

本文引用: 王迪, 黄小凤, 莫丽军, 等. 桂北地区汉族人乳脂球表皮生长因子 8 遗传多态性与冠心病的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(6): 495-500.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-06-0495-06

· 临床研究 ·

## 桂北地区汉族人乳脂球表皮生长因子 8 遗传多态性与冠心病的相关性

王迪<sup>1</sup>, 黄小凤<sup>2</sup>, 莫丽军<sup>1</sup>, 蒋惟<sup>1</sup>, 向晓华<sup>1</sup>, 韦传东<sup>1</sup>

(1. 桂林医学院第二附属医院检验科, 2. 桂林医学院生物技术学院, 广西桂林市 541199)

[关键词] 冠心病; 乳脂球表皮生长因子 8; 单核苷酸多态性; 基因型; 等位基因; 基因频率

[摘要] 目的 探讨桂北地区汉族人乳脂球表皮生长因子 8(MFG-E8)基因单核苷酸多态性与冠心病(CHD)的相关性。方法 选取 158 例桂北地区汉族 CHD 患者为 CHD 组, 以年龄和性别与之匹配的 183 例同期健康体检者为对照组。采用酶联免疫吸附法检测 CHD 组和对照组血清 MFG-E8 水平; 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应技术和 DNA 直接测序法检测 MFG-E8 基因 rs1878326 和 rs4945 位点基因型; 同时分析 CHD 组相关位点基因型与血清 MFG-E8 水平的关系。结果 CHD 组血清 MFG-E8 水平为 1.63 (1.31, 2.04)  $\mu\text{g/L}$ , 对照组为 3.29 (2.89, 3.59)  $\mu\text{g/L}$ , CHD 组明显低于对照组 ( $Z = -15.370, P < 0.001$ )。CHD 组 MFG-E8 基因 rs4945 C>A 位点 CA 基因型频率为 31.6%, A 等位基因频率为 15.8%, 均高于对照组 (18.6%、9.3%), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。rs4945 C>A 位点 CA 基因型患 CHD 的风险比 CC 基因型增大 ( $OR = 2.029, 95\% CI: 1.229 \sim 3.349$ ), A 等位基因患 CHD 的风险比 C 等位基因增大 ( $OR = 1.835, 95\% CI: 1.153 \sim 2.921$ )。CHD 组 rs4945 C>A 位点不同基因型血清 MFG-E8 水平比较差异无统计学意义 ( $Z = -1.580, P = 0.114$ )。rs1878326 C>A 位点的基因型及等位基因频率与 CHD 不具有相关性 ( $P > 0.05$ )。结论 桂北地区汉族人 CHD 患者血清 MFG-E8 水平明显低于正常人, MFG-E8 基因 rs4945 C>A 多态性位点与 CHD 具有相关性。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

## Correlation between milk fat globule epidermal growth factor 8 genetic polymorphism and coronary heart disease in Han people in northern Guangxi

WANG Di<sup>1</sup>, HUANG Xiaofeng<sup>2</sup>, MO Lijun<sup>1</sup>, JIANG Wei<sup>1</sup>, XIANG Xiaohua<sup>1</sup>, WEI Chuandong<sup>1</sup>

(1. Clinical Laboratory of Second Affiliated Hospital, 2. School of Biotechnology, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541199, China)

[KEY WORDS] coronary heart disease; milk fat globule epidermal growth factor 8; single nucleotide polymorphism; genotype; allele; gene frequency

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the correlation between milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) gene single nucleotide polymorphism and coronary heart disease (CHD) in Han people in northern Guangxi. **Methods** A total of 158 CHD patients of Han nationality in northern Guangxi were selected as CHD group, and 183 age- and gender-matched healthy subjects were selected as control group. Serum MFG-E8 levels in CHD group and control group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Genotypes of MFG-E8 gene rs1878326 and rs4945 loci were detected by restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction and DNA direct sequencing. At the same time, the relationship between the genotypes of related loci and serum MFG-E8 levels was analyzed in CHD group. **Results** The serum MFG-E8 level in CHD group was 1.63 (1.31, 2.04)  $\mu\text{g/L}$ , and that in control group was 3.29 (2.89, 3.59)  $\mu\text{g/L}$ . The serum MFG-E8 level in CHD group was significantly lower than that in control group ( $Z = -15.370, P < 0.001$ ). The

[收稿日期] 2021-03-22

[修回日期] 2021-07-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460067, 81860078); 桂林市科技计划项目(20210106z, 20210227-8-3)

[作者简介] 王迪, 硕士, 主管技师, 研究方向为分子诊断学, E-mail 为 624258357@qq.com。通信作者韦传东, 博士, 主任医师, 研究方向为分子诊断学, E-mail 为 chuandongwei@163.com。

frequency of CA genotype at rs4945 C>A locus of MFG-E8 gene in CHD group was 31.6%, and the frequency of A allele was 15.8%, which were higher than those in control group (18.6%, 9.3%), and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). rs4945 C>A locus CA genotype had higher risk of CHD than CC genotype (OR=2.029, 95% CI:1.229~3.349), and A allele had higher risk of CHD than C allele (OR=1.835, 95% CI:1.153~2.921). There was no significant difference in serum MFG-E8 levels between different genotypes at rs4945 C>A locus in CHD group ( $Z=-1.580$ ,  $P=0.114$ ). There was no correlation between the genotype and allele frequency of rs1878326 C>A locus and CHD ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The serum MFG-E8 level of CHD patients of Han nationality in northern Guangxi is significantly lower than that of normal people, and the rs4945 C>A polymorphism of MFG-E8 gene is associated with CHD.

冠状动脉粥样硬化性心脏病简称冠心病 (coronary heart disease, CHD), 是由于冠状动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 使血管狭窄或闭塞而造成心肌缺血、缺氧而发生的一种心脏病。近几年流行病学调查显示, 无论是在西方国家还是中国, CHD 已成为死亡率最高的一种心血管疾病<sup>[1]</sup>。CHD 是一种具有遗传倾向的疾病, 有研究显示, 有 CHD 家族史的人相对于普通人患 CHD 的风险加大<sup>[2]</sup>, 近些年越来越多的学者注意到了遗传因素在 CHD 中具有重要的意义。随着分子生物技术的快速发展及人类基因组计划的完成, 全基因组关联研究在疾病研究中得到很大发展, 其公布了多个 CHD 易感基因位点, 这些位点的突变与 CHD 的发生具有相关性<sup>[3]</sup>。乳脂球表皮生长因子 8 (milk fat globule epidermal growth factor 8, MFG-E8) 是一种分布于多种组织的糖蛋白, 具有亲脂性。As 是 CHD 的病理生理基础, MFG-E8 在 As 斑块形成的过程中具有双面作用, 它既可以通过清除凋亡的血管平滑肌细胞来延缓或阻止 As 的进展<sup>[4]</sup>, 也可以增加血管平滑肌的侵袭能力使血管壁增厚<sup>[5]</sup>。有学者研究发现, 在已发生粥样硬化的动脉中, MFG-E8 在巨噬细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞均呈高水平表达<sup>[6]</sup>; 也有研究显示在 CHD 患者血清中, MFG-E8 水平较低, 并且这种血清水平的高低与心肌梗死患者早期病情的严重程度呈明显的负相关<sup>[7]</sup>。目前国内外有针对 MFG-E8 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与系统性红斑狼疮的相关研究报道。中国大陆和中国台湾学者也分别研究报道了 MFG-E8 编码区 rs4945 和 rs1878326 的 2 个多态性位点与系统性红斑狼疮的相关性<sup>[8-9]</sup>, 但对 MFG-E8 基因 SNP 与 CHD 是否具有易感性还没有相关的报道。本研究通过探讨 MFG-E8 基因的 rs1878326 和 rs4945 位点的多态性与桂北地区汉族人群 CHD 是否具有相关性, 从而为今后 CHD 基因易感位点的研究提供理论依据。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

选取 2017 年 10 月—2018 年 5 月在桂林医学院附属医院心内科就诊的 CHD 患者 (CHD 组) 和同期健康体检者 (对照组)。所有研究对象均为来自桂北地区的汉族人。CHD 组符合 2008 年美国心脏协会颁布的 CHD 诊断标准: 冠状动脉造影显示 3 支主要冠状动脉 (左前降支、左回旋支及右冠状动脉) 中至少有 1 支狭窄程度  $\geq 50\%$ 。所选患者有以下情况者予以排除: (1) 高血压、糖尿病; (2) 年龄不在 18~90 岁之间; (3) 严重肝肾功能不全; (4) 免疫系统疾病; (5) 严重血液系统疾病; (6) 恶性肿瘤。对照组经冠状动脉造影排除 CHD, 无高血压、糖尿病、免疫系统疾病、血液系统疾病和恶性肿瘤, 且一般实验室检查指标 (肝肾功能、血脂) 均正常。CHD 组 158 例, 其中男性 114 例, 女性 44 例, 平均年龄 ( $59.16 \pm 9.49$ ) 岁; 对照组 183 例, 其中男性 123 例, 女性 60 例, 平均年龄 ( $57.32 \pm 9.39$ ) 岁。

### 1.2 一般资料采集

通过查阅病历资料, 收集 CHD 组和对照组个人信息, 如姓名、性别、年龄、民族、体质指数 (body mass index, BMI), 及实验室检查结果, 如天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、肌酐 (creatinine, Cr)、尿素 (Urea)。

### 1.3 MFG-E8 检测

使用酶联免疫吸附试剂盒 (货号: E-EL-H2063c, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司) 检测 CHD 组和对照组血清 MFG-E8 水平。

### 1.4 DNA 提取

使用全血 DNA 试剂盒 (货号: 2018011002, 亚能生物技术有限公司) 按说明书操作提取 CHD 组和

对照组全血 DNA。

### 1.5 引物设计

在 NCBI GenBank 基因库中查找人类 MFG-E8 基因包含 2 个位点(rs1878326、rs4945)的碱基序列,设计引物,交由华大基因公司合成。引物序列见表 1。

表 1. MFG-E8 基因 2 个多态性位点扩增引物序列  
Table 1. Sequences of primers for amplification of two polymorphic sites in MFG-E8 gene

多态性位点	引物片段	退火温度
rs1878326 C>A	F:5'-ATTGTCCCTTTGTGGTCTTTGT-3' R:5'-CGAGCCTTCTCTCCATTGC-3'	58.0 °C
rs4945 C>A	F:5'-GAGGTGCTGAGCCGCTGATTATTC-3' R:5'-CCAGGTGGAAGGGGTTCAAAGTCA-3'	62.5 °C

### 1.6 rs1878326 C>A 基因分型

PCR 反应体系:PCR 扩增体积 20  $\mu$ L,其中 10  $\mu$ L 2 $\times$ PCR Mix(货号:KT17120,天根生化科技有限公司),上、下游引物各 1  $\mu$ L,DNA 模板 1  $\mu$ L,7  $\mu$ L 双蒸水(distillation-distillation  $H_2O$ , dd $H_2O$ )。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,32 个循环;72 °C 平衡 10 min(Bio-Rad 公司 s1000 PCR 扩增仪)。限制性内切酶 *Nla* III(货号:ER1831,Thermo Fisher Scientific 公司)酶切反应体系:PCR 产物 10  $\mu$ L,10 $\times$  BufferG 2  $\mu$ L,*Nla* III 1  $\mu$ L,dd $H_2O$  17  $\mu$ L;37 °C 酶切消化 16 h。

### 1.7 rs4945 C>A 基因分型

PCR 反应体系:PCR 扩增体积 50  $\mu$ L,其中 2 $\times$  PrimeSTAR GC Buffer 25  $\mu$ L,dNTP Mixture 4  $\mu$ L,PrimeSTAR HS DNA polymerase 0.5  $\mu$ L(货号:R044A,大连 TaKaRa 生物公司),上、下游引物各 1  $\mu$ L,DNA 模板 1  $\mu$ L,17.5  $\mu$ L dd $H_2O$ 。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,62.5 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,32 个循环;72 °C 平衡 10 min(Bio-Rad 公司 s1000 PCR 扩增仪)。限制性内切酶 *Ban* II(货号:R0119V,美国 NEB 公司)酶切反应体系:*Ban* II 1  $\mu$ L,PCR 产物 20  $\mu$ L,10 $\times$  NEBuffer 5  $\mu$ L,dd $H_2O$  24  $\mu$ L;37 °C 酶切消化 60 min。

### 1.8 PCR 产物酶切电泳

将 5  $\mu$ L 经限制性内切酶消化的 PCR 产物加入混有 3% 溴化乙锭的琼脂糖凝胶中,电泳电压 100 V,电泳时间 30 min。取出胶板,在凝胶成像系统中结合 DNA 标准分子量对各种基因型进行判断并记录酶切结果。

### 1.9 DNA 直接测序

每个基因型随机抽取 4 例相应 PCR 产物交由华大基因公司进行测序以验证限制性内切酶酶切反应判断的基因型是否正确。

### 1.10 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件包进行统计学分析。使用 Mann-Whitney *U* 非参数秩和检验判断不同组别 MFG-E8 水平是否有差异。基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算,等位基因及基因型分布进行遗传平衡检验。CHD 组和对照组各基因型频率与 CHD 的相关性通过 Logistic 回归分析完成,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CHD 组和对照组一般资料的比较

CHD 组与对照组在性别、年龄、血清 TG、LDL、AST、ALT、Cr、Urea 指标比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。CHD 组 BMI、TC 显著高于对照组( $P < 0.001$ ),HDL 显著低于对照组( $P < 0.001$ ;表 2)。

表 2. CHD 组和对照组一般临床资料的比较  
Table 2. Comparison of general clinical data between CHD group and control group

项目	对照组 ( <i>n</i> = 183)	CHD 组 ( <i>n</i> = 158)	$\chi^2/t$	<i>P</i>
男/女/例	123/60	114/44	0.976	0.323
年龄/岁	57.32 $\pm$ 9.39	59.2 $\pm$ 9.52	1.826	0.069
BMI/(kg/m <sup>2</sup> )	22.77 $\pm$ 2.37	25.91 $\pm$ 2.44	12.043	<0.001
TG/(mmol/L)	1.75 $\pm$ 1.50	1.67 $\pm$ 1.14	-0.570	0.569
TC/(mmol/L)	4.24 $\pm$ 1.09	4.74 $\pm$ 0.84	4.782	<0.001
HDL/(mmol/L)	1.35 $\pm$ 0.36	0.98 $\pm$ 0.34	-9.696	<0.001
LDL/(mmol/L)	3.33 $\pm$ 0.83	3.11 $\pm$ 1.18	-1.958	0.051
AST/(U/L)	29.45 $\pm$ 4.16	30.12 $\pm$ 4.15	1.478	0.140
ALT/(U/L)	27.12 $\pm$ 4.18	26.53 $\pm$ 4.94	-1.190	0.235
Cr/(mmol/L)	71.99 $\pm$ 13.71	69.56 $\pm$ 15.10	-1.554	0.121
Urea/(mmol/L)	5.65 $\pm$ 1.02	5.81 $\pm$ 1.44	1.088	0.278

### 2.2 CHD 组和对照组血清 MFG-E8 水平的比较

CHD 组血清 MFG-E8 水平为 1.63(1.31,2.04)  $\mu$ g/L,对照组为 3.29(2.89,3.59)  $\mu$ g/L,CHD 组明显低于对照组( $Z = -15.370$ , $P < 0.001$ )。

### 2.3 PCR 产物、限制性内切酶及酶切产物大小

MFG-E8 基因各突变位点对应的 PCR 产物大小、限制性内切酶、酶切后各基因型产物大小见表 3。



表 3. MFG-E8 基因 2 个多态性位点 PCR 扩增产物和酶切产物大小

Table 3. Sizes of PCR amplification product and enzyme cleavage product of two polymorphic sites in MFG-E8 gene

多态性位点	扩增产物 (bp)	限制性内切酶	酶切产物 (bp)	基因型
rs1878326 C>A	391	Nla III	295, 110	CC
			295, 185, 110	CA
			185, 110	AA
rs4945 C>A	539	Ban II	539	CC
			426, 113	CA

2.4 MFG-E8 基因分型结果

rs1878326 C>A 位点酶切产物在琼脂糖凝胶电泳图中可见 3 种基因型,1 通道为 PCR 扩增产物,大小 391 bp;2 通道为 AA 基因型,大小 185、110 bp;3 通道为 CC 基因型,大小 295、110 bp;4 通道为 CA 基因型,大小 295、185、110 bp(图 1)。rs4945 C>A 位点酶切产物在琼脂糖凝胶电泳图中可见 2 种基因型,1 通道为 PCR 扩增产物,大小 539 bp;2、3、4 通道为 CC 基因型,大小 539 bp;5 通道为 CA 基因型,大小 426、113 bp(图 2)。

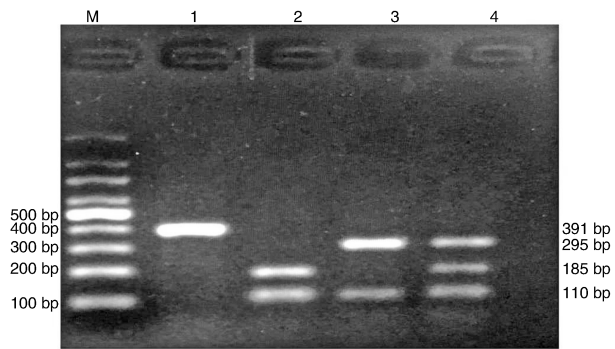


图 1. rs1878326 C>A 酶切产物电泳图

M:Marker;1 为 PCR 扩增产物,2 为 AA 基因型,3 为 CC 基因型,4 为 CA 基因型。

Figure 1. Electropherogram of rs1878326 C>A enzyme cleavage product

2.5 DNA 测序结果

rs1878326 C>A DNA 测序结果见图 3, A、B、C 分别为 CC、CA、AA 基因型,箭头所指为基因突变位点。rs4945 C>A DNA 测序结果见图 4, A、B 分别为 CC、CA 基因型,箭头所指为基因突变位点。

2.6 MFG-E8 基因 2 个多态性位点与 CHD 相关性分析

MFG-E8 基因 2 个多态性位点在 CHD 组和对

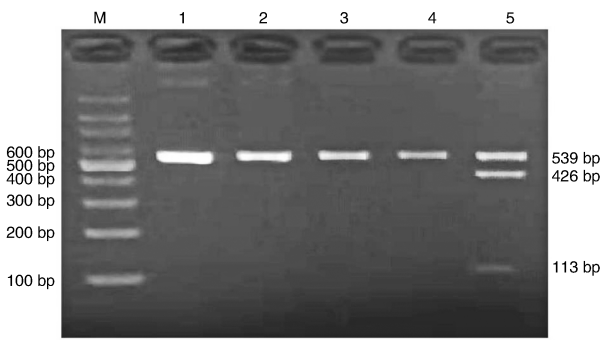


图 2. rs4945 C>A 酶切产物电泳图

M:Marker;1 为 PCR 扩增产物,2、3、4 为 CC 基因型,5 为 CA 基因型。

Figure 2. Electropherogram of rs4945 C>A enzyme cleavage product

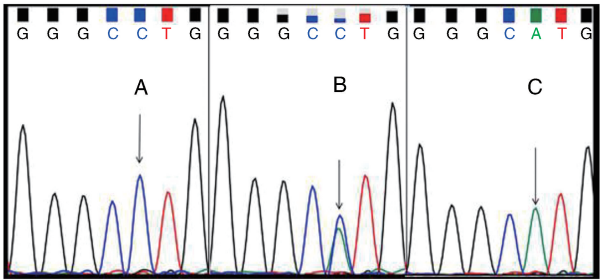


图 3. rs1878326 C>A DNA 测序图

A、B、C 分别为 CC、CA、AA 基因型,箭头所指为基因突变位点。

Figure 3. DNA sequencing chart of rs1878326 C>A

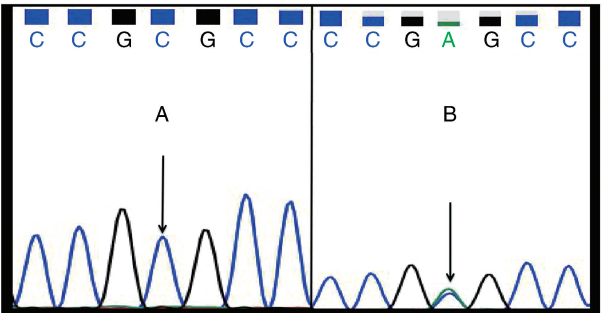


图 4. rs4945 C>A DNA 测序图

A、B 分别为 CC、CA 基因型,箭头所指为基因突变位点。

Figure 4. DNA sequencing chart of rs4945 C>A

照组中的分布频率见表 4。MFG-E8 基因 rs1878326 和 rs4945 位点基因型在 CHD 组和对照组中的分布频率经哈迪-温伯格遗传平衡检验,达到遗传平衡(rs1878326:CHD 组: $\chi^2 = 1.87, P = 0.39$ ,对照组: $\chi^2 = 0.03, P = 0.98$ ;rs4945:CHD 组: $\chi^2 = 5.58, P = 0.06$ ,对照组: $\chi^2 = 1.92, P = 0.38$ ),说明所选的研究样本具有群体代表性( $P > 0.05$ )。

MFG-E8 基因 rs1878326 多态性位点在 CHD 组和对照组中均表现出 CC、CA、AA 基因型,且这 3 种

基因型均已通过 DNA 测序验证。MFG-E8 基因 rs1878326 C>A 各基因型在 CHD 组中分布为 CC 33.5%、CA 53.2%、AA 13.3%，等位基因频率为 C 60.1%、A 39.9%；在对照组中的基因型分布为 CC 31.7%、CA 48.6%、AA 19.7%，等位基因频率为 C 56.0%、A 44.0%。通过分析显示 rs1878326 C>A 位点的基因型及等位基因频率与 CHD 不具有相关性 ( $P>0.05$ )。

MFG-E8 基因 rs4945 多态性位点在 CHD 组和对照组中均表现出 CC、CA 基因型，且这 2 种基因型均已通过 DNA 测序验证。MFG-E8 基因 rs4945 C>A 各基因型在 CHD 组中分布为 CC 68.4%、CA 31.6%，

等位基因频率为 C 84.2%、A 15.8%；在对照组中的基因型分布为 CC 81.4%、CA 18.6%，等位基因频率为 C 90.7%、A 9.3%。使用 Logistic 回归分析显示，rs4945 C>A 位点基因型及基因频率与 CHD 相关，CHD 组 CA 基因型频率和 A 等位基因频率明显高于对照组 ( $P=0.006$ ,  $P=0.010$ )，CA 基因型和 A 等位基因可能增加患 CHD 的风险；CA 基因型患 CHD 的风险比 CC 基因型增大 ( $OR=2.029$ ,  $95\%CI:1.229 \sim 3.349$ )；A 等位基因患 CHD 的风险比 C 等位基因增大 ( $OR=1.835$ ,  $95\%CI:1.153 \sim 2.921$ )。

表 4. MFG-E8 基因 2 个多态位点各基因型和等位基因在 CHD 组和对照组的分布

Table 4. Distribution of genotypes and alleles of two polymorphisms in MFG-E8 gene in CHD group and control group

项目	对照组 ( <i>n</i> = 183)	CHD 组 ( <i>n</i> = 158)	Logistic 回归分析	
			OR(95% CI)	<i>P</i> 值
rs1878326 C>A				
CC/[ 例( % ) ]	58(31.7)	53(33.5)		
CA/[ 例( % ) ]	89(48.6)	84(53.2)	1.033(0.641 ~ 1.664)	0.894
AA/[ 例( % ) ]	36(19.7)	21(13.3)	0.638(0.332 ~ 1.228)	0.179
C/[ 个( % ) ]	205(56.0)	190(60.1)		
A/[ 个( % ) ]	161(44.0)	126(39.9)	0.844(0.622 ~ 1.146)	0.278
rs4945 C>A				
CC/[ 例( % ) ]	149(81.4)	108(68.4)		
CA/[ 例( % ) ]	34(18.6)	50(31.6)	2.029(1.229 ~ 3.349)	0.006
C/[ 个( % ) ]	332(90.7)	266(84.2)		
A/[ 个( % ) ]	34(9.3)	50(15.8)	1.835(1.153 ~ 2.921)	0.010

注：空白处表示数据不适用。

## 2.7 MFG-E8 不同基因型与血清 MFG-E8 水平的相关性分析

在 CHD 组中 rs4945 C>A 不同基因型 MFG-E8 血清水平的比较：158 例 CHD 患者，其中 CC 基因型 108 例，血清 MFG-E8 水平为  $1.54(1.26, 1.92)\mu\text{g/L}$ 。CA 基因型 50 例，血清 MFG-E8 水平为  $1.75(1.36, 2.15)\mu\text{g/L}$ 。检验结果显示 CC 基因型与 CA 基因型血清 MFG-E8 水平比较差异无统计学意义 ( $Z=-1.580$ ,  $P=0.114$ )。

## 3 讨论

冠状动脉粥样硬化可被看作是一种慢性炎症反应疾病<sup>[10]</sup>，MFG-E8 作为一种新发现的抗炎因子在 As 的发生发展中起重要作用<sup>[11]</sup>。炎性细胞在 As 斑块中可使脂质中心变大并且破坏纤维帽结构，

从而导致斑块破裂和血栓形成。大量研究表明，活化的巨噬细胞陆续往斑块中迁移是 As 的重要特点<sup>[12]</sup>，也有研究发现 MFG-E8 在人类 As 斑块内膜高表达<sup>[13]</sup>。MFG-E8 在巨噬细胞吞噬凋亡细胞的过程中起中介作用，巨噬细胞分泌的 MFG-E8 与凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合，然后与巨噬细胞表面的整合素  $\alpha\text{v}\beta 5$  相结合导致巨噬细胞内 CrkII/DOCD180/Rac1 信号通路激活，使细胞内的蛋白骨架重新排列进而开始吞噬凋亡细胞。如果外源性的加入 MFG-E8 的同分异构体，就会使以上通路关闭，导致巨噬细胞的吞噬活性减弱，从而加重炎症反应。有研究表明血清 MFG-E8 水平在 As 的发展过程中降低<sup>[7]</sup>。本研究也证实了这一理论，采用酶联免疫吸附法分别检测了 CHD 组和对照组血清 MFG-E8 水平，显示 CHD 组血清 MFG-E8 水平明显

低于对照组 ( $P < 0.001$ )。现阶段临床上对于 CHD 的诊断主要依靠冠状动脉造影,这是一种有创、耗时、价格昂贵的方法,而且在 CHD 的早期诊断上并没有太大优势。大量研究证明血清 MFG-E8 低水平可增加 CHD 的患病风险,血清 MFG-E8 水平检测方法简单、省时、重复性好,对 CHD 的早期诊断及预后评估具有较高价值。

MFG-E8 的 N 端有 2 个表皮生长因子区, C 端有 C1 和 C2 区,其中 C1 区和凝血因子 V 同源, C2 区和凝血因子 VIII 同源<sup>[14]</sup>。MFG-E8 基因 rs4945 C>A 位点 SNP 表现为丝氨酸替代位于第 3 位的精氨酸,这 2 种氨基酸的带电荷量和大小有很大不同,而且这种替代发生在信号肽区域上,这个位点的突变可能会引起蛋白转录的活性,从而影响蛋白转运等功能<sup>[9]</sup>。本研究的结果与这些理论相符, MFG-E8 基因 rs4945 C>A 位点基因型及等位基因频率与 CHD 具有相关性,其中 CA 基因型和 A 等位基因可能增加 CHD 的患病风险。MFG-E8 基因 rs1878326 C>A 位点的 SNP 表现为甲硫氨酸替代位于第 76 位的亮氨酸,在第 76 位密码子附近出现一个 Kozak [(A or G)-3CCAUGG+4] 序列,这可能会使翻译起始序列发生改变,产生没有作用的 MFG-E8 蛋白。第 76 位亮氨酸的突变位于 C 末端的 C1 区 F5/80 区域,这是结合凋亡细胞的位置,所以这个突变 C1 区没有表现出显著作用。虽然有报道 MFG-E8 基因 rs1878326 C>A 位点的 SNP 增加中国人群患系统性红斑狼疮的风险,同时也有报道其与德国和法国人群老年性黄斑病变具有相关性,但通过研究发现 MFG-E8 基因 rs1878326 C>A 位点的 SNP 与 CHD 之间不具有相关性。由于本次研究样本的选择来自桂北地区汉族人,地域及生活习惯的差异可能会影响基因分型结果,其次本研究样本量有限且均来自桂林医学院附属医院内科患者,有可能会出现研究样本入选偏倚,并且目前国内外相关研究较少,因此需要多区域、大样本研究来进一步确认 MFG-E8 基因多态性与 CHD 的相关性,从而为 CHD 的治疗及预防提供理论依据。

总之,通过研究得出 CHD 组血清 MFG-E8 水平显著低于对照组。分析了 MFG-E8 基因 rs4945 和 rs1878326 这 2 个多态性位点的基因型,其中 rs4945 C>A 位点 CA 基因型和 A 等位基因可增加 CHD 患病风险,但是没有发现其对 MFG-E8 血清水平的影响。此外,还发现 rs1878326 C>A 位点与 CHD 不具有相关性。

#### [参考文献]

- [1] GBD 2015 DISEASE AND INJURY INCIDENCE AND PREVALENCE COLLABORATORS. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10053): 1545-1602.
- [2] FALLAH S, SEIFI M, FIROOZRAI M, et al. Effect of apolipoprotein E genotypes on incidence and development of coronary stenosis in Iranian patients with coronary artery disease [J]. *J Clin Lab Anal*, 2011, 25 (1): 43-46.
- [3] DAS A, GHATAK S, SINHA M, et al. Correction of MFG-E8 resolves inflammation and promotes cutaneous wound healing in diabetes [J]. *J Immunol*, 2016, 196 (12): 5089-5100.
- [4] BEAUCHAMP N J, VAN ACHTERBERG T A, ENGELSE M A, et al. Gene expression profiling of resting and activated vascular smooth muscle cells by serial analysis of gene expression and clustering analysis [J]. *Genomics*, 2003, 82 (3): 288-299.
- [5] FU Z, WANG M, GUCEK M, et al. Milk fat globule protein epidermal growth factor-8: a pivotal relay element within the angiotensin II and monocyte chemoattractant protein-1 signaling cascade mediating vascular smooth muscle cells invasion [J]. *Circ Res*, 2009, 104 (12): 1337-1346.
- [6] LI H, LI L, CHEN H, et al. The structure and properties of MFG-E8 and the *in vitro* assessment of its toxic effects on myoblast cells [J]. *Protein Expr Purif*, 2021, 178: 105720.
- [7] DAI W, LI Y, LV Y N, et al. The roles of a novel anti-inflammatory factor, milk fat globule-epidermal growth factor 8, in patients with coronary atherosclerotic heart disease [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 233 (2): 661-665.
- [8] 陈杰, 饶亚华, 朱建华. 汉族人中 MFG-E8 基因的多态性与系统性红斑狼疮的关系 [J]. *免疫学杂志*, 2015, 31 (11): 1009-1012.
- [9] HU C Y, WU C S, TSAI H F, et al. Genetic polymorphism in milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) is associated with systemic lupus erythematosus in human [J]. *Lupus*, 2009, 18 (8): 676-681.
- [10] 毕嘉琛, 刘志刚, 刘晓程. 冠状动脉粥样硬化性心脏病的自身免疫机制 [J]. *免疫学杂志*, 2017 (5): 448-451.
- [11] REN Y, LIU W, ZHANG L, et al. Milk fat globule EGF factor 8 restores mitochondrial function via integrin-mediated activation of the FAK-STAT3 signaling pathway in acute pancreatitis [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11 (2): e295.
- [12] LAPLANTE P, BRILLANT-MARQUIS F, BRISSETTE MJ, et al. MFG-E8 reprogramming of macrophages promotes wound healing by increased bFGF production and fibroblast functions [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137 (9): 2005-2013.
- [13] CHIANG H Y, CHU P H, LEE T H. MFG-E8 mediates arterial aging by promoting the proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells [J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26 (1): 61.
- [14] FUJIWARA C, UEHARA A, SEKIGUCHI A, et al. Suppressive regulation by MFG-E8 of latent transforming growth factor  $\beta$ -induced fibrosis via binding to  $\alpha$  integrin: significance in the pathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71 (2): 302-314.

(此文编辑 曾学清)