

· 临床研究 ·

单核细胞趋化蛋白-2518G/A 基因多态性与冠心病的关系

杨丽霞*, 郭瑞威, 齐 峰, 王先梅, 郭传明, 任 丽, 徐安妨

(成都军区昆明总医院心血管内科, 昆明 650032)

【摘要】目的 研究单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)-2518G/A 基因多态性对冠心病发病的影响。**方法** 选取冠心病患者 300 例, 正常对照组 60 例。冠心病患者分急性冠状动脉综合征 (ACS) 组 180 例以及稳定型心绞痛 (SAP) 组 120 例。所有患者行冠状动脉造影 (CAG) 检查, 采用 Gensini 评分。酶联免疫法测定 MCP-1 浓度, PCR-RFLP 方法检测 MCP-1-2518G/A 位点多态性, 研究 MCP-1-2518G/A 基因多态性与冠心病的相关性。**结果** (1) MCP-1-2518G/A 基因多态性 ACS 组 GG 型基因和 G 等位基因频率分布较 SAP 组及正常对照组升高 [GG 型基因: ACS 组 (33.4%), SAP 组 (24.2%), 对照组 (15.0%), $P < 0.05$; G 等位基因频率: ACS 组 (51.1%), SAP 组 (40.4%), 对照组 (31.7%), $P < 0.05$], ACS 组 AA 型基因及 A 等位基因较 SAP 组及正常对照组降低 [AA 型基因: ACS 组 (31.1%), SAP 组 (43.3%), 对照组 (51.7%), $P < 0.05$; A 等位基因频率: ACS 组 (48.9%), SAP 组 (59.6%), 对照组 (68.3%), $P < 0.05$]。 (2) 三种基因型间 MCP-1 浓度比较, GG 型 MCP-1 浓度较 AG 型及 AA 型升高 [GG 型基因: (153 ± 22) ng/L, AG 型基因: (136 ± 18) ng/L, AA 型基因: (124 ± 15) ng/L, ($P < 0.05$)]。 (3) 多元回归分析冠脉病变 Gensini 评分与低密度脂蛋白-胆固醇、空腹血糖、MCP-1 GG 型基因成正相关 ($P < 0.05$), 高密度脂蛋白-胆固醇与冠状动脉狭窄程度呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** MCP-1-2518G/A 基因多态性与冠心病严重程度相关; MCP-1-2518G/A 基因多态 G 等位基因能通过增强 MCP-1 表达参与冠心病发病。

【关键词】 趋化因子 CCL2; 基因多态性; 冠状动脉疾病**【中图分类号】** R541.4**【文献标识码】** A**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2012.00069

MCP-1-2518G/A gene polymorphisms and coronary atherosclerotic heart disease

YANG Lixia, GUO Ruiwei, QI Feng, WANG Xianmei, GUO Chuanming, REN Li, XU Anfang

(Department of Cardiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between MCP-1-2518 G/A gene polymorphisms and coronary heart disease (CHD). **Methods** The 360 patients were divided into three groups to undergo the coronary angiography (CAG): acute coronary syndrome (ACS) group ($n=180$), stable angina pectoris (SAP) group ($n=120$) and control group ($n=60$). The severity and extent of coronary lesions was analyzed by CAG and typified by means of Gensini coronary score system. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the MCP-1 concentration. PCR-RFLP way was used to measure MCP-1-2518 G/A gene polymorphisms. **Results** MCP-1 gene polymorphisms GG gene and G allelic gene was significantly higher in ACS group compared with the SAP group and the control group [GG gene: ACS(33.4%), SAP(24.2%), control group(15.0%), $P < 0.05$; G allelic gene: ACS(51.1%), SAP(40.4%), control group(31.7%), $P < 0.05$], and was significantly lower in ACS group compared with the SAP group and the control group [AA gene: ACS(31.1%), SAP(43.3%), control group(51.7%), $P < 0.05$; A allelic gene: ACS(48.9%), SAP(59.6%), control group(68.3%), $P < 0.05$]. The MCP-1 concentration in GG gene group was significantly higher than that in AG gene group and AA gene group [GG gene: (153 ± 22) ng/L, AG gene: (136 ± 18) ng/L, AA gene: (124 ± 15) ng/L, ($P < 0.05$)]. The Gensini score of coronary artery lesions was positively correlated with low density lipoprotein cholesterol, free blood glucose, MCP-1-2518 G/A GG gene polymorphisms ($P < 0.05$) and high density lipoprotein cholesterol was negatively correlated with stenotic degree of coronary artery. **Conclusions** MCP-1 gene polymorphisms is positive regulators of coronary artery lesions. The G allelic of MCP-1-2518 G/A polymorphism can increase the MCP-1 expression than A allelic in coronary heart disease.

【Key words】 chemokines CCL2; gene polymorphisms; coronary disease

炎症反应在冠心病发病中起着重要作用, 它不仅贯穿于冠状动脉粥样硬化 (arteriosclerosis, AS)

的全过程, 也是内在和外在危险因素导致、尤其是斑块不稳定发生破裂的中心环节。单核细胞趋化蛋

白-1 (monocyte chemotaxis protein-1, MCP-1) 在动脉粥样硬化炎症反应中发挥有重要作用, 它对动脉粥样硬化炎症反应的特征性细胞-单核/巨噬细胞的迁移和激活起特异性的调控作用。MCP-1 还在多种细胞尤其是构成 AS 病变的 3 种主要细胞——单核细胞、内皮细胞、平滑肌细胞中表达, 直接或间接地参与了动脉粥样硬化的形成^[1]。本文旨在研究冠心病患者外周血 MCP-1-2518 G/A 基因多态性在各类冠心病病变中的变化, 探讨它在冠心病尤其是急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 发病中的调控作用。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2009 年 1 月至 2009 年 10 月在成都军区昆明总医院心内科住院行冠状动脉造影 (coronary angiography, CAG) 的患者 360 例, 分为 ACS 组 180 例、稳定型心绞痛 (stable angina pectoris, SAP) 组 120 例和对照组 60 例。ACS 组包括急性 ST 段抬高型心肌梗死 60 例、非 ST 段抬高型心肌梗死 60 例和不稳定型心绞痛 (unstable angina pectoris, UAP) 60 例。对照组为 CAG 结果正常者。急性心肌梗死、UAP、SAP 诊断均符合 AHA/ACC 诊断标准, 且经 CAG 检查至少有一只血管病变狭窄程度 $\geq 50\%$, UAP 病例同时行心脏血管造影 (computed tomography angiography, CTA) 检查病变为软斑块 (CT 值小于 50Hu)。排除合并脑卒中、严重肝肾功能不全、感染、自身免疫疾病、哮喘及肿瘤患者。

1.2 标本处理

ACS 患者急诊入院时即刻采血, 其余于入院次日清晨空腹 12 h 采血, 抗凝管取静脉血 3ml, 3000 r/min 离心 10min, 分离血清于 -80°C 冰箱冻存待测。同时采肘静脉血采用全自动生化仪测定总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 以及红细胞、白细胞、血小板计数、纤维蛋白原、肝肾功能等生化指标。

1.3 冠状动脉造影

患者住院期间常规选择性或急诊冠状动脉造影检查, 冠状动脉狭窄程度的计算: 采用美国冠状动脉手术研究 (Coronary Artery Surgery Study, CASS)

诊断标准和 Gensini 评分标准^[2], 狭窄 $\leq 25\%$ 为 1 分, 25%~50% 为 2 分, 50%~75% 为 4 分, 75%~90% 为 8 分, 90%~99% 为 16 分, 100% (闭塞) 为 32 分。不同节段冠状动脉评分系数按 Gensini 标准, 狭窄程度评分再乘以一个标志病变位置, 在冠脉树中重要性的参数左主干 $\times 5$; 左前降支近段 $\times 2.5$; 中段 $\times 1.5$; 远段 $\times 1$; 第一对角支 $\times 1$; 第二对角支 $\times 0.5$; 左回旋支近段 $\times 2.5$, 远段和后降支、钝缘支均 $\times 1$, 后侧支 $\times 0.5$; 右冠近、中、远段和后降支均 $\times 1$, 每例患者冠状动脉病变程度的最终积分为各分支积分之和。

1.4 MCP-1 基因多态性检测

(1) 基因组 DNA 的制备。抽取研究对象外周冻存静脉血, 严格按照 DNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司, 北京) 说明书操作。(2) 基因组 DNA 的扩增、酶切。目的基因片段 PCR 扩增引物序列^[3]: 上游引物: 5'-CCGAG-ATGTTCCCAGCACAG-3', 下游引物: 5'-CTGCTT-TGTTTGTGCTCTT-3'。反应体系为 25 μl , 其中模板 DNA 200 ng, dNTPs 600 $\mu\text{mol/L}$, 引物各 10 μmol , Taq 酶 0.7 U, 10 $\times$ Buffer 2 μl , 适量的灭菌 ddH₂O。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min, 然后按 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5min, 重复 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。应用限制性内切酶 Pvu II 对 PCR 扩增产物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行酶切 1h。取 6 μl 酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 以 1000bpMarker 为参照, 紫外灯下观察、拍照并分析其结果。

1.5 采用 ELISA 法测定 MCP-1 水平

试剂盒购自大连泛邦生物工程有限公司, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理

应用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较用单因素方差分析 (ANOVA) 法; MCP-1-2518G/A 多态性分布及等位基因频率采用 χ^2 检验, 用多元逐步回归分析法分析冠脉病变 Gensini 评分与各危险因素的关系。

2 结果

2.1 MCP-1 基因多态性分析

GG 纯合子酶切为 708 bp 和 222 bp 两种片段; AG 杂合子酶切后为 930 bp、708 bp 和 222 bp 三种片段; 若为 AA 纯合子则因无酶切位点而仅显示 930bp 一种片段 (图 1)。

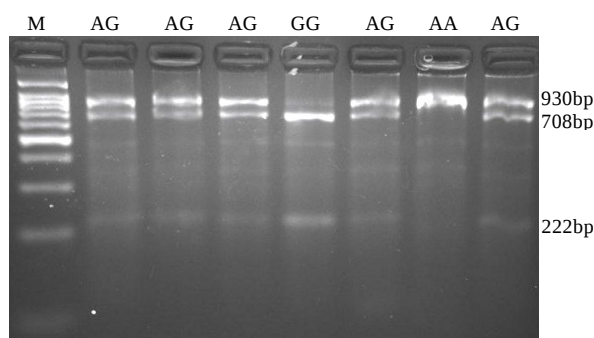


图 1 MCP-1 2518 位点 Pvu II 酶切图

Figure 1 Digestion of MCP-1 2518 with Pvu II

2.2 MCP-1 基因多态及等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律

表 1 结果表明, 各组间基因类型、等位基因频率不同, ACS 组 GG 明显高于 SAP 及对照组(33.4% vs 24.2%, 33.4% vs 15.0%, $P < 0.05$), AA 型基因 ACS 组较 SAP 组及正常对照组降低(31.1% vs 43.3%, 31.1% vs 51.7%, $P < 0.05$), AG 型基因三组间无统计学差异($P > 0.05$); ACS 组 G 等位基因频率高于 SAP 组及对照组(51.1% vs 40.4%, 51.1% vs 31.7%, $P < 0.05$), ACS 组 A 等位基因频率分布较 SAP 组及正常对照组降低(48.9% vs 59.6%, 48.9% vs 68.3%, $P < 0.05$)。

表 1 各组基因型及等位基因频率分布

Table 1 Distribution frequency of genotype and allele in every groups

组别	AA [n(%)]	AG [n(%)]	GG[n(%)]	A allele(%)	G allele(%)
对照组	31 (51.7)	20 (33.3)	9 (15.0)	68.3	31.7
SAP	52 (43.3)	39 (32.5)	29 (24.2)	59.6	40.4
ACS	56 (31.1)*	64 (35.5)	60 (33.4)*	48.9*	51.1*

注: SAP: 稳定型心绞痛; ACS: 急性冠脉综合征。与 SAP 和对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 MCP-1 各型基因 MCP-1 浓度比较

AA 型、AG 型 GG 型依次升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 MCP-1 各型基因间 MCP-1 浓度比较

Table 2 MCP-1 concentration in every genotype ($\bar{x} \pm s$)

基因型	MCP-1 (ng/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	FBG (mmol/L)
AA	124 ± 15	2.58 ± 0.25	1.37 ± 0.35	5.5 ± 0.5
AG	136 ± 18*	2.57 ± 0.36	1.32 ± 0.24	5.8 ± 2.0
GG	153 ± 22*#	2.62 ± 0.35	1.35 ± 0.18	6.0 ± 2.2*

注: MCP-1: 单核细胞趋化蛋白-1; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; FBG: 空腹血糖。与 AA 基因型比较, * $P < 0.05$; 与 AG 基因型比较, # $P < 0.05$

2.4 MCP-1-2518G/A 基因多态与冠状动脉病变 Gensini 评分多元回归分析

以冠状动脉病变 Gensini 评分为应变量, 以各危险因素为自变量进行多元逐步回归分析, 有四个

因素进入回归方程, 依次为 HDL-C、LDL-C、空腹血糖、MCP-1 基因类型, 结果示冠状动脉病变 Gensini 评分与 LDL-C、空腹血糖、MCP-1 基因类型成正相关, 冠状动脉病变 Gensini 评分与 HDL-C 呈负相关, 详见表 3。

表 3 冠状动脉病变 Gensini 评分影响因素的多元回归分析

Table 3 The multiple regression analysis of risk factors of Gensini score of coronary artery lesions

变量	B	SB	t	P
基因多态	11.47	0.35	5.73	< 0.001
FBG	3.61	0.24	4.17	< 0.001
LDL-C	13.71	0.18	3.20	0.002
HDL-C	- 31.87	- 0.27	- 4.41	< 0.001

注: FBG: 空腹血糖; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇

3 讨论

冠心病的发病是一个多因素参与、多种细胞因子相互调控形成的复杂炎症反应导致的冠状动脉狭窄病变或斑块破裂引起的急性冠状动脉事件。其病变过程不仅受到外在生活方式、环境因素等的影响, 同时还与自身遗传等内在因素密切相关, 众多研究显示基因多态性是参与冠心病发病的一个遗传因素, 近期发现 MCP-1-2518G/A 位点基因多态性与冠心病密切相关, Szalai 等^[4]研究 318 例冠心病患者得出 -2518G/A 的变异可能为冠心病易感发病的遗传危险因素。McDerotte 等^[5]也发现了该位点基因多态性与缺血性心脏病相关。Jemaa 等^[6]研究提示 MCP-1 基因-2518G/A 多态性与心肌梗死相关。我们对行冠状动脉造影 300 例冠心病患者和 60 例患者采用 PCR-RFLP 方法检测 MCP-1-2518G/A 位点多态性, 我们的研究显示, MCP-1-2518G/A 基因多态性 GG 型基因 ACS 组(33.4%)较 SAP 组(24.2%)及正常对照组(15.0%)升高; ACS 组 G 等位基因频率分布(51.1%)较 SAP 组(40.4%)及正常对照组(31.7%)升高, 经 χ^2 检验, $P < 0.05$ 。AA 型基因 ACS 组(31.1%)较 SAP 组(43.3%)及正常对照组(51.7%)降低; ACS 组 A 等位基因频率分布(48.9%)较 SAP 组(59.6%)及正常对照组(68.3%)降低, 经 χ^2 检验, $P < 0.05$ 。据此, 我们认为 GG 型基因及 G 型等位基因与冠心病的炎症反应严重程度相关, GG 型基因及 G 型等位基因在冠心病尤其是 ACS 易损斑块炎症反应中发挥重要作用。

多元回归分析 MCP-1-2518G/A 基因多态性与冠状动脉病变 Gensini 评分相关性显示, MCP-1-2518G/A 基因多态性与冠状动脉粥样硬化的狭窄程度呈正相关, 提示 MCP-1 及其-2518G/A 基因多态性与冠心病炎症反应严重程度相关。

MCP-1-2518G/A 基因多态性参与冠心病发病的机制未见报道, 我们认为 MCP-1-2518G/A 位点位于 MCP-1 启动子区域, MCP-1-2518G/A 基因多态性为功能性的, 因此该位点基因的多态性可能通过参与 MCP-1 基因转录水平的调控参与冠心病的发病。在 MCP-1 的近端调控区存在 GC 盒子, -2518G/A 位点位于 MCP-1 启动子近端调控区, 我们认为 MCP-1 基因-2518G/A 位点的基因多态性将决定 MCP-1 基因启动子 GC 盒, G 等位基因形成 MCP-1 启动子区域 GC 盒, A 等位基因则不能形成 MCP-1 启动子区域 GC 盒。而 GC 盒是在 MCP-1 启动子近端调控区上特异结合反式作用因子刺激蛋白 1 (stimulatory protein 1, SP1) 增强转录的结合位点。SP1 是一种强有力的核转录激活因子^[7,8], 细胞内丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是 SP-1 上游信号分子^[9,10]。MAPK/SP-1 通过 GC 盒子结合 MCP-1 基因激活转录表达 MCP-1 趋化因子。我们分别对 MCP-1 基因-2518G/A 位点产生的三种类型 GG 型较 AG 型及 AA 型的患者进行 MCP-1 浓度测定, 结果显示 GG 型较 AG 型及 AA 型升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义, 结果与预想相一致。

综上所述, MCP-1-2518G/A 基因多态性与冠心病相关, 其可能通过增强 MCP-1 转录表达参与冠心病发病。

【参考文献】

- [1] Kusano KF, Nakamura K, Kusano H, *et al.* Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis [J]. *Circ J*, 2004, 68(7): 671-676.
- [2] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease [J]. *Am J Cardiol*, 1983, 51(3): 606.
- [3] Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259(2): 344-348.
- [4] Szalai C, Duba J, Prohasakl Z, *et al.* Involvement of polymorphisms, in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease(CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-12518 G/A genotype in CAD patients [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 158(1): 233-239.
- [5] McDerotte DH, Yang Q, Kathiresan S, *et al.* CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study [J]. *Circulation*, 2005, 112(8): 1113-1120.
- [6] Jemaa R, Rojbani H, Kallel A, *et al.* Association between the -2518 G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 390 (1-2): 122-125.
- [7] Suske G. The Sp-family of transcription factors [J]. *Gene*, 1999, 238(2): 291-300.
- [8] Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, *et al.* The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer binding protein Sp1 [J]. *Nature*, 1999, 397(6718): 446-450.
- [9] Kao YS, Fong JC. Endothelin-1 induces glut1 transcription through enhanced interaction between Sp1 and NF-kappaB transcription factors [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(4): 771-778.
- [10] Zu L, He J, Jiang H. *et al.* Bacterial endotoxin stimulates adipose Lipolysis via toll-like Receptor4 and extracellular signal-regulated kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(9): 5915-5926.

(编辑: 周宇红)