

湖北地区老年冠心病患者肿瘤坏死因子 β 基因的多态性

汪 明, 李 艳, 张平安, 蒋学俊, 黄从新

(武汉大学人民医院检验科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 内科学; 冠状动脉疾病; 肿瘤坏死因子 β ; 单核苷酸多态性; 等位基因; 聚合酶链反应; 湖北地区

[摘要] 为探讨湖北地区老年冠心病患者肿瘤坏死因子 β 804C/A 多态性分布、肿瘤坏死因子 β 血清水平与冠心病的相关性, 应用套式聚合酶链反应结合等位基因特异性聚合酶链反应, 对 290 例老年冠心病患者和 239 例健康对照者的肿瘤坏死因子 β 804C/A 进行基因分型, 用酶联免疫吸附法测定其血清水平。结果发现, CC、CA 和 AA 型基因在冠心病组频率分别为 25.9%、49.3% 和 24.8%, 在对照组分别为 37.2%、45.6% 和 17.2%, 老年冠心病患者中的 AA 基因型显著高于对照组 ($P < 0.05$)。基因型频率的相对风险分析发现, AA 型和 CA 型患者冠心病的风险是 CC 型的 1.701 倍 (OR = 1.701, 95% CI 为 1.173~2.466)。冠心病组肿瘤坏死因子 β 血清水平 (47 ± 22 ng/L) 明显高于对照组 (13 ± 11 ng/L) ($P < 0.05$), 两组中 AA 基因型者肿瘤坏死因子 β 血清水平平均略高于 CC 型和 CA 型者, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。以上提示, 肿瘤坏死因子 β 804C/A 基因多态性与冠心病的发病有相关性, 804A 等位基因可能是冠心病发生的重要易感基因。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Tumor Necrosis Factor- β 804C/A Polymorphisms for Coronary Heart Disease in the Elderly in Hubei Province

WANG Ming, LI Yan, ZHANG Ping-An, JIANG Xue-Jun, and HUANG Cong-Xin

(Department of Clinical Laboratory Science, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Tumor Necrosis Factor- β ; Single Nucleotide Polymorphism; Genotypes; Polymerase Chain Reaction; ELISA; Hubei Province

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between tumor necrosis factor- β gene polymorphism as well as its serum levels and coronary heart disease. **Methods** Nested polymerase chain reaction (PCR) coupled with allele-specific PCR (AS-PCR) were used for the detection of tumor necrosis factor- β genotype in 290 elderly patients with coronary heart disease and 239 elderly healthy controls. The serum tumor necrosis factor- β levels were measured by ELISA. **Results** Three genotypes CC, CA, AA were detected in both groups, and the genotypes were 25.9% and 37.2%, 49.3% and 45.6%, 24.8% and 17.2%, patients and controls respectively. There were statistically significant differences in the distributions of the genotypes ($P < 0.05$) and the allele frequencies ($P < 0.05$) between two groups. The relative risk suffered from coronary heart disease of AA and CA genotypes was 1.701 times of the CC genotype (OR = 1.701, 95% CI: 1.173~2.466). The serum tumor necrosis factor- β levels of the patients were significantly different from that of the controls ($P < 0.05$), however, among different tumor necrosis factor- β genotypes (CC, CA, AA) of patients and controls respectively, there were no significant differences. **Conclusions** The single nucleotide polymorphism (SNP) at position 804 in the exon 3 of tumor necrosis factor- β gene is associated with coronary heart disease and the allele A may be a risk factor for coronary heart disease in Chinese. tumor necrosis factor- β gene polymorphism may affect coronary heart disease through its serum levels.

冠心病(coronary heart disease, CHD)是危害老年人健康的主要疾病之一, 近年来, 越来越多基础和临床证据显示^[1-3], 炎症反应与细胞因子及细胞因子间的网络调控在动脉粥样硬化的发生、发展中起着重要作用, 有研究证实肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis

factor- β , TNF- β)与动脉粥样硬化存在密切关系^[4]。Messer等^[5]报道了TNF- β 第3外显子内的804C/A单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)可能影响TNF- β 的表达水平, 与冠心病的发病可能相关^[6]。因此, 本文采用套式聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)结合等位基因特异性扩增技术(allele-specific PCR, AS-PCR), 对我国湖北地区老年冠心病患者和健康人TNF- β 基因多态性的分布及其血清水平进行调查, 探讨TNF- β 基因多态性及血清TNF- β 水平与冠心病的相关性。

[收稿日期] 2004-03-25 [修回日期] 2004-09-28

[基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目(2003ABA183)

[作者简介] 汪明, 硕士研究生, 主要从事炎症因子与冠心病的研究。李艳, 心血管内科博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向主要为冠心病、高血压和糖尿病分子生物学发病机制的研究, 在国内外发表多篇论文。

1 对象和方法

1.1 对象及分组

冠心病组为 290 例冠心病患者(其中男 156 例,女 134 例),年龄 60~82 岁,平均 64 ± 12 岁,均为我院心内科、CCU 及老年科住院患者,冠心病诊断符合世界卫生组织(WHO)1979 年制定的标准,并排除高血压、糖尿病和家族性高胆固醇血症等。对照组为 239 例门诊体检健康者(其中男 135 例,女 104 例),年龄 55~81 岁,平均 61 ± 14 岁,排除肝、肾、内分泌和心脑血管疾病。两组对象均为湖北地区汉族非血缘个体。

1.2 模板提取

采用改良碘化钠法^[7]提取外周血白细胞 DNA。参照文献[8]设计 1 对外引物, P1: 5'-AGA GCT GGT GGG GAC ATG TCT G-3', P2: 5'-CCG TGC TTC GTG CTT TGG ACT A-3', 扩增长度为 740 bp(包含 804 位点); 针对 TNF- β 804 位点的等位基因分别设计两条特异性引物, P3: 5'-GAG GTG AGC AGC AGG TTT GAG GG-3', P4: 5'-GAG GTG AGC AGC AGG TTT GAG GT-3', 两者仅 3' 端的末端碱基不同, 分别对应于 804 位点的两个等位基因(C/A), 两者分别与 P2 配对, 构成两套内引物, 扩增特异性 694 bp 的条带, 以上引物均由北京赛百盛公司合成。

1.3 基因分型及产物鉴定

扩增特异性 DNA 片段需两步完成。第一步扩增使用外引物, 扩增体系为 25 μ L, 含 1 ng 引物 P1 和 P2, 0.05 mmol/L dNTP, 1 u Taq DNA 聚合酶, 4 μ L 模板 DNA, 10 \times PCR 缓冲液(含 1.5 mmol/L MgCl₂)。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 6 min, 按以下条件循环 30 次, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 末次循环后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。第二步扩增使用内引物并采用 AS-PCR 技术, 扩增体系为 25 μ L, 含 1 ng 等位基因特异性引物 P2 和 P3(或 P4), 0.05 mmol/L dNTP, 1 u Taq DNA 聚合酶, 2 μ L 首轮扩增的产物, 10 \times PCR 缓冲液(含 1.5 mmol/L MgCl₂)。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 6 min, 加入 Taq 酶, 按以下条件循环 7 次, 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s \rightarrow 65 $^{\circ}$ C 退火 5 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 末次循环后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。扩增在 GeneAmp PCR System 2700 型基因扩增仪(Applied Biosystems 公司, USA)上进行, 试剂购自 TaKaRa 公司(日本)。

取 8 μ L PCR 扩增产物, 经含溴化乙锭的 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果经 VILBER/LOURMAT 凝胶成像及分析系统(法国)拍照, 分析判读。若仅在使用特异性引物 P3(或 P4)时扩增出 694 bp 的条带,

则为 CC 型(或 AA 型)纯合子, 如果两份 AS-PCR 均扩增出 694 bp 条带, 则为 CA 型杂合子。

1.4 肿瘤坏死因子 β 血清水平及血脂水平的测定

采用酶联免疫吸附法测定 TNF- β 血清水平, 试剂盒为 BMS human TNF- β ELISA BMS202(购自 MedSystems Diagnostics GmbH 公司, Austria)。酶法测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG); 遮蔽法直接测定高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC); 载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 用双波长免疫透射比浊法测定。血脂水平测定在 OLYMPUS AU1000 型(日本)全自动生物化学分析仪上进行。

1.5 统计学处理

肿瘤坏死因子- β 基因频率采用频率计数法计算; 均值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用 t 检验和单因素方差分析(组间比较用 LSD 法), 计数资料和研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, 全部结果均采用 SPSS11.5 软件包处理。

2 结果

2.1 肿瘤坏死因子 β 基因型检测结果

采用套式 PCR 结合 AS-PCR 成功地扩增到特异性 694 bp 片段, 根据此片段存在与否, 可以区分 TNF- β 804C/A 的 3 种基因型(图 1, Figure 1)。

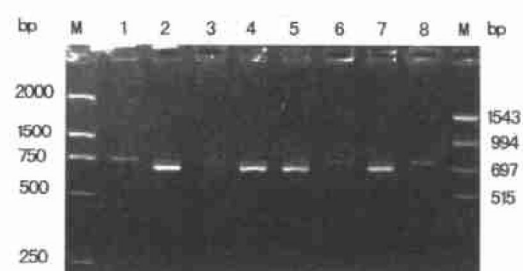


图 1. 肿瘤坏死因子- β 基因多态性的凝胶电泳结果 M 为 DNA 标准物, 1 和 8 为外引物扩增产物, 2 和 3 为 CC 型, 4 和 5 为 CA 型, 6 和 7 为 AA 型。

Figure 1. The electrophoresis conclusion of polymorphism in TNF- β gene

2.2 冠心病组与对照组肿瘤坏死因子 β 基因型及等位基因频率比较

两组基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定

律,具有群体代表性。CHD 组 TNF- β 基因 CC 型、CA 型和 AA 型频率分别为 25.9%、49.3% 和 24.8%, 对照组 TNF- β 基因 CC 型、CA 型和 AA 型频率分别为 37.2%、45.6% 和 17.2%, 两组间比较差异有显著性($\chi^2 = 9.458, P < 0.05$), CHD 组 AA 型频率明显高

于对照组。CHD 组 C 和 A 等位基因频率分别 50.5% 和 49.5%, 对照组分别为 60.0% 和 40.0%, 两组间比较差异也有显著性($\chi^2 = 9.598, P < 0.05$) (表 1, Table 1)。

表 1. 湖北地区汉族人群肿瘤坏死因子 β 基因型和等位基因分布及风险分析(%)

Table 1. The distributions of TNF- β genotype and allele and its risk analysis in people of Hubei Province

分 组	n	基因型频率				等位基因频率	
		CC	CA	AA	CA+ AA	C	A
冠心病组	290	75(25.9)	143(49.3)	72(24.8)	215(74.1)	293(50.5)	287(49.5)
对照组	239	89(37.2)	109(45.6)	41(17.2)	150(62.8)	287(60.0)	191(40.0)
χ^2			9.458		7.792 ^a		9.598
P			0.009		0.005 ^a		0.002
OR (95% CI)			1.701 ^a (1.173~ 2.466)				1.472 ^b (1.152~ 1.880)

a: AA 型+ CA 型与 CC 型比较; b: 等位基因 A 与等位基因 C 比较。

2.3 冠心病组与对照组间肿瘤坏死因子 β 血清水平及血脂水平的比较

两组在性别和年龄上进行了匹配。CHD 组 TNF- β 血清水平 (47 ± 22 ng/L) 高于对照组 (13 ± 11 ng/L), 差异有显著性 ($P < 0.05$); 每组中均以 AA 型血清水平最高, 但与同组的其它基因型比较, 差异无

显著性 ($P > 0.05$)。CHD 组 TC、TG 和 LDLC 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 在两组之间比较差异无显著性 ($P > 0.05$); TG 和 HDLC 水平各基因型之间差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 2, Table 2)。

表 2. 冠心病组与对照组血脂水平及血清肿瘤坏死因子 β 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The comparison of serum TNF- β and lipid levels in CHD group and control group

分 组	n	总胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	载脂蛋白 AI (g/L)	载脂蛋白 B (g/L)	TNF- β (ng/L)
对照组	239	4.29 \pm 0.76	1.12 \pm 0.49	1.25 \pm 0.30	2.29 \pm 0.86	1.29 \pm 0.53	0.97 \pm 0.39	13 \pm 11
冠心病组	290	4.98 \pm 1.15 ^a	1.97 \pm 1.06 ^a	1.15 \pm 0.33	3.21 \pm 0.91 ^a	1.24 \pm 0.25	1.13 \pm 0.32	47 \pm 22 ^a
CC 型	75	4.92 \pm 1.21	2.35 \pm 1.65	1.12 \pm 0.39	3.38 \pm 0.79	1.24 \pm 0.31	1.08 \pm 0.27	37 \pm 16
CA 型	143	4.98 \pm 0.99	2.01 \pm 1.99	1.14 \pm 0.32	3.22 \pm 0.83	1.23 \pm 0.22	1.14 \pm 0.30	49 \pm 23
AA 型	72	5.03 \pm 1.03	1.55 \pm 0.70 ^b	1.19 \pm 0.32 ^b	3.01 \pm 0.83	1.24 \pm 0.24	1.12 \pm 0.29	51 \pm 21

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 CC 型比较。

3 讨论

肿瘤坏死因子 β 也称为淋巴毒素 (lymphotoxin, LT), 是肿瘤坏死因子超家族中重要的成员之一。其基因位于第六号染色体 6p²¹, 全长约为 3 kp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成。肿瘤坏死因子 β 与肿瘤坏死因子 α 在分子结构以及生物学活性上有许多相似之处, 广泛参与免疫系统的发育、炎症反应和免疫调节等^[9], 在动脉硬化症及动脉粥样硬化的形成和发展过程中起着重要作用^[6,8]。Sandra 等^[4] 应用免疫组织化学染色技术显示动脉粥样斑块内存在

大量肿瘤坏死因子 β , 肿瘤坏死因子 β 可上调血管内皮细胞表面粘附分子的表达, 并参与激活巨噬细胞, 促进炎症反应, 还可能参与脂质代谢的调节, 从而参与动脉粥样硬化的全程; Messer 等^[5] 认为, 这一点突变对肿瘤坏死因子 β 表达水平有影响, 但尚存在争议。

冠心病组和对照组之间比较, 肿瘤坏死因子 β 基因型及等位基因分布差异均有显著性 ($P < 0.05$), 冠心病组 AA 型频率明显高于对照组。基因型频率的相对风险分析发现, AA 型+ CA 型基因型患

冠心病的风险是 CC 型的 1.701 倍。A 等位基因携带者患冠心病的危险性增加了 1.472 倍,提示 A 等位基因可能是冠心病的易感基因,与日本学者 Kuiochi 等^[6]报道结果一致。最近有学者报道,肿瘤坏死因子 β 基因敲除(TNF- $\beta^{-/-}$)小鼠的动脉粥样斑块面积相对于对照组减小约 60%^[4],提示其在斑块形成和发展过程中可能起到重要作用,而本研究显示冠心病组肿瘤坏死因子 β 血清水平(47 ng/L)高于对照组(13 ng/L, $P < 0.05$),但不同基因型间肿瘤坏死因子 β 血清水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。患者各基因型间血脂水平比较发现,AA 型的 TG 水平较 CC 型低,而 HDLC 水平较 CC 型高($P < 0.05$),传统观念认为, TG 是冠心病的危险因素,而 HDLC 则具有保护作用,这显然不能用脂源学说来解释,提示此类人群中炎症因子在冠心病发病机制中的作用不容忽视。

冠心病是一种老年多发病,受遗传、环境等多种因素的影响,其中炎症和遗传是冠心病发病学中的两种重要机制。基因多态性直接关系到人类对疾病的易感性、对环境因子及治疗反应的差异性以及疾病临床表型的多样性,而炎症分子基因多态性与冠心病关系的研究则有可能把炎症和遗传两种机制在一定程度上联系起来。本文初步认为肿瘤坏死因

子 β 804C/A 基因多态性与冠心病的发生有相关性,等位基因 A 可能是冠心病重要的易感基因。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115-126
- [2] Murray CJ, Lopez, AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet*, 1997, **349**: 1 436-442
- [3] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002, **105**: 1 135-143
- [4] Sandra AS, Cynthia MV, Ren'e CL. Loss of lymphotoxin α but not tumor necrosis factor β reduces atherosclerosis in mice. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 12 364-368
- [5] Messer G, Spengler U, Jung MC. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med*, 1991, **173**: 209-219
- [6] Kouichi O, Yozo O, Aritoshi I. Functional SNPs in the lymphotoxin α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genet*, 2002, **32**: 650-654
- [7] 李艳,徐朴,张平安. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 451-454
- [8] Mycko M, Kwinkowski M, Buenafe AC. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin α . *J Neuroimmunology*, 1998, **84**: 198-206
- [9] Hugh M, Sibyl M, Rachel E. Multiple roles for tumor necrosis factor- α and lymphotoxin α/β in immunity and autoimmunity. *Arthritis Res*, 2002, **4** (suppl 3): S141-S152

(此文编辑 朱雯霞)