

冠心病与白细胞介素 6 基因-572C/G 多态性的相关性

付海霞¹, 李庚山¹, 李 艳², 张平安², 许家琰¹, 李建军¹, 夏 冷¹

(武汉大学人民医院 1. 心内科, 2. 检验科; 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 内科学; 冠状动脉疾病与遗传因素相关; 聚合酶链反应—限制片段长度多态性; 冠心病; 白细胞介素 6; 基因多态性; 基因型; 等位基因

[摘要] 为了解冠心病与白细胞介素 6 基因-572C/G 多态的相关关系, 应用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性分析方法测定了 139 例冠心病患者和 168 例正常对照者的白细胞介素 6 基因-572C/G 多态性, 并结合疾病临床谱、冠状动脉造影结果探讨了其与冠心病的相关关系。结果发现, -572C/G 基因型和等位基因频率在两组间存在明显差异, 冠心病组 GG 基因型和 G 等位基因频率均显著高于对照组 ($P < 0.01$); 相对于 CC 基因型, 暴露于 CG 基因型、GG 基因型的相对危险度分别为 1.37 (95% CI: 0.86~2.20, $P > 0.05$) 和 2.85 (95% CI: 1.32~6.13, $P < 0.01$), 校正了血压、血糖和血脂等传统危险因素的影响后, GG 基因型的相对危险度 (95% CI: 1.22~6.65, $P < 0.05$) 仍然具有统计学意义; 但-572C/G 多态性在稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛、心肌梗死患者间以及在单支病变组、双支病变组、三支病变组间的分布均无明显差异 ($P > 0.05$)。结果提示, 白细胞介素 6 基因-572GG 基因型可能是中国汉族人群冠心病发病的易感基因之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship between Interleukin-6 Gene - 572C/G Polymorphism and Coronary Heart Disease

FU Hai Xia¹, LI Geng-Shang¹, LI Yan², ZHANG Ping-An², XU Jia-Li¹, LI Jian-Jun¹, and XIA Ling¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Interleukin-6; Gene Polymorphisms; Genotype; Alleles; Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To study the association of interleukin-6 (IL-6) gene - 572C/G polymorphism with coronary heart disease (CHD). **Methods** IL-6/-572C/G polymorphism was examined in 139 CHD patients and 168 healthy adults by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. **Results** -572CC, CG and GG genotype frequencies were 51.80%, 40.29% and 7.91% in CHD group, 63.10%, 35.71% and 1.19% in control group respectively. -572 G and C allele frequencies were 28.06%, 71.94% and 19.05%, 81.95% in two groups respectively. GG genotype and G allele were more frequent in patients than in controls ($P < 0.01$). Compared with CC genotype, relative risk (RR) for CHD were 1.37 (95% CI: 0.86~2.20, $P > 0.05$) for CG genotype and 2.85 (95% CI: 1.32~6.13, $P < 0.01$) for GG genotype. After adjusting for classical risk factors, the effect of GG genotype remained statistically significant (RR= 2.85, 95% CI: 1.22~6.65, $P < 0.05$). But the distribution of IL-6/-572C/G polymorphism had no significant difference among patients with stable angina, unstable angina and myocardial infarction, among patients with single vessel, two vessel and three vessel lesions too ($P > 0.05$). **Conclusions** IL-6/-572C/G polymorphism was associated with susceptibility to CHD and GG genotypes might be a risk factor for CHD in Chinese Hans population.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种炎症性疾病^[1]。白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是参与炎症反应、免疫反应的重要介质, 可通过复杂的细胞因子网络促进 As 的发生和发展, 其基因是冠心病发病的重要候选基因之一。本研究就 IL-6 基因启动子区-572C/G 多态性与冠心病的关系进行研究。

[收稿日期] 2003-03-02

[修回日期] 2003-08-04

[作者简介] 付海霞, 女, 1973 年出生, 河南省安阳市人, 博士研究生, 研究方向为冠心病的发病机制。E-mail: fuxiami@yeah.net。李庚山, 男, 1932 年出生, 湖北省云梦县人, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病。李艳, 女, 1961 年出生, 湖北省云梦县人, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为细胞因子与冠心病。

1 对象与方法

1.1 研究对象

各组受检者均为无血缘关系的中国汉族人。冠心病组 139 例, 其中男性 105 例, 女性 34 例, 年龄 62.61 ± 10.35 岁。冠心病以 1979 年世界卫生组织确定的诊断标准为依据, 其中 94 例患者行选择性冠状动脉造影 (selective coronary angiography, SCA) 证实, 以管腔直径狭窄 $\geq 50\%$ 为有意义的病变。对照组为年龄、性别与冠心病组相匹配的健康人群 168 例, 其中男性 116 例, 女性 52 例, 年龄 60.54 ± 14.38 岁。

1.2 基因组 DNA 的抽提

取外周静脉血 2 mL, 采用改良碘化钠法提取人白细胞基因组 DNA。

1.3 白细胞介素 6 基因-572C/G 多态性的检测

参照文献[2]采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 基因分析方法。正义引物 5'-GGAGACGCCTTGAAGTAACTGC-3', 反义引物 5'-GAGTTTCCTCTGACTCCATCGCAG-3' (大连宝生物工程有限公司合成)。产物片段为 163 bp, 应用 Mbi I 限制性内切酶 (MBI Fermentas 公司) 进行酶切, -572G 等位基因含有酶切位点。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定酶切产物。

1.4 统计学方法

基因型与等位基因频率采用频率计数法计算, 研究对象基因型与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、组间及不同性别人群基因型与等位基因频率的比较均采用 χ^2 检验, 不同等位基因型间临床一般特征的比较采用 t 检验, 相对危险度 (relative risk, RR) 采用 Logistic 回归分析计算。

2 结果

2.1 冠心病患者的一般临床特征

平均体重指数为 $(23.96 \pm 2.12) \text{ kg/m}^2$, 吸烟者 58 例, 合并高血压、糖尿病、血脂异常者分别为 85、22 及 67 例。稳定型心绞痛 (stable angina, SA) 25 例,

不稳定型心绞痛 (unstable angina, UA) 70 例, 心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 44 例。行 SCA 而资料又保存完整的 83 例患者中 (另 11 例 SCA 患者为复诊患者, 既往 SCA 结果记录不详), 单支病变 32 例, 双支病变 28 例, 三支病变 23 例。

2.2 白细胞介素 6 基因-572C/G 多态性在冠心病组和对照组人群中的分布与比较

IL-6 基因-572 位点有三种基因型: -572 CC 基因型不含酶切位点, 酶切后仅有一条 163 bp 的片段; -572 GG 基因型含有酶切位点, 可被完全酶切为 101 bp 和 62 bp 两条片段; -572 CG 基因型产生不完全酶切, 酶切后产生 163 bp、101 bp 和 62 bp 三条片段 (图 1, Figure 1)。两组人群中-572 位点均存在 CC、CG、GG 三种基因型, GG 基因型最少见, 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡, 无性别差异。冠心病组 GG 基因型、G 等位基因频率均显著高于对照组, 而 CC 基因型、C 等位基因频率均明显低于对照组 ($P < 0.01$)。冠心病合并高血压、糖尿病和血脂异常与未合并高血压、糖尿病和血脂异常间基因型与等位基因频率分布无显著差异 (表 1, Table 1)。以 CC 基因型为参照, 暴露于 CG、GG 基因型的 RR 值分别为 1.37 (95% CI: 0.86~2.20, $P > 0.05$) 和 2.85 (95% CI: 1.32~6.13, $P < 0.01$), 校正了血压、血糖和血脂等冠心病传统危险因素的影响后, GG 基因型患冠心病的 RR 值为 2.85 (95% CI: 1.22~6.65, $P < 0.05$), 仍然具有统计学意义。

表 1. 冠心病组与对照组-572C/G 多态性的分布

Table 1. The distribution of -572 C/G polymorphism in CHD patients and controls

分 组	n	基因型 [例 (%)]			等位基因频率 (%)	
		CC	CG	GG	C	G
冠心病组	139	72 (51.80) ^a	56 (40.29)	11 (7.91) ^a	71.94 ^a	28.06 ^a
男性	105	56 (53.33)	43 (40.95)	6 (5.72)	73.81	26.19
女性	34	16 (47.06)	13 (38.24)	5 (14.70)	66.18	33.82
合并高血压	85	48 (57.47)	29 (34.12)	8 (9.41)	73.53	26.47
未合并高血压	54	24 (44.44)	27 (50.00)	3 (5.55)	69.44	30.55
合并糖尿病	22	9 (40.91)	10 (45.45)	3 (13.64)	63.64	36.36
未合并糖尿病	117	63 (53.84)	46 (39.32)	8 (6.84)	73.50	26.50
合并血脂异常	67	33 (49.25)	29 (43.29)	5 (7.46)	70.90	29.10
未合并血脂异常	72	39 (54.17)	27 (37.50)	6 (8.33)	72.92	27.08
对照组	168	106 (63.10)	60 (35.71)	2 (1.19)	81.95	19.05
男性	116	75 (64.66)	40 (34.48)	1 (0.86)	81.90	18.10
女性	52	31 (59.62)	20 (38.46)	1 (1.92)	78.85	21.15

a: $P < 0.01$, 与对照组间基因型比较。

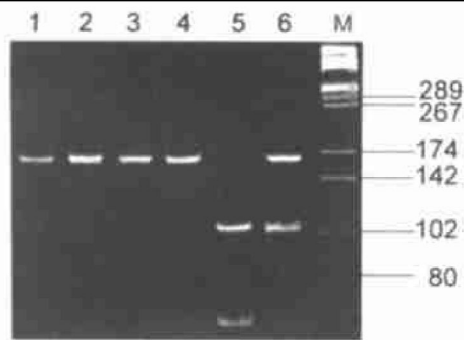


图 1. 白细胞介素 6 基因- 572 位点基因型图谱 1-4: CC 基因型; 5: GG 基因型; 6: CG 基因型; M: pGEM-3Zf(+)/Hae Ⅲ markers。

Figure 1. IL-6/ - 572 genotypes

2.3 冠心病临床谱及冠状动脉病变支数与- 572C/G 多态性的关系

据临床表现将冠心病患者分为 SA 组、UA 组和 MI 组, - 572C/G 基因型在各组间的分布无统计学差异。将 SCA 资料保存完整的 83 例患者分为单支病变组、双支病变组和三支病变组, - 572C/G 基因型在三组间的分布亦无统计学差异(表 2, Table 2)。

表 2. 冠心病临床谱及冠状动脉病变支数与- 572C/G 基因型的关系 [例 (%)]

Table 2. Relationship between CHD clinical types or the vessel number with lesion and - 572C/ G genotypes

分 组	n	CC 基因型	CG 基因型	GG 基因型
稳定型心绞痛组	25	12 (48.00)	10 (40.00)	3 (12.00)
不稳定型心绞痛组	70	34 (48.57)	32 (45.72)	4 (5.71)
心肌梗死组	44	26 (59.09)	14 (31.82)	4 (9.09)
单支病变组	32	15 (46.88)	12 (37.50)	5 (15.62)
双支病变组	28	15 (53.57)	13 (46.43)	0 (0.00)
三支病变组	23	10 (43.48)	10 (43.48)	3 (13.04)

2.4 冠心病危险因素与- 572C/G 多态性的关系

对照组 GG+ CG 基因型与 CC 基因型相比仅血小板计数存在差异($P < 0.05$), 而体重指数、收缩压、舒张压、血糖、总胆固醇、甘油三酯和白细胞计数水平均无明显差异(表 3, Table 3)。

3 讨论

炎症是冠心病发病的重要机制之一, 炎症因子

表 3. - 572C/G 基因型与对照组人群临床特征的关系比较

Table 3. Comparison of clinical characters between - 572C/ G genotypes in control groups

指 标	CC 基因型	GG+ CG 基因型
体重指数 (kg/m^2)	23.12 $\pm$ 2.31	23.21 $\pm$ 2.17
收缩压 (mm Hg)	121.51 $\pm$ 17.01	122.43 $\pm$ 16.75
舒张压 (mm Hg)	80.04 $\pm$ 9.00	80.29 $\pm$ 9.67
血糖 (mmol/L)	5.01 $\pm$ 0.38	5.05 $\pm$ 0.38
总胆固醇 (mmol/L)	4.49 $\pm$ 0.49	4.39 $\pm$ 0.53
甘油三酯 (mmol/L)	1.12 $\pm$ 0.37	1.21 $\pm$ 0.40
白细胞 ($\times 10^9/\text{L}$)	5.97 $\pm$ 1.11	5.87 $\pm$ 1.02
血小板 ($\times 10^9/\text{L}$)	182.41 $\pm$ 45.40	187.30 $\pm$ 59.75 ^a

a: $P < 0.05$, 与 CC 基因型相比。

基因表达水平的差异可能与人群对冠心病的易感性有关。IL-6 系迄今发现的功能最为广泛的炎性细胞因子之一, 是肝急性期反应蛋白 -C- 反应蛋白(C-reactive protein, CRP) 产生的主要介质, 在冠心病发生发展过程中的作用可能比 CRP 更重要。CRP 又可反过来促进单核细胞合成 IL-6^[3], 这样在二者间形成级联放大效应, 共同参与 As 和冠心病的发生与发展。血浆 IL-6 水平不仅可预测健康人群将来患 MI 的危险度, 而且与冠心病的预后有关。人 IL-6 基因位于第 7 号染色体, 全长 5 kb, 含四个内含子、五个外显子, 通过对其编码区及上、下游序列的研究发现, 该基因的多态性主要为存在启动子区的 - 597G/A、- 572C/G、- 174G/C 及 - 373A_nT_n^[4]。理论上, IL-6 基因启动子区的任何多态性都有可能改变基因的结合序列, 增强或减弱基因的表达调控与表达水平, 从而与人群对冠心病的易感性有关。

本研究结果发现国人中 - 572 位点存在 CC、CG、GG 三种基因型, GG 基因型为少见基因型, G 等位基因为稀有基因, 这与日本人群的报道相似^[5], 但明显不同于欧美人群^[2,6], 提示 IL-6 基因 - 572C/G 多态性存在种族差异; GG 基因型、G 等位基因在健康人群和冠心病人群中的分布频率分别为 1.19%、7.91% 和 19.05%、28.06%, 冠心病患者 GG 基因型、G 等位基因频率均显著高于对照组($P < 0.01$), 以 CC 基因型为参照, CG 基因型患冠心病的 RR 值为 1.37, 无统计学意义($P > 0.05$), GG 基因型的 RR 值为 2.85, 具有统计学意义($P < 0.01$), 且在校正血压、血糖和血脂等冠心病传统危险因素的影响后, 这种意义仍然存在($P < 0.05$), 提示国人中冠心病与 IL-6 基因 - 572C/G 多态性存在相关性, GG 基因型可能是冠心病发生的易感因素之一, 这可能有助于

解释一些无冠心病传统危险因素的人群延缓冠心病的原因。不过在研究中发现冠心病临床谱及冠状动脉病变支数与-572C/G多态性无关($P > 0.05$)。本研究结果与Humphries等^[2]及Georges等^[6]的研究不同,这两位学者发现-572C/G多态性同欧美人群冠心病的发病无关。结论不一致的可能原因有: -572C/G多态性存在种族差异,国人-572位点多态性频率明显不同于欧美人群($P < 0.001$),后者GG基因型最常见,G等位基因为常见基因,频率在95.00%左右^[2,6]; ④-174G/C多态性是IL-6基因多态性研究的热点,目前陆续有该位点多态性与As的危险因素^[2,7-10]、As^[11]以及冠心病危险性^[2,6]的报道,但国人中IL-6基因-174位点几乎均为GG基因型^[12,13],明显不同于欧美人群,这种种族间的遗传背景差异有可能招致同一种突变在不同人群产生不同的表型效应。

-572C/G多态性影响冠心病发生的可能机制尚不明确。它不影响IL-6基因启动子区现已知的任何DNA结合序列,不过Ota等^[5]认为不排除-572C/G多态性通过未知的DNA结合序列或DNA二级结构影响IL-6基因的表达调控的可能,但尚需-572C/G多态性的功能性研究加以证实。IL-6可增加血液粘滞度水平,减低血管顺应性,间接收缩血管;增加葡萄糖摄取,降低胰岛素敏感性;促进胆固醇合成,减少胆固醇分泌;促进白细胞聚集、血小板生成和粘附;损害血管内皮功能,促进血管平滑肌细胞增殖^[14,15]。但本研究中仅发现健康人群中-572G等位基因携带者(GG+CG基因型)外周血血小板数量明显高于CC基因型人群($P < 0.05$),而IL-6基因-572C/G多态性与血压、血糖和血脂等冠心病的传统危险因素均无关,但这一结论需待更大样本的研究以及更为特定的研究人群加以证实。

综上所述,我们在中国汉族人群中首次报道了冠心病患者IL-6基因的多态性,发现IL-6基因-572C/G多态性与冠心病的发生相关,GG基因型可能是冠心病发病的易感因素之一。若确如此,则有

望在人群中通过筛查IL-6基因型来发现部分冠心病易感人群,并给予早期防治和个性化治疗。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammation disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Havel E, Miller E. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J*, 2001, **22** (24): 2243-2252
- [3] 陈学军, 李建军, 夏 玲, 王晶, 李庚山. 辛伐他汀对C反应蛋白和脂多糖诱导的单核细胞合成白细胞介素6的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 139-142
- [4] Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Bio Chem*, 2000, **275** (24): 18 138-144
- [5] Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, et al. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin 6 gene associated with decreased bone mineral density. *J Hum Genet*, 2001, **46** (5): 267-272
- [6] Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. *J Mol Med*, 2001, **79** (5-6): 300-305
- [7] Fernandez JM, Broch M, Vendrell, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85** (3): 1 334-339
- [8] Fernandez JM, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Pugeat M, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2000, **49** (3): 517-520
- [9] Brull DJ, Lesson CP, Montgomery HE, Mullen M, DeDivitiis M, Humphries SE, et al. Effect of the Interleukin-6 -174G>C promoter gene polymorphism on endothelial function in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest*, 2002, **32** (3): 153-157
- [10] Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, et al. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc*, 2002, **53** (4): 1 029-034
- [11] Rundek T, Elkind MS, Pittman J, Boder-Albala B, Marti S, Steve EB, et al. Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6, and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study. *Stroke*, 2002, **33** (5): 1 420-423
- [12] 田野, 马威然, 张玉海. 细胞因子基因型多态性对肾移植效果的影响. *中华医学杂志*, 2001, **81** (12): 719-721
- [13] Zhai R, Liu G, Yang C, Wu C, Christiani DC. The G to C polymorphism at -174 of the interleukin-6 gene is rare in a Southern Chinese population. *Pharmacogenetics*, 2001, **11** (8): 699-701
- [14] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*, 2000, **148** (2): 267-272
- [15] 潘晓宏, 单 江, 罗建红. 碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素6促进大鼠血管平滑肌细胞增殖的协同作用. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 233-236

(此文编辑 文玉珊)