

GRB2 rs8082005、RXRA rs3849222 位点与延边地区 EOPE 易感性的关系

蔡宛轩¹, 刘霞¹, 金光¹, 董春玉², 杨恩月³

摘要 目的 分析基因的多个位点与妊娠高血压的早发型子痫前期(EOPE)风险的联系。**方法** 自延边地区居住10年以上、经医院诊断为EOPE且无其他疾病的患者382例患者中随机选取192例为病例组。同期在该医院自然分娩的健康人群中随机选取192例作为对照组。依据PCR-RFLP方法来测定其中具体的基因型及等位基因分布等信息,依据非条件Logistic方法来获得比值比(OR)及95%可信区间(CI),确认各类基因型的风险度。**结果** GRB2 rs8082005位点存在T和C两种等位基因,TC、TT和CC基因型;RXRA rs3849222位点存在T和C两种等位基因,TC、TT和CC基因型。经非条件Logistic回归分析,在GRB2 rs8082005位点中,与TT基因型相比,CC基因型更易患EOPE($OR = 3.155$, $95\% CI = 1.513 \sim 6.579$, $P = 0.002$);在显性模型中,相比于携带TT+TC基因型患者,携带CC基因型患者增加EOPE发病风险($OR = 3.000$, $95\% CI = 1.495 \sim 6.022$, $P = 0.002$)。在RXRA rs3849222位点中,与CC基因型相比,TT基因型更易得EOPE($OR = 2.031$, $95\% CI = 1.077 \sim 3.820$, $P = 0.028$);在隐性模型中,相比于携带CC+CT基因型患者,携带TT基因型患者EOPE发病风险增加($OR = 2.549$, $95\% CI = 1.421 \sim 4.573$, $P = 0.002$)。**结论** GRB2 rs8082005、RXRA rs3849222位点单核苷酸多态性(SNP)与延边地区孕妇患妊娠高血压的EOPE风险有明显相关性。

关键词 早发型子痫前期;单核苷酸多态性;易感性

中图分类号 R 365

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1403-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.026

子痫前期(preeclampsia, PE)影响全球2%~8%的孕妇,是孕妇围产期死亡的主要危险因素之一,对母婴健康有着极大威胁^[1-3]。PE以34周作

为基本界限,分为早发型子痫前期(early-onset preeclampsia, EOPE)和迟发型子痫前期(late-onset preeclampsia, LOPE)。明确EOPE的发病机制对开展疾病的早期预防和干预至关重要。遗传因素在EOPE的发病中影响重大。寻找并确定PE的遗传易感基因,对了解疾病发病机制以及更好地开展疾病的预防与干预工作至关重要^[4]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)一方面是遗传标志物,另一方面还会显著影响到易感性及预后。

生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor bound protein 2, GRB2),通过调控受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)信号通路来调节众多细胞的功能^[3]。相关报道指出,RXRA实际位于AD-IPO通路,人RXRA的实际位置则是染色体9q34.3,其为RXR的重要成员^[5-7]。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本实验选择延边地区居住10年以上,且2015年3月开始在延边大学附属医院和延边妇幼保健院住院部诊断为EOPE、无其他疾病的382例患者中随机选取192例作为实验组;此外,随机选取同期在延边大学附属医院和延边妇幼保健院自然分娩的192例健康人群作为对照组。所有受试者均签署知情同意书。本研究已通过伦理审查。审批文书号:YB.No20180823。

1.2 SNP的选择 通过Regulome-DB数据库、NCBI-SNP数据库(MAF>10、LD值: $r^2 < 0.8$)、Hapmap-SNP数据库筛选与EOPE相关的28个基因和134个Regulome-SNP位点。经统计分析,28个基因和134个Regulome-SNP位点中GRB2 rs8082005、RXRA rs3849222位点差异有统计学意义($P < 0.05$)。

1.3 血样收集及DNA提取、测序 收集患者和健康人清晨的空腹外周血液至枸橼酸钠抗凝剂试管,并在-20℃低温冰柜(青岛海尔集团)储存备用。提取DNA时按照全血DNA提取试剂盒(日本

2023-05-08 接收

基金项目:吉林省自然科学基金(编号:20190201056JC、YDZJ202201-ZYTS175)

作者单位:¹ 延边大学病理学与病理生理学实验室,延吉 133002
延边大学附属医院² 妇产科、³ 临床药理机构,延吉 133002

作者简介:蔡宛轩,女,硕士研究生;

杨恩月,女,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: enyueyang@163.com

KURABO 公司)说明书通过全血核酸提取仪 Quick Gene-810(日本 KURABO 公司),采用分光光度计 Nano Drop-2000(美国伯腾仪器有限公司)测定 DNA 样本的浓度及污染度。合格标准:浓度 $>20 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $A_{260}/A_{280}:1.65 \sim 1.85$ 。将合格的 DNA 样本送到北京华大基因公司进行以 MassARRAY SNPS 质谱为基础的基因分型。

1.4 PCR-RFLP 与基因分型 运用相应的引物设计软件,以及对应的 Primer Premier 5.0,进而完成相关引物。设计引物原则为:将聚合酶链式反应扩增范围控制在 $150 \sim 300 \text{ bp}$ 并且不能含有自身互补序列避免产生引物二聚体;发卡结构以及 G + C 含量应在 $40\% \sim 60\%$ 之间(表 1)。依靠查询软件来寻求适宜的限制性内切酶,来实现酶切断的效果(表 2)。采用 Sequenom MassARRAY[®] 质谱的基因分型法及 PCR-RFLP,开展相应的基因分型操作。

表 1 位点 PCR 扩增引物序列及条件

基因	SNP	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
GRB2	rs8082005	Forward: TGAGTGAGGTCTGCTCTTTG	144
		Reverse: CAAAGAGCAGACCTCACTCA	
RXRA	rs3849222	Forward: TGTAAACATGTGAGCTGCATGC	290
		Reverse: CCATCAAACAGCAATAAGCTGC	

表 2 限制性内切酶设计

SNP	限制性内切酶	酶切片段长度 (bp)		
		野生型	杂合型	突变型
rs8082005	TaqI	23 121	23 121 144	144
rs3849222	Hpa II	121 169	121 169 290	290

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据资料采用 χ^2 检验分析,验证资料是否匹配采用相应的 H-W 平衡律, $P > 0.05$ 说明群体代表性和可比性;运用 t 检验方法,对比病例组、对照组的年龄 ($P > 0.05$) 差异;运用 Logistic 回归分析对比病例、对照组的基因型方面的区别,运用 TYPER 4.0 软件分析样本波峰图。

2 结果

2.1 rs3849222、rs8082005 SNP 分型峰值图 检测样本为 RXRA rs3849222 CC 型,则只有 C 碱基对应分子量位置有峰,而 T 碱基对应分子量处无峰。见图 1。检测样本为 RXRA rs3849222 TC 型,则 T 碱基对应分子量位置有峰,C 碱基对应分子量位置也有峰。见图 2。测样本为 RXRA rs3849222 TT 型,则只有 T 碱基对应分子量位置有峰,而 C 碱基对应分子

量处无峰。见图 3。检测样本为 GRB2 rs8082005 CC 型,则只有 C 碱基对应分子量位置有峰,而 T 碱基对应分子量处无峰。见图 4。检测样本为 GRB2 rs8082005 TC 型,则 T 碱基对应分子量位置有峰,C 碱基对应分子量位置也有峰。见图 5。测样本为 GRB2 rs8082005 TT 型,则只有 T 碱基对应分子量位置有峰,而 C 碱基对应分子量处无峰。见图 6。

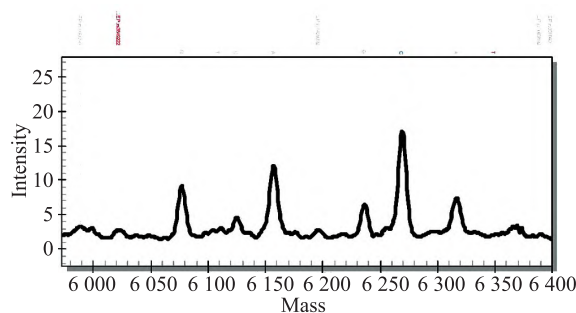


图 1 RXRA rs3849222 CC 基因型

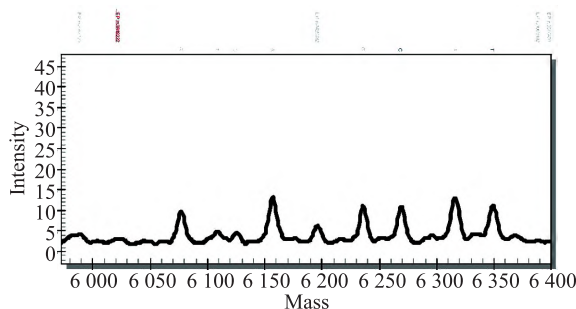


图 2 RXRA rs3849222 TC 基因型峰值图

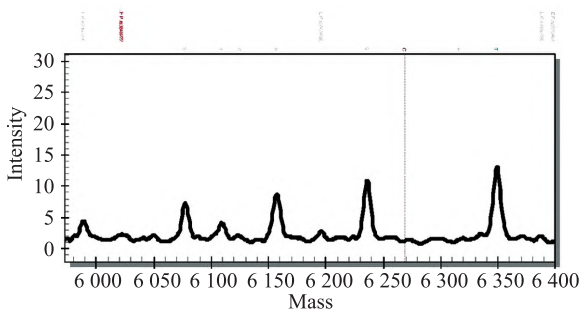


图 3 RXRA rs3849222 TT 基因型峰值图

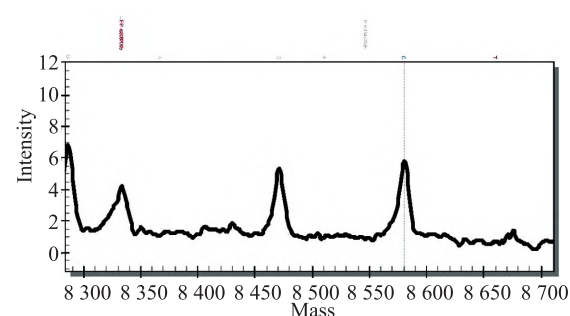


图 4 GRB2 rs8082005 CC 基因型峰值图

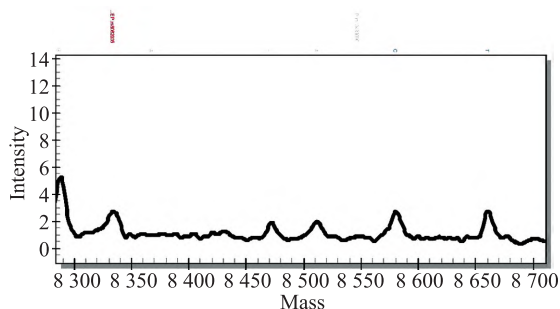


图5 GRB2 rs8082005 TC 基因型峰值图

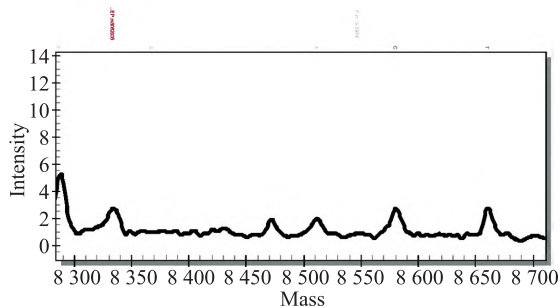


图6 GRB2 rs8082005 TT 基因型峰值图

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 本研究纳入患者及正常对照组各 192 例,经拟合优度 χ^2 检验分析表明纳入研究对象的基因型分布频率均符合哈迪-温伯格遗传平衡检验($\chi^2 = 0.613$, $P = 0.456$),提示所研究位点符合在人群中的分布规律,说明实验组和对照组所选的研究对象来自同一孟德尔群体,具有群体代表性和可比性。

2.3 两组基本资料的比较 本实验中共选择实验组女性 192 例(100%),对照组女性 192 例(100%)。经 t 检验分析,两组在年龄分布比例差异没有统计学意义。

2.4 多态性与易感性的关系 实验组中 GRB2 rs8082005 TT、TC、CC 基因型分别占比 43.8% (84/

192)、50.0% (96/192)、6.2% (12/192),对照组中 GRB2 rs8082005 TT、TC、CC 基因型分别占比 37.0% (71/192)、46.4% (89/192)、16.6% (32/192)。经非条件 Logistic 回归分析,与携带 TT、TC 基因型患者相比,携带 CC 基因型患者更易罹患 EOPE ($OR = 3.155$, 95% $CI = 1.513 \sim 6.579$, $P = 0.002$);在隐性模型中,相比于 TT + TC 基因型携带者,携带 CC 基因型患者 EOPE 发病风险增加 ($OR = 3.000$, 95% $CI = 1.495 \sim 6.022$, $P = 0.002$)。实验组中 RXRA rs3849222 TT、CT、CC 基因型分别占比 9.9% (19/192)、54.7% (105/192)、35.4% (68/192),对照组中 rs3849222 TT、CT、CC 基因型分别占比 21.9% (42/192)、39.6% (76/192)、38.5% (74/192)。经非条件 Logistic 回归分析,与携带 CC 基因型患者相比,携带 TT 基因型患者更易罹患 EOPE ($OR = 2.031$, 95% $CI = 1.077 \sim 3.820$, $P = 0.028$);在隐性模型中,相比于携带 CC + TC 基因型患者,携带 TT 基因型患者增加 EOPE 发病风险 ($OR = 2.549$, 95% $CI = 1.421 \sim 4.573$, $P = 0.002$)。综上所述,通过 Logistic 回归分析证实了 SNPs 携带 (GRB2 rs8082005 CC 或 RXRA rs3849222 TT) 更容易罹患 EOPE,见表 3。

2.5 基因多态性对携带不同基因型患者发生 EOPE 的影响 在联合基因型分析中,GRB2 rs8082005 CC、RXRA rs3849222 TT 基因型为危险基因型,所以每个个体的危险基因型数在 0 到 2 之间 (0, 1, 2),最终得出,与危险基因数 0 个相比,携带危险基因数 1 个和携带危险基因数 2 个差异具备统计价值 ($P < 0.001$)。危险基因型数量与 EOPE 的发病率呈正相关,携带 1 个或 2 个危险基因型的患者较不携带危险基因型患者更容易患病 EOPE。(调整 $OR = 2.779$, 95% $CI = 1.665 \sim 4.639$, $P < 0.001$;调整 $OR = 5.175$, 95% $CI = 1.080 \sim 24.794$, $P = 0.04$)。见表 4。

表3 GRB2 rs8082005、RXRA rs3849222 基因型频率分布

基因	SNP	基因型	病例组 ($n = 192$)	对照组 ($n = 192$)	OR(95% CI)	P 值
GRB2	rs8082005 T > C	TT	84 (43.8)	71 (37.0)	1.000	0.005 ^a
		TC	96 (50.0)	89 (46.4)	1.097 (0.715 ~ 1.682)	0.672 ^b
		CC	12 (6.3)	32 (16.7)	3.155 (1.513 ~ 6.579)	0.002 ^b
		TC + CC vs TT			1.326 (0.881 ~ 1.995)	0.177 ^b
		CC vs TT + TC			3.000 (1.495 ~ 6.022)	0.002 ^b
RXRA	rs3849222 C > T	CC	68 (35.4)	74 (38.5)	1.000	0.001 ^a
		CT	105 (54.7)	76 (39.6)	0.655 (0.427 ~ 1.035)	0.071 ^b
		TT	19 (9.9)	42 (21.9)	2.031 (1.077 ~ 3.830)	0.028 ^b
		CT + TT vs CC			0.874 (0.578 ~ 1.324)	0.526 ^b
		TT vs CC + CT			2.549 (1.421 ~ 4.573)	0.002 ^b

a:应用 χ^2 检验实验组与对照组的基因型频率,以及相应的次要等位频率;b:应用二元 Logistic 回归分析,从而获得 OR (95% CI) 及 P 值

表4 危险基因型个数与EOPE易感性的统计分析

危险基因数 (个)	病例组 [n(%)]	对照组 [n(%)]	调整 OR(95% CI)	P 值
0	163(84.9)	126(65.6)	1.000	<0.001 ^a
1	27(14.1)	58(30.2)	2.779(1.665~4.639)	<0.001 ^b
2	2(1.0)	8(4.2)	5.175(1.080~24.794)	0.040 ^b

a:应用 χ^2 检验实验组与对照组的基因型频率,以及相应的次要等位频率;b:应用二元 Logistic 回归分析,从而获得 OR(95% CI)及 P 值

3 讨论

早发型子痫前期是所有子痫前期病例中最严重的临床类型,占有子痫前期病例的 5%~20%,并且与新生儿的发病率和病死率有关^[8],它的病情进展快,存在不可预测性,危害高于 LOPE^[9-10]。如 McGinnis et al^[11] 报告,全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS),鉴定 SNP 与子痫前期有显著相关性深入分析其发病原理,寻找高效的预防方法,设计对应的治疗措施,必然会成为病症的研究热点。EOPE 发生可能与多个基因参与有关,而遗传因素在该疾病的发生过程中扮演着重要角色。

GRB2 作为衔接蛋白,与体内多种酪氨酸激酶依赖性信号通路有关,因为独特的自身结构,在多种肿瘤细胞中均有表达,又与胃癌、结肠癌、肝癌的转移侵袭力相关^[12]。王亚楠^[13]发现,GRB2 基因 rs9907177(C>T)位点的单核苷酸多态性与妊娠期高血压疾病存在易感性,携带 GRB2 rs9907177(C>T)CT 和 TT 组合的基因型人群患 HDP 的风险高于携带 CC 基因型人群。本论文也研究分析 GRB2,结果表明 GRB2 rs8082005 携带 C 等位基因较 TT+TC 基因型患者增加患 EOPE 风险。本课题组曾研究过 GRB2 的 SNP,结果可能由于铂类药物作用于 GRB2 rs1044228 位点,影响 GRB2 复合物介导相关的 EGFR 等信号通路,导致携带 GRB2 rs1044228CC 基因型非小细胞肺癌患者生存期更长。

ADIPOQ 属于内皮保护因子,能够增加胰岛素敏感性、减少心血管疾病、抑制巨噬细胞的活性及炎症因子 TNF- α 的表达,具有良好的抗炎作用,能有效地抑制内皮细胞产生生物活性因子^[14]。血管内皮损伤是 EOPE 发病的主要环节,TNF- α 可促进其他因子损伤内皮细胞,从而降低内皮细胞 NO 的分泌及增加内皮素的释放,使许多脏器功能严重受损,导致 EOPE 的发病^[15]。EOPE 孕妇血清 ADIPOQ 水平明显降低,且其病情越重,ADIPOQ 水平降低越明

显,可能与 ADIPOQ 水平下降所致抗炎、抗氧化能力不足、滋养层细胞浸润障碍加剧、血管内皮功能下降、NO 合成不足等机制有关^[16]。由于 RXRA 位于 ADIPO 通路,会受到影响。因此该研究分析了 RXRA rs3849222 位点与延边地区孕妇 EOPE 易感性关系,结果表明 RXRA rs3849222 位点 SNP 与延边地区孕妇患 EOPE 风险存在明显相关性,且携带 T 和 CC+TC 等位基因相比携带 C 等位基因型患者增加患 EOPE 风险。

综上所述,GRB2 rs8082005(C>T)、RXRA rs3849222(T>C)可能是 EOPE 的易感因素,影响妊娠期高血压的发生。由于 EOPE 是由遗传因素导致的妊娠期疾病,受多个基因、位点的调控,且环境、饮食、生活方式等也会对其发生发展产生影响^[17]。该研究有一些局限性,如研究样本选择来自吉林省延边朝鲜族自治州,这可能造成了选择偏倚并影响了结果。后续研究中,可联合多地区、多民族收集样本进一步研究 RXRA、GRB2 基因多态性与疾病的关系,明确是否存在地域影响。

参考文献

- [1] Ives C W, Sinkey R, Rajapreyar I, et al. Preeclampsia-pathophysiology and clinical presentations: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(14): 1690-702.
- [2] Rana S, Burke S D, Karumanchi S A. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders[J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226(2S): S1019-34.
- [3] Fishel Bartal M, Sibai B M. Eclampsia in the 21st century[J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226(2S): S1237-53.
- [4] Benny P, Yamasato K, Yunits B, et al. Maternal cardiovascular-related single nucleotide polymorphisms, genes, and pathways associated with early-onset preeclampsia[J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0222672.
- [5] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70.
- [6] 李华振, 狄冉, 郭晓飞, 等. 绵羊繁殖轴相关组织 RXRs 基因的表达及 RXRA 基因多态性与季节性发情之间的关系[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(8): 1401-9.
- [7] 陆莹, 杜文聪, 李倩, 等. 应用 BP 人工神经网络探讨 PPAR- γ 和 RXR- α 基因多态性与汉族人群 2 型糖尿病遗传易感性的关系[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(1): 1-7.
- [8] JAISWAL MANASVI. 早发型子痫前期与晚发型子痫前期的临床结果比较[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [9] Chen G, Hu M, Wang X C, et al. Effects of RXR α on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells through TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23

- (11):4723–9.
- [10] 何丽桥,李妹燕,黄春传,等. 血浆中D-二聚体、vWF预测早发型子痫前期价值[J]. 中国计划生育学杂志, 2019,27(6):797–800.
- [11] McGinnis R,Steinthorsdottir V, Williams N O, et al. Variants in the fetal genome near FLT1 are associated with risk of preeclampsia [J]. *Nat Genet*, 2017,49(8), 1255–60.
- [12] 王雅楠. EphA2通过调控Grb2表达参与肝癌细胞侵袭的机制研究[D]. 西安:西安医学院, 2020.
- [13] 王亚楠. Grb2基因位点rs9907177(C>T)的多态性与妊娠期高血压疾病的相关性研究[D]. 延吉:延边大学, 2022.
- [14] Lee K H, Jeong J, Woo J, et al. Globular adiponectin exerts a pro-inflammatory effect *via* I κ B/NF- κ B pathway activation and anti-inflammatory effect by IRAK-1 downregulation[J]. *Mol Cells*, 2018,41(8):762–70.
- [15] Lu Y, Gao X, Wang R, et al. Adiponectin inhibits proliferation of vascular endothelial cells induced by Ox-LDL by promoting dephosphorylation of Caveolin-1 and depolymerization of eNOS and up-regulating release of NO[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019,73:424–34.
- [16] Adu-Gyamfi E A, Fondjo L A, Owiredu W K B A, et al. The role of adiponectin in placentation and preeclampsia[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(1):106–17.
- [17] 楚静,张璐,汤潜,等. ADAMTS7基因rs3825807位点单核苷酸多态性与子痫前期遗传易感性关系[J]. 青岛大学学报(医学版), 2022,58(3):379–82.

Relationship between *GRB2* rs8082005, *RXRA* rs3849222 and susceptibility to early-onset preeclampsia in Yanbian area

Cai Wanxuan¹, Liu Xia¹, Jin Guang¹, Dong Chunyu², Yang Enyue³

(¹Laboratory of Pathology and Pathophysiology of Yanbian University, Yanji 133002; ²Gynaecology and Obstetrics, ³Clinical Pharmacology Institute, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133002)

Abstract **Objective** To analyze the association between multiple loci of genes and the risk of early-onset preeclampsia (EOPE) with pregnancy induced hypertension. **Methods** Among 382 EOPE patients who had lived in Yanbian area for more than 10 years, 192 patients were randomly selected as case group. At the same time, 192 cases of natural delivery in the hospital were randomly selected as the control group. PCR-RFLP method was used to determine the specific genotype and allele distribution information, and non-conditional Logistic method was used to obtain odds ratio (*OR*) and 95% confidence interval (*CI*) to confirm the risk of various genotypes. **Results** There were two alleles of T and C at the *GRB2* rs8082005 locus, TC, TT, and CC genotypes. There were two alleles of T and C at the *RXRA* rs3849222 locus, TC, TT, and CC genotypes. Through unconditional logistic regression analysis, in the *GRB2* rs8082005 locus, compared with the TT genotype, the CC genotype was more susceptible to EOPE (*OR* = 3.155, 95% *CI* = 1.513–6.579, *P* = 0.002). In the explicit model, compared to patients with TT + TC genotype, patients with CC genotype increased the risk of EOPE (*OR* = 3.000, 95% *CI* = 1.495–6.022, *P* = 0.002). In the *RXRA* rs3849222 locus, compared with the CC genotype, the TT genotype was more susceptible to EOPE (*OR* = 2.031, 95% *CI* = 1.077–3.820, *P* = 0.028). In the invisible model, compared to patients with CC + CT genotype, patients with TT genotype had an increased risk of EOPE (*OR* = 2.549, 95% *CI* = 1.421–4.573, *P* = 0.002). **Conclusion** There is a significant correlation between single nucleotide polymorphism (SNP) at the *GRB2* rs8082005 and *RXRA* rs3849222 loci and the risk of EOPE in pregnant women with gestational hypertension in Yanbian area.

Key words early-onset preeclampsia; single-nucleotide polymorphism; susceptibility to