

中国北方汉族人群 IL-17F 基因 H is161A rg 多态性与心肌梗死的关联

张效林, 裴芳, 黄明方, 闫承慧, 康建, 梁振洋, 韩雅玲

(中国人民解放军沈阳军区总医院内科, 辽宁省沈阳市 10016)

[关键词] 冠心病; 心肌梗死; 基因; 单核苷酸多态性

[摘要] 目的 探讨 interleukin-17(IL-17F) 基因 H is161A rg 单核苷酸多态性与中国北方汉族人群心肌梗死的关联关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术对 1 068 例心肌梗死的患者和 985 例对照组进行检测, 分析 IL-17F 基因 H is161A rg 单核苷酸多态性的基因型和等位基因分布情况。结果 IL-17F 基因 H is161A rg 单核苷酸多态性三种基因型 TT 型、TC 型和 CC 型在心肌梗死分布频率分别为 76.3%、17.9% 和 5.8%, 在对照组分别为 75.8%、16.6% 和 7.6%, 两组间的基因型分布皆符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 三种基因型在两组间的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。T 等位基因在心肌梗死组和对照组的分布频率分别为 85.3% 和 84.2%, 差异亦无统计学意义 ($P = 0.33$)。按性别和年龄等进行亚组分析显示, IL-17F 基因 H is161A rg 单核苷酸多态性的基因型和等位基因频率在心肌梗死组和对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 IL-17F 基因 H is161A rg 单核苷酸多态性与中国北方汉族人群心肌梗死的发病可能无相关关系。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association of the IL-17F H is161A rg Polymorphism and Myocardial Infarction in Han Population of North China

ZHANG Xiao-Lin, PEI Fang, HUANG Ming-Fang, YAN Cheng-Hui, KANG Jian, LIANG Zhen-Yang and HAN Ya-Ling
(Department of Cardiology, Northern Hospital, Shenyang, People's Republic of China, Shenyang 10016, China)

[KEY WORDS] Coronary Artery Disease; Myocardial Infarction; Gene; Single Nucleotide Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To assess the possible association between cellular repressor of the interleukin-17(IL-17F) H is161A rg polymorphism and myocardial infarction (MI) in a Han Chinese population. **Methods** We conducted a case-control association study on a cohort of 1 068 unrelated MI patients and 985 age and sex matched controls to investigate the association between the IL-17F H is161A rg polymorphism and MI risk in a Chinese Han population. **Results** The genotype frequencies of TT, TC and CC in the IL-17F H is161A rg polymorphism were 76.3%, 17.9% and 5.8% in MI group, 75.8%, 16.6%, and 7.6% in the controls respectively ($P > 0.05$). The T allele frequency of IL-17F H is161A rg polymorphism allele in MI cases and controls were 85.3% and 84.2% respectively ($P = 0.33$). Further stratification analysis by gender or age and analysis of clinical features in relation to myocardial infarction also yielded negative results ($P > 0.05$). **Conclusion** This study indicates the IL-17F H is161A rg polymorphism is unlikely to be a major contributor to the pathogenesis of MI.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是冠心病 (coronary artery disease, CAD) 的病理基础, 它是由血管内皮受损、炎症反应、血管平滑肌细胞增生以及基质改变等因素共同作用的结果^[1,2]。炎症反应可以促进斑块的形成并对斑块的稳定性起着重要作用, 各种促炎因子在动脉粥样硬化及并发症的发生发展过程中可能起重要作用。interleukin-17 (IL-

17F) 是由一种新的效应 CD4⁺ 细胞系—Th17 细胞系产生的一种多效能的细胞因子。IL-17F 和 IL-17A 同属 IL-17 家族, 这两个基因位于相同的染色体区域紧密相邻, 有 50% 的氨基酸序列一致, 生物学功能十分相似^[3]。IL-17F 具有强大的致炎性, IL-17F 能促使体内多种细胞合成分泌促炎因子 (如细胞因子 6) 和趋化蛋白 (如趋化因子 8, 趋化因子 1) 以招募、趋化和激活中性粒细胞^[4,5], 同时还能促进基质金属蛋白酶的表达式^[6], 而这些细胞因子都与 As 及其斑块破裂相关, 提示 IL-17F 可能在 As 和 CAD 的发病机制上起到重要的作用。

H is161A rg 多态是 IL-17F 基因外显子 3 的非同义突变, 该 7488T[→]C 突变使 IL-17F 第 161 位氨基

[收稿日期] 2010-05-18 [修回日期] 2010-08-02

[基金项目] 军队“十一五”计划科技攻关课题资助项目 (06G021)

[作者简介] 张效林, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管分子遗传学, E-mail 为 xiaolindianyu75@sina.com。裴芳, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管分子遗传学, E-mail 为 cdy060315@163.com。黄明方, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病的介入治疗, E-mail 为 huangmingfang@163.com。通讯作者韩雅玲, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病的基础、临床及介入治疗研究。

酸由组氨酸(His)变为精氨酸(Arg),导致 IL-17F 促进靶细胞分泌促炎因子的能力下降^[7-9]。作为一个功能位点,IL-17F 基因 His161Arg 多态已经广泛的应用于和哮喘、炎性肠病等慢性炎症疾病的关联研究^[10-12],迄今,尚无其与 CAD 的关联研究报道。本研究应用病例对照研究方法观察 IL-17F 基因 His161Arg 多态与中国北方汉族人群心肌梗死(myocardial infarction, MI)发病风险的相关关系,以明确 IL-17F 基因 His161Arg 多态是否为中国北方汉族人群 MI 的遗传危险因素。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选自 2005 年 5 月至 2009 年 9 月在沈阳军区总医院心血管内科住院的 MI 患者 1 068 例,男 650 例,女 418 例,平均年龄 59.76 ± 10.87 岁。所有患者均发病 3 个月或 3 个月以上,病情稳定,且经冠状动脉造影证实主要冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 。急性 MI 诊断标准:根据 WHO 1979 年诊断标准,即典型胸痛症状持续 30 min 以上;心电图连续 2 个导联 ST 段抬高(肢体导联 ≥ 0.1 mV,胸导联 ≥ 0.2 mV)并有动态改变;心肌酶学升高并大于正常值高限的 2 倍,24 h 内有动态改变,心肌同功酶升高更有助于诊断。在我科住院病人中随机选取年龄和性别与病例组匹配的对照者 985 男 586 例,女 399 例,平均年龄 59.40 ± 10.05 岁。对照组入选标准:既往无心脏病史,无胸痛、胸闷等心脏病症状,心电图无明显缺血性改变,冠状动脉造影证实主要冠状动脉狭窄 $< 20\%$ 。所有参加者均为中国北方汉族人,且无血缘关系。研究对象除外严重慢性感染、肿瘤、肝、肾疾病等系统性疾病,但不除外高血压和糖尿病,其中高血压定义为收缩压 ≥ 140 mmHg 和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg 或目前正在服用降血压药物;糖尿病指空腹血糖(FPG) ≥ 7.0 mmol/L 及(或)口服葡萄糖耐量试验(OGTT) PG 2 h ≥ 11.1 mmol/L 或目前正在服用降糖药物;吸烟指平均每天至少吸 1 支,并且连续吸烟 ≥ 1 年,现在仍在吸烟或入选本研究时戒烟不足 1 月。全部入选对象均由临床医师提前征得患者同意并填写知情同意书。

1.2 方法

常规酚-氯仿法抽提基因组 DNA (deoxyribonucleic acid),稀释 DNA 样本并用紫外可见分光光度计检测 DNA 浓度,保证各 DNA 样本浓度基本一致, -20℃ 冰箱储存备用。聚合酶链反应 (polymerase

chain reaction, PCR) 扩增基因组 DNA,引物按照 Primer 5.0 以及 Oligo 6 软件设计如下。正向引物: 5'-GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC-3';反向引物: 5'-AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC-3'。50 μ L PCR 反应体系中含: 10 \times 缓冲液 5 μ L; 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L; 引物各 20 μ mol 模板 DNA 0.2 μ g 耐热 DNA 聚合酶 4 μ L; 去离子水加至 50 μ L,所有试剂均为大连宝生物公司产品。扩增反应在热循环仪 (Bio-Rad) 上完成,循环参数为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 最后延伸 7 min, 4℃ 保存。采用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性分析进行分型。酶切体系 (20 μ L): 取 PCR 产物 7 μ L, 加限制性内切酶 HincII 1 μ L (即 5 U), 10 \times Buffer G 缓冲液 1 μ L, 灭菌双蒸水 11 μ L。随机抽取 10% 样品的测序结果经由他人复核,结果 100% 一致,应用 ABI 公司 DNA 测序仪 (3730) 测序。

1.3 统计学方法

符合 Hardy-Weinberg 平衡。采用 SPSS 的广义线性模块,以方差分析调整性别、年龄等已知影响因素后,在对照组和病例组中研究各基因型间心血管病危险因素和冠脉病变支数之间的差异。 χ^2 检验分析单个多态等位基因频率及基因型频率在病例组和对照组间的分布,多元非条件 logistic 回归模型用于检验调整传统心血管病危险因素后多态与疾病的关联 (Enter 模式)。回顾性统计效能的估算用 QUANTO version 1.2 软件。所有 P 值基于双侧检验,统计学显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 IL-17F 基因 His161Arg 多态研究对象的临床基线资料

病例组的年龄和性别与其对应的对照组间差异无显著性。病例组体质指数、糖尿病、吸烟、高血压、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和总胆固醇的水平均显著高于对照组;其它指标差异无显著性 (表 1)。

2.2 IL-17F 基因 His161Arg 多态 (7488T/C) 酶切电泳图和测序图谱

IL-17F 基因 His161Arg 多态的 PCR 产物于 37℃ 恒温箱中消化过夜。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,在紫外灯下读取酶切结果并确定基因型。为保证分型的准确性,其中再抽取 10% 的样品双向测序 (图 1 和图 2)。

表 1 IL-17F 基因 H is161A rg多态研究对象的临床基线资料

指 标	病例组	对照组
男 /女 (例)	650/418 ^a	586/399
年龄 (岁)	59.76 ± 10.87	59.40 ± 10.05
BM I (kg/m ²)	25.10 ± 2.93 ^a	23.12 ± 3.04
糖尿病 (例)	204(19.19%) ^a	124(12.54%)
吸烟 (例)	534(50.00%) ^a	374(37.97%)
高血压 (例)	632(59.18%)	580(58.89%)
TG (mmol/L)	2.16 ± 1.08 ^a	2.04 ± 1.47
TC (mmol/L)	4.60 ± 1.12	4.51 ± 0.91
LDLC (mmol/L)	2.56 ± 0.57	2.51 ± 0.54
HDLc (mmol/L)	1.47 ± 0.30 ^a	1.42 ± 0.37

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.3 IL-17F 基因 H is161A rg多态性与 M I之间的关联分析

IL-17F 基因 H is161A rg单核苷酸多态性三种基因型 TT型、TC型和 CC型在 M I组分布频率分别为 76.3%、17.9%和 5.8%，在对照组分别为 75.8%、16.6%和 7.6%，两组间的基因型分布皆符合 Hardy-Weinberg平衡定律，三种基因型在两组间的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。T 等位基因在 M I组和对照组间的分布频率分别为 85.3%和 84.2%，差异亦无统计学意义 ($P = 0.33$)。多元回归模型调整心血管病常见的危险因素后均未见该变异和 M I的发病风险存在相关关系 ($P > 0.05$)。对 IL-17F 基

因 H is161A rg多态性分别按年龄、性别进一步分层分析后探讨 IL-17F 基因 H is161A rg多态性和 M I发病的相关关系,但未发现 IL-17F 基因 H is161A rg多态性与中国北方汉族人群 M I的发病风险存在相关关系 (表 2)。

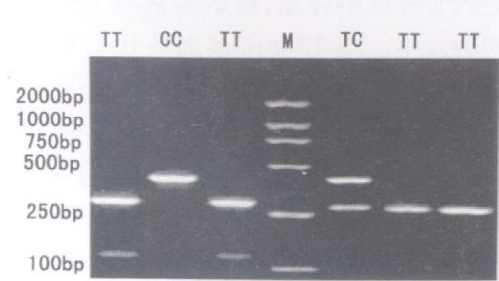


图 1 IL-17F 基因 H is161A rg多态性 (7488T/C)酶切电泳图
7488TT: 288/124bp 7488TC: 412/288/124bp 7488CC: 412bp

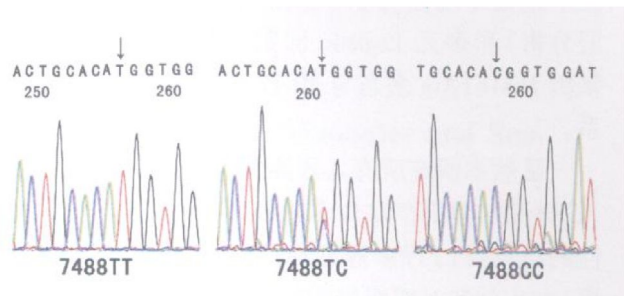


图 2 IL-17F 基因 H is161A rg多态 (7488T/C)测序图谱

表 2 IL-17F 基因 H is161A rg多态性与 M I之间的关联分析

Group		基因型 (例)			等位基因频率		OR (95% CI)	P
		TT	TC	CC	T	C		
All	病例组	815 (76.3%)	191 (17.9%)	62 (5.8%)	1821 (85.3%)	315 (14.7%)	1.09 (0.91-1.29)	0.33
	对照组	747 (75.8%)	164 (16.6%)	74 (7.6%)	1658 (84.2%)	312 (15.8%)		
< 55岁	病例组	428 (75.3%)	100 (17.6%)	40 (7.1%)	970 (85.4%)	166 (14.6%)	1.02 (0.79-1.31)	0.89
	对照组	346 (76.1%)	78 (17.2%)	30 (6.7%)	775 (85.2%)	135 (14.8%)		
≥55岁	病例组	379 (75.8%)	83 (16.6%)	38 (7.6%)	855 (85.5%)	145 (14.5%)	1.03 (0.79-1.34)	0.82
	对照组	324 (75.4%)	70 (16.3%)	36 (8.3%)	732 (85.1%)	128 (14.9%)		
Stratified by gender								
男性	病例组	498 (76.6%)	107 (16.5%)	45 (6.9%)	1114 (85.7%)	186 (14.3%)	1.12 (0.89-1.41)	0.30
	对照组	447 (76.2%)	98 (16.8%)	41 (7.0%)	987 (84.2%)	185 (15.8%)		
女性	病例组	317 (75.9%)	70 (16.7%)	31 (7.4%)	712 (85.2%)	124 (14.8%)	1.07 (0.81-1.41)	0.64
	对照组	301 (75.3%)	66 (16.5%)	32 (8.1%)	673 (84.3%)	125 (15.7%)		

3 讨论

CAD是严重威胁人类健康和生命的心血管疾病,是我国 40岁以上人群最主要的死亡原因。冠心病的发生发展受多个微效基因及环境因素的影响,

属于复杂性状多基因疾病。现已认识到,As是一种以具有免疫活性的单核细胞浸润为特征的动脉壁的慢性炎症性疾病。As所致的 CAD是一种免疫介导的慢性炎症性疾病的观点已为大家所接受。致 As

的单核细胞和 T 细胞的募集由特殊功能的细胞因子所调制,细胞因子及其相应的受体在 A s 病变的形成发展及粥样斑块的不稳定等方面起重要作用^[1,2,13]。IL-17F 是目前新发现的一种前炎性细胞因子,其强大的招募中性粒细胞的独特之处及促进多种细胞因子释放的作用,被认为参与了机体多种炎症性疾病的发生。H is161A rg 多态是 IL-17F 基因外显子 3 的非同义突变,自 Kawaguchi 等^[6]通过功能实验证明该位点突变(即 7488T \rightarrow C)能影响 IL-17F 激活 Raf-1 蛋白激酶、细胞分裂素活化蛋白激酶 1/2 和细胞外信号调节激酶 1/2 从而导致 IL-17F 分泌 IL-6 等促炎因子的能力下降后,该位点引起人们的广泛关注。现在,相当数量的关联研究证明 IL-17F 基因 H is161A rg 多态与哮喘、炎症肠病等慢性炎症疾病相关^[6,7,14-16]。在本研究中,我们首次探讨了 IL-17F 基因 H is161A rg 多态和 M I 发病的相关关系,但不论是单变量分析(包括按性别、年龄进一步分层分析)和多元 Logistic 回归分析都未发现 IL-17F 基因 H is161A rg 多态与 M I 或 CAD 发病存在相关关系。

虽然本研究所有入选病例及对照组都有严格的选择标准,但仍存在许多潜在不足可能会产生假阴性的结果:(1)许多冠心病的危险因素(吸烟、糖尿病)在病例和对照两组间的差异均可能对研究结果产生偏倚;(2)统计学效能的不足可能导致阴性的结果。我们的样本量只有 80% 的把握度(双侧检验,显著性水平 $\alpha=0.05$)能检验出 1.5 的相对危险度,因此未来需要在更大样本量的病例-对照人群中进一步开展研究;(3)IL-17F 基因 H is161A rg 多态可能对 M I 仅起微效的作用,因此这种作用易于被其他环境因素或遗传因素及它们间的交互作用所掩盖或放大^[17];(4)本文仅对 IL-17F 基因 H is161A rg 多态 M I 的关系进行了分析,因此不能排除 IL-17F 其他多态位点与 M I 之间可能存在阳性关联,这需要在未来的研究中进一步验证;(5)由于不是前瞻性的研究设计,样本的选择偏倚和 M I 病例的存活偏倚不能排除;(6)虽然现有研究提示 IL-17F 能招募中性粒细胞,分泌许多与 A s 相关的细胞因子^[18],可能参与了 A s 的发生、发展和斑块破裂,但 IL-17F 对 M I 发病的影响机制还有待进一步阐明。总之,M I 是一种多因素、多基因遗传性疾病,单一致病基因和(或)单一多态性位点的影响可能对疾病的发生仅产生微效作用,因此后续研究联合应用流行病学、临床医学、遗传学和现代分子生物学等进行多学

科多领域的研究,可以更清楚地认识 M I 发生的遗传学机制、M I 早期发生发展及预后、治疗的疾病过程,为 M I 发生的预测及个体化防治提供新的依据。

[参考文献]

- [1] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. *Immunity*, 2004 **21** (4): 467-476
- [2] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2002 **53** (1): 31-47.
- [3] Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease [J]. *Coron Artery Dis*, 2006 **17** (8): 699-706
- [4] Cheng X, Yu X, Ding YJ, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome [J]. *Clin Immunol*, 2008 **127** (1): 89-97.
- [5] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007 **25**: 821-852
- [6] Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, et al. IL-17F sequence variant (H is161A rg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006 **117** (4): 795-801.
- [7] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis [J]. *J Clin Immunol*, 2008 **28** (1): 44-49.
- [8] Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability [J]. *Circulation*, 2001 **104** (14): 1598-603.
- [9] Csiszar A, Ungvari Z. Synergistic effects of vascular IL-17 and TNF α may promote coronary artery disease [J]. *Med Hypotheses*, 2004 **63** (4): 696-698.
- [10] Funaya T, Hakoda M, Ichikawa N, et al. Associations between HLA-DRB1, RANK, RANKL, OPG, and IL-17 genotypes and disease severity phenotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2007 **26** (12): 137-141.
- [11] Southam L, Heath O, Chapman K, et al. Association analysis of the interleukin 17 genes IL17A and IL17F as potential osteoarthritis susceptibility loci [J]. *Ann Rheum Dis*, 2006 **65** (4): 556-557.
- [12] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. Genetic polymorphisms of molecules associated with inflammation and immune response in Japanese subjects with functional dyspepsia [J]. *Int J Mol Med*, 2007 **20** (5): 717-723.
- [13] Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yi JP, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold structure and activity of a novel cytokine IL-17F, and implications for receptor binding [J]. *EMBO J*, 2001 **20** (19): 5332-341.
- [14] Jang WC, Nam YH, Ahn YC, et al. Interleukin-17F gene polymorphisms in Korean patients with Behcet's disease [J]. *Rheumatol Int*, 2008 **29** (2): 173-178.
- [15] Ramsey CD, Lazarus R, Camargo CA, et al. Polymorphisms in the interleukin 17F gene (IL17F) and asthma [J]. *Genes Immun*, 2005 **6** (3): 236-241.
- [16] Seidlerer J, Ellen I, Diegelmann J, et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p H is161A rg polymorphism in IBD [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2008 **14** (4): 437-445.
- [17] Metzger K, Fremont M, Roelant C, et al. Lower frequency of IL-17F sequence variant (H is161A rg) in chronic fatigue syndrome patients [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008 **376** (1): 231-233.
- [18] Ross R. Cellular and molecular studies of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1997 **131** (Suppl): S3-4.

(此文编辑 李小玲)