

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01078

· 论 著 ·

儿茶酚胺氧位甲基转移酶基因多态性与动脉瘤性蛛网膜下隙出血后早期脑血管痉挛的相关性

何朝晖, 刘 浏, 谭关平, 孙晓川*

重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨儿茶酚胺氧位甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)基因多态性与动脉瘤性蛛网膜下隙出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)的相关性。**方法** 搜集重庆医科大学附属第一医院神经外科2008年1月至2008年12月收治的167例自发性SAH急性期(<3 d)患者的临床资料。运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术分析SAH患者COMT基因型及等位基因频率;运用TCD判定SAH患者早期CVS的严重程度;运用Hunt-Hess分级评估患者病情严重程度;运用头颅CT的Fisher分级评估出血量的多少。采用 χ^2 检验和logistic回归分析方法分析COMT基因分型结果等临床资料与CVS的相关性。**结果** 各等位基因分布符合Hardy-Weinberg定律,研究样本为遗传平衡群体。A等位基因携带者的CVS发生率(51.7%)明显高于G等位基因携带者(38.5%)。A/A基因型患者CVS发生率(66.7%)明显高于G/G(35.9%)。单因素logistic回归分析提示A等位基因、A/A基因型和Hunt-Hess分级3~5级与CVS具有相关性。调整临床相关因素后,多因素logistic回归仍提示A等位基因、A/A基因型是SAH后早期CVS的危险因素。**结论** COMT A等位基因、A/A基因型可能是SAH后早期CVS的危险因素。

[关键词] 蛛网膜下隙出血;脑血管痉挛;儿茶酚胺氧位甲基转移酶;单核苷酸多态性

[中图分类号] R 743.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)10-1078-05

Correlation between COMT gene polymorphism and early cerebral vasospasm after aneurismal subarachnoid hemorrhage

HE Zhao-hui, LIU Liu, TAN Guan-ping, SUN Xiao-chuan*

Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To analyze the correlation between catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism and cerebral vasospasm (CVS) in early period after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** The clinical data of 167 patients with spontaneous SAH, who were treated in our hospital from Jan. 2008 to Dec. 2008, were collected for this study. COMT genotyping was performed by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The degree of CVS was identified by transcranial Doppler (TCD). Hunt-Hess classification was used to evaluate the severity of the patients' condition. The bleeding amount was evaluated by means of Fisher classification of head CT. χ^2 test (SPSS13.0 software) and logistic regression were adopted to analyze the correlation of COMT gene polymorphism and other clinical data with early CVS after SAH. **Results** The distribution of each allele matched with Hardy-Weinberg law and the research samples were heredity equilibrium population. Early CVS incidence of patients with COMT A allele was significantly higher than those with COMT G allele (51.7% vs 38.5%, $P < 0.01$). Early CVS incidence of patients with COMT A/A genotype was significantly higher than those with COMT G/G genotype (66.7% vs 35.9%, $P < 0.05$). Univariate logistic regression demonstrated that COMT A allele, A/A genotype and Grade 3-5 of Hunt-Hess classification were all associated with early CVS. After adjustment of general information, further multivariate logistic regression demonstrated that COMT A allele, A/A genotype were the risk factors of early CVS after SAH. **Conclusion** COMT A allele and A/A genotype might be risk factors of early CVS after SAH.

[收稿日期] 2014-01-06 **[接受日期]** 2014-04-08

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81371309),国家临床重点专科建设项目(财社[2011]170号),重庆市科委自然科学基金(CSTC, 2008BB5219). Supported by National Natural Science Foundation of China (81371309), National Key Clinical Specialty Construction Project of China (Caishe[2011]170), and Natural Science Foundation of Chongqing Science and Technology Committee (CSTC, 2008BB5219).

[作者简介] 何朝晖,博士,教授. E-mail: geno_he@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89011152, E-mail: sunxch1445@gmail.com

[Key words] subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; catechol-O-methyltransferase; single nucleotide polymorphism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10):1078-1082]

动脉瘤性 SAH 后 CVS 可造成严重脑缺血和脑损害,是动脉瘤破裂后患者病情加重导致死亡或残疾的主要原因。临床工作中常见 SAH 后早期 CVS 的严重程度存在个体差异的现象。目前研究发现,某些基因的多态性与 SAH 后 CVS 的严重程度的个体差异有关^[1]。早期研究表明,SAH 后早期 CVS 与机体释放入血的儿茶酚胺(catecholamine, CA)增多有关^[2]。儿茶酚胺氧位甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)是 CA 主要的分解代谢限速酶,据此我们推测,SAH 后早期 CVS 的严重程度的个体差异可能与 COMT 活性的个体差异有关,而 COMT 活性的个体差异可能由其基因多态性决定。但迄今为止,COMT 的基因多态性是否与 SAH 后早期 CVS 的严重程度有关尚未见相关报道。本研究旨在通过验证 COMT 基因多态性与 SAH 后早期 CVS 的相关性,探讨 SAH 后早期 CVS 程度个体差异的可能机制。

1 资料和方法

1.1 病例选择 入选标准:(1)自发性 SAH 后 3 d 内的患者;(2)SAH 患者均经 CT 或血性脑脊液证实;(3)临床资料记录完整。排除标准:(1)发病时有可疑头部外伤史;(2)出血 3 d 内伴有脑疝形成;(3)出血后存活不足 3 d 的病例。

1.2 临床资料记录 对所有入选的病例记录性别、年龄、高血压病史、高血脂病史、入院时 Hunt-Hess 分级情况、发病后首次头颅 CT 的 Fisher 分级情况、经 CTA 或 DSA 及经颅多普勒超声(transcranial Doppler sonography, TCD)检查结果、治疗措施等。将患者血压控制在 90~140/50~90 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)范围内,常规予以抗脑血管痉挛、抗纤溶等治疗。

1.3 SAH 患者的血管痉挛判断标准 行 CTA 或 DSA 检查提示动脉瘤位于前循环(大脑前动脉 ACA、大脑中动脉 MCA)的患者,手术或介入治疗前,在出血后的 1~3 d 内,每天行 TCD 检查,测量大脑中动脉和大脑前动脉的血流速度,取每例患者 TCD 检查测得的大脑中动脉的最高流速(V_m)为判

断依据,具体标准如下^[3]:无痉挛, $V_m < 120$ cm/s;有痉挛, $V_m \geq 120$ cm/s。

1.4 COMT 基因型分析 引物设计和合成由上海生工生物工程有限公司完成,特异性扩增 COMT 基因第 4 外显子第 158 位氨基酸的基因序列。序列为: P_1 , 5'-TCG TGG ACG CCG TGA TTC AGG-3'; P_2 , 5'-AGG TCT GAC AAC GGG TCA GGC-3'。PCR 反应体系:DNA 2.0 μ L, P_1 0.5 μ L, P_2 0.5 μ L, Taq 酶 10.0 μ L, H₂O 7.0 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 57 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 30 s) \times 30 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min。限制性酶切反应体系: NIa III 0.5 μ L; 100 \times BSA 0.2 μ L; 10 \times Buffer 2 μ L; PCR 扩增产物 10 μ L; 灭菌水, 7.3 μ L。5 V/1 cm 电泳。电泳后于紫外灯下观察,并于成像系统成像。PCR 产物全长应为 217 bp。G 等位基因含 83 bp、197 bp 两个 NIa III 酶切位点,经 NIa III 酶切后应呈现 83、114、20 bp 共 3 个条带;A 等位基因含 83 bp、179 bp、197 bp 3 个 NIa III 酶切位点,应被酶解为 83、96、18、20 bp 共 4 个条带。结果判读:参照 Richard 方法加以简化,做出分型结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, χ^2 检验分析自发性 SAH 患者的临床资料中各相关因素的构成比; χ^2 检验分析 COMT 各基因型和等位基因患者 CVS 的发生率的统计学差异;logistic 单因素回归分析各相关因素、COMT 基因型及等位基因和 CVS 的相关性;对临床资料进行调整后,采用 logistic 多元回归分析 COMT 基因型及等位基因和 CVS 的相关性。多元回归方程采用 Forward wald 方法,变量入选标准为 $P < 0.05$,剔除标准为 $P > 0.10$ 。

2 结果

2.1 SAH 患者的相关临床资料 根据纳入标准和排除标准,2008 年 1 月 1 日至 2008 年 12 月 31 日重庆医科大学附属第一医院神经外科收治的 167 例自发性 SAH 患者入选本研究。所有患者均进行 COMT 基因型鉴定。167 例患者中入院时 Hunt-Hess 分级 1~2 级者 135 例,3~5 级者 32 例;头颅

CT的Fisher分级1~2级者104例,3~4级者63例;TCD检查发现无CVS 97例(58.1%),有CVS 70例(41.9%)。根据TCD结果,将患者分为CVS(+)组与CVS(-)组。经 χ^2 检验分析(表1)发现:CVS(+)组与CVS(-)组在年龄、性别、高血压病史、高血脂病史、Fisher分级级别的构成上差异无统计学意义,而CVS(+)组中Hunt-Hess分级3~5级的构成比较CVS(-)组高,差异有统计学意义($P=0.0226$)。

表1 入选患者基本临床资料

Tab 1 Clinical data of the included spontaneous SAH patients

Index	CVS		χ^2	P
	(-)	(+)		
Age (year)			0.2316	0.6306
<60	48	32		
≥60	49	38		
Sex			0.3119	0.5765
Male	43	28		
Female	54	42		
Hypertension			0.3185	0.5725
yes	36	29		
No	61	41		
Hyperlipidemia			0.1546	0.6942
Yes	40	31		
No	57	39		
Hunt-Hess classification			4.9559	0.0226
1-2	84	51		
3-5	13	19		
Fisher classification			3.2747	0.0704
1-2	66	38		
3-4	31	32		

CVS: Cerebral vasospasm; SAH: Subarachnoid hemorrhage

2.2 COMT基因型分布和等位基因频率 COMT基因型和等位基因频率分析结果表明:G/G、G/A、A/A基因型分别为92(55.1%)、63(37.7%)、12(7.2%)例,分布符合Hardy-Weinberg定律,研究样本为遗传平衡群体。

2.3 COMT基因多态性与CVS的关系

2.3.1 COMT基因型与CVS的关系 A/A基因型患者CVS发生率(66.7%,8/12)明显高于G/G(30.4%,28/92),差异有统计学意义($\chi^2=6.1571$,

$P=0.0131$);A/A基因型患者CVS发生率也高于G/A基因型患者(46.0%,29/63),但差异无统计学意义($\chi^2=1.7171$, $P=0.1901$);G/A基因型患者CVS发生率(46.0%)也高于G/G基因型患者(30.4%),但差异无统计学意义($\chi^2=3.2754$, $P=0.0873$)。

2.3.2 COMT等位基因频率与CVS的关系 A等位基因携带者CVS发生率(51.7%,45/87)明显高于G等位基因携带者(34.4%,85/247),差异有统计学意义($\chi^2=8.1104$, $P=0.0044$)。

2.4 CVS发生的影响因素分析 单因素logistic回归分析显示:(1)A等位基因与CVS具有相关性($P=0.0217$),G等位基因与CVS无明显相关($P=0.1356$);(2)A/A基因型与CVS具有相关($P=0.0224$),G/G和G/A基因型与CVS无明显相关($P=0.1974$, $P=0.0736$);(3)Fisher分级3~4级与CVS无明显相关($P=0.0587$);(4)Hunt-Hess分级3~5级与CVS具有相关性($P=0.0432$)。多因素logistic回归分析显示:调整临床资料后,仍然发现A等位基因、A/A基因型是CVS的危险因素($P=0.0397$, $P=0.0310$)。详见表2。

表2 CVS发生的影响因素分析

Tab 2 Logistic regression analysis of factors for CVS

Correlative factor	P (Univariate)	OR (95% CI)
		(Multivariate)
Sex	0.5202	0.792 (0.389, 1.611)
Age	0.0569	2.248 (1.011, 4.997)
Hyperlipidemia	0.2933	1.470 (0.717, 3.014)
Hypertension	0.5403	0.768 (0.577, 2.366)
Fisher classification	0.0587	4.540 (2.040, 19.840)
Hunt-Hess classification	0.0432	5.110 (1.600, 24.060)
G/G	0.1974	1.013 (0.532, 4.565)
G/A	0.0736	1.580 (0.770, 6.570)
A/A	0.0224	3.105 (1.174, 8.208)
G	0.1356	1.204 (0.662, 4.505)
A	0.0217	4.422 (1.243, 15.735)

CVS: Cerebral vasospasm

3 讨论

TCD是目前临床上检查和连续监测CVS的最常用方法^[4]。研究证明TCD所反映的血流速度增

加与动脉造影所显示的脑血管痉挛有很好的相关性,特别是大脑中动脉^[5]。Aäslid^[6]根据 TCD 的临床追踪观察,对 SAH 引起的 CVS 进行临床分级:血流速度 120~140 cm/s 为轻度血管痉挛,140~200 cm/s 为中度血管痉挛,大于 200 cm/s 时为重度血管痉挛,小于 120 cm/s 时无血管痉挛表现。因此,本研究采用 TCD 在 SAH 后急性期(1~3 d)观测 SAH 患者的血流动力学变化,并以 TCD 观察最准确和最灵敏的大脑中动脉为主要观测点来诊断 CVS。

临床工作中常发现部分患者中出血量多少与 CVS 严重程度不相符,如部分 SAH 量少的患者出现较为严重的 CVS,而部分 SAH 量多的患者不出现 CVS。这提示 SAH 后 CVS 的严重程度及患者预后存在个体差异,而机体的个体差异可能与基因多态性有关。目前研究发现,某些基因的多态性与 SAH 后 CVS 的严重程度有关,并且可能影响到 SAH 患者预后^[1]。前已述及,SAH 后早期 CVS 与机体释放入血的 CA 增多有关^[2]。COMT 是主要的 CA 分解代谢限速酶,广泛存在于人体内前脑、基底神经节、神经胶质细胞及边缘系统等各部位。在突触间隙,特别是突触后膜,COMT 活性较高,在镁离子的催化下能将 S-腺苷蛋氨酸提供的甲基转移到 CA 苯环的 3 位氧上,成为 3-甲基基 4-羟基衍生物,进而使具生物活性或毒性的 CA 灭活^[7]。因此,COMT 是影响体内 CA 含量以及 CVS 严重程度的重要因素。

针对 SAH 后 CVS 的严重程度存在个体差异这一现象,我们推测:由于基因多态性的存在,在 CVS 发生后,部分患者 COMT 活性较低,对增多的 CA 的灭活能力较弱,因而 CVS 程度较重,持续时间较长,患者病情较重,预后较差;部分患者 COMT 活性较高,对增多的 CA 的灭活能力较强,因而 CVS 程度较轻,持续时间较短,患者病情较轻,预后较好。

研究表明,红细胞内 COMT 酶活性个体间差异很大,可以分成低度活性、中度活性、高度活性 3 种表型^[8]。在人类 COMT 基因第 4 外显子存在 1 个 G→A 点突变,序列分析确认如果 S-COMT 的第 108 位的缬氨酸(Val)被甲硫氨酸(Met)取代,与此相对应 MB-COMT 的 158 位 Val 被 Met 取代,便可引起 COMT 热不稳定性改变,从而导致 COMT 活性改

变。COMT 的 3 种表型是由 Val-COMT (高活性)和 Met-COMT (低活性)两个等位基因所决定的,以共显性的方式遗传。前者使酶活性增高 3~4 倍,Val/Val 基因型的酶具有高活性,Val/Met 基因型的酶具有中度活性,而 Met/Met 基因型的酶活性低^[9]。以上现象提示 COMT 基因具有多态性。另有研究发现,COMT 基因多态性与帕金森病(PD)、精神分裂症和注意缺陷多动障碍遗传易感性之间存在相关性,提示此推测存在的可能性^[10-12]。但迄今为止,COMT 的基因多态性是否与 SAH 后早期 CVS 的严重程度有关尚未见相关报道。

本研究结果显示,A/A 基因型患者 CVS 发生率明显高于 G/G 基因型患者($P=0.013 1$),A 等位基因携带者 CVS 发生率明显高于 G 等位基因携带者($P=0.004 4$),这种相关性在单因素 logistic 回归中得到了证实。在调整了性别、年龄、血压、Hunt-Hess 分级和 Fisher 分级后,用多元 logistic 回归分析发现,这种相关性同样存在。结果提示高活性 COMT 酶可更为有效地分解灭活 CA,因而 CVS 程度较轻;而低活性 COMT 酶对增多的 CA 灭活能力较弱,因而 CVS 程度较重。

有学者把头颅 Fisher 分级法中的出血量与发生 CVS 的潜在危险性联系起来,认为可以帮助估计哪些患者在 SAH 后更容易发生 CVS^[13]。本研究显示,CT 的 Fisher 分级中 3~4 级的患者发生 CVS 的比例(32/63, 50.8%)虽明显高于 1~2 级的患者(38/104, 36.5%),但未显示出统计学意义($P=0.070 4$),单因素 logistic 分析亦未发现二者之间存在相关性,与文献报道不符。该结果印证了出血较多的患者 CVS 的程度不一定较重的临床现象,提示可能与基因多态性所致的个体差异有关,但同时也需要考虑到可能与样本量较少造成的统计学差异有关,尚待大样本量研究加以证实。

SAH 的 Hunt-Hess 评分法也可预计 CVS 的严重程度,患者的评分分值越高,就越容易发生血管痉挛^[14]。在本研究中,Hunt-Hess 评级 3~5 级的患者发生 CVS 的比例(19/32, 59.4%)高于 Hunt-Hess 评级 1~2 级的患者(51/135, 37.8%),差异具有统计学意义($P=0.022 6$),单因素 logistic 分析发现 Hunt-Hess 评级 3~5 级是 CVS 的危险因素之一,与文献报道相符。这提示 CVS 是造成患者病情危

重的主要原因之一,换言之,只要患者病情较重,则往往提示患者发生 CVS 的机会较大。

需要特别注意的是,COMT 仅为 CA 代谢通路中的其中 1 个限速酶,其在 SAH 后 CA 含量增高的发生机制中只能发挥部分作用,COMT 基因多态性与 CVS 的相关性可能只是 CVS 个体差异中的重要因素,与 CA 代谢通路中的其他酶基因协同作用发挥其多态性作用。SAH 患者 CVS 的个体差异应与 CA 代谢通路中的其他限速酶的基因多态性有关,这将是我们的下一步研究的目标。

CVS 是 SAH 后的主要并发症,已经有大量研究采用基因工程方法预防和治疗 SAH 后 CVS。但目前临床实际工作中采取的治疗措施都是针对 CVS 的外部因素,而没有从患者个体差异的最根本原因——遗传学角度来进行预防和治疗。随着对 CVS 发生的危险因素和发生发展机制的认识不断深入以及基因技术的不断提高,临床上已经能够在短时间内检测各种基因类型并进行基因多态性分析,对 SAH 患者自然病程的危险性进行特别评估和预测。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Ko N U, Rajendran P, Kim H, Rutkowski M, Pawlikowska L, Kwok P Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism (-786T→C) and increased risk of angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 2008, 39: 1103-1108.

[2] Dilraj A, Botha J H, Rambiritch V, Miller R, van Dellen J R. Levels of catecholamine in plasma and cerebrospinal fluid in aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurgery*, 1992, 31: 42-50.

[3] Krejza J, Kochanowicz J, Mariak Z, Lewko J, Melhem E R. Middle cerebral artery spasm after subarachnoid hemorrhage: detection with transcranial color-coded duplex US[J]. *Radiology*, 2005, 236: 621-629.

[4] Lindegaard K F. The role of transcranial Doppler in the management of patients with subarachnoid haemorrhage—a review[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 1999, 72: 59-71.

[5] Aaslid R. Transcranial Doppler assessment of cerebral vasospasm[J]. *Eur J Ultrasound*, 2002, 16(1-2): 3-10.

[6] Aaslid R. *Transcranial Doppler Sonography*[M]. New York: Springer-Verlag Wien, 1986: 1-125.

[7] Männistö P T, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors[J]. *Pharmacol Rev*, 1999, 51: 593-628.

[8] Chen X, Wang X, O'Neill A F, Walsh D, Kendler K S. Variants in the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families[J]. *Mol Psychiatry*, 2004, 9: 962-967.

[9] Palmatier M A, Kang A M, Kidd K K. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles[J]. *Biol Psychiatry*, 1999, 46: 557-567.

[10] Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Otsuka E, Hattori M, Honda F, et al. High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 1997, 221(2-3): 202-204.

[11] Egan M F, Goldberg T E, Kolachana B S, Callicott J H, Mattay V S, Hariri A R, et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6917-6922.

[12] Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Zohar A, Gritsenko I, et al. Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): association of the high-enzyme activity Val allele with ADHD impulsive-hyperactive phenotype[J]. *Am J Med Genet*, 1999, 88: 497-502.

[13] Hirashima Y, Kurimoto M, Hori E, Origasa H, Endo S. Lower incidence of symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage owing to ruptured vertebrobasilar aneurysms[J]. *Neurosurgery*, 2005, 57: 1110-1116.

[14] Dietrich H H, Dacey R G Jr. Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm [J]. *Neurosurgery*, 2000, 46: 517-530.

[本文编辑] 贾泽军