

白细胞介素 6 基因启动子-634C/G 多态性与冠心病的关联

黄 荣,潘 闽,蔡星星,顾周山,苏亚民,朱健华*

(南通大学附属医院心内科,江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:探讨白细胞介素(interleukin 1,IL)-6 基因启动子-634C/G 多态性与冠心病的相关性。方法:纳入 86 例冠心病及 91 例对照组患者,检测相关生化指标,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测两组患者 IL-6 基因型,酶联免疫吸附(ELISA)法检测 IL-6 血清水平。比较两组间基因型、等位基因频率以及不同基因型对血清 IL-6 水平的影响。结果:冠心病组与对照组间年龄、性别、吸烟史、高血压病史及相关生化指标未见统计学差异($P > 0.05$),冠心病组外周血 IL-6 水平明显高于对照组[(26.57 ± 6.68)ng/L vs. (6.89 ± 2.32)ng/L, $P < 0.05$],IL-6 基因启动子-634C/G 3 种基因型(CC,CG,GG)在冠心病组中的频率为 57%、29%、14%,在对照组中的频率为 65.9%、31.9%、2.2%,两组间基因型频率存在统计学差异($P < 0.05$)。冠心病组中 IL-6 基因启动子位点 G 等位基因携带者(GG,CG 基因型)血清 IL-6 水平高于不携带者[(34.575 ± 6.618)ng/L vs. (16.758 ± 5.182)ng/L, $P < 0.05$]。结论:IL-6 基因启动子 634C/G 基因多态性与冠心病相关,其中 G 等位基因携带者外周血 IL-6 水平显著增高。

[关键词] 白细胞介素 6;冠心病;基因多态性

[中图分类号] R541.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1557-04

doi:10.7655/NYDXBNS20151112

Association between interleukin-6 promotor-634C/G polymorphism and coronary artery disease

Huang Rong, Pan Min, Cai Xingxing, Gu Zhoushan, Su Yamin, Zhu Jianhua*

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the association of-634C/G polymorphism of interleukin-6(IL-6) gene with coronary artery disease (CAD). **Methods:** A total of 86 CAD patients and 91 healthy controls were selected for this study. The PCR-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was performed to assess the genotypes frequencies. The concentration of serum IL-6 was measured with ELISA. The relations of the levels of serum IL-6 between groups were analyzed. **Results:** The circulating IL-6 levels in the CAD group[(26.57 ± 6.68) ng/L] were significantly higher than those in the control group[(6.89 ± 2.32) ng/L, $P < 0.05$]. The distribution of the IL-6 -634C/G genotypes(CC,CG, and GG) was 65.9%,31.9% and 2.2% in the controls, and 57%, 29% and 14% in the CAD group, respectively($P < 0.05$). Compared with the wild type CC, the G allele carriers(CG+GG genotypes) had higher circulating IL-6 levels[(34.575 ± 6.618)ng/L vs. (16.758 ± 5.182)ng/L, $P < 0.05$] in the CAD group. **Conclusion:** These findings suggest that IL-6 -634C/G polymorphism is associated with CAD and the G allele carriers have increased circulating IL-6 levels.

[Keywords] interleukin-6; coronary artery disease; genetic polymorphism

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1557-1560]

在冠状动脉粥样硬化的过程中,炎症因子扮演着重要角色。既往研究表明在冠心病患者中白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、IL-10、C 反应蛋白等炎症因子的表达明显升高,并与冠状动脉病变的严重程度密切相关^[1]。IL-6 作为一种前炎症细胞因子,主

要由单核-巨噬细胞系统分泌,具有诱导免疫和诱发炎症的作用,在炎症中起着核心调控作用,参与动脉粥样硬化的形成和发展。有试验表明 IL-6 血浆水平的升高与冠心病的发展及其严重程度密切相关^[2],评估血浆 IL-6 浓度的变化可能帮助预测冠心病的发生^[3]。

IL-6 的基因定位于人类 7 号染色体短臂 2 区 1 带,其中包含 5 个外显子和 4 个内含子。IL-6 基因

[基金项目] 南通市临床医学专项资助(HS2013069)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:hrseu1988@163.com

转录和表达水平的个体差异很大,这是由于环境及遗传等多种因素共同作用决定的。其中 IL-6 基因多态性被认为是影响 IL-6 表达的重要遗传因素。IL-6 基因的启动子存在多个单核苷酸多态性,包括-174、-597、-634 等位点。目前已有部分研究证实 IL-6 基因多态性可能与冠心病发病风险相关,但结果仍然存在争议^[4-5]。我们既往研究发现,IL-6 启动子区-634 多态位点 G 等位基因携带者血浆 IL-6 水平显著增高,然而该多态位点与冠心病的相关性目前尚不清楚。本研究采用 PCR-RFLP 技术研究 IL-6 基因启动子-634C/G 多态性与冠心病的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

入选标准:研究对象均选自 2013 年 10 月—2014 年 6 月在南通大学附属医院内科住院患者,均已行选择性冠脉造影。排除标准:年龄>90 岁,严重肝肾功能不全,急性左心衰竭,急性肺水肿,发热及感染性疾病,恶性肿瘤,结缔组织病等。①冠心病组:86 例,男 46 例,女 40 例,平均年龄(63.5 ± 13.6)岁,全部病例均符合冠心病诊断标准,并经过冠脉造影证实 1 支或多支血管狭窄 $\geq 50\%$;②对照组:91 例,男 43 例,女 48 例,平均年龄(64.0 ± 14.6)岁,且冠状动脉造影示无冠心病或血管狭窄 $< 50\%$ 。记录两组患者体重、身高、吸烟史及高血压病史。两组一般资料比较无明显差异($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 生化指标检测

空腹 12 h 取静脉血 2 mL,用日立 7020 自动生化分析仪检测总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,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)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、肌酐等一系列生物化学指标。

1.2.2 基因型检测

所有研究对象在入院后第 2 天晨起空腹抽取静脉血各 2 mL,离心收集血清,保存于 -70°C 冰箱。取 EDTA- Na_2 抗凝外周静脉血,红细胞裂解液裂解后分离得到白细胞,改良 KI 法抽提 DNA,参照文献^[6]设计一对引物,P1:5'-GAGACGCCTTGAAG-TAACTG-3'和 P2:5'-AACCAAAGATGTTCTGAACT-GA-3'(上述引物均由上海生工生物工程股份有限

公司合成)。PCR 反应体系为 50 μL ,其中含模板 DNA 50~150 ng,200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP,引物各 0.45 $\mu\text{mol/L}$,TaqDNA 聚合酶 2 U。所用试剂均为北京天根生化科技有限公司产品。经 95°C 5 min 预变性; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min 共 35 个循环;最后 72°C 延伸 6 min。以上反应在 GeneAmp PCR system 2700(PE 公司,美国)基因扩增仪中完成。取 PCR 产物 10 μL 经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观察扩增结果,并结合 DNA 分子量标准判断其是否为目的片段,-634 位点片段为 180 bp。限制性酶切反应在 32 μL 体系中进行,含 PCR 反应产物 10 μL ,*Bsr*B I 限制性内切酶 2 U。 37°C 水浴中酶解 3 h,冰浴终止反应。取 5 μL 酶切产物上样,2% 琼脂糖凝胶电泳分析,以 DL2000 Marker 为标准分子量参照,1 \times TAE 缓冲液,电压为 100 V,电泳 50 min, BioRad 凝胶成像分析仪观察并拍照。

1.2.3 血清 IL-6 水平检测

采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定血清 IL-6 水平。其中 ELISA 试剂盒由苏州莱弗思公司提供,测定步骤按试剂盒要求进行。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,基因型和等位基因频率采用直接计数法。Hardy-Weinberg 平衡的偏差用 χ^2 检验,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析,计数资料以例数或百分率描述,采用 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料及 IL-6 水平比较

两组间性别、年龄、吸烟史、ALT、TC、TG、HDL-C、LDL-C、肌酐、体重指数(body mass index,BMI)和高血压等指标未见显著性差异($P > 0.05$)。冠心病组血清 IL-6 水平显著高于对照组($P < 0.05$,表 1)。

2.2 IL-6 基因启动子-634C/G 多态性的酶切分型

PCR 产物经限制性内切酶 *Bsr*B I 处理后,2% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示 CG 杂合子型有 180、120、60 bp 3 条带,CC 未突变型有 180 bp 1 个条带,GG 突变型有 120、60 bp 2 个条带(图 1)。

2.3 冠心病组与对照组 IL-6 基因多态性的比较

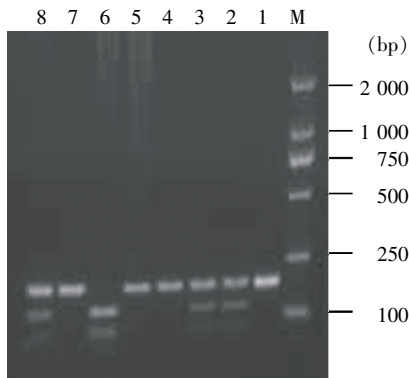
经 χ^2 检验,冠心病组与对照组达到 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),具群体代表性。IL-6 基因-634C/G 多态性在两组人群中的分布差异有统计学意义($\chi^2=8.415$, $P < 0.05$);等位基因频率在两组

表 1 两组一般资料及 IL-6 水平比较

Table 1 Comparison of general data and IL-6 level in CAD and control subjects

指标	冠心病组(n=86)	对照组(n=91)
性别(男/女)	46/40	43/48
年龄(岁)	63.50 ± 13.60	64.00 ± 14.56
吸烟(%)	65	52
ALT(U/L)	35.45 ± 17.23	26.54 ± 14.32
TC(mmol/L)	4.32 ± 1.31	3.89 ± 0.63
TG(mmol/L)	1.85 ± 1.70	1.15 ± 0.76
LDL-C(mmol/L)	2.75 ± 0.73	2.39 ± 0.49
HDL-C(mmol/L)	1.31 ± 0.39	1.64 ± 0.30
肌酐(mmol/L)	80.32 ± 27.53	75.20 ± 13.52
BMI(kg/m ²)	24.32 ± 3.50	24.53 ± 3.10
高血压(%)	65.11	49.45
IL-6(ng/L)	26.57 ± 6.68	6.89 ± 2.32*

与冠心病组比较, *P<0.05。



M:DL2000 DNA 分子标记;2,3,8:CC 杂合子型;1,4,5,7:CC 未突变型;6:GG 突变型。

图 1 IL-6 基因启动子-634C/G 酶切后电泳结果

Figure 1 Electrophoresis results of IL-6 -634C/G genotypes

表 2 两组 IL-6 基因启动子-634 C/G 基因型及等位基因频率分布的比较

Table 2 Distribution of the IL-6-634C/G genotypes and alleles in CAD and control subjects [n(%)]

组别	例数	-634C/G 基因型频率			等位基因频率	
		CC	CG	GG	C	G
冠心病组	86	49(57.0)	25(29.0)	12(14.0)	123(71.5)	49(28.5)
对照组	91	60(65.9)	29(31.9)	2(2.2)	149(81.9)	33(18.1)

可以影响冠心病的预后^[12]。

研究发现 IL-6 基因启动子区多态性是影响 IL-6 循环水平的重要遗传因素^[13-14],既往实验证明了其与多种心血管疾病密切相关^[15]。在常见的 3 种多态位点 -174C/G(rs1800795)、-634C/G(rs1800796)及 -597G/A(rs1800797)中,-174C/G 与 -597G/A 处于连锁不平衡。研究表明,在亚洲人群中,-174C/G 位点突变率很低,与传统心血管危险因素和心肌梗死无明确关系;而 -634C/G 位点变异较为常见,可能与冠心病的发生发展有关^[16]。近期研究分析了 245 例冠

人群中的分布差异也有统计学意义 ($\chi^2=5.329, P < 0.05$,表 2)。

2.4 冠心病组各基因型间血清 IL-6 水平的比较

冠心病组中 IL-6 基因-634 位点 G 等位基因携带者(GG,CG 基因型)血清 IL-6 水平高于非 G 等位基因携带者[(34.575 ± 6.618)ng/L vs.(16.758 ± 5.182)ng/L, $P < 0.05$]。

3 讨论

目前在我国,冠心病的发病率逐年增高,成为影响人群健康和社会公共卫生的主要疾病。而随着对冠心病发病机制的深入研究,炎症反应在整个冠心病发生发展过程中的重要作用受到关注^[2],同时,研究显示炎症因子表达可以影响冠心病发病的危险度和严重程度^[7]。部分炎症因子基因位点的突变有可能改变其免疫原性和功能,从而影响冠心病的发生发展。

目前研究表明,IL-6 作为一种重要的炎症性细胞因子,由单核/巨噬细胞、纤维母细胞、淋巴细胞、内皮细胞、成纤维细胞、肌细胞以及多种肿瘤细胞产生^[8]。可促进 T 细胞增殖,促使 B 细胞的分化,参与炎症反应和免疫反应。IL-6 能够激活内皮细胞,导致血管平滑肌细胞增殖^[9]。Steiner 等^[10]在鼠肺动脉高压模型中发现,IL-6 可能通过平滑肌细胞增殖与迁移最终导致血管重塑。研究表明在动脉粥样硬化血管中,IL-6 mRNA 的表达明显高于对照组^[11],证实了 IL-6 与冠心病的发生密切相关。同时 IL-6 循环水平

冠心病患者和 260 例健康人 IL-6 基因多态性,冠心病组 IL-6 启动子区-634C/G 的 G 等位基因频率高于对照组($P < 0.01$),而两组人群中 IL-6 启动子区 -597G/A 的基因型无统计学差异^[17]。有实验表明在冠心病患者中,-634G 等位基因携带者冠心病的相对风险度是-634C 等位基因携带者的近 1.5 倍^[14]。在 Brull 等^[18]的研究中,冠脉搭桥术后患者血清 IL-6 水平在 -634C 等位基因携带者中较 -174GG、-174C 等位基因携带者明显增高。本研究比较了冠心病组及对照组间基因型、等位基因频率以及对血清 IL-6 水

平的影响,结果表明冠心病组中 IL-6 基因-634 位点携带 G 等位基因的患者血清 IL-6 水平高于不携带者,证实了-634 位点 G 等位基因对外周血 IL-6 的表达有上调作用,可能与冠心病的发生发展存在相关性。此外,东亚人群的研究显示,IL-6 启动子区-634 位点 G 等位基因还可以上调外周血 C 反应蛋白,而 C 反应蛋白水平与冠心病密切相关^[19]。

目前 IL-6 基因多态性与冠心病的相关性及其机制研究结果还存在争议,可能与种族差异、病例选择标准、样本量有关,相信随着对 IL-6 基因多态性的深入研究,无论对于早期预测心血管疾病的发生、冠心病危险度分层、评估患者预后,还是评价药物治疗的效果方面,都具有十分重要的临床意义。

[参考文献]

- [1] 刘虹,徐庆科,夏伟,等. 冠心病与炎症因子IL-6、IL-8、IL-10、hs-CRP及TNF的相关性研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2011,19(9):1446-1447
- [2] Pan M,Gao SP,Jiang MH,et al. Interleukin 6 promoter polymorphisms in normal Han Chinese population: frequencies and effects on inflammatory markers[J]. J Investig Med,2011,59(2):272-276
- [3] Tang JN,Shen DL,Liu CL,et al. Plasma levels of C1q/TNF-related protein 1 and interleukin 6 in patients with acute coronary syndrome or stable angina pectoris [J]. Am J Med Sci,2015,349(2):130-136
- [4] Song C,Liu B,Yang D,et al. Association between interleukin-6 gene -572G>C polymorphism and coronary heart disease[J]. Cell Biochem Biophys,2015,71(1):359-365
- [5] Zheng GH,Chen HY,Xiong SQ. Polymorphisms of -174G>C and-572G>C in the interleukin 6(IL-6)gene and coronary heart disease risk;a meta-analysis of 27 research studies [J]. PLoS One,2012,7(4):e34839
- [6] 李艳,杨超,张平安,等. 白细胞介素6基因-174G/C和-634C/G多态性与冠心病的相关性研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(4):369-372
- [7] Kaptoge S,Seshasai SR,Gao P,et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease:new prospective study and updated meta-analysis[J]. Eur Heart J,2014,35(9):578-589
- [8] Cui Y,Zheng L,Jiang M,et al. Circulating microparticles in patients with coronary heart disease and its correlation with interleukin-6 and C-reactive protein[J]. Mol Biol Rep,2013,40(11):6437-6442
- [9] Lee GL,Chang YW,Wu JY,et al. TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2012,32(11):2751-2760
- [10] Steiner MK,Syrkina OL,Kolliputi N,et al. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension[J]. Circ Res,2009,104(2):236-244
- [11] Terry CF,Loukaci V,Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation[J]. J Biol Chem,2000,275(24):18138-18144
- [12] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. N Engl J Med,1999,340(2):115-126
- [13] Beckie TM,Beckstead JW,Groer MW. The association between variants on chromosome 9p21 and inflammatory biomarkers in ethnically diverse women with coronary heart disease;a pilot study[J]. Biol Res Nurs,2011,13(3):306-319
- [14] He Z,Tan Z,Sun Z,et al. Unchanged interleukin 6 level of protein and energy restricted goats during late gestation;the role of elevated blood nitric oxide[J]. J Endocrinol,2012,213(1):59-65
- [15] 郑金国,邓新桃,潘闽,等. 心房颤动与白细胞介素-6的关系[J]. 江苏大学学报,2010,20(5):425-427
- [16] Zheng GH,Chen HY,Xiong SQ. Polymorphisms of-174G>C and -572G>C in the interleukin 6(IL-6)gene and coronary heart disease risk;a meta-analysis of 27 research studies[J]. PLoS One,2012,7(4):e34839
- [17] 付海霞,李庚山,李艳,等. 白细胞介素-6基因多态性对冠心病发病易感性的影响及其机制[J]. 中华心血管病杂志,2006,34(6):519-522
- [18] Brull DJ,Montgomery HE,Sanders J,et al. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2001,21(9):1458-1463
- [19] Li J,Song J,Jiang MH,et al. Interleukin-6 promoter polymorphisms and susceptibility to atrial fibrillation in elderly han chinese patients with essential hypertension[J]. J Interferon Cytokine Res,2012,32(11):542-547

[收稿日期] 2015-05-29