

IL-6 基因启动子区域-572C>G 和-174G>C 多态性与江苏宿迁汉族人群冠心病的相关性*

王跃帮, 吴娟, 崔倩, 王飞, 常珊碧 (宿迁市第一人民医院检验科, 江苏宿迁 223800)

摘要:目的 探讨白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)基因启动子区域-572C>G 和-174G>C 基因多态性与宿迁汉族人群冠心病(coronary heart disease, CHD)的关系。方法 参考2010卫生部CHD诊断标准(WS319-2010), 选择2017年1~12月在宿迁市第一人民医院心内科确诊的CHD患者, 应用聚合酶链-限制性片段长度多态性(Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法检测266例CHD患者和192例体检健康人群(对照组), 分析其IL-6-572C>G 和 IL-6-174G>C 基因多态性, 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 检测血糖、血脂等生化指标。结果 IL-6-572C>G 基因型和等位基因频率在两组间分布差异有统计学意义($\chi^2=11.1, 19.5, 22.4$, 均 $P<0.05$), CHD 组 GG 型和 CG 型 OR 值分别是 CC 型的 4.88 倍(95%CI: 2.31~10.31)和 1.96 倍(95%CI: 1.32~2.91); -174G>C 基因型和等位基因频率在两组间分布差异无统计学意义($\chi^2=0.024, 0.027$, 均 $P>0.05$)。结论 IL-6-572G 等位基因可能是宿迁汉族 CHD 的易感基因, IL-6-174G>C 基因多态性可能与宿迁汉族人群 CHD 没有相关性。

关键词:冠心病; 白细胞介素-6; 基因多态性

中图分类号: R541.4; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)03-031-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.010

Association between Interleukin-6-572C>G and -174G>C Gene Polymorphism in the Promoter Region and Coronary Heart Disease of Han Population in Suqian of Jiangsu

WANG Yue-bang, WU Juan, CUI Qian, WANG Fei, CHANG Shan-bi

(Department of Clinical Laboratory, Suqian First People's Hospital, Jiangsu Suqian 223800, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of interleukin 6 (IL-6) gene promoter region upstream of the -572C>G and -174G>C gene polymorphism with coronary heart disease (CHD) of Han population in Suqian of Jiangsu. Methods Reference 2010 CHD diagnostic criteria of the Ministry of Health (WS319-2010), detecting the polymorphism of IL-6-572C>G and -174G>C gene polymorphism in 266 CHD patients and 192 healthy population by polymerase chain restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and Hardy-Weinberg equilibrium was tested, measuring the concentration of blood sugar, lipid. Results At IL-6-572C>G, the OR about GG and type CG in CHD group were CC 4.88 times (95% CI: 2.31~10.31) and 1.96 times (95% CI: 1.32~2.91) respectively. The difference of genotype and alleles were statistical significance between the two groups ($\chi^2=11.1, 19.5$ and 22.4 , all $P<0.05$). At IL-6-174G>C, the difference of genotype and alleles were no statistical significance between the two groups ($\chi^2=0.024$ and 0.027 , all $P>0.05$). Conclusion IL-6-572G allele may be a susceptible gene of CHD in Han population in Suqian. However IL-6-174G>C gene polymorphism is not related to CHD Han population in Suqian.

Keywords: coronary heart disease; interleukin-6; gene polymorphism

冠心病(coronary heart disease, CHD)目前已经超过恶性肿瘤成为人类死亡的第一号杀手, 2014年报道农村和城市冠心病死亡率分别为 143.72/10 万和 136.21/10 万^[1]。冠心病是一种炎症性疾病, 白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)作为重要的炎性细胞因子在冠心病的发生发展中起重要作用^[2], 血液中 IL-6 浓度受其基因水平的调控, IL-6 基因上游启动子区域存在大量的基因多态性位点^[3], 可能影响 IL-6 的表达, 为进一步研究 IL-6 基因多态性与冠心病的关系, 本文通过聚合酶链-

限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法, 进一步研究 IL-6-572C>G 和 -174G>C 基因多态性与江苏宿迁地区汉族人群冠心病的关系, 为预防冠心病提供相关理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2017年1~12月在宿迁市第一人民医院心内科确诊的冠心病患者266例, 其中男性165例, 女性101例, 年龄 64.57 ± 11.02 岁, 冠心病诊断标准依据2010年卫生部颁布冠心

* 作者简介: 王跃帮(1984-), 男, 硕士, 主管技师, 主要从事临床生化检验, E-mail: jssqwyb@sohu.com。

通讯作者: 常珊碧(1984-), 女, 硕士在读, 主管技师, E-mail: 330667489@qq.com。

病诊断标准 WS319-2010): ①有冠状动脉搭桥的病史; ②冠状动脉管腔狭窄 $>50\%$ 。满足以上任意一条即可。排除标准: 对患有严重感染者、心肌梗、恶性肿瘤、心脏瓣膜病、白血病和自身免疫性疾病等予以排除。对照组为同期我院体检健康者 192 例, 男性 117 例, 女性 75 例, 年龄 62.74 ± 10.93 岁。研究对象均知情同意且无血缘关系, 经宿迁市第一人民医院伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器 糖化血红蛋白仪检测试剂盒(美国伯乐公司), 三酰甘油(TG)测定试剂盒、总胆固醇(CHOL)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒、载脂蛋白 A-I(ApoA-I)测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒、载脂蛋白 B(ApoB)测定试剂盒、C 反应蛋白(CRP)测定试剂盒、葡萄糖(Glu)测定试剂盒(美国贝克曼公司), 全血基因组 DNA 试剂盒(德国 qia-gen 公司), 限制性内切酶 *Sfa*NI, *Bsr*BI(美国 NEB 公司), PCR 扩增试剂盒(近岸蛋白质公司); Beckman Coulter AU5800 全自动生化分析仪(美国贝克曼公司), FR-200A 紫外分析仪(上海复日科技公司), Bio-Rad 糖化血红蛋白仪, DNA 电泳仪(美国伯乐公司), Thermal Cycler PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品采集: 分别采集冠心病患者和健康体检者空腹静脉血各 2 管(禁食 8~12 h); 3 ml EDTA-K₂ 紫色抗凝管, 提取全血基因组 DNA, 提取产物置 -20°C 冰箱冷冻保存; 5 ml 带有分离胶的黄色促凝管 3 000 r/min 离心 15 min, 血清置 -20°C 冰箱冷冻保存。

1.3.2 生化指标检测: 各指标检测严格按照 ISO15189 的相关要求和试剂说明书执行, TG 检测采用甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法, HDL-C, LDL-C 检测采用直接法, ApoA-I, ApoB 和 CRP 检测采用免疫比浊法, CHOL 检测采用酶法, Glu 检测采用己糖激酶法, HbA1c 检测采用高效液相色谱法。

1.3.3 全血基因组 DNA 模板制备: 全血基因组 DNA 提取完成后, 用紫外分光光度计检测 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 吸光度, 选取纯度在 1.8~2.0 之间的样品置 -20°C 冰箱保存备用。

1.3.4 聚合酶链-限制性片段长度多态性方法检测基因多态性: 应用聚合酶链-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法, 分别检测 IL-6 -174G $>$ C 和 -572C $>$ G 基因多态性。IL-6 -174G $>$ C 引物参考文献[4], 上游引物序列: 5'-ATGCCAAAGT-GCTGAGTCACTA-3', 下游引物序列: 5'-TC-

GAGGGCAGAATGAGCCTC-3', PCR 产物大小为 308bp, Tm 56°C ; IL-6 -572C $>$ G 引物参考文献[5], 上游引物序列: 5'-AGAGAGCAAAGTCCT-CACTG-3', 下游引物序列: 5'-ATGTTCT-GAACTGAGTTTCC-3', PCR 产物大小 321bp, Tm 58.5°C ; 两种引物序列均由上海捷瑞公司设计合成。PCR 反应体系: 模板 DNA(约 100 ng) 2 μl , $2 \times$ Taq Master Mix 25 μl , 上、下游引物各 1 μl , ddH₂O 21 μl 。-174G $>$ C PCR 循环参数: 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 20 s, 56°C 退火 20 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次, 72°C 再延伸 5 min, 4°C 保存; -572C $>$ G PCR 循环参数: 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 40 s, 58.5°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次, 72°C 再延伸 5 min, 4°C 保存。扩增产物鉴定和酶切分析: 5 μl PCR 产物直接琼脂糖凝胶(15 g/L)电泳 120 v, 15 min; 酶切反应体系: 总体积 50 μl , $10 \times$ NEBuffer 3.1 为 5 μl , 限制性内切酶 *Sfa*NI GCATC(N) 或 *Bsr*BI(CCGCTC) 分别为 2 μl , PCR 产物 8 μl , ddH₂O 35 μl , 37°C 水浴酶切 60 min, 酶切产物经琼脂糖凝胶(25 g/L)电泳 120 v, 20 min, 以 DL2000 Marker 为标准, FR-200A 紫外分析仪拍照。

1.4 统计学分析 SPSS 22.0 数据处理软件进行统计学分析, 计数资料两组间比较用卡方检验, 以例数/百分率[N(%)]表示; 计量资料两组间比较用独立样本 *t* 检验, 以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 所有统计分析均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较 见表 1。

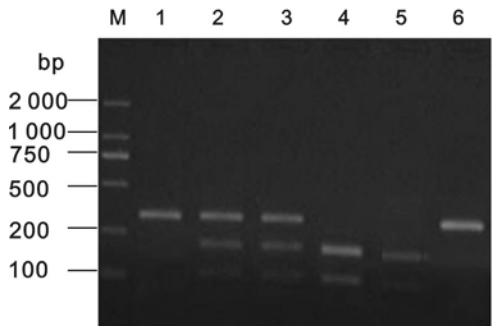
表 1 CHD 组和对照组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

指 标	CHD 组 (<i>n</i> =266)	健康对照组 (<i>n</i> =192)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	64.57 \pm 11.02	62.74 \pm 10.93	1.29	>0.05
性别(男/女)	165/101	117/75	0.56	>0.05
BMI(kg/m ²)	24.96 \pm 4.42	23.99 \pm 1.37	-0.87	>0.05
吸烟(是/否)	108/158	55/137	6.95	<0.05
SBP(mmHg)	137.31 \pm 17.84	108.91 \pm 11.61	14.01	<0.05
DBP(mmHg)	78.77 \pm 11.69	76.11 \pm 7.85	2.01	<0.05
TG(mmol/L)	1.64 \pm 1.12	1.39 \pm 0.78	2.50	<0.05
CHOL(mmol/L)	3.72 \pm 0.95	4.65 \pm 1.17	-8.05	<0.05
HDL-C(mmol/L)	0.95 \pm 0.29	1.31 \pm 0.39	-9.58	<0.05
LDL-C(mmol/L)	2.11 \pm 0.93	2.67 \pm 1.04	-5.16	<0.05
ApoA-I(g/L)	1.05 \pm 0.23	1.29 \pm 0.32	-8.04	<0.05
ApoB(g/L)	0.76 \pm 0.26	0.86 \pm 0.22	-3.67	<0.05
Glu(mmol/L)	5.69 \pm 1.65	5.46 \pm 0.89	1.69	>0.05
CRP(mg/L)	3.35 \pm 1.03	1.95 \pm 0.64	13.98	<0.05
HbA1c	6.37 \pm 1.35	5.62 \pm 0.45	6.62	<0.05

与对照组相比,性别、血糖、BMI 和年龄在两组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),吸烟、TG, CHOL, HDL-C, LDL-C, DBP, SBP, CRP, HbA1c, ApoA-I 和 ApoB 在两组间差异均有统计

学意义(均 $P<0.05$)。

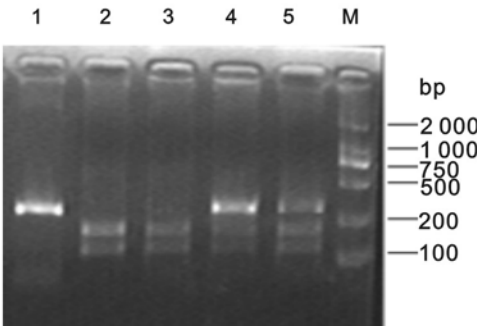
2.2 基因型结果 PCR 扩增产物片段酶切结果分别见图 1 和图 2。



注:M 是 DL2000maker 标记物;1 是 PCR 扩增产物;2,3 是 CG 基因型;4,5 是 GG 基因型;6 是 CC 基因型。

图 1 PCR 产物及酶切产物电泳图

2.3 基因型和等位基因频率比较 见表 2,表 3。宿迁汉族人群 IL-6-572C>G 基因多态性可见 CC, CG 和 GG 型,与 CC 型相比,CG 和 GG 基因型和等位基因频率在两组间的差异均有统计学意义(χ^2



注:M 是 DL2000maker;1 是 PCR 扩增产物;2,3 是 GG 基因型;4,5 是 GC 基因型。

图 2 PCR 产物及酶切产物电泳图

$=11.1, 19.5, 22.4$, 均 $P<0.05$)。IL-6-174G>C 基因多态性可见 GG 和 GC 型,未见 CC 型,基因型和等位基因频率在两组间的差异均无统计学意义($\chi^2=0.024, 0.027$, 均 $P>0.05$)。

表 2 IL-6-572C>G 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

参 数		CHD组 (n=266)	对照组 (n=192)	χ^2	P 值	OR(95%CI)
基因型	CC	86(32.3)	100(52.1)			
	CG	138(51.9)	82(42.7)	11.1	0.001	1.96(1.32~2.91)
	GG	42(15.8)	10(5.2)	19.5	0.001	4.88(2.31~10.31)
等位基因	C	310(58.3)	282(73.4)			
	G	222(41.7)	102(26.6)	22.4	0.001	1.98(1.49~2.63)

表 4 IL-6-174G>C 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

参 数		CHD组 (n=266)	对照组 (n=192)	χ^2	P 值	OR(95%CI)
基因型	GG	261(98.1)	188(97.9)	0.024	0.877	1.11(0.29~4.18)
	GC	5(1.9)	4(2.1)			
等位基因	G	531(99.1)	380(99.0)	0.027	0.869	1.12(0.30~4.19)
	C	5(0.9)	4(1.0)			

3 讨论 近年来,我国冠心病的发病率逐年递增,日益加重了我国公共卫生负担,威胁居民生命健康,严重制约社会经济发展。大量研究表明炎症因子在动脉粥样硬化、冠心病的发生中起重要作用^[6],IL-6 作为重要的炎性细胞因子,主要通过细胞因子网络促进冠状动脉粥样硬化的发生^[7],血清中 IL-6 的浓度与冠心病的严重程度紧密相关^[8],IL-6 上游启动子区域存在大量的基因多态性位点,影响 IL-6 的表达。

本研究一般资料结果表明:性别、血糖、BMI 和年龄在冠心病组和对照组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),冠心病患者的收缩压、舒张压、

TG, CRP 和 HbA1c 与对照组相比明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),吸烟在两组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),而 HDL-C, ApoB, CHOL, ApoA-I 和 LDL-C 比对照组明显减低,差异具有统计学意义($P<0.05$),本研究发现葡萄糖在两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。冠心病组血清中 LDL-C 浓度明显低于对照组,其主要原因是本研究中的冠心病患者基本存在 5~10 年的患病史,40% 的患者并发有高血压和糖尿病病史,患者长期服用降血压、降血糖和降血脂等治疗药物并且长期低脂饮食。

本研究结果表明,两者基因多态性频率分布均

符合 H-W 遗传平衡原理,具有群体代表性,江苏宿迁地区汉族人群 IL-6-572C>G 基因型主要为 CC 型和 CG 型,其次为 GG 型,基因型频率分别为 32.3%, 51.9%, 15.8% (CHD 组) 和 52.1%, 42.7%, 5.2% (健康对照组), C, G 等位基因频率分别为 58.3%, 41.7% 和 73.4%, 26.6%, G 等位基因频率明显高于 C 等位基因频率,与对照组相比冠心病组 CG 和 GG 基因型频率明显升高,研究结果与陈丹等^[5,9]人研究结果一致。本研究中冠心病组 GG 型(突变型)和 GC 型(杂合突变型)发病风险分别是 CC 型(野生型)的 4.88 倍(95% CI: 2.31~10.31)和 1.96 倍(95% CI: 1.32~2.91), -572G 等位基因可能是宿迁汉族冠心病人群的易感基因, Mao 等^[10]人对河南地区人群研究发现 -572C>G 与冠心病没有相关性,其研究对象长期生活在中部地区,环境、气候、饮食结构与本研究地区差异较大,且其没有限制种族的纳入; IL-6-174G>C 基因型主要见于 GG, GC 型,未见 CC 型,与对照组相比,冠心病组基因型和等位基因差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),研究结果与 Bhanushali 等^[11]人的研究结果一致。

冠心病是多基因遗传性疾病,易受基因和环境多重因素的影响^[12],种族、地域的差别,其基因多态性亦不相同,本实验结果表明, IL-6 基因启动子区域 -572G 等位基因是冠心病的易感基因,而 -174 位点基因多态性与宿迁地区汉族冠心病人群无相关性。本研究由于病例数量的限制,未能够进一步分析 IL-6 基因多态性和冠心病严重程度之间的关系。

参考文献:

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2015》概要[J]. 中国循环杂志,2016,31(6):521-528.
Chen WW, Gao RL, Liu LS, et al. Chinese cardiovascular disease report 2015 [J]. Chinese Circulation Journal, 2016, 31(6): 521-528.
- [2] Momiyama Y, Adachi H, Fairweather DL, et al. Introductory editorial-inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease[J]. New England Journal of Medicine, 2016, 352(16): 1685-1695.
- [3] Liu SL, Yin YW, Sun QQ, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-6 gene and susceptibility to coronary artery disease in Chinese population; Evidence based on 4 582 subjects[J]. Human Immunology, 2015, 76(7): 505-510.
- [4] Chae J, Ng T, Hui LY, et al. Impact of TNF- α (rs1800629) and IL-6(rs1800795) polymorphisms on cognitive impairment in Asian breast cancer patients [J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164204.
- [5] 陈丹,张葵,魏红霞,等. IL-6 基因-572C/G 多态性与江苏宿迁地区汉族人群冠心病的关系[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(5): 366-370.
Chen D, Zhang K, Wei HX, et al. Association between interleukin-6 gene-572C/G polymorphism and coronary heart disease in Han population of Suqian city, Jiangsu province, China[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 34(5): 366-370.
- [6] 刘永玲,罗厚龙,刘行超,等. 血清 SOD 和 hsCRP 等指标在急性冠脉综合征中的应用及相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(6): 115-117, 121.
Liu YL, Luo HL, Liu XC, et al. Level and correlation-ship of serum SOD and hsCRP and other indicators in acute coronary syndrome[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(6): 115-117, 121.
- [7] 姚创利,黎阳,鲁旭娟,等. 超氧化物歧化酶及其同工酶和超敏 C-反应蛋白与冠心病的关系[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 73-75.
Yao CL, Li Y, Lu XJ, et al. Relationship of superoxide dismutase isoenzyme and high sensitive C-reactive protein with coronary heart disease [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 73-75.
- [8] 王伊林,崔晓雪,于焱,等. 白细胞介素在动脉粥样硬化发病中的作用研究进展[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(Z1): 310-312.
Wang YL, Cui XX, Yu Y, et al. Research progress of the role of interleukin in atherosclerosis [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2016, 13(Z1): 310-312.
- [9] Li L, Li E, Zhang LH, et al. IL-6-174G/C and IL-6-572C/G polymorphisms are associated with increased risk of coronary artery disease[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2015, 14(3): 8451-8547.
- [10] Mao L, Geng GY, Han WJ, et al. Interleukin-6(IL-6) -174G/C genomic polymorphism contribution to the risk of coronary artery disease in a Chinese population[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2016, 15(2)doi:10. 4238/gmr. 15027803.
- [11] Bhanushali AA, Das BR. Promoter variants in interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha and risk of coronary artery disease in a population from Western India[J]. Indian J Hum Genet, 2013, 19(4): 430-436.
- [12] 梁丽丽,蔡梦云,周萌媛,等. CTRP9 基因多态性与冠心病的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(1): 67-70.
Liang LL, Cai MY, Zhou MY, et al. Association of CTRP 9 gene polymorphism with coronary heart disease[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2017, 37(1): 67-70.

收稿日期:2018-04-01

修回日期:2018-05-03