

GPX-1 基因 Pro198Leu 多态性与血管性认知功能障碍相关性研究

祝鸿雁 魏成群*

黑龙江省医院, 黑龙江 哈尔滨 150086

【摘要】 目的 研究 GPX-1 基因 Pro198Leu 多态性与血管性认知功能障碍的相关性。方法 将我院在 2020 年 1 月—2021 年 8 月所收治的脑梗死患者(认知功能障碍)100 名、同时期收治的脑梗死患者(认知功能正常)100 例,及健康体检的志愿者 100 例,作为本次的研究对象。通过应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性方法与琼脂糖凝胶电泳技术,分别对其进行检测。脑梗死患者(认知功能障碍)为 A 组,脑梗死患者(认知功能正常)为 B 组,健康体检的志愿者 C 组。观察 GPX-1 基因 Pro198Leu 多态性与血管性认知功能障碍之间的相关性。结果 将研究对象 GPX-1(谷胱甘肽过氧化物酶-1)基因的多态性作为本次的判定指标,发现 A 组与 C 组之间有一定的差异性($P < 0.05$),具有统计学意义。B 组与 C 组之间有显著的差异($P < 0.05$),具有统计学意义。A 组与 B 组在 CC 基因型与 CT 基因型之间有显著的差异($P < 0.05$),具有统计学意义。结论 GPX-1 基因 Pro198Leu 多态性与血管性认知功能障碍的发病具有相关性,GPX-1 基因 Pro198Leu 多态 CT 基因型个体在哈尔滨地区汉族人群中发生血管性认知功能障碍的风险显著增加。

【关键词】 GPX-1 基因 Pro198Leu; 多态性; 相关性; 血管性认知功能障碍

目前血管性认知功能障碍的发病率逐年增加,现已成为公共卫生领域面临的最大挑战之一,认知功能障碍防治方面药物的研发已成为目前国内外生命科学领域关注的热点和难点问题^[1]。谷胱甘肽过氧化物酶-1(GPX-1)是一种重要的抗氧化酶,已有研究表明 GPX-1 与脑梗死的发生有关,且脑梗死后认知功能障碍高发,但 GPX-1 与认知功能障碍有无相关性,目前鲜见报道。本文将通过应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性方法(PCR-RFLP)方法与琼脂糖凝胶电泳技术,分析三组人群 GPX-1 基因 Pro198Leu 的多态性与血管性认知功能障碍之间的相关性。旨在对于血管性认知功能障碍的早发现 and 早诊断,以尽早预防,减少认知功能障碍的发生、发展,改善患者预后,提高其生活质量。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将我院在 2020 年 1 月—2021 年 8 月所收治的哈尔滨脑梗死患者(认知功能障碍)100 例作为 A 组,100 例脑梗死患者(认知功能正常)作为 B 组,100 例健康体检

的志愿者作为 C 组,作为本次的研究对象。在 A 组中,男性患者 53 例,女性患者 47 例;年龄在 38 ~ 73 岁之间,平均年龄(53.28 ± 6.09)岁;在 B 组中,男性患者 59 名,女性患者 41 名;年龄在 41 ~ 80 岁之间,平均年龄(62.52 ± 5.17)岁;在 C 组中,男性志愿者 61 例,女性志愿者 39 名;年龄在 35 岁 ~ 69 岁之间,平均年龄(50.09 ± 5.26)岁。将三组患者的一般资料进行数据分析($P > 0.05$),不具备统计学意义,具有可比性。纳入标准:①脑梗死患者:均符合全国第四届脑血管病学术会议修订的诊断标准,并经头部 CT 或 MRI 证实。②以上患者均排除严重心肝肾功能不全、风湿免疫性疾病、肿瘤、近期感染、慢性炎症患者,昏迷及言语功能障碍等不能配合 MMSE 量表评定的患者。③经 MMSE 量表评定将入组者分为血管性认知功能障碍组及认知功能正常组。④正常对照组:为体检中心同期的健康体检者,除既往有缺血性脑卒中病史者,并排除其它器质性疾病。

1.2 方法 分别对三组受试者应用 PCR-RFLP 方法与琼脂糖凝胶电泳技术分析。

* 通讯作者:魏成群

[课题]2020 年黑龙江省卫生健康委科研课题《GPX-1 基因 198ProLeu 多态性与血管性认知功能障碍相关性研究》(课题编号 2020-247)

在患者知情同意后,抽取外周静脉血 2 ml, EDTA 抗凝, -20 °C 保存至基因组 DNA 提取。详细记录每个样本的临床资料,应用 PCR-RFLP 方法, PCR 引物序列为: 上游 5' TCCAGACCATTGACATCGAG3', 下游 5' ACTGGGATCAACAGGACCAG3'。使用前需解冻并震荡混匀。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 2.0 μl, dNTP 2.0 μl, 上游引物 0.5 μl, 下游引物 0.5 μl, 待测 DNA 2.5 μl, Taq 聚合酶 0.2 μl, 加无菌双蒸水 17.3 μl, 总体积 25 μl。PCR 循环条件: 首先 94 °C 预变性 8min, 然后进行循环, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 37 个循环, 之后 72 °C 延伸 5min。PCR 反应扩增的 DNA 片段长度为 222bp。琼脂糖凝胶电泳: 取 PCR 产物 5ul, 并将其与 loading buffer 混合在 0.04ul/ml 的溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳。电压恒定设置为 150V, 持续时长 30 分钟左右, 在紫外投射灯下观察凝胶成像的结果, 并对其进行记录。限制性内切酶法: 反应体积为 20ul, 取 PCR 产物 5ul, 并且加入限制性内切酶 ApaI 1ul 和缓冲液 10×Buffer 2ul, 最后加水直到体积达到 20ul, 37 °C 恒温水浴酶切反应 3 小时左右, 酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳 (150V, 30 ~ 40 分钟), 溴化乙锭染色, 观察结果并进行

记录。如果 GPX-1 基因 Pro198Leu 碱基为 C 时, 可以看到扩增产物被酶切成两段, 如果由 C 转为 T 时, 扩增产物不会被酶切, 在电泳条带上可以进行判读。

基因判读: PCR 的产物总产长是 222bp, 有一个 1 个 ApaI 酶切位点, 酶切产物可出现 170、52bp 两种核苷酸片段。因为 GPX-1 基因 Pro198Leu 具有 C → T 多态性, 所以当 Pro198Leu 位为 T 等位基因时, 不会出现酶切的现象。因此基因型的判定可以分为三种: ① CC 型 (170bp, 52bp 呈两个片段); ② CT 型 (222bp, 170bp, 52bp 呈三个片段); ③ TT 型 (222bp 呈一个片段)^[2]。

1.3 判定指标 将研究对象体内的 GPX-1 基因多态性作为本次研究的判定指标, 三组分别进行对比, 观察 GPX-1 基因 Pro198Leu 多态性与血管性认知功能障碍的相关性。

1.4 统计学软件 通过统计学软件 SPSS13.0 进行结果分析, 使用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验, 表示为 ($\bar{x} \pm s$), 计数资料表示为 (%), $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑梗死患者 (认知功能障碍) 组与对照

表 1 两组间 GPX-1 基因 Pro198Leu 基因型比较 (A,C 两组)

组别	例数(男/女)	等位基因		基因型		
		C	T	CC	CT	TT
A	100(53/47)	158(79%)	42(21%)	60(60%)	38(38%)	2
C	100(61/39)	190(95%)	10(5%)	90(90%)	10(10%)	0
P 值	-	< 0.05		< 0.05		

注: A: 脑梗死患者 (认知功能障碍) 组; C: 正常对照组, 括号内为所占比例。

表 2 两组间 GPX-1 基因 Pro198Leu 基因型比较 (B,C 两组)

组别	例数(男/女)	等位基因		基因型		
		C	T	CC	CT	TT
B	100(59/41)	176(88%)	24(12%)	77(77%)	22(22%)	1
C	100(61/39)	190(95%)	10(5%)	90(90%)	10(10%)	0
P 值	-	< 0.05		< 0.05		

注: B: 脑梗死患者 (认知功能正常) 组; C: 正常对照组, 括号内为所占比例。

表 3 组间 GPX-1 基因 Pro198Leu 基因型比较 (A、B 两组)

组别	例数(男/女)	等位基因		基因型		
		C	T	CC	CT	TT
A	100(53/47)	158(79%)	42(21%)	60(60%)	38(38%)	2
B	100(59/41)	176(88%)	24(12%)	77(77%)	22(22%)	1
P 值	-	< 0.05		< 0.05		

注: A: 脑梗死患者 (认知功能障碍) 组; B: 脑梗死患者 (认知功能正常) 组

组间 198C/T 多态基因型和等位基因频率分布(A,C 两组) 将 A 组与 C 组中的 GPX-1 基因 Pro198Leu 基因型进行比较, 发现两组之间有明显的差异 ($P < 0.05$), 具有统计学意义, 见表 1。

2.2 脑梗死患者(认知功能正常)组与对照组间 198C/T 多态基因型和等位基因频率分布(B,C 两组) 将 B 组与 C 组中的 GPX-1 基因 Pro198Leu 基因型进行比较, 发现两组之间有明显的差异 ($P < 0.05$), 具有统计学意义, 见表 2。

2.3 脑梗死患者(认知功能障碍)与脑梗死(认知功能正常)对照组间 198C/T 多态基因型和等位基因频率分布(A、B 两组) 将 A 组与 B 组中的 GPX-1 基因 Pro198Leu 基因型进行比较, 发现两组之间的 CC、CT 基因型具有明显的差异, 且组间比较有一定的差异性 ($P < 0.05$), 具有统计学意义, 见表 3。

3 讨 论

血管性认知障碍目前的发病率越来越高, 极大的降低了患者的生活质量。其主要病因是脑动脉粥样硬化导致血管狭窄, 脑血流量下降^[3]。初期临床表现可仅仅为记忆力下降, 随着认知衰退发展, 逐渐出现执行功能和处理速度等受损症状, 甚至步态异常, 尿失禁以及不能控制自身情绪, 嗜睡等等。GPX-1 是人体内部比较重要的抗氧化酶, 能够帮助体内组成抗氧化防御系统^[4-5]。对于正常人来说, 体内的自由基始终保持着平衡, 但是一旦出现了不平衡, 就会让抗氧化防御系统受到破坏, 形成氧化应激反应。自由基会对细胞中的不饱和脂肪酸进行攻击, 造成细胞损伤^[6], 形成动脉粥样硬化的斑块。在此过程当中, 还会不断的形成脂质过氧化物, 造成自由基过量, 这是一个恶性循环。GPX-1 能够清除体内多余的脂质过氧化物, 帮助自由基取得平衡, 对于血管性认知功能障碍患者来说, 具有很重要的临床意义^[7]。GPX-1 基因已经成为业内很多学者的研究对象, 但是大多数的学者对于 GPX-1 基因的研究都是在动脉粥样硬化当中, 很少有关于 GPX-1 基因对血管性认知功能障碍的研究, 对此, 本文展开了初步研究。

在本文的研究当中, 通过应用 PCR-RFLP 方法与琼脂糖凝胶电泳技术, 将三组所出现的 GPX-1 基因 Pro198Leu 的多态性及基因分布作为判定指标, 经过对比之后发现, A 组人群 CT

基因型较 C 组明显增多, 差异显著 ($P < 0.05$), 具有统计学意义 ($\chi^2=24.333$, P 值 =0.000)。B、C 两组之间的对比中, 发现组间存在一定的差异性 ($P < 0.05$), 两组人群的基因型分布频率差异显著, 具有统计学意义 ($\chi^2=6.512$, P 值 =0.039)。A 组 CT 型基因较 B 组增多, 差异显著 ($P < 0.05$), 有统计学意义 ($\chi^2=6.709$, P 值 =0.035)。也就是说, GPX-1 基因 Pro198Leu 的多态性与血管性认知功能障碍的发病有相关性。

综上所述: GPX-1 基因 Pro198Leu 多态 CT 基因型个体在哈尔滨地区汉族人群中血管性认知功能障碍的患病风险显著增加, 本实验的研究对象是生活在当地的汉族居民, 且样本有限, 今后仍需要扩大样本进一步研究, 以增加结果的准确性。

参考文献

- [1] 郭宏伟, 刘迪龔, 胡义奎, 刘涛生, 谭龙君, 冯琼. 初发脑梗死患者血小板内皮聚集受体 1 基因多态性与卒中后神经功能缺损和认知功能障碍的关系 [J]. 广西医学, 2021, 43(11): 1326-1329+1375.
- [2] 张超贤, 郭李柯, 张利利, 李光艳, 常廷民. 幽门螺杆菌感染与 PPAR γ 2 基因 Pro12Ala、GPx-1 基因 Pro198Leu 多态性的交互作用和非酒精性脂肪性肝病的关系 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(07): 1551-1559.
- [3] Chui H. Vascular dementia, a new beginning, shifting focus from clinical phenotype to ischemic brain injury [J]. Neurol clin, 2000, 18: 951-978.
- [4] 严 辞. GPx1、GSTM1、GSTT1 以及 GSTP1 基因多态性与中国汉族人群精神分裂症的相关性研究 [D]. 中国医科大学, 2020.
- [5] 刘莹. GPx-1 基因 Pro198Leu 多态性与 2 型糖尿病微血管病变的相关性研究 [D]. 南昌大学, 2016.
- [6] 彭红艳. GPx-1 基因 Pro200Leu 多态性与 2 型糖尿病周围神经病变的关联研究 [D]. 中南大学, 2014.
- [7] 陶雪涛, 姚立, 施宁川. 泽泻提取物对自发性糖尿病大鼠 Bmal1(Arntl)、Acsl5、Gpx1 基因表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(04): 833-836.