

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.02.006  
文章编号: 1005-8982 (2019) 02-0029-04

临床研究·论著

## TOMM40 基因 rs2075650 位点多态性与脑梗死的关系

焦雪倩, 余丹, 黄伏生

(武汉大学中南医院 检验科, 湖北 武汉 430071)

**摘要: 目的** 探讨线粒体外膜转移酶 40 (TOMM40) 基因 rs2075650 位点多态性的分布及其与武汉地区中老年人脑梗死发生的关系。**方法** 运用高分辨率熔解曲线技术对 507 例脑梗死患者和 510 例体检健康者的 TOMM40 基因 rs2075650 位点进行基因型检测。选取 80 例患者和 80 例体检健康者, 运用实时荧光定量聚合酶链反应检测 TOMM40 mRNA 的表达水平。用哈迪-温伯格技术检测对照组的群体代表性。**结果** 两组患者 TOMM40 基因 rs2075650 位点 AA、AG 及 GG 基因型频率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 两组的 A、G 等位基因频率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两组患者显性模型比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 两组患者隐性模型比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。脑梗死患者 TOMM40 mRNA 相对表达量低于对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 武汉地区中老年人 TOMM40 rs2075650 位点的多态性可能与脑梗死的发病相关。

**关键词:** 脑梗死 / 脑梗塞; TOMM40 / 基因; 多态性, 单核苷酸

**中图分类号:** R743.3

**文献标识码:** A

## Relationship between rs2075650 polymorphism of TOMM40 gene and cerebral infarction

Xue-qian Jiao, Dan Yu, Fu-sheng Huang

(Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

**Abstract: Objective** To investigate the association between rs2075650 polymorphism of translocase of outer mitochondrial membrane 40 (TOMM40) gene and cerebral infarction in middle-aged and elderly people of Wuhan. **Methods** TOMM40 rs2075650 locus was genotyped using the high resolution melting (HRM) method in 507 cerebral infarction patients (case group) and 510 healthy controls (control group). Fluorescence quantitative polymerase chain reaction was performed to detect TOMM40 mRNA expression in 80 cases and 80 controls. Hardy-Weinberg law was used to test the group representativeness of the controls. The differences between the two groups were analyzed by the Student's *t*-test, nonparametric test and Chi-square test. **Results** The frequencies of AA, AG and GG genotypes at rs2075650 locus of TOMM40 gene were significantly different between the case group and the control group ( $P < 0.05$ ), and so was the allele frequency of A and G between the two groups ( $P < 0.05$ ). There was a significant difference in dominant model (AA vs. AG + GG) between the two groups ( $P < 0.05$ ), however, there was no significant difference in recessive model (GG vs. AG + AA) between the two groups ( $P > 0.05$ ). The expression of TOMM40 mRNA in the control group was higher than in the case group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The rs2075650 polymorphism of TOMM40 gene may be related with cerebral infarction in middle-aged and elderly people of Wuhan.

**keywords:** cerebral infarction; TOMM40/gene; polymorphism, single nucleotide

收稿日期: 2018-07-23

[通信作者] 黄伏生, E-mail: huangfuse@sina.com

脑卒中是遗传和环境共同作用的疾病,具有高发率和高病死率,其中梗死性脑卒中是最常见的形式,约占全部脑卒中的 80%<sup>[1]</sup>。据报道,高血压、糖尿病及高血脂等是脑梗死的危险因素<sup>[2]</sup>。此外,一些未知的基因也与脑梗死的发生有关。线粒体外膜转移酶 40 (translocase of outer mitochondrial membrane 40, TOMM40) 定位于 19q13.2,在某些蛋白质如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶及氧自由基清除因子等进入线粒体的过程中起作用<sup>[3]</sup>。本研究采用高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 技术,探索 TOMM40 基因多态性与武汉地区中老年人脑梗死发病的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 9 月—2017 年 7 月在武汉大学中南医院就诊的 507 例汉族脑梗死患者作为脑梗死组。其中,男性 305 例,女性 202 例;年龄 40 ~ 84 岁,平均 (66.89 ± 11.68) 岁;所有患者经过 CT 或 MRI 证实。纳入标准:无脑梗死病史,经 CT 或 MRI 检查无脑血管病变。排除标准:脑出血、颅内占位、自身免疫性疾病、严重的肝肾疾病、感染性疾病及恶性肿瘤。收集同期在武汉大学中南医院体检中心就诊的 510 例汉族健康体检者作为对照组。其中,男性 313 例,女性 197 例;年龄 42 ~ 87 岁,平均 (65.62 ± 11.77) 岁;收集受试者的性别、年龄、收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)、血糖 (blood glucose, GLU)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (Triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 及低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。本研究通过本院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 外周血 DNA 的提取** 收集受试者的静脉血 2 ml,用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA,纯度和浓度采用 Nanodrop 2000C 分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司) 检测。

**1.2.2 目的片段的扩增及基因型的检测** TOMM40 基因 rs2075650 位点正向引物:5' -AGGAAGAGAT GAGAGTTGGTGTG-3',反向引物:5' -CTGGAGAA GAGAAACGCTGTC-3'。PCR 反应体系为 10 μl。PCR

反应结束后使用 LightScanner 96 高分辨率分析系统 (美国 Idaho Technology 公司) 结合熔解曲线进行基因分型。根据熔解曲线图挑选出不同基因型的样本进行 PCR 扩增,扩增产物送到武汉天一辉远生物公司进行测序验证。

**1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)** 选取脑梗死组和对照组患者各 80 例,收集静脉血 2 ml,取 200 μl 血用 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提取 DNA,剩余血液用 Trizol (美国 Invitrogen 公司) 试剂提取 RNA,纯度和浓度用 Nanodrop 2000C 分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司) 检测,将提取的 RNA 置于 -80℃ 冰箱保存。利用逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 将 RNA 逆转录为 cDNA。TOMM40 基因正向引物:5' -CATCCAGACCCAGCAGTCG-3',反向引物:5' -GAGGTACTGGGCTACGAGGA-3',选取 3-磷酸甘油醛脱氢酶为内参基因。内参基因正向引物:5' -GGTCTCTCTGACTTCAACA-3',反向引物:5' -GTGAGGGTCTCTCTCTTCCT-3'。总反应体系为 20 μl。qRT-PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。每个样本重复检测 2 次,取 2 次检测的平均值。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 或中位数和四分位数间距  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,比较用  $t$  检验或秩和检验,计数资料以率 (%) 或构成比表示,比较用  $\chi^2$  检验,群体基因型用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组一般资料比较

两组年龄、性别及 LDL-C 比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );两组 SBP、DBP、GLU、TC 及 TG、HDL-C 比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 两组基因型和等位基因的频率比较

两组 TOMM40 基因 rs2075650 位点 AA、AG 及 GG 基因型频率比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),

表1 两组一般资料比较

组别	n	男/女/例	年龄[岁, ( $\bar{x} \pm s$ )]	SBP[mmHg, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	DBP[mmHg, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	GLU[mmol/L, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]
脑梗死组	507	305/202	66.89 ± 11.68	140 (128.00, 158.00)	80 (76.00, 89.00)	5.77 (5.06, 7.05)
对照组	510	313/197	65.62 ± 11.77	129.50 (114.75, 142.00)	75 (68.00, 82.00)	5.02 (4.64, 5.40)
t/Z/χ <sup>2</sup> 值		0.157	-1.817	-9.869	-9.634	-13.367
P 值		0.692	0.069	0.000	0.000	0.000

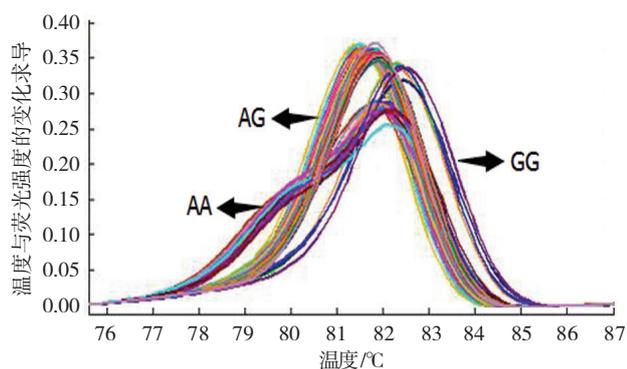
组别	n	TC[mmol/L, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	TG[mmol/L, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	HDL-C[mmol/L, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	LDL-C[mmol/L, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]
脑梗死组	507	4.12 (3.31, 4.99)	1.42 (0.98, 1.95)	1.09 (0.90, 1.30)	2.51 (1.95, 3.27)
对照组	510	4.29 (3.90, 4.73)	1.05 (0.81, 1.29)	1.49 (1.28, 1.71)	2.60 (2.22, 2.90)
Z 值		-2.160	-11.033	-18.124	-0.163
P 值		0.031	0.000	0.000	0.870

两组 A、G 等位基因频率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。脑梗死组显性模型 AA 与 AG+GG 基因型频率分别占 83.63% 和 16.37%, 对照组分别为 77.84% 和 22.16%, 两组 AA 与 AG+GG 基因型频率比较, 差异有统计学意义 [ $\hat{O}R=0.688$  (95%CI: 0.502,

0.942)  $P=0.019$ ], 脑梗死组隐性模型 GG 与 AG+AA 基因型频率分别占 1.18% 和 98.82%, 对照组分别为 2.55% 和 97.45%, 两组 GG 与 AG+AA 基因型频率比较, 差异无统计学意义 [ $\hat{O}R=2.184$  (95%CI: 0.824, 5.792)  $P=0.108$ ]。见表 2 和附图。

表2 两组患者基因型和等位基因频率比较 例 (%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
脑梗死组	507	424 (83.63)	77 (15.19)	6 (1.18)	925 (91.23)	89 (8.78)
对照组	510	397 (77.84)	100 (19.61)	13 (2.55)	894 (87.65)	126 (12.36)
χ <sup>2</sup> 值			6.447			6.878
P 值			0.040			0.009



附图 HRM 对 TOMM40 基因 rs2075650 位点的分型图

### 2.3 两组 TOMM40 mRNA 表达水平比较

脑梗死组 TOMM40 mRNA 表达量为 3.91 (1.71, 6.49), 对照组为 7.84 (6.24, 10.18), 经秩和检验, 差异有统计学意义 ( $Z=-6.834$ ,  $P=0.000$ ), 脑梗死组低于对照组。

### 3 讨论

TOMM40 基因位于 19q13.2, 是外膜转位酶形成的复合体, 介导核基因编码的蛋白质从细胞质进入线粒体的传递。TOMM40 位于载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 上游, 其中的几个单核苷酸多态性与 APOE 具有连锁不平衡<sup>[4-5]</sup>。TOMM40 与阿尔茨海默病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、长寿及认知障碍等有关<sup>[6-8]</sup>。APOE 可能与 TOMM40 相互作用而影响线粒体功能<sup>[9]</sup>。线粒体被认为是所有细胞的动力, 在中枢神经系统中发挥重要作用, 为神经元的存活提供能量<sup>[10]</sup>。线粒体中 99% 蛋白质都是由核基因编码合成再转运到线粒体中, 而 TOMM40 几乎为所有核编码的线粒体蛋白质入口的重要组成部分, TOMM40 的减少或功能障碍导致一些重要的蛋白质不能进入线粒体发挥作用, 影响线粒体的功能和神经元的存活<sup>[11]</sup>。HAINES 等<sup>[12]</sup>发现

敲除小鼠的解偶联蛋白 2 (uncoupling protein 2, *UCP2*) 基因能使缺血再灌注小鼠脑组织的梗死面积增加, 敲除 *UCP2* 后能抑制缺血再灌注后的抗氧化基因。*UCP2* 能够保护血管内皮细胞, 改善脑血管功能障碍<sup>[13-14]</sup>。*UCP2* 的表达下调还与动脉粥样硬化、血管损伤有关, 影响神经传递, 对神经系统疾病的发生有重要影响<sup>[15]</sup>。解偶联蛋白属于线粒体载体蛋白超家族, *TOMM40* 的缺乏可能影响解偶联蛋白转运到线粒体发挥作用, 从而引起线粒体功能障碍, 影响脑组织的功能。

本研究中脑梗死组与对照组 *TOMM40* 基因的 rs2075650 位点之间基因型和等位基因的频率分布比较有差异, 对照组中突变等位基因 G 的频率高于脑梗死组, 脑梗死组和对照组的显性模型 (AA vs AG+GG) 基因型频率也有差异, 说明该基因位点可能与脑梗死的发病相关。YAMASE 等<sup>[16]</sup>发现 *TOMM40* 的 rs2075650 位点与脑梗死有相关性, 且次要等位基因 G 是脑梗死的保护性基因, 与本研究结果一致。对相关指标的分析表明, 血压、GLU 及 TG 是脑梗死发病的危险因素, HDL-C 可能是脑梗死的保护性指标, 这符合传统的研究结果。然而本研究中两组 LDL-C 比较无差异, 可能是脑梗死患者所用药物及人群选择差异导致。qRT-PCR 结果显示, 对照组的 *TOMM40* mRNA 相对表达量高于脑梗死组。机制可能是脑梗死患者 *TOMM40* mRNA 表达量下调影响核基因编码的蛋白质进入线粒体, 导致一些关键性蛋白质不能发挥作用, 线粒体的功能障碍、脑组织能量不足等可能导致脑梗死的发生。LEE 等<sup>[17]</sup>发现 *TOMM40* mRNA 在阿尔茨海默病患者中表达下调, 该疾病的发生可能也与 *TOMM40* 相关蛋白质无法正常发挥作用有关。

综上所述, 本研究用 HRM 技术对脑梗死组和对照组 *TOMM40* 的 rs2075650 位点进行基因分型, 并用 qRT-PCR 检测基因的相对表达量, 发现武汉地区中老年汉族人群中该基因位点与脑梗死的发病相关。

#### 参 考 文 献:

- [1] PREVICH L, MA L, WRIGHT J, et al. Progress in AQP research and new developments in therapeutic approaches to ischemic and hemorrhagic stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1146.
- [2] JEON M Y, JEONG H. Effects of a stroke primary prevention program on risk factors for at-home elderly[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21(1): 3696-3703.
- [3] 王丽霞, 杨林. *TOMM40* 基因多态性与阿尔茨海默病的相关性研究进展 [J]. *重庆医学*, 2015(7): 983-985.
- [4] LYALL D M, HARRIS S E, BASTIN M E, et al. Alzheimer's disease susceptibility genes APOE and TOMM40, and brain white matter integrity in the Lothian Birth Cohort 1936[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(6): 1513-1525.
- [5] LIU X, BAI F, YUE C, et al. The association between TOMM40 gene polymorphism and spontaneous brain activity in amnesic mild cognitive impairment[J]. *J Neurol*, 2014, 261(8): 1499-1507.
- [6] LACZÓ J, ANDEL R, VYHNALEK M, et al. The effect of TOMM40 on spatial navigation in amnesic mild cognitive impairment[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(6): 2024-2033.
- [7] FORTNEY K, DOBRIBAN E, GARAGNANI P, et al. Genome-wide scan informed by age-related disease identifies loci for exceptional human longevity[J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(12): DOI: 10.1371/journal.pgen.1005728
- [8] CHRISTIANSEN M K, LARSEN S B, NYEGAARD M, et al. Coronary artery disease-associated genetic variants and biomarkers of inflammation[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): DOI: 10.1371/journal.pone.0180365.
- [9] LYALL D M, ROYLE N A, HARRIS S E, et al. Alzheimer's disease susceptibility Genes APOE and TOMM40, and hippocampal volumes in the lothian birth cohort 1936[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): DOI: 10.1371/journal.pone.0080513.
- [10] FERENCZ B, LAUKKA E J, LÖVDÉN M, et al. The influence of APOE and TOMM40 polymorphisms on hippocampal volume and episodic memory in old age[J]. *Front Hum Neurosci*, 2013, 7(1): e198.
- [11] YANO H, BARANOV S V, BARANOVA O V, et al. Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(6): 822-831.
- [12] HAINES B A, MEHTA S L, PRATT S M, et al. Deletion of mitochondrial uncoupling protein-2 increases ischemic brain damage after transient focal ischemia by altering gene expression patterns and enhancing inflammatory cytokines[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(11): 1825-1833.
- [13] PU Y, ZHANG H, WANG P, et al. Dietary curcumin ameliorates aging-related cerebrovascular dysfunction through the ampk/uncoupling protein 2 pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(5): 1167-1177.
- [14] SHIMASAKI Y, PAN N, MESSINA L M, et al. Uncoupling protein 2 impacts endothelial phenotype via p53-mediated control of mitochondrial dynamics[J]. *Circ Res*, 2013, 113(7): 891-901.
- [15] 贺晓丽, 张丹参, 杜冠华. 解偶联蛋白与神经系统疾病的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2008(03): 281-284.
- [16] YAMASE Y, HORIBE H, UEYAMA C, et al. Association of TOMM40 and SLC22A4 polymorphisms with ischemic stroke[J]. *Biomed Rep*, 2015, 3(4): 491-498.
- [17] LEE T, GOH L, CHONG M S, et al. Downregulation of TOMM40 expression in the blood of alzheimer disease subjects compared with matched controls[J]. *J Psychiatr Res*, 2012, 46(6): 828-830.

(李科 编辑)