

文章编号:1003-2754(2019)02-0136-04

GALNT2 基因启动子区甲基化与急性脑梗死的相关分析

郭 丹, 刘 丹, 张广炜

摘要: **目的** 探讨 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2 (GALNT2) 基因启动子区甲基化与急性脑梗死的相关性。**方法** 选取急性脑梗死患者 84 例与同期来我科就诊的非急性脑梗死患者 90 例,通过实验检测急性脑梗死与非急性脑梗死患者体内 GALNT2 基因启动子区甲基化的表达情况及与脑梗死危险因素的相关性。**结果** 急性脑梗死组 GALNT2 基因启动子甲基化阳性率明显高于对照组 ($P < 0.01$),与 GALNT2 基因启动子区甲基化阳性呈正相关 ($r = 0.263, P < 0.01$),且是急性脑梗死发病的独立危险因素 ($OR = 2.346, 95\% CI 1.160 \sim 4.743, P < 0.05$)。**结论** GALNT2 基因启动子区甲基化状态的改变可能会引起急性脑梗死的发生,并且通过检测 GALNT2 基因启动子区甲基化状态的改变能够对急性脑梗死的基因预防与治疗提供良好的基础。

关键词: GALNT2; 甲基化; 急性脑梗死**中图分类号:** R743.3 **文献标识码:** A

Correlation analysis of GALNT2 gene promoter region methylation and acute cerebral infarction GUO Dan, LIU Dan, ZHANG Guangwei. (Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between methylation in the promoter region of n-acetylgalactosyltransferase 2 (GALNT2) gene and acute cerebral infarction. **Methods** 84 patients with acute cerebral infarction and 90 patients with non-acute cerebral infarction who visited our department at the same time were selected. The methylation of GALNT2 gene promoter region in patients with acute cerebral infarction and non-acute cerebral infarction were detected by experiments and the correlation between methylation and risk factors of cerebral infarction was also detected. **Results** The positive methylation rate of GALNT2 gene promoter in the acute cerebral infarction group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$), which was positively correlated with the positive methylation rate of GALNT2 gene promoter ($r = 0.263, P < 0.01$), and was an independent risk factor for the onset of acute cerebral infarction ($OR = 2.346, 95\% CI 1.160 \sim 4.743, P < 0.05$). **Conclusion** The change of hypermethylated state of GALNT2 gene promoter may cause the occurrence of acute cerebral infarction, which can provide a good foundation for gene prevention and treatment of acute cerebral infarction.

Key words: GALNT2; Methylation; Acute cerebral infarction

GALNT2 基因属于多肽-N-乙酰氨基半乳糖转移酶家族中的一员,其主要功能是参与 O-糖基化的第一步反应^[1]。在已知的研究中表明 GALNT2 基因内中 1q42 突变与血浆中高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 与甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平有关^[2],它是脂蛋白脂肪酶 (LPL) 的抑制剂, LPL 在极低密度脂蛋白 (VLDL) 和乳糜微粒中水解 TG,影响 HDL-C 和 TG 水平^[3]。近些年来, DNA 甲基化已成为新的研究热点,是指 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 上的甲基在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyl transferase, DNMT) 的催化作用下,与胞嘧啶的 C5 位结合形成

甲基胞嘧啶 (5 mC) 的化学修饰过程^[4]。DNA 甲基化主要发生在 CpG 异二核苷酸上,主要集中于 CpG 岛,而该区域主要集中于一些基因的启动子区,而 CpG 岛的甲基化可以使一些转录因子无法与 DNA

收稿日期:2018-12-23;修订日期:2018-01-30

基金项目:内蒙古科技大学包头医学院青苗计划项目 (No. BYJJ-QM 201751)

作者单位:(内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院,内蒙古 包头 014010)

通讯作者:刘 丹, E-mail: liudanbaotou2313@163.com; 张广炜, E-mail: 47603758@qq.com

结合而抑制基因的转录,最终影响基因的表达。已知 GALNT2 基因启动子区甲基化的转变将会影响基因的表达,降低 HDL-C,升高 TG,引起脂质代谢紊乱,促使动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的形成与发展。而本课题主要是研究 GALNT2 基因启动子区甲基化与急性脑梗死之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 病例组随机选择在我院神经内科 2017 年 9 月-2018 年 10 月住院的急性脑梗死患者 84 例,均为汉族,彼此无亲缘关系。对照组选择同一时间段来我院住院的非急性脑梗死患者 90 例。病例组入选标准:(1)年龄 ≥ 18 岁;(2)发病时间 ≤ 7 d;(3)脑梗死诊断符合 1996 年全国第四届脑血管病学术会议修订的脑梗死的诊断标准,且经头部 CT 或 MRI 检查证实。病例组排除标准:(1)既往曾有脑出血病史或 CT 显示存在脑出血;(2)有明显的心、肝、肾功能不全及恶性肿瘤;(3)存在心房颤动等严重心律失常;(4)心源性栓塞所致的卒中。

1.2 方法与分组 病例组与对照组于入院次日清晨采集肘静脉血共计 2 ml,用抗凝管编号后放入 -20°C 低温冰箱保存。进行亚硫酸氢盐修饰基因组 DNA 和基因组 DNA 纯化回收,甲基化特异性 PCR(Methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)检测和琼脂糖凝胶电泳判定甲基化结果,用 BECKMAN LX20 全自动生化仪(美国 Beckman Coulter 公司)测胆固醇(total cholesterol, TC)、TG、HDL-C、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件包对数据进行统计描述和分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间比较采用独立样本 t 检验。计数资料采用频数(构成比)描述及 χ^2 检验,两种指标的相关性分析采用 Pearson 线性相关分析或 Spearman 秩相关分析。多因素分析采用 Logistic 回归分析,将相关分析中 $P < 0.05$ 的所有变量纳入多变量回归分析,结果用校正后的 OR 值或 95% 可信区间表示。 $P < 0.05$ 被视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组和对照组的一般资料和临床实验指标对比 P 值来源于独立样本 t 检验及 χ^2 检验,结果显示年龄、性别、空腹血糖、TC、TG、LDL-C 的组间 $P > 0.05$,差异无统计学意义;而收缩压、舒张压、

抽烟史、饮酒史、HDL-C 的组间 P 值 < 0.05 ,差异有统计学意义(见表 1)。

2.2 GALNT2 基因甲基化特异性 PCR 检测结果 采用甲基化和非甲基化特异性引物扩增被亚硫酸氢盐修饰转化后的对照组和病例组 DNA 时, GALNT2 甲基化引物与非甲基化引物扩增得到预期大小的扩增片段如(见图 1)。

在检测的急性脑梗死组患者血液标本 GALNT2 基因启动子区甲基化阳性人数为 45 人,其甲基化阳性率为 53.57%,而对照组阳性人数为 25 人,其甲基化阳性率为 27.78%, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

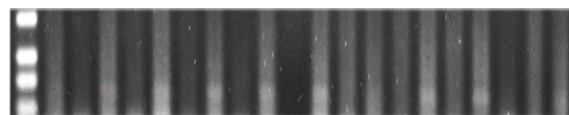


图 1 GALNT2 基因甲基化特异性 PCR 检测电泳图。M:甲基化引物扩增产物;U:非甲基化引物扩增产物

2.3 病例组与对照组一般资料、临床实验指标、GALNT2 基因启动子区甲基化的相关性分析 分别对病例组与对照组和年龄、性别、抽烟、饮酒、血压、血脂及 GALNT2 基因甲基化情况进行 Pearson 线性相关或 Spearman 秩相关分析(正态分布数据进行 Pearson 相关分析,偏态分布数据进行 Spearman 秩相关分析),结果显示:急性脑梗死与抽烟($r = 0.349, P = 0.000$)、饮酒($r = 0.162, P = 0.033$)、收缩压($r = 0.259, P = 0.001$)、GALNT2 基因启动子甲基化阳性情况($r = 0.263, P = 0.000$)均为正相关;而与 HDL-C($r = -0.255, P = 0.001$)为负相关,表明抽烟、饮酒、高血压、GALNT2 基因启动子区甲基化阳性与低的 HDL-C 均为急性脑梗死发病的危险因素(见表 2)。

2.4 急性脑梗死发病危险因素的 Logistic 回归分析 将急性脑梗死与其危险因素进行相关分析中的 $P < 0.05$ 的各变量进行 Logistic 回归分析,在校正其他危险因素后,结果显示:抽烟史、收缩压、HDL-C、GALNT2 基因启动子区甲基化阳性与急性脑梗死的发病明显相关,可能是急性脑梗死发病的独立危险因素。其中 GALNT2 基因启动子区甲基化每增加 1 倍,急性脑梗死发病率增加 2.346 倍(95% CI 1.160~4.743)(见表 3)。

表1 病例组和对照组的一般资料与临床实验指标对比

指标	病例组 (n = 84)	对照组 (n = 90)	t/χ^2	P
年龄(岁)	61.64 ± 11.25	63.32 ± 11.85	-0.96	0.34
性别(男: 女)	48: 36	40: 50	2.8	0.094
抽烟(是: 否)	45: 39	18: 72	21.2	0.000 **
饮酒(是: 否)	17: 67	8: 82	4.55	0.033 *
收缩压(mmHg)	146.43 ± 21.01	136.04 ± 20.70	3.28	0.001 *
舒张压(mmHg)	85.05 ± 12.43	80.97 ± 9.98	3.4	0.018 *
空腹血糖(mmol/L)	6.61 ± 3.42	5.83 ± 1.88	1.88	0.062
TG(mmol/L)	1.88 ± 1.14	1.89 ± 1.55	-0.05	0.960
TC(mmol/L)	4.54 ± 1.19	4.80 ± 1.27	-1.41	0.162
LDL-C(mmol/L)	2.85 ± 0.99	2.89 ± 0.95	-0.32	0.753
HDL-C(mmol/L)	1.15 ± 0.30	1.35 ± 0.41	-3.46	0.001 **

病例组与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 病例组与对照组一般资料、临床实验指标、GALNT2 基因启动子区甲基化的相关性分析

指标	病例组 (n = 84)	对照组 (n = 90)	r	P
年龄(岁)	61.64 ± 11.25	63.32 ± 11.85	-0.073	0.340
性别(男: 女)	48: 36	40: 50	0.127	0.095
抽烟(是: 否)	45: 39	18: 72	0.349	0.000 **
饮酒(是: 否)	17: 67	8: 82	0.162	0.033 *
收缩压(mmHg)	146.43 ± 21.01	136.04 ± 20.70	0.259	0.001 *
舒张压(mmHg)	85.05 ± 12.43	80.97 ± 9.98	0.149	0.050
空腹血糖(mmol/L)	6.61 ± 3.42	5.83 ± 1.88	0.147	0.053
TG(mmol/L)	1.88 ± 1.14	1.89 ± 1.55	0.091	0.233
TC(mmol/L)	4.54 ± 1.19	4.80 ± 1.27	-0.107	0.162
LDL-C(mmol/L)	2.85 ± 0.99	2.89 ± 0.95	-0.024	0.753
HDL-C(mmol/L)	1.15 ± 0.30	1.35 ± 0.41	-0.255	0.001 **
GALNT2 甲基化	45: 39(53.57%)	25: 65(27.78%)	0.263	0.000 **

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, r 为相关系数, P 为对年龄、性别、抽烟、饮酒、血压、血脂、GALNT2 基因启动子区甲基化指标进行 Pearson 线性相关分析或 Spearman 秩相关分析的 P 值

表3 急性脑梗死发病危险因素的 Logistic 回归分析

指标	OR	95% CI	P
抽烟史	3.249	1.477 ~ 7.146	0.003
收缩压	1.028	1.011 ~ 1.046	0.002
HDL-C	0.186	0.062 ~ 0.562	0.003
GALNT2	2.346	1.160 ~ 4.743	0.018

3 讨论

急性脑梗死占我国脑卒中的 69.6% ~ 70.8%^[5], 其中有大约 75% 的人存在不同程度的劳动力丧失和生活不能自理, 同时有大约 1/4 ~ 3/4 的脑梗死患者在 2 ~ 5 y 内会发生新的脑梗死。随着人

们生活水平的提高, 生活方式的改变, 脂质代谢紊乱对脑梗死的影响成为目前的研究热点。而脂代谢紊乱是 AS 发生发展的关键因素之一, 通常表现为 HDL-C 水平显著降低和(或) TC、TG、LDL-C 水平明显升高^[6]。脂质代谢失衡诱发炎症反应, AS 的起始是由于动脉壁破坏、动脉壁内皮细胞表达的炎症趋化因子导致白细胞迁移, 而吞噬了脂质的单核细胞或组织细胞与实验结果结合则形成了泡沫细胞, 胆固醇是组成泡沫细胞的主要物质。脂质代谢紊乱与炎症反应是 AS 形成的两个必备条件。而与脂代谢紊乱有关的 GALNT2 基因甲基化的改变是否是脑梗死的危险因素则成为我们今天的研究热点。

本实验的结果表明, HDL-C 水平降低是急性脑

梗死发病的危险因素,线性相关分析显示与急性脑梗死的发病呈负相关,且经过 Logistic 回归分析表示低的 HDL-C 是急性脑梗死发病的独立危险因素与已有的研究在 AS 引发的心脑血管疾病中,HDL-C 的升高是与主要的危险因素相吻合^[7]。

本研究中,在入组的急性脑梗死的患者中,GALNT2 甲基化阳性率为 53.6%,而对照组甲基化阳性率为 28%,明显高于对照组,且与 GALNT2 甲基化阳性呈正相关,这提示 GALNT2 基因甲基化的改变可能与急性脑梗死的发生有着密切的关系,且 Logistic 回归分析显示 GALNT2 基因甲基化改变是急性脑梗死的独立危险因素。而且发现抽烟、饮酒、收缩压异常也是急性脑梗死发病的危险因素,且抽烟、饮酒、收缩压与急性脑梗死呈正相关,并且经过 Logistic 回归分析发现抽烟史、收缩压为急性脑梗死发病的独立危险因素,与大量的流行病学调查发现^[8],抽烟史与急性脑梗死发病的独立危险因素一致,这主要是因为烟草中的尼古丁、一氧化碳及焦油会使内皮细胞受损,引起内皮功能紊乱,进而加速 AS 的形成,从而引起急性脑梗死的发生。并且根据王薇等人^[9]的调查研究表明,收缩压/舒张压增高,均会增加脑卒中的发病风险与本课题的研究结果收缩压是急性脑梗死发病的独立危险因素相吻合。

本课题的不足之处:我们已知的脑梗死的危险因素糖代谢异常、血脂代谢紊乱、收缩压和/或舒张压的异常^[10,11],在本课题的研究中未得出阳性结论,可能与患者正在服用降血糖药物或应用胰岛素控制血糖、服用降压药物控制血压、服用他汀类药物调节血脂有关,也可能与纳入的样本量少,并且血压采用的是入院时两次测量血压取平均值所得血压,结果存在一定的局限性,需要后期进行足够多数据的临床实验研究证明。

综合以上的研究,我们可以发现 GALNT2 基因启动子甲基化,不仅可以引起脂质代谢紊乱,还与急性脑梗死的发病存在密切的关系,所以通过检测

GALNT2 基因启动子区的甲基化情况来预测急性脑梗死的发生风险,同时也为急性脑梗死的基因治疗和预防提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Bennett EP, Mandel U, Clausen H, et al. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(6): 736-756.
- [2] Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans[J]. *Nature Genetics*, 2008, 40(2): 189-197.
- [3] Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 1999, 19(3): 472.
- [4] 汤琳琳, 麦一峰, 段世伟. DNA 羟甲基化与表观遗传学调控[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(11): 1084-1091.
- [5] Tsai CF, Thomas B, Sudlow CLM. Epidemiology of stroke and its subtypes in Chinese vs white populations: A systematic review[J]. *Neurology*, 2013, 81(3): 264-272.
- [6] Weissglasvolkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol[J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(8): 2032.
- [7] Lei C, Wu B, Liu M, et al. Risk factors and clinical outcomes associated with intracranial and extracranial atherosclerotic stenosis acute ischemic stroke[J]. *Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases the Official Journal of National Stroke Association*, 2014, 23(5): 1112-1117.
- [8] Love BB, Biller J, Jones MP, et al. Cigarette smoking. A risk factor for cerebral infarction in young adults[J]. *Arch Neurol*, 1990, 47(6): 693-698.
- [9] 王薇, 赵冬, 刘军, 等. 收缩压及舒张压与脑卒中和冠心病关系的前瞻性研究[J]. *高血压杂志*, 2000, 8(10): 276-278.
- [10] O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study[J]. *Lancet*, 2010, 376(9735): 112-123.
- [11] Jia Q, Liu L, Wang Y. Risk factors and prevention of stroke in the Chinese population[J]. *Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases the Official Journal of National Stroke Association*, 2011, 20(5): 395-400.