

CX3CR1 基因 249V/I 多态性与早发冠心病及血脂比值的相关性

肖宏凯, 陈柏荣, 黄茵, 林岫芳

(中山大学附属第五医院心血管内科, 广东省珠海市 519000)

[关键词] CX3CR1; 基因多态性; 冠心病; 血脂比值

[摘要] **目的** 探讨趋化因子 Fractalkine 受体 CX3CR1 基因位点 249V/I 多态性与早发冠心病以及血脂比值的相关性。**方法** 入选患者分为早发冠心病组($n=149$, 年龄 <50 岁)、晚发冠心病组($n=150$, 年龄 >65 岁)和健康对照组($n=149$, 年龄 $47\sim93$ 岁), 均接受血脂水平检测, 计算总胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇比值(TC/HDLC)、载脂蛋白 B/载脂蛋白 A1 比值(ApoB/ApoA1), 应用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性方法对 CX3CR1 基因位点 249V/I 多态性分布进行分析, 比较 CX3CR1 基因多态性及血脂比值在三组之间的差异性。**结果** 等位基因 I249 在三组的分布频率比较差异有统计学意义($P<0.0001$); 早发冠心病组 TC/HDLC 和 ApoB/ApoA1 比值明显高于晚发冠心病组($P<0.0001$), 且独立于 249V/I 基因多态变异。**结论** CX3CR1 等位基因 I249 变异与冠心病的发病年龄存在相关性。高血脂比值与冠心病的发病年龄存在相关性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Association of CX3CR1 Gene 249V/I Polymorphisms to Early-onset Coronary Artery Disease and Lipid Ratios

XIAO Hong-Kai, CHEN Bai-Rong, HUANG Yin, and LIN Xiu-Fang

(Department of Cardiovascular, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

[KEY WORDS] CX3CR1; Gene Polymorphism; Coronary Artery Disease; Lipid Ratios

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between Fractalkine receptor CX3CR1 gene 249V/I polymorphism and early-onset coronary artery disease (CAD) and lipid ratios in patients with no classic risk factors. **Methods** By polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), we examined the frequencies of V249I among early-onset CAD patients ($n=149$; <50 years), late-onset CAD patients ($n=150$; >65 years) and healthy controls ($n=149$, $47\sim93$ years) without known CAD risk factors. We compared plasma total cholesterol (TC)/high density lipoprotein cholesterol (HDL) ratio and apolipoprotein B (ApoB)/apolipoprotein A1 (ApoA1) ratio among the groups and mutation carriers and non-carriers. **Results** There were significant differences in 249V/I allele frequencies among the three groups ($P<0.0001$). TC/HDL and ApoB/ApoA1 ratios were significantly higher in early-onset CAD patients compared with late-onset CAD patients and healthy controls ($P<0.0001$) and independent on either mutation. **Conclusions** The I249 allele of the Fractalkine receptor CX3CR1 gene may be associated with the age of patients with CAD. We also found an independent association between high lipid ratios and the age of patients with CAD.

近来,炎症反应作为冠心病发生发展的一个重要因素愈发受到关注^[1]。趋化因子 Fractalkine 及其受体 CX3CR1 在炎症过程介导白细胞的游出、黏附和聚集,介导炎症过程,参与动脉粥样硬化斑块的形成、破裂及后续血栓状态等病理生理过程中^[2]。

国外研究显示, CX3CR1 存在两个基因多态位点: 249V/I 和 280T/M, 两者等位基因的变异对 CX3CR1 和 Fractalkine 的亲和力产生明显影响, 从而影响冠状动脉粥样硬化的发生发展^[3], 我们亦曾报道 CX3CR1 等位基因 I249 变异与冠心病发病危

[收稿日期] 2013-11-20

[作者简介] 肖宏凯, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病及冠状动脉介入治疗, E-mail 为 254680719@qq.com。陈柏荣, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为心血管病及冠状动脉介入治疗。通讯作者林岫芳, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病介入治疗, E-mail 为 linxiufang_126@126.com。

险性下降相关^[4]。但 CX3CR1 基因多态变异与冠心病的发病年龄相关性研究尚未见报道。另外,国外学者研究显示血脂比值为心肌梗死的重要危险因素。高血脂比值与冠状动脉斑块的不稳定和破裂存在相关性^[5-7]。但亦未见国内文献报道血脂比值与冠心病发病年龄的关系。本文旨在分析 CX3CR1 基因多态位点 249V/I 的多态性在早发冠心病、晚发冠心病及健康对照组的分布情况,并进一步分析血脂水平、血脂比值在三组人群中的差异性。

1 对象和方法

1.1 研究对象

我院心内科住院患者和部分参加我院健康体检者,均为我国汉族人群,符合以下任一项:①冠状动脉造影证实一支或以上血管内径狭窄 $\geq 50\%$;②急性心肌梗死;③陈旧性心肌梗死。即列入病例组,根据年龄 < 50 岁划入早发冠心病组($n = 149$,平均年龄 45.4 ± 4.0 岁),年龄 > 65 岁划入晚发冠心病组($n = 150$,平均年龄 73.7 ± 5.4 岁)。符合以下任一项列入健康对照组($n = 149$,年龄 $47 \sim 93$ 岁,平均 67.0 ± 6.4 岁):①冠状动脉造影证实血管无病变;②无冠心病相关的临床症状;ECG、运动平板试验、UCG均正常的其它疾病住院患者或健康体检者。考虑到冠心病的常见传统危险因素对试验数据可能产生偏倚影响,对符合以下任一项的对象予以排除:①总胆固醇(total cholesterol, TC) > 7.2 mmol/L;②糖尿病;③收缩压 > 180 mmHg和(或)舒张压 > 100 mmHg;④任何已被证实的肝脏、肾脏功能不全和甲状腺疾病。

1.2 辅助检查

入选人群均接受血脂水平检测。测定 TC、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、载脂蛋白 B(apolipoprotein B, ApoB)和载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1),并计算 TC/HDLC 比值和 ApoB/ApoA1 比值。

1.3 全血基因组 DNA 提取

使用血细胞基因组纯化试剂盒(TaKaRa 公司)提取基因组 DNA。

1.4 CX3CR1 基因多态性分析

PCR 方法扩增 CX3CR1 中含 249V/I 酶切位点片段。上游引物为 5'-CCG AGG TCC TTC AGG AAA TCT-3',下游引物为 5'-TCA GCA TCA GGT TCA GGA ACT C-3'。PCR 反应条件:94℃预变性 1

min,94℃变性 30 s,50℃退火 40 s,72℃延伸 55 s,共 34 个循环,最后 72℃终末延伸 5 min,4℃保存。PCR 产物经测序,总长为 588 bp。NCBI 上进行 BLAST,确认为目的基因,符合课题设计。使用限制性内切酶 Psp1406I 对 249V/I 和 280T/M 的酶切位点进行酶切。结果显示,249V/I 多态位点中,VV 纯合子有 205 bp、383 bp 两个条带,II 纯合子仅有 588 bp 一个条带,VI 杂合子有 205 bp、383 bp、588 bp 三个条带。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,显著性水准为 0.05。

2 结果

2.1 三组间临床资料比较

三组间吸烟比例、血压水平、体质指数(body mass index, BMI)、TC 和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),三组间年龄差异较大,三组间 HDLC 水平存在显著性差异($P < 0.05$),早发冠心病患者 HDLC 水平最低,晚发冠心病组患者次之,而健康对照组则最高(表 1)。

表 1. 三组间一般临床资料比较

Table 1. Comparison of general clinical data in the three groups

分 组	早发冠心病组	晚发冠心病组	健康对照组
年龄(岁)	45.4 ± 4.0	73.7 ± 5.4	67.0 ± 6.4
吸烟	16.80%	25.40%	16.00%
收缩压(mmHg)	119.74 ± 21.30	123.12 ± 20.97	114.29 ± 20.24
舒张压(mmHg)	80.35 ± 12.56	78.21 ± 15.37	76.47 ± 16.28
BMI(kg/m ²)	24.19 ± 3.08	24.12 ± 2.61	23.94 ± 3.80
TC(mmol/L)	4.92 ± 1.23	5.02 ± 0.79	4.87 ± 1.06
LDLC(mmol/L)	3.15 ± 0.98	3.24 ± 0.44	3.13 ± 0.83
HDLC(mmol/L)	0.95 ± 0.28	1.17 ± 0.29	1.32 ± 0.33

2.2 三组间 CX3CR1 多态位点 249V/I 基因型分析

健康对照组和晚发冠心病组存在明显更高的 I249 等位基因频率,而早发冠心病组则最低。三组间 I249 等位基因的基因型频率和 V249 等位基因的基因型频率差异有统计学意义($P < 0.0001$;表 2)。多因素 Logistic 回归分析显示, CX3CR1 多态位点 249V/I 多态性与冠心病的发病年龄有关联,VI + II

基因型在早发冠心病组中分布频率明显低于晚发冠心病组,并独立于冠心病其余危险因素,其差异有统计学意义(OR = 0.248, 95% CI 为 0.107 ~ 0.565, $P=0.003$)。

2.3 三组间 TC/HDL 和 ApoB/ApoA1 比值分析

早发冠心病组明显具有更高的血脂比值,晚发冠心病组血脂比值则偏低,而健康对照组血脂比值最低,三组间差异具有统计学意义($P < 0.0001$; 表 3)。对三组入选者按 VV 和 VI + II 基因型分组后进行血脂比值比较,结果发现各组内两种基因型血脂比值极其相近,差异无统计学意义($P > 0.05$);而三组间各基因型血脂比值差异均存在统计学意义,且分布趋势一致(早发冠心病组 > 晚发冠心病组 > 健康对照组, $P < 0.0001$; 表 4)。三组间血脂比值的显著性差异及趋势分布并不因为 249V/I 基因位点的多态变异而发生改变,进一步说明 CX3CR1 基因位点 249V/I 多态变异与冠心病发病年龄的相关性不受血脂水平危险因素的影响。

表 4. 三组间不同基因型血脂比值比较

Table 4. Comparison of blood lipid ratio of different genotypes in three groups

项 目	早发冠心病组		晚发冠心病组		健康对照组		P 值
	VV ($n=73$)	VI + II ($n=76$)	VV ($n=48$)	VI + II ($n=102$)	VV ($n=39$)	VI + II ($n=110$)	
TC/HDL	7.64 ± 1.99	7.57 ± 2.25	6.67 ± 1.81	6.23 ± 1.76	4.28 ± 1.42	4.41 ± 1.13	<0.0001
ApoB/ApoA1	1.07 ± 0.24	1.09 ± 0.26	1.0 ± 0.27	0.96 ± 0.26	0.67 ± 0.30	0.69 ± 1.13	<0.0001

3 讨 论

近年,炎症反应在冠心病的发病机制中所起的作用受到广泛关注。因此,单核细胞、T 细胞、自然杀伤细胞及趋化因子受体在炎症反应中对动脉粥样硬化所起的作用已被深入探讨和研究^[8]。趋化因子受体通过介导淋巴细胞、单核细胞与血管壁内皮细胞表面的趋化结合来介导炎症反应的过程。某些趋化因子受体等位基因变异可能导致炎症细胞与血管内皮细胞结合力发生变化,从而影响动脉粥样硬化的进程^[9]。

Fractalkine 是一种膜结合型趋化因子。大多数的 Fractalkine 表达在活化的内皮细胞表面,既有趋化作用又有黏附功能。Imai 等研究发现 CX3CR1 是 Fractalkine 的高亲和力受体, CX3CR1 表达细胞能迅速与膜结合型 Fractalkine 或 Fractalkine 表达细胞高亲和力结合,参与白细胞向炎症组织的游走。CX3CR1 跨膜区存在 5 个单核苷酸多态性位点的遗

表 2. 三组间 CX3CR1 基因 249V/I 基因型频率分布(例)
Table 2. The frequency distribution of CX3CR1 249V/I genotypes in the three groups (Cases)

基因型	早发冠心病组 ($n=149$)	晚发冠心病组 ($n=150$)	健康对照组 ($n=149$)
VV	73(49%) ^{ab}	48(32%) ^b	39(26%) ^b
VI	63(42%)	87(58%)	91(61%)
II	13(9%)	15(10%)	19(13%)
VI + II	76(51%) ^{ab}	102(68%) ^b	110(74%) ^b

a 为 $P < 0.01$, 与晚发冠心病组 VV 基因型或 VI + II 基因型比较; b 为 $P < 0.0001$, 三组间 VV 基因型或 VI + II 基因型比较。

表 3. 三组间血脂比值比较

Table 3. Comparison of blood lipid ratio in the three groups

项 目	早发冠心病组 ($n=149$)	晚发冠心病组 ($n=150$)	健康对照组 ($n=149$)	P 值
TC/HDL	7.61 ± 2.12	6.40 ± 1.79	4.36 ± 1.25	<0.0001
ApoB/ApoA1	1.08 ± 0.25	0.97 ± 0.26	0.68 ± 0.20	<0.0001

传变异,其中 2 个遗传突变子 249V/I 和 280T/M 存在连锁不平衡。249V/I 和 280T/M 两个多态位点的变异对 CX3CR1 和 Fractalkine 的亲和力产生明显影响,从而影响炎症过程中白细胞的游走、黏附和聚集,对冠心病患者动脉粥样硬化的发生发展密切相关^[3]。

CX3CR1 基因多态性在冠心病发生发展过程中的作用仍然存在很大争议。近年来国外学者针对 CX3CR1 基因多态性与动脉粥样硬化性疾病易感性的相关性进行了不同程度的探讨,研究认为 CX3CR1 的 I249 等位基因变异与急性冠状动脉综合征发生的危险性下降有关^[10,11],提示 I249 等位基因的存在可能对冠心病患者的心血管病起保护作用。但另有学者报道 CX3CR1 的 I249 等位基因变异与急性冠状动脉事件、脑卒中的发生风险增加有关^[12,13]。

本研究中,我们检测了入选人群的 249V/I 多态性及血脂比值的分布情况。值得注意的是,由于冠

心病是一个多因素导致的慢性疾病,所以本研究入选的人群均排除了存在冠心病常见传统的危险因素,从而避免上述因素对研究结果产生偏倚。另外,本研究将冠心病的发病年龄作为研究对象,将入选人群按年龄分界为早发、晚发冠心病组。而健康对照组的年龄不作界定,根据患者排除冠心病的标准随机入选。进一步探讨 CX3CR1 基因多态性及血脂比值与冠心病发病年龄的相关性。本研究结果显示, CX3CR1 基因 249V/I 多态位点变异和冠心病的发病年龄存在显著相关, I249 等位基因在冠心病组中分布频率明显低于健康对照组,而早发冠心病组亦明显低于晚发冠心病组,提示 I249 等位基因的变异可能对冠心病患者的心血管病变起着保护作用, I249 等位基因变异与冠心病的发病年龄提前存在相关性。

此外,我们对三组间血脂比值进行了比较,发现早发冠心病组人群明显具有更高的血脂比值,晚发冠心病组血脂比值则偏低,而健康对照人群血脂比值最低。国外多项病例对照研究已表明,血脂比值(特别是 ApoB/ApoA1)是心肌梗死最重要的危险因素^[5-7]。本研究结果显示高血脂比值与冠心病存在明显相关性,且特别倾向出现于早发冠心病患者。

总之,本研究结果显示 CX3CR1 基因多态性 I249 等位基因变异不但可能减少冠心病的发病风险,且与冠心病的发病年龄存在相关性;高血脂比值与冠心病发病年龄存在相关性。但上述试验结果尚远远不足说明趋化因子受体多态性变异与动脉粥样硬化的因果关系,我们却能由此展望动脉粥样硬化基因靶向治疗的可能性。鉴于样本量、地域、性别和种族限制,以及冠心病发病基因的多样性,要更确切地显示 CX3CR1 多态性与冠心病易感性的因果关系,尚需大样本、多中心的进一步研究。

[参考文献]

- [1] Alexander RW. Cytokine receptor CX3CR-1 and fractalkine: New factors in the atherosclerosis drama[J]. *Circ Res*, 2001, 89: 376-377.
- [2] Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, et al. Fractalkine in vascular biology: From basic research to clinical disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 34-40.
- [3] 冯皓, 郭葆玉. 趋化因子受体 CX3CR1 的分子结构及

生物学功能[J]. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24 (6): 378-380.

- [4] 肖宏凯, 金莉子, 谢桂庭, 等. CX3CR1 基因多态性与冠心病的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (12): 993-995.
- [5] Dunder K, Lind L, Zethelius B, et al. Evaluation of a scoring scheme, including proinsulin and the apolipoprotein B/apolipoprotein A1 ratio, for the risk of acute coronary events in middle-aged men: Uppsala Longitudinal Study of Adult Men (ULSAM) [J]. *Am Heart J*, 2004, 148: 596-601.
- [6] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. INTERHEART study investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study [J]. *Lancet*, 2004, 364: 937-952.
- [7] Walldius G, Jungner I, Holme I, et al. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): A prospective study [J]. *Lancet*, 2001, 358: 2 026-033.
- [8] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 508-519.
- [9] Ortlepp JR, Vesper K, Mevissen V, et al. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age [J]. *J Mol Med*, 2003, 81: 363-367.
- [10] Moatti D, Faure S, Fumeron F, et al. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease [J]. *Blood*, 2001, 97: 1 925-928.
- [11] McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, et al. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2001, 89: 401-407.
- [12] Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis GE, et al. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease [J]. *Thromb Res*, 2007, 119 (1): 63-71.
- [13] Hattori H, Ito D, Tanahashi N, et al. T280M and V249I polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 and ischemic cerebrovascular disease [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 374 (2): 132-135.

(此文编辑 文玉珊)