poststroke Depression[J]. Scientific World Journal, 2013, 2013: 459692-459692
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [5] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression [J]. Genes Dev, 2004, 18(5): 504-511
- [6] Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, et al. MicroRNAs in cancer management [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(6): e249-258
- [7] Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, et al. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development [J]. RNA, 2003, 9(10): 1274-1281

(下转第 5643 页)

- Yang Hua-qiang, Wang Yun-fu, Du Ling. Therapeutic effect of human umbilical cord blood stem cells transplantation in patients with decompensated cirrhosis [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(23): 4497-4499
- [16] 杜玲, 杨华强, 罗国君. 脐血干细胞移植治疗中间型脊髓性肌萎缩症 1 例并文献复习[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(9): 1764-1766
- Du Ling, Yang Hua-qiang, Luo Guo-jun. Umbilical Cord Blood Stem Cells Transplantation for Intermediate Spinal Muscular Atrophy: Report and Review of Literature of One Case [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(9): 1764-1766
- [17] 谭业辉, 刘晓亮, 王畅, 等. 造血干细胞动员中外周血 CD34⁺ 细胞的变化趋势及其对采集的影响 [J]. 中华器官移植杂志, 2012, 33(2): 90-93
- Tan Ye-hui, Liu Xiao-liang, Wang Chang, et al. Variation of peripheral blood CD34⁺ cells during hematopoietic stem cell mobilization and its influence on collection [J]. Chinese Journal of Organ Transplantation, 2012, 33(2): 90-93
- [18] 汪健, 孙自敏, 李庆, 等. 体外扩增对脐带血 CD34⁺ 细胞归巢相关分子影响的研究[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(3): 219-224
- Wang Jian, Sun Zi-min, Li Qing, et al. Study on Influence of the Homing Related Molecules on Umbilical Cord Blood CD34⁺ Cells after Amplified with Cytokines in vitro [J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2013, 15(3): 219-224
- [19] 张乐, 赵丹丹, 夏冰, 等. 骨髓增生异常综合征中 CD34⁺ 细胞 CXCR4 的表达及其与细胞迁移的相关性[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 13(18): 1081-1084
- Zhang Yue, Zhao Dan-dan, Xia Bing, et al. CXCR4 expression of bone marrow CD34⁺ cells in myelodysplastic syndromes and its correlation with cell migration [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2013, 13(18): 1081-1084
- [20] 尹建平, 张义成, 刘胜洪, 等. 造血干细胞移植后 HLA-G 表达与移植抗宿主反应的相关性研究 [J]. 中国输血杂志, 2012, 12(10): 1017-1021
- Yin Jian-ping, Zhang Yi-cheng, Liu Sheng-hong, et al. Correlation of HLA-G expression with graft-versus-host reaction following HSCT [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2012, 12(10): 1017-1021

(上接第 5650 页)

- [8] Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain [J]. Genome Biol, 2004, 5(9): R68
- [9] Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(6): 1469-1477
- [10] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12481-12486
- [11] Wu C, Gong Y, Sun A, et al. The human MTHFR rs4846049 polymorphism increases coronary heart disease risk through modifying miRNA binding[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013, 23(7): 693-698
- [12] Kim WH, Min KT, Jeon YJ, et al. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population [J]. Gene, 2012, 504(1): 92-97
- [13] Zhang M, Jin M, Yu Y, et al. Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population[J]. Eur J Cancer Care (Engl), 2012, 21(2): 274-280
- [14] Min KT, Kim JW, Jeon YJ, et al. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population [J]. Mol Carcinog, 2012, 51 Suppl 1: E65-73
- [15] Jeon YJ, Kim OJ, Kim SY, et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(2): 420-430
- [16] Liu Y, Ma Y, Zhang B, et al. Genetic Polymorphisms in Pre-microRNAs and Risk of Ischemic Stroke in a Chinese Population [J]. J Mol Neurosci, 2014, 52(2): 473-480
- [17] Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival [J]. J Clin Invest, 2008, 118(7): 2600-2608
- [18] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006
- [19] Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(1): 92-101
- [20] Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients[J]. Plos One, 2009, 4(11): e7689
- [21] Zeng L, Liu J, Wang Y, et al. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 3: 1265-1272