

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.10.014

MAP2K4、MAPK1 基因多态性与缺血性中风不同证型患者及其血脂水平的关联分析

古联¹, 吴艳丽¹, 梁宝云¹, 谭金晶¹, 陈清¹, 韦湫桂¹, 申婷婷¹, 蒋海云¹, 唐农^{2*}

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁市兴宁区东葛路 89-9 号, 530023; 2. 广西中医药大学)

摘要 目的 探讨丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (MAP2K4)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) 基因多态性与缺血性中风风痰瘀阻证、气虚血瘀证的易感性及血脂水平的关联。方法 采用病例对照研究方法, 纳入缺血性中风风痰瘀阻证 311 例、气虚血瘀证 284 例、正常对照者 605 例。采用 Sequenom 技术进行基因分型, 运用实时荧光定量法 PCR (RT-PCR) 检测外周血 MAP2K4、MAPK1 的 mRNA 表达水平和血脂水平。采用非条件 Logistic 回归模型分析基因型与缺血性中风易感性的关联, 采用线性回归分析各位点多态性与血脂水平的关联。结果 MAPK1 基因 rs9340 多态性与男性缺血性中风风痰瘀阻证易感性显著关联 ($P=0.047$), 而 MAPK1 基因 rs6928 多态性、MAP2K4 基因 rs3826392 多态性与缺血性中风风痰瘀阻证、气虚血瘀证的易感性无关联 ($P>0.05$)。携带 rs6928 CC 基因型的风痰瘀阻证患者的 MAPK1 mRNA 表达水平显著低于其他基因型携带者 ($P=0.006$)。在缺血性中风气虚血瘀证中, MAPK1 基因 rs6928 多态性与患者的甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL) 水平均有显著关联 ($P<0.05$), rs9340 与患者 TG 水平的关联具有意义 ($P<0.05$), 但未观察到 MAP2K4 基因 rs3826392 多态性与缺血性中风风痰瘀阻证、气虚血瘀证的血脂水平具有关联 ($P>0.05$)。结论 MAPK1 基因 rs9340 多态性可能影响中国男性缺血性中风风痰瘀阻证的发生, MAPK1 基因多态性影响缺血性中风气虚血瘀证的血脂代谢。

关键词 缺血性中风; 风痰瘀阻证; 气虚血瘀证; 丝裂原活化蛋白激酶; 单核苷酸多态性; 血脂

中风是以猝然昏仆, 不省人事, 伴口眼歪斜、言语不利、半身不遂为主症的一种疾病, 具有高发病率、高病死率、高致残率、高复发率等特点, 为现代社会严重威胁人类健康的三大疾病之一^[1]。中医学认为, 中风的病机属于本虚标实, 本虚有气、血、阴、阳之不同, 而标实则有风、火、痰、瘀之差异。“风”是中风特点的总体概括, “痰、瘀”是贯穿中风全过程的基本病理因素^[2]。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联反应是参与中风发生发展病程的重要通路, 丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (MAP2K4) 与丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) 是 MAPK 级联反应的重要因素^[3]。本研究选取中风风痰瘀阻证及气虚血瘀证患者作为研究对象, 探索 MAP2K4、MAPK1 基因遗传多态性在中风不同

证型的作用。本次研究由广西中医药大学医学伦理委员会审查通过。

1 临床资料

1.1 诊断标准

西医诊断标准参照全国第四届脑血管病学术会议修订的《各类脑血管疾病诊断要点》^[4]中动脉粥样硬化性血栓性脑梗死、脑栓塞、腔隙性脑梗死的诊断标准。全部受试者均经过两名主治医师及以上职称的神经内科医师共同诊断, 同时以头颅 CT 和/或 MRI 确诊。中医诊断及辨证分型标准参照国家中医药管理局脑病急救协作组制订的《中风病诊断与疗效评定标准 (试行)》^[5]。

1.2 纳入标准

病例组受试者均符合上述诊断标准及中医辨证标准, 发病 7 天以内, 年龄 40~80 岁。对照组受试者性别、年龄与病例组匹配, 为健康个体或同期患非神经系统疾病且病情较轻微的住院患者。所有研究对象均为相互之间无亲缘关系的中国汉族人

基金项目: 国家自然科学基金 (81260594, 81473670); 广西自然科学基金 (2013GXNSFAA019145); 广西中医药大学第一附属医院青年科学基金 (CZYQJ2014007); 广西高等学校优秀中青年骨干教师培养工程

* 通讯作者: tangnong2012@163.com, (0771) 5848507

群, 并签署知情同意书。

1.3 排除标准

所有纳入病例均排除因肿瘤、心脏源性栓塞、脑外伤、短暂性脑缺血发作、脑血管畸形等其他原因引起的中风; 合并系统性疾病, 如炎症性疾病, 胶原性疾病, 严重心、肝、肾功能障碍。对照组排除有脑卒中、冠心病者, 合并自身免疫性疾病者, 近期使用激素或免疫抑制剂者。

1.4 一般资料

本研究病例组纳入 2012 年 9 月至 2014 年 6 月于广西中医药大学第一附属医院神经内科住院的缺血性中风患者 595 例, 其中风痰瘀阻证患者 311 例, 男 188 例, 女 123 例, 平均年龄 (64.46 ± 10.90) 岁; 气虚血瘀证患者 284 例, 男 142 例, 女 142 例, 平均年龄 (66.99 ± 10.45) 岁。对照组受试者为同期广西中医药大学第一附属医院体检中心参加健康体检的正常个体以及骨科等患非神经系统疾病且病情较轻微的住院患者, 共 605 例, 男 327 例, 女 278 例, 平均年龄 (65.56 ± 12.45) 岁。病例组和对照组受试者性别、年龄分布上差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取和多态性引物设计

抽取研究对象清晨空腹外周静脉血 2 ml, EDTA 抗凝, 4℃ 保存。采用北京天根科技有限公司全血基因组 DNA 快速提取试剂盒 (TIANamp Blood DNA Kit 离心柱形, 北京天根生化科技公司, 批号 Cat no. DP318-03) 提取基因组 DNA。以 1 μl DNA 原液, TE 稀释 100 倍, 于 BioPhotometer Plus 核酸蛋白测定仪 (型号 Eppendorf, 艾本德中国) 测定 DNA 浓度和纯度 ($OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$, DNA 提取合格)。采用引物设计软件 Sequenom Assay Designer 3.1 software (Sequenom, San Diego, CA, USA) 进行 MAP2K4 基因多态性 rs3826392, MAPK1 基因多态性 rs6928、rs9340 的引物设计。运用北京博森公司 Sequenom 实验平台进行基因分型, 分型结果如下: rs3826392 等位基因为 C/A, 其中次等位基因为 C, 主要等位基因为 A; rs6928 等位基因为 G/C, 其中次等位基因为 G, 主要等位基因为 C; rs9340 等位基因为 T/C, 次等位基因为 T, 主要等位基因为 C。

2.2 外周血 mRNA 提取和基因相对表达量测定

抽取研究对象清晨空腹外周血 2 ml, EDTA 抗

凝, 严格按照操作步骤进行外周血单核细胞 (PB-MC) 分离实验。采用美国 Invitrogen 公司提供的 Trizol 试剂 (批号 Cat no. 15596-026) 提取总 RNA, 分装 3 管, -80℃ 低温冰箱保存备用。使用紫外分光光度计 (北京北分瑞利分析仪器公司, 型号 UV1801) 分别测定 RNA 在 260 nm 与 280 nm 处的吸光度, 以此推算 mRNA 的浓度, 以 OD_{260}/OD_{280} 表示 RNA 纯度, 若纯度介于 $1.7 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ 范围, RNA 提取合格。采用 Prime-Script™ RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa) 进行 mRNA 逆转录合成 cDNA 实验, 严格按照试剂盒 (大连 TaKaRa 公司, 批号 Cat no. RR047A) 说明书进行操作, 采用 20 μl 反应体系。本研究以 GAPDH 为管家基因, 以 MAP2K4, MAPK1 为目的基因。RT-PCR (美国 Bio-Rad 公司, 批号 CFX96) 检测各标本 MAP2K4 与 MAPK1 基因 mRNA 表达水平。引物设计应用 Primer Premier5 软件, 由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列: GAPDH 上游引物: 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3', 下游引物: 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3', 长度均为 23bp; MAP2K4 上游引物: 5'-TGTGGCACTGGATCAATGAG-3', 下游引物: 5'-GTCTTGCTGACCAATGAGAG-3', 长度均为 20bp; MAPK1 上游引物: 5'-CGTTGGTACAGGGCTC-CAGAA-3', 长度 21bp, 下游引物: 5'-CTGC-CAGAATGCAGCCTACAGA-3', 长度 22bp。以 SYBR Green (TAKARA) 为荧光标记物, 进行 PCR 扩增和荧光检测。反应体系: 总体系为 20.0 μl, 其中 SYBR Premix Ex Taq: 5 μl; 上游引物: 4 μl; 下游引物: 4 μl; cDNA 模板: 2 μl; ddH₂O: 10 μl。PCR 扩增循环: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 60℃ 30 s, 共 40 个循环。结果采用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)。 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{病例组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。

2.3 血脂水平测定

抽取研究对象清晨空腹外周血 2 ml, 非抗凝管装置。检测试剂盒购自浙江伊利康生物技术有限公司, 采用 HITACHI 日立全自动生化分析仪 (7600-020ISE 型), 按照标准化试验程序对血清总胆固醇 (TC, 批号 L6002)、甘油三酯 (TG, 批号 L6001)、高密度脂蛋白 (HDL, 批号 L6003)、低密度脂蛋白 (LDL, 批号 L6004) 进行测定。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计分析软件, 计数资料组间

比较采用卡方检验, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 标示, 组间比较采用方差分析或非参数检验。采用 PLINK 1.07 软件 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>), 应用拟和优度 χ^2 检验进行正常对照基因型分布 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) 平衡分析, 以非条件 Logistic 回归模型分析基因型与缺血性中风易感性的关联。所有的 OR 值均经年龄、性别因素校正。采用线性回归分析各位点多态性与血脂水平的关联。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两中医证型与正常对照 MAP2K4 和 MAPK1 基因型、等位基因型分布比较

正常对照 MAP2K4 基因多态性 rs3826392 和 MAPK1 基因多态性 rs6928、rs9340 基因型 A1A1/

A1A2/A2A2 平衡分析结果 PHWE 分别为 0.786、0.745、0.302。表 1 示, 两中医证型与正常对照 MAP2K4 基因多态性 rs3826392 和 MAPK1 基因多态性 rs6928、rs9340 基因型各位点基因型频率和等位基因分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 MAP2K4、MAPK1 基因多态性与缺血性中风风痰瘀阻证、气虚血瘀证易感性关联分析

表 2 示, 在总样本中, rs3826392、rs6928 和 rs9340 与风痰瘀阻证、气虚血瘀证的易感性无显著关联 ($P > 0.05$)。性别分层分析结果显示, 在男性样本中, rs9340 多态性与风痰瘀阻证易感性的关联存在统计学意义 (隐性模型: 校正 OR = 2.10, 95% CI = 1.02 ~ 4.32, $P_{\text{adj}} = 0.043$)。在女性样本中, 未观察到这 3 个位点多态性与相应的证型易感性关联具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 风痰瘀阻证、气虚血瘀证与正常对照 MAP2K4 和 MAPK1 基因型、等位基因型分布比较

组别	例数	基因型 (A1A1/A1A2/A2A2)			等位基因型 (A1/A2)		
		rs3826392	rs6928	rs9340	rs3826392	rs6928	rs9340
正常对照	605	21/179/405	138/307/160	27/223/355	221/989	583/627	277/933
风痰瘀阻证	311	6/102/203	71/149/91	22/106/183	114/508	291/331	150/472
气虚血瘀证	284	10/88/186	61/142/81	21/92/171	108/460	264/304	131/434
χ^2 值	2.433	0.925	3.060	0.001	0.322	0.344	
P_1 值	0.296	0.630	0.217	0.973	0.571	0.558	
χ^2 值	0.188	0.481	4.241	0.144	0.449	0.106	
P_2 值	0.910	0.786	0.120	0.704	0.503	0.744	

注: A1: 次要等位基因型; A2: 主要等位基因型; χ^2 值、 P_1 值, 正常对照与风痰瘀阻证比较; χ^2 值、 P_2 值, 正常对照与气虚血瘀证比较

表 2 MAP2K4、MAPK1 基因多态性与风痰瘀阻证、气虚血瘀证易感性关联分析

证型	分组	单核苷酸多态性	加性模型		显性模型		隐性模型	
			校正 OR (95% CI)	P_{adj}	校正 OR (95% CI)	P_{adj}	校正 OR (95% CI)	P_{adj}
风痰瘀阻证	总样本	rs3826392	1.02 (0.79 ~ 1.32)	0.877	1.10 (0.82 ~ 1.47)	0.523	0.55 (0.22 ~ 1.38)	0.204
		rs6928	0.94 (0.77 ~ 1.14)	0.530	0.86 (0.63 ~ 1.16)	0.328	0.99 (0.72 ~ 1.38)	0.986
		rs9340	1.07 (0.85 ~ 1.35)	0.544	1.01 (0.76 ~ 1.32)	0.994	1.60 (0.89 ~ 2.86)	0.115
	男性	rs3826392	1.09 (0.77 ~ 1.52)	0.634	1.13 (0.77 ~ 1.66)	0.538	0.90 (0.30 ~ 2.67)	0.844
		rs6928	1.06 (0.83 ~ 1.37)	0.633	0.91 (0.60 ~ 1.36)	0.633	1.31 (0.88 ~ 1.99)	0.198
		rs9340	1.33 (0.99 ~ 1.77)	0.059	1.28 (0.89 ~ 1.85)	0.181	2.10 (1.02 ~ 4.32)	0.043
	女性	rs3826392	0.94 (0.63 ~ 1.39)	0.751	1.06 (0.68 ~ 1.65)	0.807	0.20 (0.03 ~ 1.56)	0.125
		rs6928	0.79 (0.58 ~ 1.07)	0.133	0.81 (0.51 ~ 1.29)	0.380	0.64 (0.37 ~ 1.11)	0.108
		rs9340	0.77 (0.53 ~ 1.13)	0.182	0.71 (0.46 ~ 1.10)	0.129	0.94 (0.32 ~ 2.74)	0.913
气虚血瘀证	总样本	rs3826392	1.04 (0.81 ~ 1.35)	0.747	1.06 (0.78 ~ 1.42)	0.719	1.02 (0.47 ~ 2.19)	0.969
		rs6928	0.94 (0.77 ~ 1.15)	0.530	0.91 (0.67 ~ 1.25)	0.579	0.92 (0.66 ~ 1.30)	0.641
		rs9340	1.04 (0.82 ~ 1.31)	0.766	0.94 (0.70 ~ 1.25)	0.649	1.70 (0.94 ~ 3.06)	0.079
	男性	rs3826392	1.19 (0.83 ~ 1.70)	0.346	1.24 (0.82 ~ 1.87)	0.319	1.15 (0.38 ~ 3.43)	0.802
		rs6928	1.01 (0.76 ~ 1.34)	0.939	0.98 (0.63 ~ 1.54)	0.933	1.05 (0.66 ~ 1.68)	0.831
		rs9340	1.04 (0.74 ~ 1.45)	0.827	1.01 (0.67 ~ 1.51)	0.960	1.24 (0.51 ~ 3.00)	0.631
	女性	rs3826392	0.92 (0.64 ~ 1.33)	0.653	0.89 (0.58 ~ 1.38)	0.611	0.98 (0.33 ~ 2.90)	0.964
		rs6928	0.88 (0.66 ~ 1.17)	0.364	0.87 (0.56 ~ 1.36)	0.548	0.80 (0.48 ~ 1.31)	0.369
		rs9340	1.06 (0.76 ~ 1.48)	0.744	0.89 (0.59 ~ 1.35)	0.580	2.25 (0.99 ~ 5.09)	0.052

注: P_{adj} : 根据年龄进行校正

3.3 不同基因型缺血性中风患者 mRNA 表达水平比较

共有 75 例中风病例完成 MAPK1 基因的 mRNA 表达水平测定, 其中, 风痰瘀阻证 38 例、气虚血瘀证 37 例, 各证型分别有 20 例进行基因分型。表 3 示, 在风痰瘀阻证患者中, 携带 rs6928 CC 基因型患者的 MAPK1 mRNA 表达水平显著低于 (GG + GC) 基因型携带者 ($P = 0.006$), 未观察到 rs3826392 和 rs9340 遗传多态性对 MAP2K4、MAPK1 基因表达水平有显著影响。在气虚血瘀证患者中, 未观察到 rs3826392、rs6928 和 rs9340 对 MAP2K4、MAPK1 基因表达水平有显著影响。

表 3 不同 rs6928 基因型缺血性中风痰瘀阻证患者的 MAPK1 mRNA 表达水平比较

遗传模型	基因型	例数	MAPK1 mRNA	Z 值	P 值
显性模型	GG + GC	14	1.10 (0.69 ~ 2.10)	-2.17	0.006
	CC	6	0.74 (0.21 ~ 1.00)		
隐性模型	CC + GC	18	1.06 (0.74 ~ 1.63)	-0.25	0.801
	GG	2	1.22 (0.60 ~ 2.39)		
等位模型	G	16	1.44 (0.89 ~ 2.77)	-1.33	0.184
	C	24	0.97 (0.82 ~ 1.34)		

3.4 MAP2K4、MAPK1 基因多态性与中风风痰瘀阻证、气虚血瘀证患者血脂水平关联分析

表 4 示, 风痰瘀阻证 rs3826392、rs6928 和 rs9340 与患者的 TC、TG、HDL、LDL 水平之间的关联均无统计学意义 ($P > 0.05$)。气虚血瘀证 rs6928

与患者 TG、HDL 水平显著关联 ($P < 0.05$), rs9340 与患者的 TG 水平显著关联 ($P < 0.05$)。

4 讨论

HWE 平衡定律是指对于一个大且随机交配的种群, 基因频率和基因型频率在没有迁移、突变和选择的条件下会保持不变, 因此这个平衡也称遗传平衡定律。不符合哈代-温伯格遗传平衡定律表明所选择的人群有可能不是来自自然群体, 影响基因型鉴定的准确性^[9]。本研究结果显示, $P_{HWE} > 0.05$, 表明符合 HWE 平衡定律, 本研究群体调查的数据可信。中医学认为, 中风为阴阳失调、气血逆乱所致。病理因素以风、火、痰、气、瘀、虚多见, 风痰瘀阻证与气虚血瘀证是中风常见的代表性中医证型。中风是一种证候复杂的疾病, 不同证型的缺血性中风患者具有不同的临床表型和遗传特征, 提示某些易感基因遗传多态性影响中医证型的发生^[9]。姚群峰等^[8]发现 MTHFR 基因 C677T 多态性与中风肝阳上亢、痰湿瘀阻证有显著关联; 贾妮等^[8]报道 ACE 基因的 D 等位基因与中风痰证, I 等位基因与气虚证的发生存在相关性。

MAPK 广泛分布于中枢神经系统中, 参与细胞运动、增殖、分化和凋亡等生理过程。MAPK 信号通路是缺血性脑损伤发生发展的重要通路^[10]。MAP2K4 位于人类染色体 17p11.2, MAPK1 位于人类染色体 22q11.21, 均为 MAPK 信号传导通路中

表 4 不同中医证候缺血性中风患者 MAP2K4、MAPK1 基因多态性与血脂水平关联分析

证型	单核苷酸多态性	模型	总胆固醇		甘油三酯		高密度脂蛋白		低密度脂蛋白	
			β (95% CI)	P_{adj}	β (95% CI)	P_{adj}	β (95% CI)	P_{adj}	β (95% CI)	P_{adj}
风痰瘀阻证	rs3826392	加性模型	0.28 (-0.61 ~ 0.06)	0.109	-0.04 (-0.23 ~ 0.15)	0.674	0.01 (-0.06 ~ 0.08)	0.817	-0.18 (-0.39 ~ 0.05)	0.126
		显性模型	-0.29 (-0.66 ~ 0.08)	0.128	-0.02 (-0.23 ~ 0.18)	0.827	0.02 (-0.05 ~ 0.10)	0.533	-0.19 (-0.43 ~ 0.05)	0.122
		隐性模型	-0.52 (-1.80 ~ 0.76)	0.428	-0.30 (-0.99 ~ 0.40)	0.405	-0.17 (-0.42 ~ 0.09)	0.200	-0.18 (-1.02 ~ 0.65)	0.671
	rs6928	加性模型	-0.15 (-0.40 ~ 0.09)	0.226	-0.01 (-0.15 ~ 0.12)	0.882	-0.03 (-0.08 ~ 0.02)	0.208	-0.05 (-0.21 ~ 0.11)	0.528
		显性模型	-0.21 (-0.60 ~ 0.17)	0.276	0.06 (-0.15 ~ 0.28)	0.549	-0.04 (-0.12 ~ 0.04)	0.298	-0.04 (-0.29 ~ 0.22)	0.778
		隐性模型	-0.19 (-0.61 ~ 0.23)	0.374	-0.11 (-0.34 ~ 0.12)	0.363	-0.04 (-0.13 ~ 0.04)	0.304	-0.11 (-0.38 ~ 0.17)	0.435
	rs9340	加性模型	-0.02 (-0.30 ~ 0.27)	0.913	-0.02 (-0.18 ~ 0.13)	0.758	-0.02 (-0.07 ~ 0.04)	0.596	0.05 (-0.14 ~ 0.23)	0.608
		显性模型	0.04 (-0.33 ~ 0.40)	0.845	-0.04 (-0.24 ~ 0.16)	0.714	0.00 (-0.07 ~ 0.07)	0.954	0.09 (-0.14 ~ 0.33)	0.445
		隐性模型	-0.22 (-0.91 ~ 0.46)	0.524	-0.01 (-0.39 ~ 0.38)	0.961	-0.10 (-0.24 ~ 0.04)	0.163	-0.05 (-0.50 ~ 0.40)	0.831
气虚血瘀证	rs3826392	加性模型	-0.01 (-0.26 ~ 0.27)	0.970	-0.02 (-0.17 ~ 0.14)	0.847	0.05 (-0.02 ~ 0.12)	0.169	-0.01 (-0.22 ~ 0.21)	0.973
		显性模型	-0.06 (-0.37 ~ 0.25)	0.699	-0.05 (-0.23 ~ 0.13)	0.579	0.06 (-0.02 ~ 0.14)	0.171	-0.05 (-0.31 ~ 0.20)	0.675
		隐性模型	0.45 (-0.34 ~ 1.24)	0.266	0.20 (-0.26 ~ 0.66)	0.395	0.06 (-0.14 ~ 0.27)	0.552	0.33 (-0.33 ~ 0.99)	0.325
	rs6928	加性模型	-0.03 (-0.24 ~ 0.17)	0.754	0.12 (-0.24 ~ -0.001)	0.048	0.05 (-0.01 ~ 0.11)	0.070	-0.02 (-0.20 ~ 0.15)	0.800
		显性模型	-0.13 (-0.45 ~ 0.19)	0.428	0.25 (-0.44 ~ -0.06)	0.008	0.04 (-0.05 ~ 0.12)	0.373	-0.11 (-0.37 ~ 0.16)	0.445
		隐性模型	0.06 (-0.29 ~ 0.42)	0.739	-0.05 (-0.26 ~ 0.15)	0.623	0.10 (0.01 ~ 0.19)	0.034	0.06 (-0.24 ~ 0.36)	0.686
	rs9340	加性模型	0.08 (-0.16 ~ 0.31)	0.524	-0.13 (-0.26 ~ 0.004)	0.059	0.03 (-0.03 ~ 0.09)	0.276	0.06 (-0.14 ~ 0.25)	0.568
		显性模型	0.09 (-0.20 ~ 0.39)	0.536	-0.18 (-0.35 ~ -0.01)	0.041	0.05 (-0.03 ~ 0.13)	0.191	0.04 (-0.21 ~ 0.29)	0.739
		隐性模型	0.11 (-0.45 ~ 0.67)	0.706	-0.12 (-0.44 ~ 0.20)	0.473	0.01 (-0.13 ~ 0.16)	0.856	0.18 (-0.29 ~ 0.64)	0.451

注: β , 相关系数; P_{adj} , 根据性别、年龄进行校正

关键的激酶,通过激活 MAPK 级联,对缺血区神经元和未受损脑区细胞的凋亡发挥重要作用^[3]。本研究结果显示,MAPK1 基因 rs9340 多态性与中国汉族男性缺血性中风风痰瘀阻证易感性的关联具有统计学意义,但未发现该位点多态性与气虚血瘀证发生显著关联,表明 rs9340 可能参与缺血性中风风痰瘀阻证的发生机制,但对气虚血瘀证的发生无显著影响,提示 rs9340 可作为鉴别缺血性中风辨证分型的潜在生物学标志。另外,我们并未发现 rs9340 多态性与女性缺血性中风风痰瘀阻证显著关联,提示该位点对缺血性中风风痰瘀阻证发生机制的影响可能存在一定的性别差异。研究表明,由于雌激素、雄激素^[1]及男性与女性间遗传差异^[2]的影响,中风患病风险存在性别差异^[3]。如赵杰等^[4]发现 ALOX15 基因 rs721786 和 rs2619112 多态性与中国北方汉族男性患者动脉粥样硬化性中风的易感性相关联,而未发现与女性患者在该中风亚型易感性相关联。

LUEDDE M 等^[5] 研究报道,MAPK1 基因 rs6928 多态性与冠心病的发生显著关联,脂质代谢异常是冠心病与动脉粥样硬化的共同危险因素,而动脉粥样硬化是中风发生的病理基础。本研究发现,在缺血性中风气虚血瘀证患者中,rs6928 与 TG 及 HDL 水平显著关联,rs9340 与 TG 显著关联,但未发现这两个基因多态性与风痰瘀阻证患者的血脂水平的关联具有统计学意义,表明 MAPK1 基因多态性对中风气虚血瘀证、风痰瘀阻证的脂质代谢的影响存在差异。《医林改错》指出“中风半身不遂、偏身麻木是由气虚血瘀而成。”气虚为本,血瘀为标。气虚日久,可致血瘀,气血失畅,脑络瘀阻,神机失用,发为中风。饮食不节,过食肥甘,情志失调,劳欲过度亦为中风之病因,终致气虚血瘀,气血津液代谢紊乱。始虚-生痰-生瘀是中风的病理基础,而脂质代谢与中医的“痰、瘀”密切关联。聂琼芳^[6] 研究发现,中风气虚血瘀证患者血液流变异常,血流成“浓、黏、凝、聚”状态,与血瘀证的病理实质一致。邱昕等^[7] 发现,在 900 例中风患者中,气虚血瘀证患者较风痰瘀阻证更易发生高血脂症。由此可见,中风证型与现代医学的血脂指标存在关联,而我们的研究结果提示 rs6928 和 rs9340 可作为鉴别缺血性中风辨证分型的分子生物学依据。

综上所述,MAPK1 基因多态性可能影响中国男性缺血性中风风痰瘀阻证的发生,同时影响气虚

血瘀证的血脂水平,提示可将 MAPK1 基因作为缺血性中风证型遗传关联研究的候选基因。为排除假阳性结果,本研究从多方面进行了严格的实验控制:纳入的研究对象均为南方汉族人,病例组和对照组在性别、年龄上相匹配,具有可比性;严格按照实验操作步骤进行实验操作;采用 Sequenom 技术进行基因分型,该实验技术更为准确、高效,并随机抽取 5% 的样本进行盲法重复测量,基因分型一致率达 100%;采用遗传学统计软件 PLINK 1.07 进行遗传关联的统计分析,以保证研究结果的可靠性。但是,本研究样本量相对较小,尚需大样本量、多中心的后续研究以验证我们的研究结果。

参考文献

- [1] 黄月芳,章正贤. 中医药防治缺血性中风的临床研究概况 [J]. 中医杂志,2011,52(10):885-888.
- [2] 杨利,黄燕,蔡业峰,等. 1418 例中风患者痰瘀证候分布和演变规律探析 [J]. 辽宁中医杂志,2004,31(6):459-460.
- [3] IRVING EA, BARONE FC, REITH AD, et al. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat [J]. Brain Res Mol Brain Res,2000,77(1):65-75.
- [4] 中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点 [J]. 中华神经科杂志,1996,29(6):379.
- [5] 国家中医药管理局脑病急症协作组. 中风病诊断与疗效评定标准(试行) [J]. 北京中医药大学学报,1996,19(1):55-56.
- [6] WAPLES RS. Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? [J]. J Hered,2015,106(1):1-19. doi: 10.1093/jhered/esu062.
- [7] 管冬元,方肇勤. 中医证候与基因相关性研究的现状与反思 [J]. 中医杂志,2005,46(8):569-571.
- [8] 姚群峰,许倩倩,郭爽. 缺血性脑卒中医证型与 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 多态性的相关性研究 [J]. 湖北中医药大学学报,2013,15(3):20-22.
- [9] 贾妮,尤劲松,黄培新. ACE 基因多态性与急性缺血性中风始发证候相关性的研究 [J]. 辽宁中医杂志,2008,35(4):481-482.
- [10] SAWE N, STEINBERG G, ZHAO H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke [J]. J Neurosci Res,2008,86(8):1659-1669.
- [11] KRAUSE DN, DUCKLES SP, PELLIGRINO DA. Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function [J]. J Appl Physiol (1985),2006,101(4):1252-1261.
- [12] TOUZÉ E, ROTHWELL PM. Sex Differences in Heritability of Ischemic Stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. Stroke,2015,46(12):3555-3562.

- nalyses [1]. Stroke, 2008, 39(1): 16-23.
- [3] APPELROS P, STEGMAYR B, TERÉNT A. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review [J]. Stroke, 2009, 40(4): 1082-1090.
- [4] ZHAO J, HE Z, MA S, et al. Association of ALOX15 gene polymorphism with ischemic stroke in Northern Chinese Han population [J]. J Mol Neurosci, 2012, 47(3): 458-464.
- [5] LUEDDE M, SCHAEFER AS, SCHELLER N, et al. Key genes of the interleukin 6 signaling pathway are not associated with coronary artery disease in a large European population [J]. Open J Genet, 2013, 3, 67-78. DOI: 10.4236/ojgen.2013.31008.
- [6] 聂琼芳. 中风病中医证型与血液流变学改变的相关性研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1967-1968.
- [7] 邱昕, 王开欣, 陈国华, 等. 武汉地区 900 例缺血性脑卒中风痰瘀阻型及气虚血瘀型患者危险因素回顾性分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(11): 1483-1485.

Association Analysis of Gene Polymorphism of MAP2K4 and MAPK1 and Different Syndrome Types and Serum Lipid Levels in Patients with Ischemic Stroke

GU Lian¹, WU Yanli¹, LIANG Baoyun¹, TAN Jinjing¹, CHEN Qing¹, WEI Qiugui¹, SHEN Tingting¹, JIANG Haiyun¹, TANG Nong²

(1. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi; 2. Guangxi University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the association between the gene polymorphism of mitogen activated protein kinase 4 (MAP2K4) and mitogen activity protein kinase 1 (MAPK1) and the susceptibility of ischemic stroke with wind phlegm and blood stasis syndrome, Qi deficiency and blood stasis syndrome and the blood lipid level. **Methods** A case control study method was applied, and there were 311 cases of ischemic stroke with phlegm and blood stasis syndrome, 284 cases with Qi deficiency and blood stasis syndrome, and 605 cases of normal control subjects included. Gene typing was performed by using Sequenom technology, the expression level of MAP2K4 and mRNA of MAPK1 in peripheral blood and the blood lipid level were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). **Results** The MAPK1 gene rs9340 polymorphism was significantly associated with the susceptibility to wind phlegm and blood stasis syndrome in male patients with ischemic stroke ($P = 0.047$), however there was no association between MAPK1 gene rs6928 polymorphism and MAP2K4 gene rs3826392 polymorphism and the susceptibility of ischemic stroke with wind phlegm stasis syndrome, and Qi deficiency and blood stasis syndrome ($P > 0.05$). The expression level of mRNA MAPK1 was significantly lower in patients with wind phlegm and blood stasis syndrome carrying rs6928 CC genotype than other genotype carriers ($P = 0.006$). In ischemic stroke patients with Qi deficiency and blood stasis syndrome, MAPK1 gene rs6928 polymorphism was significantly associated with levels of triglyceride (TG) and high density lipoprotein (HDL) ($P < 0.05$), and there was significant association between rs9340 and TG levels ($P < 0.05$), but the association between MAP2K4 gene rs3826392 polymorphism and the blood lipid levels in ischemic stroke patients with phlegm and blood stasis syndrome, Qi deficiency and blood stasis syndrome were not found ($P > 0.05$). **Conclusion** MAPK1 gene rs9340 polymorphism may affect the occurrence of ischemic stroke with wind phlegm and blood stasis syndrome in Chinese male. MAPK1 gene polymorphism affects the blood lipid metabolism in ischemic stroke with Qi deficiency and blood stasis.

Keywords ischemic stroke; wind phlegm and blood stasis syndrome; syndrome of Qi deficiency and blood stasis; mitogen activated protein kinase; single nucleotide polymorphism; blood lipid

(收稿日期: 2015-08-07; 修回日期: 2015-09-25)

编辑: 柴倩云