

白细胞介素-6 基因多态性与冠心病的相关性研究及其对血脂的影响

韦叶生 蓝艳 刘运广 唐任光 蓝景生

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-6(IL-6) 基因启动子区基因-572 位点和-634 位点多态性与冠心病的关系, 及其对血脂、脂蛋白、载脂蛋白水平的影响。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法, 检测 165 例冠心病(冠心病组)患者和 170 名健康人(对照组)的 IL-6 基因型; 按常规方法测定血脂、脂蛋白、载脂蛋白水平。结果 冠心病组总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平均明显高于对照组($P < 0.05$); IL-6 基因-634 位点多态性在冠心病组和对照组的分布差异无显著性($P > 0.05$), 而 IL-6 基因-572 位点多态性在两组人群中的分布差异存在显著性($P < 0.05$); 等位基因频率的相对风险分析发现, G 等位基因携带者患冠心病的风险是 C 等位基因的 1.652 倍[相对比值比(OR)=1.652, 95% 可信区间(CI): 1.137~2.401], 携带 G 等位基因的冠心病个体血清 TC 水平显著高于不携带者($P < 0.05$)。结论 IL-6 基因-572 位点多态性与冠心病的发病具有相关性, 其中 G 等位基因是冠心病重要的遗传标记; IL-6 基因-572 位点多态性可能通过影响血脂水平而影响冠心病的发生。

【关键词】 白细胞介素-6; 冠心病; 基因多态性; 血脂

Relationship between interleukin - 6 gene polymorphism and coronary heart disease and its effect on plasma lipid levels WEI Ye-sheng*, LAN Yan, LIU Yun-guang, TANG Ren-guang, LAN Jing-sheng. * Department of Clinical Laboratory Center, The Affiliated Hospital to Youjiang Nationality Medical College, Youjiang 533000, Guangxi, China

【Abstract】 **Objective** To study the relationship between interleukin - 6 (IL - 6) gene promoter - 572 C/G and - 634 C/G polymorphism and coronary heart disease (CHD) and the influence of IL - 6 gene polymorphism on levels of plasma lipid and lipoprotein. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR - RFLP) was used for the detection of IL - 6 genotype in 165 patients with CHD and 170 healthy persons. The plasma lipid and lipoprotein levels were measured by routine method. **Results** Plasma total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDL - C) of the patients with CHD were significantly higher than those of the controls (all $P < 0.05$). The distributions of IL - 6 gene - 634 C/G polymorphism were not different between CHD group and control group ($P > 0.05$), but the IL - 6 gene - 572 C/G polymorphism was significantly different between them ($P < 0.05$). The relative risk of CHD of C allele was 1.652 times to the G allele [odds ratio(OR)=1.652, 95% confidence interval (CI): 1.137 - 2.401]. The level of plasma lipid in G allele carriers was significantly higher than non-carriers ($P < 0.05$). **Conclusion** IL - 6 gene - 572 C/G polymorphism is associated with CHD, and G allele is an important genetic marker. IL - 6 gene polymorphism may affect CHD through elevation of plasma lipid and lipoprotein levels.

【Key words】 interleukin - 6; coronary heart disease; gene polymorphism; plasma lipid

目前冠心病的病因和发病机制尚未完全阐明, 但炎症细胞因子在其中的作用越来越受到关注。白细胞介素-6(interleukin - 6, IL - 6)是一种重要的炎症细胞因子, 在调节免疫应答和炎症反应中起重要作用, 可通过复杂的细胞因子网络促进动脉粥样硬化的发生和发展, 而动脉粥样硬化是冠心病的病理基础, 因此, IL - 6 在冠心病的发生和发展过程中

起重要作用。IL - 6 基因位于第 7 号染色体短臂上, 含 5 个外显子和 4 个内含子。研究发现, IL - 6 基因启动子区存在基因变异及基因多态性, 这种基因多态性与多种疾病存在密切相关性^[1-4]。与冠心病是否相关, 尚不清楚, 为此, 我们采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR - RFLP)方法, 研究 IL - 6 基因多态性与冠心病的关系, 并分析其与血脂、脂蛋白水平的关系, 为揭示冠心病的发病机制提供一定理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象: 2003 年 1 月—2004 年 3 月本院心内科的住院患者, 冠心病诊断符合 1979 年世界卫生

基金项目: 广西壮族自治区医药卫生科研项目(Z2004037)

作者单位: 533000 广西百色, 右江民族医学院附属医院检验中心(韦叶生, 蓝艳, 刘运广, 唐任光), 心内科(蓝景生)

作者简介: 韦叶生(1969-), 男(壮族), 广西桂林人, 博士研究生, 讲师(Email: weiyesheng@yahoo.com.cn)。

组织(WHO)制定的标准,排除糖尿病、家族性高胆固醇血症、甲状腺疾病、肾脏疾病、肝脏疾病等;冠心病组 165 例中男 125 例,女 40 例;年龄 45~89 岁,平均(61±11)岁。对照组为本院常规健康体检者,均经心电图、X 线胸片等检查排除心、脑、肝、肾等疾病;170 名健康体检者中男 127 名,女 43 名;年龄 40~82 岁,平均(60±10)岁。研究对象为广西地区非血缘个体;两组患者性别、年龄等基线资料经统计学处理差异均无显著性(P 均 >0.05),有可比性。

1.2 研究方法

1.2.1 引物设计与合成:参考文献[5,6]设计两对引物,由赛百盛有限公司合成。扩增 IL-6 基因-572 位点的一段 DNA 序列,上游引物:5'-GGAG-ACGCCTGAAGTAAGTGC-3',下游引物:5'-GAGTTTCTCTGACTC CATCGCAG-3';扩增 IL-6 基因-634 位点的一段 DNA 序列,上游引物:5'-GAGACGCCTGAAGTAAGTGC-3',下游引物:5'-AACCAAAGATGTTCTGAACCTGA-3'。

1.2.2 人类基因组 DNA 提取:参照已建立的改良碘化钠法^[7]。

1.2.3 PCR 扩增条件:IL-6 的 PCR 扩增反应体系均为 25 μ L,其中含 $10\times$ PCR 缓冲液(buffer) 2.5 μ L;2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L;上、下游引物各 20 mol/L;模板 DNA 5.0 μ L;Taq DNA 聚合酶 1.25 U;不足体积用灭菌双蒸水补足至 25 μ L。置热循环仪(Gene Amp PCR System2700 型,USA)中 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min。按下列程序循环 35 次:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;末次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

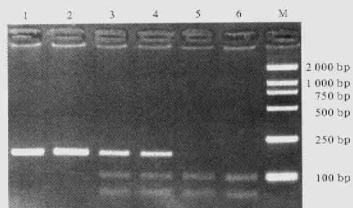
1.2.4 扩增产物的限制性酶切:分别取 PCR 扩增产物 10 μ L,用 8 U 限制性内切酶 Mbi I 酶切 IL-6 基因-572 位点;用 6 U 限制性内切酶 Bsr B I 酶切 IL-6 基因-634 位点,37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h,反应终止后,消化片段在质量分数为 3% 的琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭(EB)染色,染色后以 DL-2000 DNA 片段长度标准物为参考,在紫外灯下判断结果,并拍照。

1.2.5 血脂、脂蛋白及载脂蛋白(apo)水平测定:酶法测定血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG);遮蔽法直接测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C);apoA-I、apoB 用双波长免疫透射比浊法测定。以上测定均在 Olympus 1000 型全自动生化分析仪(日本产)上进行,每次测定均选用高、中、低 3 种质控样品进行质控,以上项目检测质控均符合英国 RIQAS 国际质控标准。

1.3 统计学方法:用 SPSS 10.0 软件包进行分析。基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算,各组间基因型和等位基因频率比较采用 χ^2 检验,并以相对比值(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示相对危险度。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;各组间数据比较依据资料的性质采用 t 检验或方差分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-6 基因型分析见图 1,图 2。



1,2:CC 基因型;3,4:CG 基因型;5,6:GG 基因型; M:DL-2000 Marker

图 1 IL-6 基因-572 位点多态性琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 Electrophoretogram results of IL-6 gene-572 C/G polymorphism



1~3:CC 基因型;4,5:CG 基因型;6,7:GG 基因型; M:DL-2000 Marker

图 2 IL-6 基因-634 位点多态性琼脂糖凝胶电泳图
Figure 2 Electrophoretogram results of IL-6 gene-634 C/G polymorphism

2.1.1 IL-6 基因-572 位点多态性:PCR 扩增产物片段大小为 163 bp,根据限制性内切酶 Mbi I 酶切片段的情况,基因型有 CC 型(163 bp 1 个条带)、CG 型(163 bp、101 bp、62 bp 3 个条带)和 GG 型(101 bp、62 bp 2 个条带)3 种。

2.1.2 IL-6 基因-634 位点多态性:PCR 扩增产物片段大小为 180 bp,根据限制性内切酶 Bsr B I 酶切片段的情况,基因型有 CC 型(180 bp 1 个条带)、CG 型(180 bp、120 bp、60 bp 3 个条带)和 GG 型(120 bp、60 bp 2 个条带)3 种。

2.2 对照组与冠心病组血脂、脂蛋白及 apo 水平比

表 1 对照组与冠心病组血脂、脂蛋白及 apo 水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of plasma lipid and lipoprotein levels between CHD and control groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	apoA-I(g/L)	apoB(g/L)
对照组	170	4.21±1.05	1.32±0.59	1.30±0.30	2.33±0.65	1.09±0.28	1.10±0.29
冠心病组	165	5.08±1.23*	1.78±0.73*	1.21±0.32	3.38±0.92*	1.15±0.27	1.12±0.31

注:与对照组比较:* $P < 0.05$

表 2 对照组与冠心病组 IL-6 基因多态性的分布

Table 2 Distribution of IL-6 gene polymorphism in CHD and control groups

组别	例数(例)	-572 位点基因型		-572 位点等位基因		-634 位点基因型			-634 位点等位基因		
		CC	CG	GG	C	G	CC	CG	GG	C	G
对照组	170	113(66.5)	55(32.3)	2(1.2)	281(82.6)	59(17.4)	116(68.2)	50(29.4)	4(2.4)	282(82.9)	58(17.1)
冠心病组	165	89(53.9)	67(40.6)	9(5.5)	245(74.2)	85(25.8)	105(63.6)	54(32.7)	6(3.7)	264(80.0)	66(20.0)
χ^2 值			8.414			7.011		1.027			0.960
P 值			0.015			0.008		0.598			0.327
OR		1.000	1.547	5.713	1.000	1.652	1.000	1.193	1.657	1.000	1.216
95%CI			0.984~	1.204~		1.137~		0.748~	0.455~		0.822~
			2.431	27.112		2.401		1.902	6.035		1.796

表 3 冠心病组 IL-6 各基因型间血脂、脂蛋白及 apo 水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of plasma lipid, lipoprotein and apo levels according the genotypes of IL-6 in CHD group($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数(例)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	apoA-I(g/L)	apoB(g/L)
-572 位点 CC	89	4.86±1.29	1.77±0.71	1.22±0.33	3.36±0.91	1.15±0.29	1.11±0.29
CG+GG	76	5.35±1.32 [△]	1.79±0.75	1.20±0.34	3.40±0.95	1.15±0.28	1.13±0.33
-634 位点 CC	105	5.07±1.26	1.78±0.74	1.20±0.32	3.38±0.94	1.14±0.27	1.12±0.28
CG+GG	60	5.10±1.25	1.78±0.75	1.23±0.35	3.39±0.93	1.16±0.30	1.12±0.32

注:与 CC 基因型比较:[△] $P < 0.05$

较(表 1):冠心病组 TC、TG 和 LDL-C 水平均显著高于对照组(P 均 <0.05);HDL-C、apoA-I、apoB 两组间比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

2.3 对照组与冠心病组 IL-6 基因多态性的比较(表 2):IL-6 基因-572 位点基因型在两组人群中的分布差异有显著性($\chi^2=8.414, P < 0.05$);等位基因频率在两组人群中的分布差异也有显著性($\chi^2=7.011, P < 0.01$);等位基因频率的相对风险分析发现,G 等位基因携带者患冠心病的风险是 C 等位基因的 1.652 倍($OR=1.652, 95\%CI:1.137 \sim 2.401$)。IL-6 基因-634 位点多态性在两组人群中的分布差异均无显著性(P 均 >0.05)。

2.4 冠心病组 IL-6 各基因型间血脂、脂蛋白及 apo 水平的比较(表 3):冠心病组 IL-6 基因-572 位点 CG+GG 基因型携带者的血清 TC 水平显著高于 CC 基因型($P < 0.05$);IL-6 基因-634 位点各基因型之间血脂、脂蛋白及 apo 水平比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

3 讨论

冠心病由多种因素共同作用所致,其流行病学研究表明,遗传基因在冠心病发病中可能起重要作用,除某些特殊的遗传性心血管疾病的致病基因已

被发现外,引起冠心病的分子机制迄今仍不明确,对冠心病易感基因的研究是近年来冠心病分子机制研究的重点和热点。动脉粥样硬化是一种炎性病变,炎症贯穿于动脉粥样硬化病变发生、发展和恶化的全过程,并在一定程度上决定着病变的稳定性和自然进程^[8,9]。IL-6 为促炎细胞因子,主要来源于活化的单核/巨噬细胞,作为炎症细胞分化的主要调节因子,可以上调黏附分子的表达,从而加强炎症反应,参与多种白细胞黏附与聚集;还可参与脂类代谢,影响 TC、LDL-C 和 HDL-C 等水平,同时还可增加血液黏滞度水平,在炎症反应、动脉粥样硬化及血栓形成中起重要作用。因而认为,IL-6 在冠心病的发生、发展过程中可能具有一定的促进作用。

IL-6 基因位于第 7 号染色体短臂上,含 4 个内含子和 5 个外显子,在基因启动子区存在基因变异及基因多态性,这种基因多态性与多种疾病存在密切相关性,与冠心病是否相关,是否通过影响血脂代谢而影响冠心病的病程等,目前尚无定论。临床研究证实,冠心病患者血清 IL-6 水平显著高于正常人群,而且其改变对以后发生的心血管事件具有预测价值^[10]。另外也有研究发现,冠心病的发展、严重程度、斑块的不稳定性以及预后均与血清 IL-6 水

平存在一定的关系^[11,12]。然而,这些研究均处于血清水平,在动脉粥样硬化及冠心病发生、发展过程中的确切分子机制尚不十分清楚。为了明确 IL-6 基因多态性是否与冠心病的发生及进展相关,我们采用 PCR-RFLP 法分析了 165 例冠心病患者和 170 名健康对照者 IL-6 基因多态性,发现冠心病患者 IL-6 基因-572 位点多态性分布与正常人比较差异具有显著性,其中携带 G 等位基因个体患冠心病的风险是 C 等位基因的 1.652 倍,提示 G 等位基因可能是冠心病的危险因素之一。

为进一步探讨 IL-6 基因多态性与其血脂水平的关系,我们同时检测了冠心病患者及健康对照者 IL-6 血清脂蛋白水平,结果发现:冠心病患者血清 TC、TG 和 LDL-C 水平显著高于健康对照者;并显示 IL-6 基因启动子-572 位点多态性可影响血清脂蛋白水平,携带 G 基因型的冠心病患者血清 TC 水平显著高于不携带者,故认为在病理条件下,携带 G 基因型的个体可促进血清 TC 的高度表达而增加冠心病的发病风险。而 IL-6 基因-634 位点多态性与冠心病的发病无相关性,对血清脂蛋白代谢也无影响,故认为这种基因多态性可能在冠心病的发生、发展过程中不起直接的作用。

综上所述,冠心病是一种多因素参与的疾病,除环境因素外,遗传因素在其中也起着更为重要的作用。本研究结果显示,IL-6 基因-572 位点多态性与冠心病具有一定相关性,其中 G 等位基因是冠心病重要的遗传标记,携带 G 基因型的个体可促进 TC 的高度表达而增加冠心病的发病风险。

参考文献:

1 Zhang Y, Hayes A, Pritchard A, et al. Interleukin-6 promoter polymorphism: risk and pathology of Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 362: 99-102.

2 Nishimura M, Matsuoka M, Maeda M, et al. Association between interleukin-6 gene polymorphism and human T-cell leukemia virus type I associated myelopathy [J]. *Hum Immunol*, 2002, 63: 696-700.

3 Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, et al. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density [J]. *J Hum Genet*, 2001, 46: 267-272.

4 Georges J L, Loukaci V, Poirier O, et al. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. Etude Cas-Temoin de L'Infarctus du Myocarde [J]. *J Mol Med*, 2001, 79: 300-305.

5 Brull D J, Montgomery H E, Sanders J, et al. Interleukin-6 gene -174g > c and -572g > c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 1458-1463.

6 Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, et al. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promoter region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes [J]. *Diabet Med*, 2002, 19: 1000-1005.

7 韦叶生, 蓝艳, 尤燕舞, 等. 转化生长因子-β1 的基因型及血清水平与 2 型糖尿病肾病的相关性研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28: 173-177.

8 Libby P, Ridker P M, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, 105: 1135-1143.

9 高波, 李忠诚. 基质金属蛋白酶-3 血浆水平及其启动子基因 5A/6A 多态性与冠心病关系的研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 536-539.

10 Ikeda U, Ito T, Shimada K, et al. Interleukin-6 and acute coronary syndrome [J]. *Clin Cardiol*, 2001, 24: 701-704.

11 Mendall M A, Patel P, Asante M, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease [J]. *Heart*, 1997, 78: 273-277.

12 Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, et al. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin [J]. *Circulation*, 1999, 100: 793-798.

(收稿日期: 2005-08-02 修回日期: 2006-03-16)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

第 11 次全国中西医结合危重病急救医学学术会议征文通知

中国中西医结合学会急救医学专业委员会拟于 2006 年 10 月在海南省海口市召开第 11 次全国中西医结合危重病急救医学学术会议。主要内容: ①国内脓毒症基础研究、临床诊断及治疗研究成果; ②介绍脓毒症国际、国内研究的新进展; ③讨论、交流脓毒症中西医结合治疗临床成果; ④交流、推广急救医学领域的各项成果; ⑤介绍国际和国内危重病、急救医学的研究动态、进展和成果。

征文内容: 西医、中医、中西医结合内科、外科、儿科、妇科、神经科、麻醉科、急诊科、ICU、医学检验、医学影像、窥镜、创伤、烧伤、微创治疗及护理等专业的基础和临床研究论文; 感染、非感染性全身炎症反应综合征(SIRS)并发脓毒症、多器官功能障碍综合征(MODS)、临床监测新技术、急救用药、急诊、ICU 质量控制标准、急救医学管理和危重病急救医学领域循证医学方面的论文。

征文要求: 全文 3 000 字以内(附 500 字摘要, 包括目的、方法、结果、结论)。尽量以电子信件方式发出, 并于发出后 72 h 内确认是否收到。也可邮寄全文及摘要各 1 份。征文截止时间: 2006 年 5 月 31 日(以邮戳为准)。邮寄地址: 天津市和平区睦南道 122 号, 天津市天和医院急救中心; 联系人: 乔佑杰, 夏欣华; 邮政编码: 300050。Email: youjieq@yahoo.com。联系电话: (022)23042084, 23042098, 13207663933; 传真: (022)23114748。

(中国中西医结合学会)