

急性心肌梗死患者血清 MCP-1 水平及其与 MCP-1 2518G/A 多态性的关系

姜九, 何君杰, 朱从飞, 唐文锐

(涟水县人民医院, 江苏省涟水县 223400)

[关键词] 单核细胞趋化蛋白 1; 急性心肌梗死; 基因多态性

[摘要] 目的 探索中国苏北涟水县汉族人群急性心肌梗死(AMI)患者血清单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)水平及其与 MCP-1 2518G/A 多态性的关系。方法 73 例无冠状动脉病变者(对照组)和 94 例 AMI 患者(AMI 组)的血清 MCP-1 水平采用 ELISA 检测, MCP-1 2518G/A 多态性采用 PCR-RFLP、DNA 测序技术方法检测。结果 血清 MCP-1 水平(以 M/IQR 表示)在 AMI 组为 186.24/285.15 ng/L, 显著高于对照组的 100.71/134.02 ng/L($P=0.001$)。多元线性回归分析显示, 血清 MCP-1 水平与男性负相关, 与高血压、糖尿病、吸烟正相关, 与年龄和血脂异常无明显相关。经校正高血压、糖尿病、年龄、性别、吸烟和血脂水平等因素后, $\geq 75\%$ 分位数的血清 MCP-1 水平与 AMI 的发病风险呈正相关(OR=2.764, 95%CI 为 1.061~7.204, $P=0.037$)。MCP-1 2518G/A 基因型分布和等位基因频率在 AMI 组与对照组之间无显著差异($P>0.05$), 血清 MCP-1 水平在对照组、AMI 组各基因型间无显著差异($P>0.05$)。结论 中国苏北涟水县汉族人群的 AMI 患者血清 MCP-1 水平显著高于对照者; 血清 MCP-1 水平受性别、高血压、糖尿病、吸烟影响, 但 $\geq 75\%$ 分位数的血清 MCP-1 水平是 AMI 的独立预测因素; MCP-1 2518G/A 多态性不增加 AMI 的易感性, 也不影响 MCP-1 血清水平。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The relationship between serum MCP-1 level and MCP-1 2518G/A polymorphism in patients with acute myocardial infarction

JIANG Jiu, HE Jun-Jie, ZHU Cong-Fei, TANG Wen-Rui

(The People's Hospital of Lianshui County, Huai'an, Jiangsu 223400, China)

[KEY WORDS] Monocyte chemoattractant protein-1; Acute myocardial infarction; Gene polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) level and MCP-1 2518G/A polymorphism in patients with acute myocardial infarction (AMI) in Chinese Han population in Lianshui County of Northern Jiangsu. **Methods** Serum MCP-1 level was measured by ELISA, and the MCP-1 2518 G/A polymorphism was genotyped by PCR-RFLP in 94 patients with AMI and 73 control subjects. **Results** Serum MCP-1 level (expressed in M/IQR) was significantly higher in AMI group (186.24/285.15 ng/L) than that in control group (100.71/134.02 ng/L, $P=0.001$). Multiple linear regression analysis revealed that the serum MCP-1 level was negatively correlated with male, positively correlated with smoking, history of diabetes mellitus and hypertension, but unrelated with old age and dislipidemia in AMI group. After adjustment for hypertension, diabetes mellitus, age, gender, dislipidemia, and smoking, serum MCP-1 level of higher than 75% quantile was positively correlated with the risk of AMI (OR=2.764, 95%CI was 1.061~7.204, $P=0.037$). There was no significant difference in genotype distribution and allele frequency of MCP-1 2518G/A between AMI group and control group ($P>0.05$). There was no significant difference in serum MCP-1 level among the genotypes of the control group and the AMI group ($P>0.05$). **Conclusion** Serum MCP-1 level was significantly higher in AMI group than that in control group in Chinese Han population in Lianshui County of Northern Jiangsu. Serum MCP-1 level was affected by sex, hypertension, diabetes, and smoking, but serum MCP-1 level of higher than 75% quantile was an independent predictor of AMI. MCP-1 2518G/A polymorphism did not increase the susceptibility of AMI, nor affect the serum level of MCP-1.

[收稿日期] 2016-12-02

[修回日期] 2017-12-14

[作者简介] 姜九, 硕士, 主要从事心血管疾病的临床和基础研究, E-mail 为 jj2908@163.com。

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是严重危害人类健康的疾病, 炎症反应在其发生发展过程中起重要作用。血液中的单核细胞趋化至血管内皮下转变成巨噬细胞, 后者不断吞噬氧化修饰低密度脂蛋白形成泡沫细胞, 促进血管平滑肌细胞增殖。熊龙根等^[1]发现单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 水平与球囊损伤后内膜增生有关。MCP-1 通过诱导斑块内细胞表达白细胞介素、组织因子、基质金属蛋白酶等使斑块变成易损斑块, 斑块破裂继发血栓形成从而诱发急性心脑血管疾病。李世英等^[2]发现脑梗死患者血清 MCP-1 水平升高。张如奔等^[3]发现急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 患者血清 MCP-1 水平显著高于正常对照组和稳定型心绞痛组。王秋波等^[4]发现 MCP-1 2518 位点的多态性与 AMI 的发病具有相关性。本研究旨在探索中国苏北涟水县汉族人群 AMI 患者血清 MCP-1 水平及其与 MCP-1 2518G/A 多态性的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象

所有入选者为 2012 年 9 月至 2016 年 6 月期间在涟水县人民医院心内科的住院患者, 其中对照组 (经冠状动脉造影证实无冠状动脉病变者) 73 例, 男 38 例, 女 35 例, 年龄 31~76 岁, 平均 59.04 ± 12.13 岁; AMI 组 94 例, 男 72 例, 女 22 例, 年龄 31~85 岁, 平均 64.35 ± 11.90 岁, 均符合 2012 年 AHA/ACC 关于 AMI 的诊断标准。所有研究对象均排除严重肝肾功能不全、严重慢性感染、风湿类疾病和肿瘤者。该研究征得所有入选者知情同意并经本院医学伦理委员会批准。

1.2 一般临床资料采集

收集所有入选者的一般临床资料, 包括性别、年龄、冠状动脉造影、高血压病史、高血脂、高血糖和吸烟史等信息。

1.3 MCP-1 2518 基因分型

采用酚-氯仿法提取周静脉血白细胞基因组 DNA, 置于 -70°C 冰箱保存备用。采用 PCR-RFLP 方法检测 MCP-1 2518 基因型。根据 GenBank 的 MCP-1 基因全 DNA 序列和相关文献设计引物 (中国大连宝生物工程有限公司提供), 上游引物为 5'-TCT CTC ACG CCA GCA CTG ACC-3', 下游引物为 5'-GAG TGT TCA CAT AGG CTT CTG-3'。PCR 扩增

反应体系 (25 μL): 热启动混合 Taq 酶 12.5 μL , 模板 DNA 1 μL , 上游引物 0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , 去离子水 10.5 μL 。扩增条件: 95°C 预变性 5 min \rightarrow 95°C 变性 40 s \rightarrow 60°C 退火 30 s \rightarrow 72°C 延伸 40 s, 共 30 个循环, 72°C 延伸 10 min。取 2 μL PCR 扩增产物在自动凝胶成像和分析系统观察扩增结果, 确定 PCR 产物为所需的片段 (234 bp)。对目的片段行限制性酶切: ①酶切反应体系及条件: Pvu II 内切酶 1 μL (由大连宝生物公司提供), PCR 产物 10 μL , 去离子水 7 μL , 缓冲液 2 μL , 混匀后于 37°C 水浴过夜; ②基因分型: 取 2 μL 上样缓冲液溴酚蓝和 5 μL 酶切产物混匀后, 用微量吸管将混合液加入凝胶槽孔中; ③电泳: 通过凝胶成像系统仪观察基因型 (AA 型酶切后仅显示 234 bp 1 种片段, GA 型酶切后显示 234 bp、159 bp 和 75 bp 3 种片段, GG 型酶切后显示 159 bp 和 75 bp 2 种片段); ④抽样检测目的片段: 抽样目的 DNA 片段送至大连宝生物工程有限公司进行基因测序, 进一步验证目的片段。

1.4 MCP-1 水平测定

取入选者外周空腹静脉血 5 mL, 室温下静置 1 h, 离心后取上层血清, -70°C 冰箱保存。采用 ELISA (试剂盒由 Adlitteram Diagnostic Laboratories, Inc 提供) 检测血清 MCP-1 水平。

1.5 血糖和血脂水平测定

在自动生化分析仪上进行血糖、血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平测定。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数值变量以中位数/四分位数间距 (M/IQR) 表示或以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分类变量以百分比表示。血清 MCP-1 水平组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验, 组内基因型间比较应用 Kruskal-Wallis H 检验, 其它数值变量组间比较采用方差分析或 t 检验。研究对象基因型与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、分类变量组间比较采用 χ^2 检验, 采用多元线性回归分析冠心病相关危险因素与血清 MCP-1 水平的相关性, 采用多变量 Logistic 回归分析血清 MCP-1 水平与 AMI 的相关性。多元线性回归分析和多变量 Logistic 回归分析采用逐步回归进行筛选, 进入标准为 0.05, 剔除标准为 0.10。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般临床资料比较

AMI 组年龄、男性、高血压、糖尿病、吸烟者的比率及血清 TC、LDL 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 两组血清 TG、HDL 水平无显著差异 ($P > 0.05$; 表 1)。

表 1. AMI 组与对照组的一般临床资料比较

Table 1. Comparison of general clinical data between AMI group and control group

项 目	AMI 组 ($n=94$)	对照组 ($n=73$)	P 值
年龄 (岁)	64.35±11.90	59.04±12.13	0.005
男性[例(%)]	72(76.60)	38(52.05)	0.001
吸烟[例(%)]	52(55.32)	19(26.03)	<0.001
高血压[例(%)]	67(71.28)	31(42.47)	<0.001
糖尿病[例(%)]	29(30.85)	6(8.22)	<0.001
TC (mmol/L)	4.69±1.21	4.27±0.92	0.017
LDL (mmol/L)	2.91±0.98	2.50±0.63	0.003
HDL (mmol/L)	1.12±0.29	1.13±0.41	0.805
TG (mmol/L)	1.50±0.76	1.85± 1.34	0.083

2.2 血清 MCP-1 水平比较

对照组血清 MCP-1 水平 (M/IQR) 为 100.71/134.02 ng/L, AMI 组血清 MCP-1 水平为 186.24/285.15 ng/L, AMI 组血清 MCP-1 水平显著高于对照组 ($P=0.001$; 图 1)。

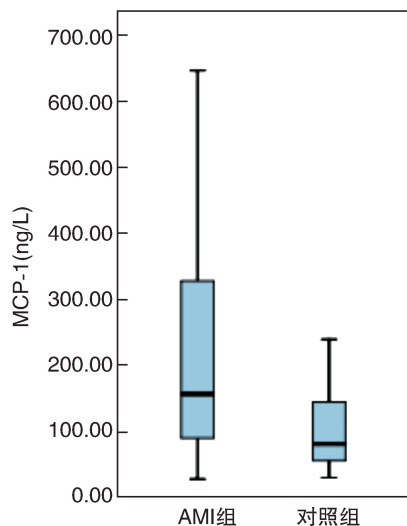


图 1. MCP-1 水平在 AMI 组与对照组之间分布的箱式图
箱式图箱子中间横线表示中位数, 下端表示下四分位数, 上端表示上四分位数, 两端连线分别是最小值和最大值。

Figure 1. Box pattern of MCP-1 level between AMI group and control group

2.3 AMI 患者血清 MCP-1 水平与冠心病相关危险因素的相关性

以男性=1、女性=0, 糖尿病史有=1、无=0, 吸烟=1、不吸烟=0, 高血压有=1、无=0, 血脂不正常=1、正常=0, 年龄 ≥ 60 岁=1、 <60 岁=0 进行多元线性回归分析, 结果显示: 血清 MCP-1 水平与男性呈负相关, 与吸烟、糖尿病和高血压呈正相关, 与年龄和血脂异常无明显相关(表 2)。

表 2. 血清 MCP-1 水平与冠心病相关危险因素的相关性

Table 2. Correlation between serum MCP-1 level and risk factors associated with coronary heart disease

影响因素	b'	t	P 值
年龄	0.074	1.041	0.299
男性	-0.273	-3.666	0.000
高血压	0.212	3.040	0.003
糖尿病	0.237	3.422	0.001
吸烟	0.438	5.807	0.000
血脂异常	0.065	0.908	0.365

2.4 血清 MCP-1 水平与 AMI 的相关性

经校正高血压史、糖尿病史、吸烟、血脂水平、年龄和性别等因素后, 多变量 Logistic 回归分析显示, $\geq 75\%$ 分位数的血清 MCP-1 水平是 AMI 发病风险的一个独立预测因素(表 3)。

表 3. 血清 MCP-1 水平与 AMI 的相关性

Table 3. Correlation between serum MCP-1 level and AMI

项目	b	S_b	Wald χ^2	P 值	OR	95%CI
AMI	1.017	0.489	4.329	0.037	2.764	1.061~7.204

注: 多因素调整包括血清 MCP-1 水平 ($\geq 75\%$ 分位数血清 MCP-1 水平=1, 否则=0)、糖尿病史(有=1, 无=0)、吸烟(吸烟=1, 不吸烟=0)、高血压病史(有=1, 无=0)、性别(男=1, 女=0)、年龄(<45 岁=1, 45 岁~ <55 岁=2, 55 岁~ <65 岁=3, ≥ 65 岁=4)、性别(男=1, 女=0)和血脂水平(异常=1, 正常=0); AMI 组 75% 分位数的血清 MCP-1 水平为 335.07 ng/L。

2.5 MCP-1 2518G/A 基因型分布及等位基因频率比较

采用 PCR-RFLP 检测 94 例 AMI 患者和 73 例经冠状动脉造影检查证实无冠状动脉病变者 MCP-1 2518G/A 多态性(图 2), PCR 产物经测序进一步验证(图 3)。入选人群符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律 ($P > 0.05$), 具有群体代表性。AMI 组 MCP-1 2518G/A 基因型分布: GG 为 37.24%, GA 为

51.06%,AA 为 11.70%,等位基因 G 和 A 频率分别为 62.77%、37.23%;对照组 MCP-1 2518G/A 基因型分布:GG 为 32.88%,GA 为 49.31%,AA 为 17.81%,等位基因 G 和 A 频率分别为 57.53%、42.47%;两组基因型分布和等位基因频率之间皆无显著差异($P>0.05$;表 4)。

2.6 血清 MCP-1 水平与 MCP-1 2518G/A 多态性的相关性

血清 MCP-1 水平在 AMI 组和对照组组内各基因型间均无显著差异($P>0.05$;表 5)。

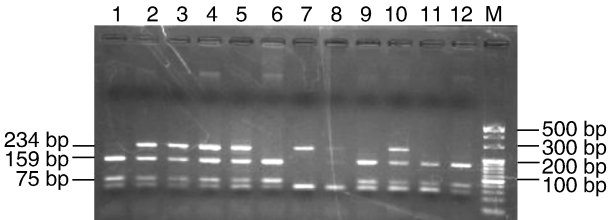


图 2. MCP-1 2518G/A 多态性的 PCR 产物酶切电泳图
M 为 20 bp DNA ladder marker,第 1、6、9、11、12 条带为 GG 型,第 2、3、4、5、8、10 条带为 GA 型,第 7 条带为 AA 型。

Figure 2. MCP-1 2518G/A polymorphism of PCR product enzyme cut electrophoresis

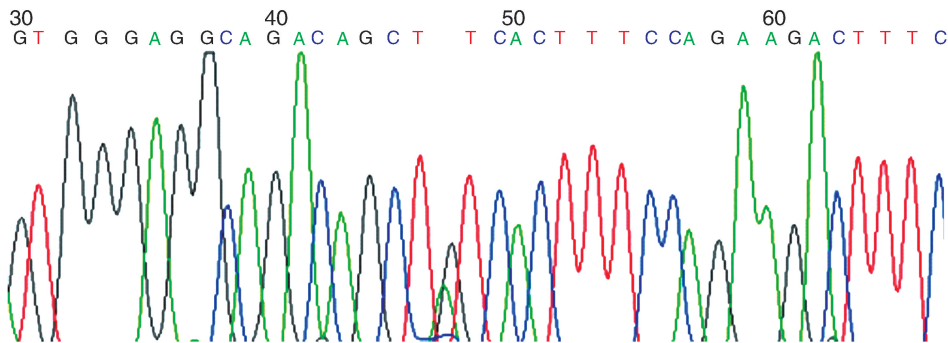


图 3. MCP-1 2518G/A 多态性 PCR 产物测序图
Figure 3. PCR product sequencing of MCP-1 2518G/A polymorphism

表 4. AMI 组与对照组的 MCP-1 2518G/A 多态性分布[例(%)]
Table 4. MCP-1 2518G/A polymorphism distribution in AMI group and control group [Case(%)]

项 目	对照组($n=73$)	AMI 组($n=94$)	P 值
基因型			
AA	13(17.81)	11(11.70)	0.525
GA	36(49.31)	48(51.06)	
GG	24(32.88)	35(37.24)	
等位基因			
G	84(57.53)	118(62.77)	0.367
A	62(42.47)	70(37.23)	

3 讨 论

炎症机制不但与动脉粥样硬化的发生发展有关,而且与动脉粥样硬化的多种并发症的发生密切相关^[5]。斑块破裂、血小板聚集、血栓形成造成冠状动脉闭塞是 AMI 的发病机制已成为共识,炎症反应在此过程中起了关键性的作用。MCP-1 通过诱导斑块内细胞表达白细胞介素、组织因子、基质金属蛋白酶等使斑块变成易损斑块,斑块破裂继发血栓形成导致冠状动脉闭塞而致 AMI 发生。

本研究发现 AMI 组 MCP-1 的血清水平明显高于对照组,此结果与之前的研究结果^[3,6,9]一致。多元线性回归分析发现血清 MCP-1 水平与男性呈负相关,与高血压、糖尿病和吸烟呈正相关,与年龄和血脂异常无明显相关,这与 McDermott 等^[7]研究发现血清 MCP-1 水平与年龄、吸烟、TG、体重指数和腰臀比明显相关的结果不尽相同,血清 MCP-1 水平与冠心病相关因素相关性的研究结果之间所存在的偏差可能有:①所观察的冠心病相关因素指标不一;②研究对象不完全相同;③研究样本含量不同;④不同种族之间冠心病相关因素存在差异有关。经校正高血压、糖尿病、年龄、性别、吸烟和血脂水平等因素后,多变量 Logistic 回归分析发现 $\geq 75\%$ 分位数的 MCP-1 血清水平是 AMI 独立预测因素,此结果与 de Lemos 等^[6]的研究结果基本一致。AMI 组 MCP-1 的血清水平显著高于对照组,但血清 MCP-1 水平受多种冠心病相关危险因素的影响,且在对照组和 AMI 组分布明显重叠,这限制了血清 MCP-1 水平在预测、诊断 AMI 中的应用。

本研究发现, MCP-1 2518G/A 的基因型分布、等位基因频率在 AMI 组与对照组之间无显著差异, MCP-1 2518 位点 G 等位基因者不影响其血清 MCP-1 水平,也不增加 AMI 的易感性。此研究结果与亚

表 5. AMI 组和对照组组内各基因型间血清 MCP-1 水平比较

Table 5. Comparison of serum MCP-1 levels among the genotypes in AMI group and control group

分 组	基因型	MCP-1(ng/L)	各基因型间 MCP-1 水平比较	P 值
对照组 (n=73)	AA (n=13)	77.99/77.49	AA : GA	0.248
	GA (n=36)	114.29/140.51	GA : GG	0.963
	GG (n=24)	113.00/161.35	AA : GG	0.506
	P	0.569		
AMI 组 (n=94)	AA (n=11)	161.16/192.76	AA : GA	0.870
	GA (n=48)	161.57/275.71	GA : GG	0.397
	GG (n=35)	211.71/405.73	AA : GG	0.469
	P	0.623		

洲人群 MCP-1 2518G/A 多态性与冠心病关系的研究结果^[10-11]一致。但对高加索、弗明翰地区人群 MCP-1 2518G/A 多态性与冠心病关系的研究发现, MCP-1 2518 位点 G 等位基因者血清 MCP-1 水平较高,并且是冠心病的一个易感基因^[6-7]。这种差异可能与下列因素有关:①中国、日本人群中 MCP-1 2518 位点 G 等位基因频率约 60%^[10-11],高加索、弗明翰地区人群中 MCP-1 2518 位点 G 等位基因频率约 30%^[6-7],很可能是所研究人群的遗传背景不同,单倍体的结构也不同导致研究结果不一致;②本研究中对照组是经冠状动脉造影检查排除了冠状动脉病变者,对照组的入选标准不同也可能导致结果有偏差;③本研究样本含量少及研究对象局限于苏北涟水县的汉族人群也可能导致结果有偏差。

中国苏北涟水县汉族人群中 AMI 组血清 MCP-1 水平显著高于对照组;血清 MCP-1 水平受性别、高血压、糖尿病、吸烟影响,但≥75%分位数的 MCP-1 血清水平是 AMI 独立预测因素;MCP-1 2518G/A 多态性不增加 AMI 的易感性,也不影响 MCP-1 血清水平。

[参考文献]

[1] 熊龙根,黎德,董 颀. 球囊扩张术后大鼠腹主动脉钙调神经磷酸酶、血浆 MCP-1 的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 231-234.

[2] 李世英,李 峥,张晋霞,等. 氧化型低密度脂蛋白、单核细胞趋化蛋白 1 与脑梗死颈动脉粥样硬化的关系[J].中国动脉硬化杂志, 2016, 24(5): 495-498.

[3] 张如卉,李志樑,付 强,等. 冠心病患者血浆中单核细

胞趋化蛋白-1 的意义[J]. 临床心血管病杂志, 2012, 28(5): 367-370.

[4] 王秋波,张蕴莉. 单核细胞趋化蛋白-1 2518A/G 基因多态性与急性心肌梗死的相关性研究[J]. 中国全科医学, 2012, 5(5B): 1 600-602.

[5] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 2(36): 141-152.

[6] de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2003, 107 (5): 690-695.

[7] McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, et al. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study[J]. Circulation, 2005, 112(8): 1 113-120.

[8] 章春艳,曹政杨,勇詹艳. 冠心病患者 Fractalkine、单核细胞趋化蛋白-1 和白细胞介素-8 的检测及意义[J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 4(4): 485-487.

[9] 李 纯. MCP-1、HCY 水平与冠心病发病相关性的临床研究[J]. 中国医学工程, 2014, 4(5): 56-57.

[10] Iwai N, Kajimoto K, Kokubo Y, et al. Assessment of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 gene on serum MCP-1 levels and myocardial infarction in Japanese [J]. Circ J, 2006, 70(7): 805-809.

[11] Zhong C, Luzhan Z, Genshan M, et al. Monocyte chemoattractant protein-1-2518G/A polymorphism, plasma levels, and premature stable coronary artery disease[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(1): 7-12.

(此文编辑 文玉珊)