

白细胞介素 1 受体拮抗剂基因内含子 2 可变串联重复序列多态性与冠心病的相关性

李艳¹, 徐朴¹, 张平安¹, 李晓艳², 黄从新²

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

[关键词] 内科学; 白细胞介素 1 受体拮抗剂基因多态性与冠心病相关; 受体拮抗剂, 白细胞介素; 基因多态性, 可变串联重复序列; 基因频率; 等位基因; 基因型; 冠状动脉疾病

[摘要] 探讨白细胞介素 1 受体拮抗剂基因内含子 2 可变串联重复序列多态性与血清白细胞介素 1 受体拮抗剂水平及冠心病的相关关系。运用聚合酶链反应的方法, 检测了 245 例冠心病患者和 236 例健康对照者白细胞介素 1 受体拮抗剂基因可变串联重复序列多态性, 并用酶联免疫吸附实验检测了血清白细胞介素 1 受体拮抗剂水平。结果发现该多态有 iv/ iv、iv/ ④、iv/ ⑤和 ④/ ⑤ 4 种基因型, 冠心病组 iv/ iv 型频率为 88.6%, iv/ ④型频率为 9.8%, iv/ ⑤型频率为 1.2%, ④/ ⑤型频率为 0.4%。对照组 iv/ iv 型频率为 80.1%, iv/ ④型频率为 16.9%, iv/ ⑤型频率为 2.1%, ④/ ⑤型频率为 0.9%, 且冠心病组携带 ④型等位基因的基因型频率显著低于对照组, 而在心肌梗死组和心绞痛组中的分布差异更为显著。冠心病组 ④型等位基因携带者血清白细胞介素 1 受体拮抗剂水平明显高于不携带者。研究表明白细胞介素 1 受体拮抗剂基因可变串联重复序列多态性可能影响个体血清白细胞介素 1 受体拮抗剂水平, 可能在冠心病的发展过程中具有保护作用。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Relationship between the Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism in Intron Two of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene and Coronary Heart Disease

LI Yan¹, XU Pu¹, ZHANG Ping-An¹, LI Xiao-Yan², and HUANG Cong-Xin²

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

[KEY WORDS] Coronary Disease; Gene Polymorphism; Interleukin 1 Receptor Antagonist

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship of variable number of tandem repeat(VNTR) polymorphism in intron 2 of interleukin 1 receptor antagonist(IL-1Ra) gene and serum IL-1Ra levels with coronary heart disease. **Methods** 245 coronary heart disease patients and 236 normal subjects were recruited in the study. Their VNTR polymorphisms of IL-1Ra gene were analyzed using polymerase chain reaction method and their serum IL-1Ra levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** There were four kinds of genotype: iv/ iv, iv/ ④, iv/ ⑤ and ④/ ⑤. The frequencies of the four genotypes were as follows: iv/ iv, 88.6%; iv/ ④, 9.8%; iv/ ⑤, 1.2%; ④/ ⑤, 0.4% in coronary heart disease patients and iv/ iv, 80.1%; iv/ ④, 16.9%; iv/ ⑤, 2.1%; ④/ ⑤, 0.9% in normal subjects, respectively. The frequency of allele ④ was significantly lower in coronary heart disease patients, than that in normal controls(5.3% and 9.3%, respectively), which is more significant in myocardial infarction patients and angina patients(4.3% and 15.6%, respectively). In coronary heart disease patients, the serum IL-1Ra levels in allele ④ carriers were significantly higher than in no allele ④ carriers. **Conclusion** The VNTR polymorphism of IL-1Ra gene may affect serum IL-1Ra levels, and may play a protective role in the development of coronary heart disease.

白细胞介素 1 (Interleukin 1, IL-1) 是一个重要的细胞因子, 具有广泛的生物学作用, 主要在炎症反应和免疫应答中起调节作用, 而 IL-1 受体拮抗剂

(Interleukin 1 receptor antagonist, IL-1Ra) 是 IL-1 家族的唯一一种天然拮抗剂, 其结构与 IL-1 非常相似, 可通过与 iv 型 IL-1 受体竞争结合而阻止 IL-1 效应的发挥^[1]。编码 IL-1Ra 的基因定位于人类染色体的 2q12-13 上, 在该基因的第 2 号内含子中存在可变串联重复序列(variable number of tandem repeat, VNTR) 多态性, 该多态性可能影响 IL-1Ra 的表达, 并与疾病的发生和发展密切相关^[2,3]。我们运用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR) 和酶联免疫吸附实验, 初步探讨了冠心病与 IL-1Ra 基因的第 2 号内含子中 VNTR 多态性的关系, 现报告结果。

[收稿日期] 2002-12-11

[修回日期] 2003-06-03

[作者简介] 李艳, 女, 1961 年 2 月出生, 湖北省武汉市人, 教授, 硕士研究生导师, 在读博士研究生, 主要从事感染与冠心病的研究, 现任武汉大学人民医院检验科主任。徐朴, 男, 1972 年 6 月出生, 湖北省随州市人, 武汉大学人民医院检验科在读硕士研究生, 现主要从事炎症因子与冠心病的研究。黄从新, 男, 1951 年 6 月出生, 湖北省汉川市人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病的研究, 现任武汉大学人民医院院长。李晓艳, 女, 1967 年 11 月出生, 湖北武汉市人。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

1.1.1 冠心病组 来自2000年10月至2003年2月武汉大学人民医院心内科病房或冠心病监护病房的患者245例,男183例,女62例,年龄40~85岁,平均 63.8 ± 10.9 岁,符合1979年WHO确定的诊断标准。

1.1.2 对照组 选自体格检查健康人群的随机个体236例,男性159例,女性77例,年龄40~82岁,平均 61.7 ± 13.1 岁,血常规、血脂及其他生物化学指标均在参考范围内,心电图检查正常,均排除肝脏、肾脏、内分泌和心脑血管疾病。所有研究对象均为汉族自然人群,且无血缘关系。

1.2 模板DNA的制备

抽取静脉血2 mL,用EDTA-K3抗凝;参照改良碘化钠法^[4],取EDTA-K3抗凝全血100 μ L加无菌双蒸水100 μ L混匀,加6 mol/L NaI 200 μ L旋涡震荡30 s,加等体积氯仿/异戊醇(24:1)旋涡震荡30 s,离心后取上清液加0.6倍体积异丙醇混匀,室温(或4℃)静置15 min,离心后沉淀以37%异丙醇(或70%乙醇)洗1次,晾干后溶于TE缓冲液中,所提DNA经紫外分光光度计定量后,置-70℃保存。

1.3 引物合成

参考文献[2]设计合成一对引物,扩增IL-1Ra基因第2号内含子中包含VNTR的一段序列。引物序列P1为5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3',P2为5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'(大连宝生物工程有限公司合成)。

1.4 聚合酶链反应

聚合酶链反应(PCR)总体积为25 μ L,其中包括基因组DNA约0.3 μ g,dNTP终浓度各100 μ mol/L,MgCl₂终浓度为1.5 μ mol/L,引物终浓度各约0.45 μ mol/L,TaqDNA聚合酶1 u,所有试剂均为Promega产品。PCR循环参数为95℃预变性5 min $\rightarrow$ 95℃变性1 min $\rightarrow$ 55℃复性1 min $\rightarrow$ 72℃延伸2 min,35个循环;72℃延伸5 min,4℃保存,以上反应均在GeneAmp PCR System 2700型(美国PE公司)基因扩增仪上完成。

1.5 扩增产物的检测及分析

聚合酶链反应(PCR)扩增产物采用2%琼脂糖凝胶电泳—溴化乙锭染色法检测,DNA标准物为DL2000(大连宝生物工程有限公司合成)。

1.6 血清白细胞介素1受体拮抗剂水平测定

清晨采集空腹不抗凝静脉血2 mL,室温静置约30 min,然后于室温3 000 r/min离心10 min,分离血清,-70℃保存。用酶联免疫吸附实验测定IL-1Ra血清水平,试剂盒购自美国Cytimmune公司,批号为CIA206-AQ702,严格按说明书操作;所用仪器为意大利SEAC型半自动免疫测定仪。

1.7 统计学处理

用频率计数法计算研究对象IL-1Ra基因第2号内含子中VNTR的基因型及等位基因频率,然后经Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验。病例组与对照组间各等位基因及基因型频率的比较用 χ^2 检验,并以比值比(OR)及其95%可信区间(CI)表示相对风险度。血清IL-1Ra水平以均数 $\pm$ 标准差表示,不同基因型间的比较用 t 检验。均以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 可变串联重复序列多态性检测结果

在IL-1Ra基因第2号内含子中存在VNTR多态性,其重复序列长86 bp,根据重复序列出现的次数,在人类的不同个体中发现五种等位基因:iv型等位基因(4个重复体,410 bp)、⑤型等位基因(2个重复体,240 bp)、⑥型等位基因(5个重复体,500 bp)、⑦型等位基因(3个重复体,325 bp)和⑧型等位基因(6个重复体,595 bp),其中⑥型、⑦型和⑧型等位基因的发生频率极低。用PCR的方法,我们在两组人群中共发现iv/iv、iv/⑤、⑤/⑤和iv/⑥四种基因型(图1, Figure 1)。

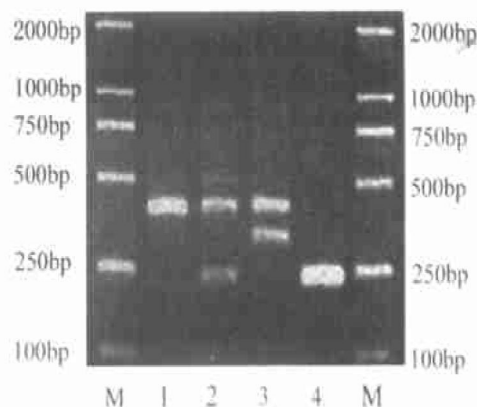


图1. 白细胞介素1受体拮抗剂基因可变重复序列多态性电泳结果 M为DL2000 DNA分子质量标记物,1为iv/iv基因型,2为iv/⑤基因型,3为⑥/⑥基因型,4为⑤/⑦基因型。

Figure 1. The electrophoresis conclusion of VNTR polymorphism in IL-1Ra gene

2.2 冠心病患者和健康对照者可变数串联重复序列多态性的分布

两组研究对象 VNTR 多态性的分布见表 1 (Table 1)。经 χ^2 检验, 该 VNTR 多态性的基因型及等位基因频率在两组人群中的分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 表明其基因频率已达到遗传平衡, 具有群体代表性。在两组人群中, 该 VNTR 多态性的基因型分布均以 iv/ iv 型最为常见, 其次为 iv/ ⑦型, ⑦ ⑦型和 iv/ ⑧型较为罕见, 未发现其他基因型; 其等位基因的分布以 iv 型最为常见, 其次为 ⑦型, ⑧型较为罕见, 未发现 ⑨型和 ⑩型等位基因。该 VNTR 多态性的基因型和等位基因型分布在两组人群的性别以及年龄之间均无显著性差异(数据未列出)。

2.3 可变数串联重复序列多态性与冠心病风险性的关系

在表 1(Table 1) 中我们发现, 不携带 ⑦型等位基因的基因型, 其患冠心病的相对风险度约是携带 ⑦型等位基因的 1.91 倍(OR= 1.91, 95% CI= 1.12~ 3.24), 这提示 ⑦型等位基因在冠心病的发生和发展过程中可能具有保护作用。

2.4 可变数串联重复序列多态性在冠心病分组后的比较

冠心病患者根据疾病状态分组后, 不携带 ⑦型等位基因和携带 ⑦型等位基因的基因型在心肌梗死组和心绞痛组中的分布差异存在显著性($\chi^2= 8.60$,

$P< 0.01$), 进一步计算其 OR 值发现, 不携带 ⑦型等位基因的基因型, 其患心肌梗死的相对风险度约是携带 ⑦型等位基因的 4.15 倍(OR= 4.15, 95% CI= 1.50~ 11.45; 表 2, Table 2)。根据选择性冠脉造影的结果分组后比较发现, IL-1Ra 基因第 2 号内含子中 VNTR 多态性在单支血管病变组和多支血管病变组中的分布差异无显著性($P> 0.50$; 表 3, Table 3)。

表 1. 白细胞介素 1 受体拮抗剂基因可变重复序列多态性的分布及其与冠心病危险性的关系

Table 1. The distribution of VNTR polymorphism in IL-1Ra gene and whose relationship with coronary heart disease risk

基因型	对照组(236 例)		冠心病组(245 例)		OR 值
	n	构成比	n	构成比	
iv/ iv	189	0.801	217	0.886	1.0
iv/ ⑦	5	0.021	3	0.012	
iv/ ⑧	40	0.169	24	0.098	1.91
⑦ ⑦	2	0.009	1	0.004	(1.12~ 3.24)
等位基因					
iv	423	0.896	461	0.941	1.0
⑦	5	0.011	3	0.006	
⑧	44	0.093	26	0.053	1.83
					(1.11~ 3.03)

携带 ⑦型等位基因的基因型(iv/ ⑦和 ⑦ ⑦) 与不携带 ⑦型等位基因的基因型(iv/ iv 和 iv/ ⑧) 相比: $\chi^2= 5.78$, $P< 0.05$; ⑦型等位基因与 iv、⑧型等位基因相比: $\chi^2= 5.75$, $P< 0.05$ 。

表 2. 白细胞介素 1 受体拮抗剂基因可变重复序列多态性与冠心病疾病状态的相关关系

Table 2. Association between the VNTR polymorphism in IL-1Ra gene and status of coronary heart disease

分 组	例数	基因型分布频率(构成比)		OR	95% CI	χ^2	P 值
		无 ⑦等位基因	有 ⑦等位基因				
心肌梗死组	117	112 (0.957)	5 (0.043)	4.15	1.50~ 11.45	8.60	< 0.01
心绞痛组	128	108 (0.844)	20 (0.156)	1.0			

表 3. 白细胞介素 1 受体拮抗剂基因可变重复序列多态性与病变累及血管数的相关关系

Table 3. Association between the VNTR polymorphism in IL-1Ra gene and number of vessel diseased

分 组	例数	基因型分布频率(构成比)		OR	95% CI	χ^2	P 值
		无 ⑦等位基因	有 ⑦等位基因				
多支血管病变组	30	22 (0.733)	8 (0.267)	1.09	0.30~ 3.99	0.20	> 0.50
单支血管病变组	20	15 (0.750)	5 (0.250)	1.0			

2.5 血清白细胞介素 1 受体拮抗剂水平比较

正常人群中 ⑦型等位基因携带者和不携带者血

清 IL-1Ra 水平差异无显著性($P> 0.05$), 但冠心病组 ⑦型等位基因携带者血清 IL-1Ra 水平(1.351 $\pm$ 0.

305 $\mu\text{g/L}$) 明显高于不携带者 ($0.956 \pm 0.554 \mu\text{g/L}$), 两组相比, 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

冠心病的动脉粥样硬化形成是一个复杂的病理过程, 而内皮细胞的活化是一个首要的问题。IL-1 能刺激血管内皮细胞活化并以自分泌方式产生 IL-1 (, 而 IL-1 的产生可以改变内皮的许多功能: 抑制内皮细胞的增殖, 诱导内皮细胞表达粘附分子, 进而引起单核细胞和淋巴细胞的招募和浸润并粘附到内皮; 调节内皮产生促凝活性以促进血栓形成; 诱导内皮细胞产生前列腺素和血小板活性因子等血管活性物质, 使血液动力学特性发生改变并促进动脉粥样硬化的形成; 参与脂质代谢、增加血管渗透性等^[1, 5-7]。以上这些资料表明, IL-1 与冠心病的发生、发展密切相关。另外, 冠状动脉的管壁内皮细胞是 IL-1 和 IL-1Ra 合成的主要场所, 而 IL-1Ra 是 IL-1 家族中唯一的内源性拮抗剂, 它可与 IL-1 竞争结合 IL-1 受体而有效地拮抗 IL-1 所引起的上述反应, 阻止或减轻动脉粥样硬化的形成, 因此 IL-1Ra 在冠心病的发生、发展过程中可能具有一定的保护作用^[6, 7]。

在 IL-1Ra 基因内含子 2 的 VNTR 核心序列中含有 3 个蛋白质结合位点, 这种结构特点提示该 VNTR 多态性对其编码的蛋白质产生可能造成影响。有资料表明, CC 型等位基因与血浆中 IL-1Ra 的高表达相关^[2], 因而, CC 型等位基因可能在冠心病的易感性中具有保护作用。我们的研究发现, 不携带 CC 型等位基因的基因型, 其患冠心病的相对风险度约是携带 CC 型等位基因的 1.91 倍 ($\text{OR} = 1.91, 95\% \text{CI} = 1.12 \sim 3.24$); 而患心肌梗死的相对风险度约是 4.15 倍 ($\text{OR} = 4.15, 95\% \text{CI} = 1.50 \sim 11.45$); 并发现冠心病组 CC 型等位基因携带者血清 IL-1Ra 水平明显高于不携带者。上述结果表明, IL-1Ra 基因第 2 号内含子中 VNTR 多态性与冠心病的发病风险密切相关, CC 型等位基因在冠心病的发生、发展过程中可能具有保护作用^[6, 8], 其机理可能是 CC 型等位基因与 IL-1Ra 的高表达相关, 而高表达的 IL-1Ra 可对 IL-1 的

致病作用起到有效拮抗。

然而, 我们根据选择性冠脉造影的结果分组后发现, IL-1Ra 基因第 2 号内含子 VNTR 多态性与累及的病变血管数无关 ($P > 0.50$), 这与 Francis^[9] 等报道的 CC 型等位基因和单支血管病变显著相关不一致。对该现象的解释可能是: 其一, 由于种族间的差异, IL-1Ra 基因第 2 号内含子中 VNTR 多态性与中国人群冠心病患者的病变血管数确实无关; 其二, 本研究在选择性冠脉造影分组的病例数偏小, 因此用统计学处理的结果未能显示出统计学意义, 在今后的研究中宜扩大病例数并作进一步相关关系的研究。

总之, IL-1Ra 基因第 2 号内含子 VNTR 多态性与冠心病的发生、发展及该疾病的严重程度呈密切负相关, CC 型等位基因可能具有保护作用, 同时也提示了炎症反应在冠心病的发生和发展过程中起着积极促进作用。上述结果为进一步研究冠心病的发病机制、预防和治疗奠定了一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin 1 in disease. *Blood*, 1996, **87**: 2 095-147
- [2] Hume M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol*, 1998, **28**: 2 598-602
- [3] Witkin SS, Gerber S, Ledger W. Influence of interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis*, 2002, **34**: 204-209
- [4] 李艳, 黄宪章, 张平安, 李栋, 刘军, 李庚山. 雌激素受体基因多态性与心肌梗死的关系. *中华医学杂志*, 2001, **81**: 389-392
- [5] Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth inhibitory prostanooids. *J Clin Invest*, 1998, **81**: 487-498
- [6] Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehilli J, Stephenson K, Neumann FJ. Protective role against restenosis from an interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *JACC*, 2000, **36**: 2 168-173
- [7] Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin 1 receptor antagonist expression in human endothelial cell and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 2 394-400
- [8] Francis SE, Camp NJ, Burton AJ, Dewberry RM, Gunn J, Stephens-Lloyd A. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and restenosis after coronary angioplasty. *Heart*, 2001, **86**: 336-340
- [9] Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation*, 1999, **99**: 861-866

(此文编辑 胡必利)