

CXCL16基因 A181V 多态性与急性冠状动脉综合征的相关性

罗永百, 王燕妮, 郑树慧, 严文英, 高玉, 郜翔

(西安交通大学医学院附属第一医院心血管内科, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 急性冠状动脉综合征; 趋化因子; CXCL16 多态性

[摘要] 目的 探讨中国西安汉族人群中 CXC趋化因子亚族第 16号配基(CXCL16)基因 A181V多态性与急性冠状动脉综合征之间及冠状动脉病变程度之间的关系。方法 入选 2008年 4月至 2008年 10月于西安交通大学医学院第一附属医院心血管内科住院并行冠状动脉造影检查的患者, 急性冠状动脉综合征患者 183例, 非冠心病患者 88例, 收集基本临床资料并对各组 A181V多态性进行基因分型, 通过冠状动脉 Gensini积分系统判断冠状动脉病变程度。结果 AA型患急性冠状动脉综合征的风险是VV型的 4.053倍, 等位基因 A携带者发生急性冠状动脉综合征的风险是等位基因 V的 1.811倍 ($P=0.002$), 在校正了年龄、性别等危险因素后, A181V多态性仍是急性冠状动脉综合征的独立危险因素。3种基因型中冠状动脉病变程度具有显著差异 ($P=0.002$), AA型冠状动脉 Gensini积分明显高于VV型 ($P=0.005$)。结论 CXCL16基因 A181V多态性中 A等位基因可能是中国西安汉族人发生急性冠状动脉综合征的独立危险因素, 并与冠状动脉病变程度相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

A association between CXCL16 A181V Polymorphism and Acute Coronary Syndrome

LUO Yong-Bai, WANG Yan-Ni, ZHENG Shu-Hui, YAN Wen-Ying, GAO Yu, and GAO Xiang

(First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

[KEY WORDS] Acute Coronary Syndrome, Chemokine, CXCL16 Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To observe the association between CXCL16 A181V polymorphism and the susceptibility of acute coronary syndrome (ACS), furthermore to approach the influence of CXCL16 A181V polymorphism to coronary severity in Xi'an Han population. **Methods** In the present study we enrolled 183 patients with ACS and 88 patients without coronary artery disease (CAD). A181V polymorphism genotypes was determined by polymerase chain reaction-ligase detection reaction (PCR-LDR), and the coronary severity was counted with Gensini score. **Results** The comparative risk of ACS in AA homozygote was 4.053 times of VV homozygote, and the comparative risk of ACS in A allele carrier was 1.811 times to V carrier. The difference of Gensini score among A181 genotypes was significant ($P=0.002$). **Conclusion** A181V polymorphism is associated with susceptibility of ACS in Xi'an Han population, and also is associated with coronary severity.

CXCL16是近年来发现的一种新的趋化因子, 属 CXC趋化因子家族^[1]。人类 CXCL16基因定位于 17p13上, 与目前已知的其他趋化因子位点分离, 其编码产物为 iv型跨膜糖蛋白, 成熟的 CXCL16由功能结构域、粘蛋白样结构域、疏水性跨膜区及短胞质尾序列构成组成, 其唯一受体为 CXCR6属 G蛋白偶联受体家族。研究表明, CXCL16不但可介导单核巨噬细胞及 T细胞向炎症部位募集, 并可作为清道夫受体介导泡沫细胞形成^[2], 此外还能介导细胞间黏附过程^[3]。目前认为 CXCL16与部分炎性疾病如动脉粥样硬化 (atherosclerosis As)^[4]、感染性疾

病^[5]、类风湿性关节炎^[6]等相关, 国外学者发现在高加索人群中, 位于 CXCL16基因上的 A181V多态性与冠状动脉病变程度之间存在相关性, V等位基因携带者其冠状动脉病变程度较重^[7]。但在中国人群中 CXCL16基因多态性与冠心病及急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome ACS)之间的相关性未见报道, 值得继续深入研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取于 2008年 4月至 2008年 10月于西安交通大学医学院第一附属医院心血管内科住院并行冠状动脉造影检查的患者 271例, 其中 ACS患者 183例 (包括急性心肌梗死 83例, 不稳定型心绞痛 100例), 男性 149例, 女性 34例, 平均年龄 57 ± 10 岁。非冠心病 (non-coronary artery disease Non-CAD) 患

[收稿日期] 2009-08-17 [修回日期] 2009-12-01

[作者简介] 罗永百, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病发病机制, E-mail为 ros_ki_hu@_mail.com。通讯作者王燕妮, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病发病机制, E-mail为 ynwang78@163.com。郑树慧, 博士研究生, 研究方向为冠心病发病机制, E-mail为 Mumiar@_stu_xjtu.edu.cn。

者 88 例作为对照组, 其中男性 54 例, 女性 34 例, 平均年龄 56 ± 10 岁。所有入选患者均排除各种急慢性感染性疾病、自身免疫病、非 A_s 导致的心绞痛及心肌梗死。

1.2 资料收集

对所有入选对象采集相关病史, 包括个人一般情况、高血压史、糖尿病史、家族史、吸烟饮酒史及身高体重, 计算体质指数。测量并记录血压、血脂、空腹血糖, 并以 Gensini 积分对冠状动脉病变程度进行评价。

1.3 DNA 模板制备

所有入选对象均于冠状动脉造影前从股动脉中抽取动脉血 2~3 mL, 乙二胺四乙酸 (ethylene dinitriacetate acid, EDTA) 抗凝, 混匀后 4℃ 保存, 2 h 内 2 000 r/min 离心 15 min, 分离血浆及血细胞, 分装后于 -80℃ 冻存。通过试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提取基因组 DNA, 并融于 TE 溶液 (pH = 8.0), 分装后 -20℃ 冻存。

1.4 引物探针设计及合成

通过 NCBI 下载 A181V 位点 (rs2277680) 序列, 利用 Primer 5.0 设计上下游引物。上游为 GGA GGG TTC AAA GGT CCA GTT, 下游为 ATG CTT ACT CGG GGA TTG TGG。并基于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物序列, 为每个位点设计分别用于识别两种不同碱基的左端等位基因特异性探针 (探针 A 及探针 G), 以及 5' 标记荧光基团的右端共用探针 (探针 R)。设计序列如下: 探针 A 为 TGG TTC TCC CAG CCT CAG GGC CAA; 探

针 G 为 ttttTGG TTC TCC CCA GCC TCA GGG CCA G; 探针 R 为 -P-CTG CCA GAC TGT GGC CCG CAG TGT G-FAM; 连接反应后终产物长度差别为探针左端的差别 (即 tttt 长度差别 5 bp)。连接产物大小分别为 AA 50 bp (对应 VV); GG 55 bp (对应 AA); AG 为 50 bp 和 55 bp (对应 AV), 通过测序仪对不同大小的产物片段进行检测, 即实现基因分型 (图 1)。

1.5 CXCL16 基因 A181V 位点的基因型检测

PCR 反应按如下扩增体系进行: 模板 DNA 1 μL, 脱氧核苷三磷酸 (deoxynucleosine triphosphate, dNTP) (10 mmol/L) 0.3 μL, 10 × PCR 缓冲液 1.5 μL (dNTP 及 PCR 缓冲液均由上海捷瑞生物工程有限公司提供)、Taq 酶 (5 mU/L) 0.3 μL, 上游引物 (10 pmol/L) 0.25 μL, 下游引物 (10 pmol/L) 0.25 μL, 加灭菌水至 15 μL。按如下反应程序进行: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 20 s, 62℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后以 72℃ 延伸 3 min, PCR 产物大小 432 bp。连接反应按如下体系进行: PCR 扩增产物 2 μL, Taq DNA 连接酶 (40 mU/L)、10 × Taq DNA 连接酶缓冲液 (连接酶及缓冲液均由美国 NEB 公司提供)、探针 A (10 pmol/L) 0.01 μL, 探针 G (10 pmol/L) 0.01 μL, 探针 R (10 pmol/L) 0.01 μL, 加入灭菌水至 10 μL。94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 3 min, 共 15 个循环。取 1 μL 连接产物, 加 2 μL 上样 Loading Dye (预混入 Marker), 95℃ 变性 3 min, 立即冰水浴, 通过 ABI377 型测序分析仪进行基因型检测。

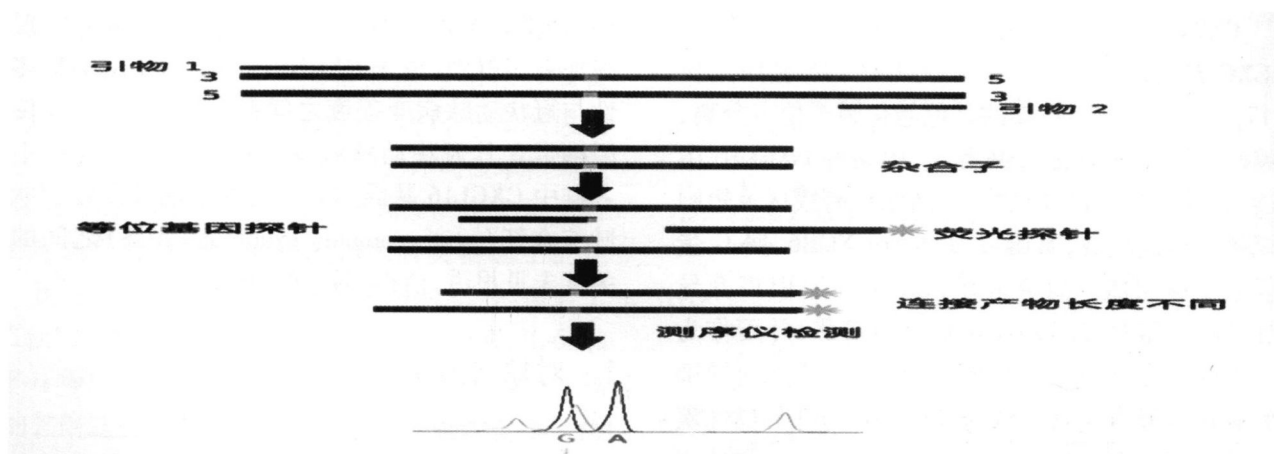


图 1 聚合酶链反应-连接酶检测反应技术分型原理

1.6 统计学方法

以 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理与分析。所有资料分析前均进行正态性及方差齐性检验, 符

合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不满足正态分布的计量资料采用中位数 (四分位间距) 表示, 基因型采用基因计数。多组间计量资料比较采用秩和检

验或单因素方差分析,两组间计量资料比较采用独立样本的 *t* 检验或秩和检验,计数资料间的比较采用 χ^2 检验。各组基因型分布均进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。通过多因素 Logistics 回归分析,排除混杂因素的影响。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

ACS组与非冠心病组在高血压、糖尿病、饮酒、家族史及体质指数等方面差异无统计学意义,而男性比例、吸烟等危险因素间差异具有统计学意义,血浆纤维蛋白原 (fibrinogen, FIB)、脂蛋白 (a) [lipoprotein (a), Lp(a)]、载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1) 浓度等已知的 ACS 危险因素间差异也具有统计学意义 (表 1)。

表 1. 研究对象的一般临床情况

项目	非冠心病组 (n=88)	ACS组 (n=183)
男性 (例)	54 (61.4%)	149 (81.4%) ^b
年龄 (岁)	56 ± 10	57 ± 10
高血压病 (例)	42 (47.7%)	96 (52.5%)
糖尿病 (例)	14 (15.9%)	33 (18.0%)
吸烟 (例)	32 (36.4%)	111 (60.7%) ^b
饮酒 (例)	9 (10.2%)	27 (14.8%)
家族史 (例)	41 (46.0%)	85 (46.4%)
体质指数 (kg/m ²)	24.03 ± 2.81	24.27 ± 2.82
收缩压 (mmHg)	130 (120~135)	130 (118~140)
舒张压 (mmHg)	80 (70~85)	80 (70~90)
空腹血糖 (mmol/L)	5.20 (4.90~5.67)	5.20 (4.70~5.90)
低密度脂蛋白 (mmol/L)	2.59 ± 0.73	2.62 ± 0.85
高密度脂蛋白 (mmol/L)	1.06 (0.91~1.25)	0.98 (0.85~1.16)
载脂蛋白 A1 (g/L)	1.08 ± 0.17	1.02 ± 0.21 ^a
脂蛋白 (a) (mg/L)	110.55 (63.50~207.50)	157.70 (91.10~287.75) ^b
纤维蛋白原 (g/L)	2.90 (2.49~3.50)	3.21 (2.84~3.99) ^b

a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01$ 与非冠心病组比较。

表 2. CXCL16基因 A181V 多态性位点中 A 等位基因是 ACS 危险因素

组别	n	A181V 基因型 (例)			等位基因 (例)		
		AA	AV	VV	AA+AV	A	V
非冠心病组	88	4 (4.5%)	44 (50.0%)	40 (45.5%)	48 (54.5%)	52 (29.5%)	124 (70.5%)
ACS组	183	35 (19.1%)	88 (48.1%)	60 (32.8%)	123 (67.2%)	158 (43.2%)	208 (56.8%)
合计	271	39 (14.4%)	132 (48.7%)	100 (36.9%)	171 (63.1%)	210 (38.7%)	332 (61.3%)

表 3. CXCL16基因 A181V 多态性是 ACS 发生的独立危险因素

危险因素	回归系数	标准误	Wald	P	OR	OR 95% 可信区间	
						上限	下限
脂蛋白 (a)	0.002	0.001	3.999	0.046	0.998	0.995	1.000
纤维蛋白原	0.514	0.209	6.039	0.014	0.598	0.397	0.901
A181V 基因型	0.704	0.246	8.181	0.004	0.495	0.305	0.801
吸烟	1.265	0.319	15.683	< 0.001	0.282	0.151	0.528
常数项	-7.621	1.606	22.522	< 0.001	0.000		

2.2 基因型分布情况

CXCL16基因 A181V 多态性位点基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。AA 基因型分布在 ACS 组中显著高于非冠心病组 [19.1% 比 4.5%; OR = 4.053 (1.535~10.699), $P = 0.001$], 同时 A 等位基因频率在 ACS 组中也显著高于非冠心病组 [43.2% 比 29.5%; OR = 1.811 (1.234~2.660), $P = 0.002$] (表 2)。

通过多因素 Logistics 回归分析后发现, A181V 基因型、吸烟、中性粒细胞百分比、Lp(a)、FIB 均是 ACS 发生的独立危险因素 (表 3)。

2.3 A181V 多态性对冠状动脉病变程度的影响

在 3 种基因型间一般临床情况分布无明显差异 (表 4)。而在 3 种基因型间的冠状动脉 Gensini 积分存在显著差异。在 AA 基因型者中冠状动脉 Gensini 积分显著高于 AV 基因型者及 VV 基因型者 ($\chi^2 = 12.234$, $P = 0.002$); 进一步两两比较后发现, AA 基因型者冠状动脉 Gensini 积分较 VV 基因型者显著增高 ($Z = 2.045$, $P = 0.005$) (图 2)。

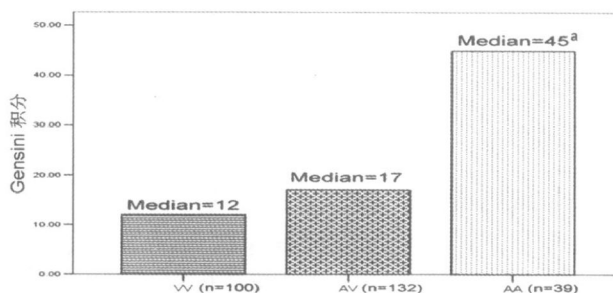


图 2. A181V 基因型对冠状动脉 Gensini 积分的影响 a为 $P < 0.01$ 与 VV 基因型比较。

表 4 各基因型间临床情况分布

项目	VV (n= 100)	AV (n= 132)	AA (n= 39)	P 值
年龄 (岁)	56 ±10	58 ±10	57 ±11	0.164
男性 (例)	76 (76.0%)	95 (72.0%)	32 (82.1%)	0.421
高血压 (例)	50 (50.0%)	67 (50.8%)	21 (53.8%)	0.919
糖尿病 (例)	14 (14.0%)	28 (21.2%)	5 (12.8%)	0.257
吸烟 (例)	52 (52.0%)	65 (49.2%)	26 (66.7%)	0.157
饮酒 (例)	16 (16.0%)	14 (10.6%)	6 (15.4%)	0.447
家族史 (例)	49 (49.0%)	61 (46.2%)	16 (41.0%)	0.696
收缩压 (mmHg)	130 (120~ 135)	130 (117~ 140)	128 (120~ 140)	0.932
舒张压 (mmHg)	80 (70~ 88)	80 (70~ 85)	80 (70~ 90)	0.492
空腹血糖 (mmol/L)	5.18 (4.70~ 5.70)	5.20 (4.86~ 5.90)	5.20 (4.85~ 5.60)	0.806
总胆固醇 (mmol/L)	4.18 ±0.99	3.97 ±0.88	4.23 ±1.17	0.155
甘油三酯 (mmol/L)	1.90 (1.23~ 2.59)	1.77 (1.31~ 2.54)	1.63 (1.21~ 2.35)	0.522
低密度脂蛋白 (mmol/L)	2.66 ±0.80	2.55 ±0.77	2.69 ±0.97	0.484
高密度脂蛋白 (mmol/L)	1.03 (0.89~ 1.20)	0.99 (0.85~ 1.19)	0.98 (0.85~ 1.17)	0.466
载脂蛋白 A1 (mmol/L)	1.03 ±0.19	1.04 ±0.21	1.04 ±0.22	0.884
载脂蛋白 B (mmol/L)	0.69 (0.55~ 0.88)	0.69 (0.57~ 0.81)	0.66 (0.51~ 0.79)	0.635
脂蛋白 (a) (mg/L)	142.20 (81.75~ 275.00)	134.00 (73.10~ 244.00)	185.50 (89.20~ 295.10)	0.471
纤维蛋白原 (g/L)	3.10 (2.71~ 3.87)	3.21 (2.70~ 3.87)	3.10 (2.58~ 3.53)	0.335

3 讨论

炎性细胞浸润是 A s 病理过程的关键环节, 研究发现在动脉粥样硬化斑块肩部存在大量单核巨噬细胞、T 细胞等炎性细胞聚集, 而趋化因子在介导这些细胞向病变部位浸润的过程中具有关键作用^[8]。CXCL16 是近年发现的一种新的趋化因子, 主要表达在单核巨噬细胞^[2]、内皮细胞^[9]、T 细胞^[10]及平滑肌细胞^[9]表面。研究发现 CXCL16 高表达于炎症部位, 如类风湿性关节炎的关节滑液^[6], 中枢神经系统感染的脑脊液^[5]等, 在 A s 斑块部位的巨噬细胞表面也表现为大量表达^[11], 提示其可能介导了炎性细胞的浸润过程。同时进一步的动物实验及临床研究还提示 CXCL16 参与了泡沫细胞形成^[2]及细胞黏附^[3]过程, 并可能具有促内皮细胞增殖及新生血管形成的作用^[12], 这些研究都提示 CXCL16 可能在 A s 的病理过程中具有重要作用。

作为一种多因素共同参与的疾病, 遗传因素对于 A s 的病理过程具有一定影响。多项研究也发现部分基因多态性与冠心病 (包括 ACS) 的易感性相关, 但由于种族和民族的不同, 这些研究结果目前仍存在一定争议。

Lundberg 等^[7]发现, 在高加索人群中 CXCL16 基因 A181V 多态性与冠心病的易感性无关, 但 VV 型与其冠状动脉节段平均狭窄程度明显高于 AA 型 (35.9 ± 9.5 比 31.2 ± 9.5 , $P < 0.05$), 且术前靶病变部位最小管腔直径中 VV 型也明显小于 AA 型 (0.74 ± 0.45 比 0.90 ± 0.59 , $P < 0.05$)。但目前国人中该位点与冠心病间关系尚未研究报道。本研究基于病例对照研究, 探讨了 CXCL16 基因 A181V 多态性位点在中国西安 ACS 人群中频率分布特点及其与冠状动脉病变的关系。结果提示, 本研究人群中 CXCL16 基因 A181V 多态性与 ACS 的遗传易感性相关, 而 AA 型其患 ACS 的风险较 VV 型明显升高 ($OR = 4.053$, $P = 0.001$), 且 A 等位基因发生 ACS 的风险也较 V 等位基因明显升高 ($OR = 1.811$, $P = 0.002$), 初步说明 CXCL16 基因 A181V 多态性位点可能与中国西安汉族人群中 ACS 发生的遗传易感性密切相关。进一步对冠状动脉病变程度进行相关分析后发现 A 等位基因与冠状动脉病变程度间成正相关, AA 型冠状动脉病变程度较 VV 型明显偏重 ($P = 0.005$), 也提示 CXCL16 基因 A181V 多态性可能对于中国西安汉族人群的冠状动脉病变程度具有一定的影响。本研究结果与 Lundberg 等

结果存在一定差异,我们认为这可能与人种间的基因分布情况不同有关。

CXCL16基因 A181V 多态性位点是指由于位于第四号外显子上的单碱基突变,使得其编码的第181位氨基酸由丙氨酸 (Ala) 向缬氨酸 (Val) 转变,研究发现 181位氨基酸位于其近膜部位的粘蛋白结构域中,由 Ala 向 Val 转变后,可能促进 CXCL16 由膜型向可溶型转变,部分学者也发现可溶型 CXCL16 浓度与冠状动脉 Gensini 积分间成正相关^[13]。而在本研究中却发现 A 等位基因其冠状动脉 Gensini 积分高于 V 等位基因,与目前的推测相反,可能是由于 CXCL16 基因 A181V 多态性使其蛋白质构象发生改变,影响其功能,使其更多表现为膜型,通过促进泡沫细胞形成、细胞黏附及细胞增殖从而影响冠状动脉病变程度,但这一推测需要得到研究证实。

总之,本研究首次在中国西安汉族人群中,发现炎症反应过程中重要的趋化因子 CXCL16 的基因多态性与冠心病特别是 ACS 的遗传易感性相关,同时其多态性对于冠状动脉病变程度也具有一定的影响,为进一步理解冠心病及 ACS 的发生发展机制及早期防治提供了新的线索。

[参考文献]

- [1] Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, et al. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX₃C chemokines [J]. *J Immunol* 2001; **166** (8): 5 145-154
- [2] Shimaoka T, Kume N, Minami M, et al. Molecular cloning of a novel

- scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein SR-PSOX on macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2000; **275** (52): 40 663-666
- [3] Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, et al. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells [J]. *J Leukoc Biol* 2004; **75** (2): 267-274
- [4] Wuttge DM, Zhou X, Shekine Y, et al. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24** (4): 750-755
- [5] le Blanc IM, van Lieshout AW, Adema GJ, et al. CXCL16 is elevated in the cerebrospinal fluid versus serum and in inflammatory conditions with suspected and proved central nervous system involvement [J]. *Neurosci Lett* 2006; **397** (1-2): 145-148
- [6] van der Voort R, van Lieshout AW, Toonen LW, et al. Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints [J]. *Arthritis Rheum*, 2005; **52** (5): 1 381-391
- [7] Lundberg GA, Kellin A, Samnegard A, et al. Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene [J]. *J Intern Med*, 2005; **257** (5): 415-422
- [8] Galkina E, Ley K. Leukocyte influx in atherosclerosis [J]. *Curr Drug Targets* 2007; **8** (12): 1 239-248
- [9] Hofnagel O, Luechtenborg B, Plenz G, et al. Expression of the novel scavenger receptor SR-PSOX in cultured aortic smooth muscle cells and umbilical endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22** (4): 710-711
- [10] Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, et al. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4⁺ T cells [J]. *J Leukoc Biol* 2005; **77** (5): 777-786
- [11] Minami M, Kume N, Shimaoka T, et al. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21** (11): 1 796-800
- [12] Zhuge X, Murayama T, Arai H, et al. CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; **331** (4): 1 295-300
- [13] Yi CW, Zeng QT. Circulating CXCL16 is related to the severity of coronary artery stenosis [J]. *Arch Med Res* 2008; **39** (5): 531-535

(此文编辑 曾学清)