

文章编号: 1001-6325(2021)04-0472-07

研究论文

p21 活化激酶 2 基因变异体 rs3662C>A 与卒中风险和预后的关系及其对转录活性的影响

司 斌^{1,2}, 张舒媛², 杨云云², 陈 宇², 张伟丽^{2*}

(1. 首都医科大学脑重大疾病研究中心 北京脑重大疾病研究院, 北京 100050;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 阜外医院 心血管疾病国家重点实验室, 北京 100037)

摘要:目的 探讨 p21 活化激酶 2(PAK2) 基因变异体 rs3662C>A 与卒中风险及预后的关系和机制。方法 收集动脉粥样硬化性脑梗死患者 733 例、腔隙性脑梗死 488 例、脑出血 435 例和健康对照 1 727 人的资料, 利用 logistic 回归模型分析 rs3662C>A 与卒中风险的关系, Cox 生存回归模型分析 rs3662C>A 与卒中预后的关系。利用荧光素酶报告基因实验分析 rs3662C>A 对 PAK2 转录活性的影响。结果 与 rs3662CC 基因型比较, rs3662A 与降低动脉粥样硬化性脑梗死的患病风险相关, 比值比为 0.67(95% CI: 0.47~0.95, $P<0.05$; 显性遗传模型), 且主要在男性中相关。平均随访 4.5 年, 携带 rs3662A 的动脉粥样硬化性脑梗死患者发生心脑血管事件和心血管病死亡的风险升高, 风险比分别为 1.84(95% CI: 1.16~2.92, $P<0.05$) 和 2.06(95% CI: 1.05~4.04, $P<0.05$)。rs3662C 降低荧光素酶表达活性的 79%($P<0.01$)。结论 PAK2 基因 rs3662A 的携带者患动脉粥样硬化性脑梗死的风险低于 rs3662CC 携带者, 但预后不良。rs3662C>A 影响 PAK2 表达活性。

关键词: p21 活化激酶 2(PAK2); 遗传变异体; 易感性; 卒中; 预后

中图分类号: R743.3 文献标志码: A

Association of genetic variant rs3662C>A in the gene of p21-activated kinase 2 with risk and prognosis of stroke as well as its effect on transcription activity

SI Bin^{1,2}, ZHANG Shu-yuan², YANG Yun-yun², CHEN Yu², ZHANG Wei-li^{2*}

(1. Beijing Institute of Brain Disorders, Laboratory of Brain Disorders, Capital Medical University, Beijing 100050;

2. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, CAMS & PUMC, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To identify the relationship between variant rs3662C>A in the gene of p21-activated kinase 2 (PAK2) and risk of stroke as well as prognosis, and to explore the effect of rs3662C>A on the transcriptional activity of PAK2 gene. **Methods** In a multi-center case-control study including 733 cerebral atherothrombotic stroke, 488 lacunar infarction, 435 intracerebral hemorrhage and 1 727 healthy controls, the relationship between variant and risk of three stroke subtypes was examined using the multivariate logistic regression model. The stroke patients were prospectively followed up for a median of 4.5 years, and the relationship between rs3662 and cardiovascular

收稿日期: 2020-12-04 修回日期: 2021-01-13

基金项目: 国家自然科学基金(81270164); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB503901)

* 通信作者(corresponding author): zhangweili1747@yahoo.com

events as well as mortality was analyzed using the Cox proportional-hazards model. The effect of rs3662C>A on the transcriptional activity of *PAK2* gene was examined using the luciferase reporter assays. **Results** The rs3662A allele was associated with a decreased risk of atherosclerotic stroke as compared with rs3662CC genotype, and odds ratio was 0.67 (95% CI: 0.47~0.95, $P<0.05$) in a dominant genetic model. This relationship had sex-specific difference and was significant incline to male. During the follow-up, atherosclerotic stroke patients carrying with rs3662A allele had a significantly higher risk of cardio-cerebrovascular events and cardiovascular mortality; hazards ratio was respectively 1.84 (95% CI: 1.16~2.92, $P<0.05$) and 2.06 (95% CI: 1.05~4.04, $P<0.05$). The rs3662C significantly reduced the luciferase activity by 79% ($P<0.01$). **Conclusions** The carriers with rs3662A allele of *PAK2* gene have a reduced risk for atherosclerotic stroke but a worse prognosis. It is found that rs3662A affects the *PAK2* expression level.

Key words: p21-activated kinase 2 (*PAK2*); genetic variants; susceptibility; stroke; prognosis

卒中(stroke)的发病率、致死率和致残率高,是危害中国人民健康的“头号杀手”^[1]。卒中病因复杂,受环境因素和遗传因素的共同影响^[2-3],在相似传统危险因素特征的人群中,卒中的发生风险存在个体差异。血管重塑和血管壁结构异常是卒中的重要发病机制^[4]。血管内皮细胞功能异常可诱发动脉粥样硬化,导致缺血性卒中,血管重塑功能缺陷可诱发微血管瘤,导致出血性卒中。研究表明,p21 活化激酶 2a (p21-activated kinase 2, *PAK2*) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在血管结构中表达,影响血管内皮细胞的迁移和血管通透性,调控脑血管发育^[5-6];抑制 *PAK2* 基因表达时,可导致斑马鱼发生脑出血表型^[7]。然而,*PAK2* 基因与人类卒中的关系,仍属未知。

本研究以初发卒中患者为研究对象,利用全国多中心、大规模的病例-对照队列和前瞻性随访研究,分析 *PAK2* 基因变异体 (variants) 与卒中患病易感性和预后的关系,并通过功能学实验探究遗传变异影响 *PAK2* 基因表达的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及细胞:人胚胎肾细胞系 HEK293T (中国医学科学院基础医学研究所细胞中心,中国北京);pMIR-Report 荧光素酶报告载体 (Thermo Fish Scientific 公司); Lipofectamine® 3000 (Invitrogen 公司);双荧光素酶报告分析系统 (Promega 公司);血液基因组 DNA 非柱式提取试剂盒 (北京康为世纪公司);microRNA mimics (吉玛基因公司);引物合成

(北京六合华大基因)。

1.1.2 研究对象:卒中病例的入组时间为 2000 年 12 月至 2001 年 12 月,来自全国 7 家临床中心 (北京、西安、重庆、山东和天津各 1 个,武汉 2 个)^[8]。研究获得中国医学科学院阜外医院伦理委员会的批准 (2006CB503800),所有患者均签署知情同意书。本研究包括 1 649 例初发卒中患者,年龄 30~74 岁,汉族,彼此无血缘关系。入选患者均经严格的神经系统检查、计算机断层扫描 (computed tomography, CT) 或磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 确诊。排除标准:1) 有脑血管疾病史;2) 其他类型的卒中:蛛网膜下腔出血、脑动脉瘤型脑出血、短暂性缺血性卒中发作;3) 既往有风湿性心脏病和房颤的患者;4) 有恶性肿瘤或严重慢性疾病的患者。

本研究包括 1 727 例对照,来源于社区健康居民,无心脑血管疾病史,按照性别、年龄 (不超过 ± 5 岁)、居住地区与卒中患者进行匹配。

医生采用门诊、电话的方法对卒中患者进行随访,每 2 年 1 次,至 2006 年 5 月结束,平均随访 4.5 年。随访终点事件主要包括心脑血管事件 (卒中再发和心肌梗死)、心脑血管疾病死亡和全因死亡。临床终点事件委员会根据患者的医疗记录确认疾病诊断,通过死亡证明或者询问家庭成员、同事获得患者死亡信息。

1.2 方法

1.2.1 研究对象的分组及处理:卒中患者分为 3 类亚型:动脉粥样硬化性脑梗死 (cerebral thrombotic stroke) 患者 733 例、腔隙性脑梗死 (lacunar infarction) 患者 488 例、脑出血 (intracerebral hemorrhage)

患者 435 例。记录患者的基线资料,包括年龄、性别、身高、体质量、血糖、血脂、吸烟、饮酒、糖尿病史、卒中家族史、高血压史等。

1.2.2 提取外周血基因组 DNA:禁食 12 h 后采取外周静脉血。用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取外周血白细胞基因组 DNA,样本于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.3 *PAK2* 基因遗传变异的选择和基因型的检测:*PAK2* 基因位于染色体 3q29。本研究使用生物信息学软件 TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 对 *PAK2* 基因 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3'UTR) 进行序列分析,发现 rs3662 (C>A) 位于 miRNA-511 (miR-511) 与 *PAK2* 结合区域,可能影响该基因的转录调控和表达。利用 Sequenom MassARRAY SNP 技术^[9] (飞行时间质谱法) 检测 rs3662 的基因型。正向引物序列: 5'-GTCAACGCGTATCATGGCTATTGAGATGGT-3', 反向引物序列: 5'-CGGCAAGCTTTCTAAAACTGACTTTTTCACA-3'; 延伸引物序列: 5'-GCCATAACTATCTAGCTTTGAG-3'。

1.2.4 载体构建与荧光素酶活性的检测:将 *PAK2* 基因 3'UTR 序列插入 pMIR-Report 荧光素酶报告载体,构建 pMIR-rs3662C 和 pMIR-rs3662A 质粒。将 HEK293T 细胞以每孔 1.2×10^4 个种于 96 孔细胞培养板,每孔体积 $100\text{ }\mu\text{L}$,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 12 h,待细胞汇合度达到 80% 时,将 pMIR-rs3662C 和 pMIR-rs3662A 质粒分别与 miR-511 共转染入 HEK293T 细胞。实验分组为:1) 阴性对照组 pMIR-Report 载体,实验组 pMIR-rs3662C 和 pMIR-rs3662A;2) 阴性对照组 pMIR-rs3662C+miRNA-NC,实验组 pMIR-rs3662C+miRNA-511;3) 阴性对照组 pMIR-rs3662A+miRNA-NC,实验组 pMIR-rs3662A+miRNA-511。

使用双荧光素酶报告分析系统在 Infinite M200 Pro 多功能酶标仪上检测萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性。以海肾荧光素酶活性作为内参,计算相对荧光素酶活性 (relative luciferase activity, RLU), $\text{RLU} = (\text{重组质粒荧光素酶活性} - \text{空白对照载体荧光素酶活性}) / (\text{海肾荧光素酶活性} - \text{空白对照载体荧光素酶活性})$ 。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 K-S 法分析数值变量是否符合正态分布,

满足正态分布的变量用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,采用 Student's *t* 检验比较两组间的均数差异,One-way ANOVA 法进行多组间的均数比较。血浆三酰甘油浓度为非正态分布,用中位数 (25^{th} , 75^{th}) 表示,采用 Mann-Whitney *U* 检验法进行组间比较。采用 χ^2 检验比较分类变量的组间差异。

采用 χ^2 检验分析 rs3662 的基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。利用多元 Logistic 回归模型分析 rs3662 与卒中风险的相关性,并校正传统危险因素 (包括年龄、性别、体重指数、吸烟、饮酒、血糖、血脂、糖尿病史、卒中家族史、高血压史)。用比值比 (odds ratio, *OR*) 和 95% 可信区间 (confidence interval, *CI*) 表示相对危险度。利用多元 Cox 生存回归模型分析 rs3662 与心脑血管事件风险、卒中后心血管死亡风险、全因死亡风险的相关性,并校正上述传统危险因素。用风险比 (hazards ratio, *HR*) 和 95% *CI* 表示相对危险度。使用 SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) 进行数据分析。

2 结果

2.1 研究对象的临床特征

本研究包括 1 649 例卒中患者和 1 727 例健康对照人群。与对照组比较,卒中患者常常同时伴有高血压、糖尿病、冠心病以及卒中家族史,具有高水平的血糖、总胆固醇和三酰甘油以及低水平的高密度脂蛋白胆固醇,并常伴有不健康的生活方式 (如吸烟、饮酒) (表 1)。

2.2 *PAK2* 基因遗传变异 rs3662C>A 与卒中患病风险的关系

rs3662C>A 的基因型频率在卒中病例组和对照组人群中的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。rs3662A 等位基因与降低动脉粥样硬化性脑梗死的患病风险相关,加性遗传模型 *OR* 为 0.72 (95% *CI*: 0.53~0.99, $P<0.05$),显性遗传模型 *OR* 为 0.67 (95% *CI*: 0.47~0.95, $P<0.05$) (表 2)。rs3662 与卒中风险的关系有性别差异。rs3662 A 等位基因主要与降低男性动脉粥样硬化性脑梗死的患病风险显著相关,加性遗传模型 *OR* 为 0.54 (95% *CI*: 0.34~0.85, $P<0.01$),显性遗传模型 *OR* 为 0.50 (95% *CI*: 0.31~0.83, $P<0.01$) (表 3)。

表 1 卒中患者和对照组的临床资料特征比较

Table 1 Clinical characteristics of stroke cases and control subjects ($\bar{x}\pm s$)

variables	control subjects (<i>n</i> = 1 727)	thrombotic stroke (<i>n</i> = 733)	lacunar infarction (<i>n</i> = 481)	ICH (<i>n</i> = 435)
age/year	59. 6±8. 5	61. 3±9. 3 ^{##}	60. 8±8. 5 [#]	58. 0±9. 7 ^{##}
male[<i>n</i> (%)]	990(57. 3)	463(63. 2) ^{##}	300(62. 4) [#]	269(61. 8)
body mass index/(kg/m ²)	24. 2±3. 3	24. 4±3. 5	24. 5±3. 2	24. 0±3. 5
systolic blood pressure/mmHg	129±17	147±23 ^{##}	143±20 ^{##}	152±23 ^{##}
diastolic blood pressure/mmHg	80±10	87±13 ^{##}	86±12 ^{##}	92±13 ^{##}
fasting serum glucose/(mmol/L)	5. 7±1. 8	6. 6±3. 1 ^{##}	6. 1±2. 8 ^{##}	6. 7±3. 8 ^{##}
total cholesterol/(mmol/L)	5. 2±1. 3	5. 1±1. 4	5. 0±1. 1	4. 7±1. 2 ^{##}
triglycerides/(mmol/L) *	1. 3(0. 9–1. 9)	1. 7(1. 2–2. 3)	1. 7(1. 2–2. 3)	1. 3(0. 9–2. 0)
HDL-C/(mmol/L)	1. 4±0. 4	1. 2±0. 5 ^{##}	1. 3±0. 5 ^{##}	1. 3±0. 5 ^{##}
cigarette smoking[<i>n</i> (%)]				
never	1 093(63. 3)	358(48. 8) ^{##}	267(55. 5) ^{##}	225(51. 7) ^{##}
former	218(12. 6)	165(22. 5) ^{##}	95(19. 5) ^{##}	95(21. 5) ^{##}
current	416(24. 1)	210(28. 6) ^{##}	121(25. 2)	116(26. 7) [#]
alcohol intake[<i>n</i> (%)]	530(30. 7)	281(38. 3) ^{##}	160(33. 3)	178(40. 9) ^{##}
history of family stroke[<i>n</i> (%)]	413(23. 9)	232(31. 7) ^{##}	139(28. 9) [#]	137(31. 5) ^{##}
history of hypertension[<i>n</i> (%)]	457(26. 5)	474(64. 7) ^{##}	285(59. 3) ^{##}	282(64. 8) ^{##}
history of diabetes[<i>n</i> (%)]	89(5. 2)	122(16. 6) ^{##}	61(12. 7) ^{##}	24(5. 5)
history of CHD[<i>n</i> (%)]	210(12. 2)	153(20. 9) ^{##}	58(12. 1)	43(9. 9)

Abbreviations. HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; CHD, coronary heart disease; ICH, intracerebral hemorrhage; * TG, median(25th, 75th);
[#]*P*<0. 05, ^{##}*P*<0. 01, stroke cases(including 3 subtypes: thrombotic stroke, lacunar infarction, and ICH) versus control subjects, respectively; 1 mmHg
=0. 133 kPa.

表 2 PAK2 基因变异体 rs3662 与卒中患病风险的相关性

Table 2 Association between variant rs3662 at PAK2 gene and risk of stroke

rs3662(C>A)	allele/%		genotype[<i>n</i> (%)]	
	A	CC	CA	AA
control subjects(<i>n</i> = 1 727)	5. 6%	1 546(89. 5%)	167(9. 7%)	14(0. 8%)
thrombotic stroke(<i>n</i> = 733)	4. 6%	672(91. 7%)	54(7. 3%)	7(1. 0%)
lacunar infarction(<i>n</i> = 481)	5. 4%	441(90. 0%)	44(9. 2%)	4(0. 8%)
ICH(<i>n</i> = 435)	6. 3%	385(88. 5%)	45(10. 3%)	5(1. 2%)
rs3662(C>A)	additive genetic model(CC <i>vs</i> CA <i>vs</i> AA)		Dominant genetic model(CA+AA <i>vs</i> CC)	
	OR(95% CI) *	adjusted OR(95% CI) *	OR(95% CI) *	Adjusted OR(95% CI) *
control subjects(<i>n</i> = 1 727)	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00
thrombotic stroke(<i>n</i> = 733)	0. 83(0. 63–1. 09)	0. 72(0. 53–0. 99) [#]	0. 78(0. 57–1. 05)	0. 67(0. 47–0. 95) [#]
lacunar infarction(<i>n</i> = 481)	0. 96(0. 71–1. 30)	1. 05(0. 76–1. 45)	0. 95(0. 68–1. 32)	1. 04(0. 73–1. 49)
ICH(<i>n</i> = 435)	1. 12(0. 83–1. 50)	1. 33(0. 94–1. 88)	1. 11(0. 80–1. 55)	1. 29(0. 87–1. 91)

abbreviations. ICH, intracerebral hemorrhage; OR, odds ratio; CI, confidence interval; * OR(95% CI) was obtained with logistic regression analysis, and
adjusted OR(95% CI) was further adjusted for age, sex, body mass index, blood pressure, serum glucose, lipid profiles, cigarette smoking, alcohol in-
take, and history of hypertension and diabetes; [#]*P*<0. 05, stroke cases(including 3 subtypes: thrombotic stroke, lacunar infarction, and ICH) versus
control subjects, respectively.

表 3 PAK2 基因变异 rs3662 与卒中患病风险的性别差异

Table 3 Sex-specific difference for association between variant rs3662 at PAK2 gene and risk of stroke

rs3662(C>A)	genotype[<i>n</i> (%)]					additive genetic model	dominant genetic model
						(CC <i>vs</i> CA <i>vs</i> AA)	(CA+AA <i>vs</i> CC)
	A/%	CC	CA	AA	<i>P</i> *	adjusted <i>OR</i> (95% CI) [#]	adjusted <i>OR</i> (95% CI) [#]
men							
control subjects(<i>n</i> = 990)	5. 5	888(89. 7)	95(9. 6)	7(0. 7)		1. 00	1. 00
thrombotic stroke(<i>n</i> = 463)	3. 1	436(94. 2)	25(5. 4)	2(0. 4)	0. 02	0. 54(0. 34–0. 85) ^{##}	0. 50(0. 31–0. 83) ^{##}
lacunar infarction(<i>n</i> = 300)	6. 0	265(88. 3)	34(11. 2)	1(0. 5)	0. 53	1. 20(0. 80–1. 81)	1. 26(0. 81–1. 96)
ICH (<i>n</i> = 269)	6. 3	237(88. 1)	30(11. 2)	2(0. 7)	0. 75	1. 16(0. 73–1. 86)	1. 16(0. 69–1. 94)
women							
control subjects(<i>n</i> = 737)	5. 8	658(89. 3)	72(9. 8)	7(0. 9)		1. 00	1. 00
thrombotic stroke(<i>n</i> = 270)	7. 2	236(87. 4)	29(10. 7)	5(1. 9)	0. 45	0. 97(0. 62–1. 53)	0. 91(0. 54–1. 54)
lacunar infarction(<i>n</i> = 181)	4. 4	168(92. 8)	10(5. 5)	3(1. 7)	0. 15	0. 85(0. 50–1. 47)	0. 73(0. 38–1. 38)
ICH (<i>n</i> = 166)	6. 3	148(89. 1)	15(9. 0)	3(1. 7)	0. 61	1. 49(0. 89–2. 50)	1. 42(0. 78–2. 60)

abbreviations. ICH, intracerebral hemorrhage; OR, odds ratio; CI, confidence interval; *P values were calculated by χ^2 test for comparisons of genotype frequencies between stroke cases versus control subjects; #adjusted OR(95% CI) was obtained with multivariate logistic regression analysis by adjusting for age, body mass index, blood pressure, lipid profiles, serum glucose, cigarette smoking, alcohol intake, and history of hypertension and diabetes; ##P<0. 01, stroke cases(including 3 subtypes: thrombotic stroke, lacunar infarction, and ICH) versus control subjects, respectively.

2.3 PAK2 基因遗传变异 rs3662C>A 与卒中患者预后的关系

卒中患者的平均随访时间为 4.5 年(范围为 0.1~6.0 年),随访过程中 82 例(5.0%)因居住地变迁而失访,随访率 95%。共有 371 例患者发生心脑血管事件,290 例死亡,其中 161 例为心血管病死亡。在动脉粥样硬化性脑梗死患者中,携带 rs3662A 等位基因的患者发生心脑血管事件的风险显著升高(HR: 1.84, 95% CI: 1.16~2.92; P<0.05),以及心血管死亡风险显著升高(HR: 2.06, 95% CI: 1.05~4.04; P<0.05)(表 4)。

2.4 PAK2 基因遗传变异 rs3662C>A 对 PAK2 转录活性的影响

对 PAK2 基因 3'UTR 序列进行生物信息学预测分析,发现 rs3662C 位于 miR-511 与 PAK2 基因结合的种子序列内,C 等位基因变为 A 等位基因时,miR-511 与 PAK2 基因的结合能力消失(图 1)。

将报告基因质粒 pMIR-rs3662C(野生型)和 pMIR-rs3662A(突变型)分别与 miR-511 共转染入 HEK293T 细胞,检测荧光素酶活性。pMIR-rs3662C 促进 miR-511 与 PAK2 基因 3'UTR 结合,显著降低荧光素酶的表达活性达 79%(P<0.01); 而 pMIR-

rs3662A 为功能缺失型变异,对荧光素酶的表达活性无显著影响;在未转染 miR-511 时,pMIR-rs3662C 和 pMIR-rs3662A 的荧光素酶表达活性差异无统计学意义(图 2)。

3 讨论

PAK2 是小 G 蛋白 Rho 家族中三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)的效应物,参与细胞增殖和凋亡功能^[10-11]。PAK2 基因在脑血管高表达,在血管发育和成熟过程中发挥重要作用,维护血管的稳定性、通透性和完整性^[5-6]。PAK2 突变可诱发斑马鱼脑出血^[7]。此外,动脉粥样硬化斑块内的新生血管丰富,这些微血管易破损、易渗漏,可促进斑块的不稳定进展,导致缺血性卒中^[12-13]。本研究通过全国多中心卒中病例-对照研究,首次发现 PAK2 基因遗传变异 rs3662A 的携带者患动脉粥样硬化性脑梗死的风险低于 rs3662CC 基因型携带者,但发生心脑血管事件和心血管死亡的风险升高。分子机制研究显示 rs3662 影响 PAK2 基因的表达活性。

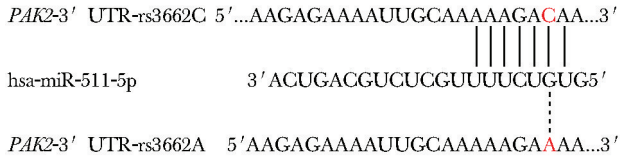
HEK293T 细胞是人源肾上皮细胞系,培养繁殖速度快、转染效率高,是研究外源性重组质粒功能的

表 4 PAK2 基因变异 rs3662 与卒中患者心血管事件和死亡风险之间的关系

Table 4 Association between variant rs3662 at PAK2 gene and risk of CVD events and mortality in stroke cases

rs3662 (C>A)	CVD events			CVD-related mortality			all-cause mortality		
	CC (ref.)	CA+AA	P	CC (ref.)	CA+AA	P	CC (ref.)	CA+AA	P
thrombotic stroke									
end-points (n)	130	22		55	10		121	17	
person-years	2 914. 9	259. 5		2 923. 1	258. 3		2 805. 5	239. 2	
adjusted HR(95% CI) *	1. 00	1. 84(1. 16–2. 92)	0. 01	1. 00	2. 06(1. 05–4. 04)	0. 04	1. 00	1. 60(0. 96–2. 66)	0. 07
lacunar infarction									
end-points (n)	99	13		27	0		49	3	
person-years	1 868. 7	209. 2		1 905. 0	221. 0		1 865. 2	215. 5	
adjusted HR(95% CI) *	1. 00	1. 12(0. 61–2. 04)	0. 73	1. 00	NA		1. 00	0. 63(0. 19–2. 02)	0. 43
ICH									
end-points (n)	98	11		62	7		88	12	
person-years	1 665. 1	211. 0		1 605. 7	213. 8		1 549. 7	205. 8	
adjusted HR(95% CI) *	1. 00	1. 03(0. 55–1. 94)	0. 92	1. 00	0. 93(0. 42–2. 06)	0. 86	1. 00	1. 09(0. 59–2. 00)	0. 78

abbreviations. CVD, cardiovascular disease; ICH, intracerebral hemorrhage; HR, hazards ratio; CI, confidence interval; * adjusted HR(95% CI) and P values were calculated by the Cox regression model adjusted for age, sex, body mass index, blood pressure, cigarette smoking, alcohol intake, and history of hypertension and diabetes.

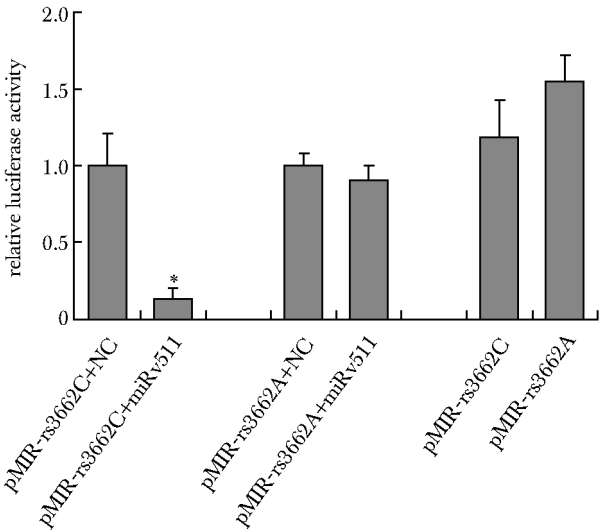


The variant rs3662 is an C to A change and indicated by red color fonts in the seed binding region

图 1 遗传变异 rs3662 位于 miR-511 与 PAK2 基因 3'UTR 序列的结合区域

Fig 1 Variant rs3662 occurs in the binding site for miR-511 in the 3'-UTR of PAK2 gene

常用工具细胞系,可高效稳定的表达外源性融合蛋白^[14]。本研究利用 pMIR-Report 荧光素酶报告基因实验,体外转染 HEK293T 细胞,检测荧光素酶活性,发现 PAK2 表达受到 rs3662C>A 调节。rs3662C 位于 miR-511 与 PAK2 基因 3'-UTR 结合的种子序列,可通过 miR-511 促进 PAK2 降解,显著降低该基因的表达活性。rs3662C 变为 rs3662A 时,miR-511 与 PAK2 不结合,可维持 PAK2 表达,有助于血管稳定。该分子机制可在一定程度上解释 rs3662A 携带者患动脉粥样硬化性脑梗死的风险低于 rs3662CC 基因型携带者。然而,rs3662 与卒中风险的性别差异,尚需要进一步阐明性激素的作用机制。



The C-allele of rs3662 suppressed luciferase activity of pMIR-rs3662C plasmid cotransfected with miR-511 in HEK293T cell line; * $P < 0.01$ compared with pMIR-rs3662C+NC

图 2 遗传变异 rs3662 C>A 对 miR-511 调控 PAK2 基因转录活性的影响

Fig 2 Effect of rs3662C>A on the PAK2 transcriptional activity regulated by miR-511($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

本研究结果显示 *PAK2* 与卒中预后相关,这反映了 *PAK2* 基因在心血管功能中的复杂作用。研究发现,*PAK2* 调节血管生成因子的形成,通过激活 MAPK/ERK 信号通路,促进血管内皮细胞增殖、迁移、细胞间黏连以及血管生成,影响新生血管的完整性^[15],这不利于卒中后缺血梗死区域的侧枝循环形成和恢复。目前,需要更多的流行病学证据和生物学研究来阐明 *PAK2* 在心脑血管疾病及其死亡中的作用。

本研究存在以下局限性:第一,rs3662C>A 与卒中风险及其预后之间的关系有待于在其他独立的人群队列中进行验证;第二,尚未完全阐明 rs3662C>A 影响 *PAK2* 基因表达的分子机制及其在心脑血管病理生理过程中发挥的作用。

综上所述,*PAK2* 基因遗传变异 rs3662C>A 与动脉粥样硬化性脑梗死的患病风险以及预后风险相关,本研究将有助于识别具有卒中高风险的个体并进行心脑血管疾病的预警。

参考文献:

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要[J]. 中国循环杂志, 2020, 35: 833-854.
- [2] Malik R, Rannikmäe K, Traylor M, *et al.* Genome-wide meta-analysis identifies 3 novel loci associated with stroke [J]. *Ann Neurol*, 2018, 84:934-939.
- [3] Chauhan G, Adams HHH, Satizabal CL, *et al.* Genetic and lifestyle risk factors for MRI-defined brain infarcts in a population-based setting [J]. *Neurology*, 2019, 92: e486-503.
- [4] Kiechl S, Willeit J. The natural course of atherosclerosis. II. Vascular remodeling. Bruneck Study Group[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19:1491-1498.
- [5] Cau J, Hall A. Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118: 2579-2587.
- [6] Buchner DA, Su F, Yamaoka JS, *et al.* *PAK2a* mutations cause cerebral hemorrhage in redhead zebrafish[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104:13996-14001.
- [7] Liu J, Fraser SD, Faloon PW, *et al.* A betaPix *PAK2a* signaling pathway regulates cerebral vascular stability in zebrafish[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 13990-13995.
- [8] Feng C, Yang Y, Yang S, *et al.* Effect of gene-gene and gene-environment interaction on the risk of first-ever stroke and poststroke death[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7: e846.
- [9] Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform [J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2009, 2:2-12.
- [10] Schwamborn JC, Puschel AW. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7: 923-929.
- [11] Guo Y, Kenney SR, Muller CY, *et al.* R-ketorolac targets Cdc42 and rac1 and alters ovarian cancer cell behaviors critical for invasion and metastasis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 2215-2227.
- [12] Sadat U, Jaffer FA, van Zandvoort MA, *et al.* Inflammation and neovascularization intertwined in atherosclerosis: imaging of structural and molecular imaging targets [J]. *Circulation*, 2014, 130:786-794.
- [13] Parma L, Baganha F, Quax PHA, *et al.* Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 816:107-115.
- [14] Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005, 51:187-200.
- [15] Barry DM, Xu K, Meadows SM, *et al.* Cdc42 is required for cytoskeletal support of endothelial cell adhesion during blood vessel formation in mice[J]. *Development*, 2015, 142: 3058-3070.