

2型糖尿病患者 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点多态性与颈动脉粥样硬化的相关性研究

刘飞^a, 陈静非^b (宝鸡市中心医院 a. 综合内科; b. 神经内科一科, 陕西宝鸡 721000)

摘要: 目的 探讨2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点多态性与颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)的相关性研究。方法 收集2018年1月~2019年12月宝鸡市中心医院收治的375例T2DM患者为研究对象并记为T2DM组,另选择同期该院体检健康的200例志愿者作为对照组,T2DM组患者再根据颈部血管超声结果分为颈动脉内-中膜厚度(carotid intima-media thickness, CINT)正常组($n=122$)和CINT增厚组($n=253$)。采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法检测 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点基因型。分别比较各组两位点基因型和等位基因型的分布频率。采用 Logistic 回归分析法分析 T2DM 患者 CINT 增厚的独立危险因素。结果 对照组和 T2DM 组的 BMI, CINT 和高血压差异具有统计学意义($t=5.270$, $Z=16.038$, $\chi^2=6.261$, $P<0.05$), 两组吸烟和血脂异常的差异无统计学意义($\chi^2=0.800$, 1.991 , 均 $P>0.05$)。CINT 正常组和 CINT 增厚组在吸烟、CINT, 糖尿病病程方面的差异具有统计学意义($\chi^2=5.302$, $Z=15.694$, 12.057 , 均 $P<0.05$), 两组 BMI, 高血压和血脂异常的差异无统计学意义($\chi^2=0.567$, 0.741 , 3.133 , 均 $P>0.05$)。对照组和 T2DM 组 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点基因型和等位基因型分布频率的差异无统计学意义($\chi^2=1.654$, 4.939 , 1.742 , 2.812 , 均 $P>0.05$)。CINT 正常组和 CINT 增厚组 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点基因型和等位基因型分布频率的差异均具有统计学意义($\chi^2=11.410$, 11.957 , 均 $P<0.05$), 两组 -137G/C 位点基因型和等位基因型分布频率的差异均无统计学意义($\chi^2=3.696$, 2.931 , 均 $P>0.05$)。采用 Logistic 回归分析法结果显示糖尿病病程和 -607C/A(CC vs CA+AA)基因型是 T2DM 患者 CINT 增厚的独立危险因素。结论 T2DM 患者中 IL-18 基因启动子区 -607C/A 位点多态性与 CAS 密切相关。

关键词: 2型糖尿病(T2DM); 白细胞介素-18(IL-18); 颈动脉内-中膜厚度(CINT); 颈动脉粥样硬化(CAS)
中图分类号: R587.1; R543.4; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 02-057-04
doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.014

Correlation between -607C/A and -137G/C Polymorphisms in the IL-18 Promoter Region and Carotid Atherosclerosis in Type 2 Diabetes Mellitus

LIU Fei^a, CHEN Jing-fei^b

(a. Department of General Medicine; b. the First Department of Neurology, Baoji Central Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between -607C/A and -137G/C polymorphisms in the IL-18 promoter region and carotid atherosclerosis(CAS) in type 2 diabetes mellitus(T2DM). **Methods** The 375 patients with T2DM admitted by Baoji Central Hospital from January 2018 to December 2019 were collected and recorded as the T2DM group. In addition, 200 volunteers who were healthy during the same period in the hospital were selected as the control group. The patients of the T2DM group were then divided by the carotid intima-media thickness (CINT normal group) ($n=122$) and CINT thickened group ($n=253$) based on the ultrasonic results of the neck vessels. The genotypes of -607C/A and -137G/C promoters were detected by polymerase chain reaction (PCR). The distribution frequencies of genotypes and alleles at the two loci were compared respectively. Logistic regression analysis was used to analyze the independent risk factors of CINT thickening in T2DM patients. **Results** The differences in BMI, CINT and hypertension between the control group and the T2DM group were statistically significant ($t=5.270$, $Z=16.038$, $\chi^2=6.261$, all $P<0.05$), while the differences in smoking and dyslipidemia between the two groups were not statistically significant ($\chi^2=0.800$, 1.991 , all $P>0.05$). The differences in smoking, CINT and diabetes course between the CINT normal group and the CINT thickened group were statistically significant ($\chi^2=5.302$, $Z=15.694$, 12.057 , all $P<0.05$), while the differences in BMI, hypertension and dyslipidemia between the two groups were not statistically significant ($\chi^2=0.567$, 0.741 , 3.133 , all $P>0.05$). There was no significant difference in the distribution frequencies of -607C/A and -137G/C promoters

作者简介: 刘飞 (1988-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 内科学, E-mail: liufeiloveyou1988@126.com。

通讯作者: 陈静非 (1987-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 脑血管病, E-mail: baijichenj87@163.com。

between the control group and the T2DM group ($\chi^2=1.654, 4.939, 1.742, 2.812$, all $P>0.05$). There were statistically significant differences in the distribution frequencies of -607C/A and -137G/C polymorphisms and allelic genotypes between the CIMT normal group and the CIMT thickened group ($\chi^2=11.410, 11.957$, all $P<0.05$), while there were no statistically significant differences in the distribution frequencies of -137G/C genotypes and allelic genotypes between the two groups ($\chi^2=3.696, 2.931$, all $P>0.05$). The results of Logistic regression analysis showed that diabetes course and genotype -607C/A(CC vs CA+AA) were independent risk factors for CIMT thickening in T2DM patients. **Conclusion** The IL-18 promoter region -607C/A polymorphism is closely related to CAS in T2DM patients.

Keywords: type 2 diabetes mellitus(T2DM); interleukin-18(IL-18); carotid intima media thickness(CIMT); carotid atherosclerosis(CAS)

颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者常见的大血管并发症之一,同样也是T2DM患者致残甚至致死的主要原因^[1]。因此探索CAS的发生、发展机制对改善T2DM患者的预后和提高其生活质量具有重要的意义和价值。白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)是机体内重要的细胞促炎因子,其是预测斑块易损性的重要指标之一。研究发现IL-18可多途径参与CAS进程,具有较明确的抑制颈动脉硬化斑块的生物学作用^[2-3]。另外近期有学者指出IL-18存在多个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点并且其与临床疾病易感性有关^[4-6]。在IL-18的多个SNP位点中基因启动子区-607C/A和-137G/C关注较多且生物学效应较明确^[7-9],但是关于-607C/A和-137G/C位点多态性与CAS的相关性研究报道尚少见,因此本研究着重分析T2DM患者IL-18基因启动子区-607C/A和-137G/C位点多态性与CAS的相关性,旨在为T2DM患者CAS寻找新的分子遗传学标记,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2018年1月~2019年12月宝鸡市中心医院收治的375例T2DM患者为研究对象并记为T2DM组,另选择同期我院体检健康的200例志愿者作为对照组。T2DM组中男性207例,女性168例;平均年龄 61.98 ± 8.99 岁。对照组中男、女性各100例;平均年龄 60.96 ± 7.79 岁。本研究经我院伦理委员会批准,所有受试者自愿参加且均签署知情同意书。

纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁者;②T2DM诊断符合《中国2型糖尿病防治指南(2013年)》^[10]上的相关标准;③糖尿病病程5年(含5年)以上者;④临床资料完整者。

排除标准:①1型糖尿病患者;②存在其他导致颈动脉狭窄的可能因素,例如大动脉炎、颈动脉夹层、纤维肌肉结构不良、梅毒感染、头颈部放射治疗史等;③并发严重肝肾疾病或其他系统严重功能障碍者;④并发恶性肿瘤者;⑤妊娠、哺乳期女性。

1.2 仪器与试剂 应用日本东芝公司Aplio 500彩色多普勒超声仪测定CIMT值。采用伯乐生命医学产品(上海)有限公司生产的T100PCR仪检测IL-18基因启动子-607C/A和-137G/C位点基因型。本研究所用引物均由上海生工生物有限公司设计提供。

1.3 方法

1.3.1 一般资料采集:主要包括体重指数(body mass index, BMI)、吸烟、颈动脉内-中膜厚度(carotid intima-media thickness, CIMT)、糖尿病病程、高血压和血脂异常。

1.3.2 CIMT的测定:测定患者双侧颈总动脉分叉处近端和远端各1~1.5 cm处的CIMT值,记录CIMT最大值。本研究定义CIMT值 < 1 mm表示正常, CIMT ≥ 1 mm表示CIMT增厚。基于此将T2DM组患者分为2个亚组: CIMT正常组($n=122$)和CIMT增厚组($n=253$)。

1.3.3 IL-18基因启动子-607C/A和-137G/C位点基因型的检测:由于两位点仅相隔470 bp,采用PCR法同时扩增两位点后直接测序分析其相应的基因型。上游引物为5'-GACTGCTGTCGGCACTCCT-3',下游引物为5'-AGCACTTCCAGCCACCCT-3'。PCR扩增反应条件:95℃预变性5 min, 94℃变性20 s, 57℃退火20 s, 72℃延伸40 s进行40个循环, 72℃延伸5 min。

1.4 统计学分析 采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以 $n(\%)$ 表示,偏态分布的资料以中位数(25%四分位数~75%四分位数)表示。基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡定律检验。多因素分析采用Logistic回归分析法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般资料的比较 见表1。对照组和T2DM组的BMI, CIMT和高血压差异具有统计学意义($P<0.05$),两组吸烟和血脂异常的差异无统计学意义($P>0.05$)。CIMT正常组和CIMT增厚组在吸烟、CIMT,糖尿病病程方面的差异具有统

计学意义 ($P < 0.05$), 两组 BMI, 高血压和血脂异常的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点基因型和等位基因分布频率比较 见表 2。对照组和 T2DM 组 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点基因型和等位基因型分布频率的差

异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。CIMT 正常组和 CIMT 增厚组 IL-18 基因启动子区 -607C/A 和 -137G/C 位点基因型和等位基因型分布频率的差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 两组 -137G/C 位点基因型和等位基因型分布频率的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组一般资料的比较

项目	对照组 (<i>n</i> =200)	T2DM 组 (<i>n</i> =375)	<i>t</i> / <i>Z</i> / χ^2	<i>P</i>	CIMT		<i>t</i> / <i>Z</i> / χ^2	<i>P</i>
					正常组 (<i>n</i> =122)	增厚组 (<i>n</i> =253)		
BMI(kg/m ²)	23.51 ± 3.31	25.01 ± 3.21	5.270	<0.001	25.15 ± 3.57	24.95 ± 3.03	0.567	0.571
吸烟 [<i>n</i> (%)]	46(23.00)	99(26.40)	0.800	0.371	23(18.85)	76(30.04)	5.302	0.021
CIMT(mm)	0.72(0.64,0.81)	1.38(0.87,1.58)	16.038	<0.001	0.82(0.73,0.87)	1.50(1.38,1.66)	15.694	<0.001
糖尿病病程 (年)		8(6,12)			6(6,7)	10(8,13)	12.057	<0.001
高血压 [<i>n</i> (%)]	106(53.00)	239(63.73)	6.261	0.012	74(60.66)	165(65.22)	0.741	0.389
血脂异常 [<i>n</i> (%)]	104(52.00)	218(58.13)	1.991	0.158	63(51.64)	155(61.26)	3.133	0.077

表 2 各组 -607C/A 和 -137G/C 位点基因型和等位基因分布频率比较 [*n*(%)]

基因型	对照组 (<i>n</i> =200)	T2DM 组 (<i>n</i> =375)	χ^2	<i>P</i>	CIMT 正常组 (<i>n</i> =122)	CIMT 增厚组 (<i>n</i> =253)	χ^2	<i>P</i>
-607C/A CC	51(25.50)	112(29.87)			24(19.67)	88(34.78)		
CA	95(47.50)	176(46.93)	1.654	0.437	60(49.18)	116(45.85)	11.410	0.003
AA	54(27.00)	87(23.2)			38(31.15)	49(19.37)		
C	197(49.25)	400(53.33)	1.742	0.187	108(44.26)	292(57.71)	11.957	0.001
A	203(50.75)	350(46.67)			136(55.74)	214(42.29)		
-137G/C GG	138(69.00)	278(74.13)			84(68.85)	194(76.68)		
GC	56(28.00)	94(25.07)	4.939	0.085	36(29.51)	58(22.92)	3.696	0.158
CC	6(3.00)	3(0.80)			2(1.64)	1(0.40)		
G	332(83.00)	650(86.67)	2.812	0.094	204(83.61)	446(88.14)	2.931	0.087
C	68(17.00)	100(13.33)			40(16.39)	60(11.86)		

2.3 T2DM 患者 CIMT 增厚的危险因素分析 见表 3。以吸烟、糖尿病病程和 -607C/A(CC vs CA+AA) 基因型为自变量, 以 CIMT 增厚为因变量, 采用

Logistic 回归分析法结果显示糖尿病病程和 -607C/A(CC vs CA+AA) 基因型是 T2DM 患者 CIMT 增厚的独立危险因素。

表 3 T2DM 患者 CIMT 增厚的危险因素分析

变量	B	S.E	Wals	OR	95%CI	<i>P</i>
吸烟	0.455	0.353	1.659	1.576	(0.789~3.147)	0.198
糖尿病病程	0.965	0.120	64.785	2.626	(2.076~3.321)	< 0.001
-607C/A(CC vs CA+AA)	0.703	0.347	4.113	2.020	(1.024~3.986)	0.043

3 讨论

目前炎症因子在动脉粥样硬化的发生、发展过程中发挥关键性作用, IL-18 作为一种炎性细胞因子, 已有研究指出其与动脉粥样硬化密切相关。2001年 MALLAT 等^[11]首次在人颈动脉粥样硬化斑块中发现 IL-18 mRNA 的存在。在随后的研究中 MALLAT 等^[12]还进一步证实 IL-18 的活性与斑块不稳定性密切相关。ELHAGE 等^[13]研究发现 IL-18

基因联合 apoE 基因敲除小鼠粥样硬化斑块面积明显减小。综合当前研究认为 IL-18 参与动脉粥样硬化的主要机制可能是① IL-18 可诱导中膜平滑肌细胞表达趋化因子受体 CXCL-16 等, 促使血管平滑肌细胞吞噬氧化低密度脂蛋白, 与动脉粥样硬化起始发生密切相关; ② IL-18 可诱导 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ) 分泌, 进而上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 表达, 抑制平

滑肌细胞合成胶原,促进斑块中纤维降解,导致斑块破裂;③同时,IL-18还可直接激活单核/巨噬细胞分泌MMP发挥作用。

近年来多项研究报道指出IL-18基因启动子区-607C/A和-137G/C多态性与冠心病遗传易感性密切相关^[7-8,14]。Ma等^[14]以中国人为研究对象,发现-607C/A CC基因型发生冠心病风险增加2.51倍。RAJESH等^[7]研究发现冠心病患者的一级亲属中携带-137G/C GG基因型是发生冠心病的高危因素。HOSEINI等^[8]研究结果显示-137G/C基因多态性与冠状动脉病变严重程度相关。但是关于-607C/A和-137G/C位点多态性与CAS的相关性尚不明确,因此,本研究推测CAS与IL-18基因多态性密切相关。研究结果显示CIMT正常组与CIMT增厚组在-607C/A基因型和等位基因型分布频率组间差异均具有统计学意义。多因素分析显示-607C/A CC基因型携带者CIMT增厚发生风险可增加2.020倍,但-137G/C位点多态性与CIMT增厚缺乏关联。此外,本研究还发现T2DM组与对照组IL-18基因启动子区-607C/A和-137G/C位点基因型和等位基因型分布频率组间差异均无统计学意义。

综上所述,本研究发现IL-18-607C/A基因多态性与CAS密切相关,其可显著增加CIMT增厚的发生风险。本研究尚存在以下缺陷:首先,作为单中心研究,本课题所纳入的研究对象仍相对较少,期待后续多中心大样本及严格设计的临床试验结果进一步验证。其次,考虑T2DM患者动脉粥样硬化的时间依赖性,本研究纳入的T2DM患者均为病程 ≥ 5 年的患者,使得结果适用具有一定限制性。最后,限于条件,本研究未能对纳入研究对象血清IL-18水平进行动态监测,对于IL-18基因多态性如何影响IL-18表达或活性,继而发挥作用,仍有待继续研究。

参考文献:

- [1] 何晓一,李春燕.2型糖尿病患者锰超氧化物歧化酶Ala-9Val基因多态性与颈动脉粥样硬化的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2020,35(5):24-27.
HE Xiaoyi, LI Chunyan, Association between manganese superoxide dismutase gene Ala-9Val polymorphism and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020,35(5):24-27.
- [2] ARAPI B, BAYOĞLU B, CENGİZ M, et al. Increased expression of interleukin 18 mRNA is associated with carotid artery stenosis[J]. Balkan Med J, 2018, 35(3):250-255.
- [3] VICTOR A R, NALIN A P, DONG Wenjuan, et al. IL-18 drives ILC3 proliferation and promotes IL-22 production via NF- κ β [J]. J Immunol, 2017, 199(7):2333-2342.
- [4] CHEN Yelong, SHOU Lihong, ZHANG Zongxin. Association of interleukin - 18 gene polymorphism and its protein expression with the lower extremity deep venous thrombosis in the chinese han population: A case - control study[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32 (suppl1): e22345.
- [5] WANG Changyuan, WEI Li, CHU Weilin, et al. Correlation of interleukin-18 gene polymorphism with the susceptibility of condyloma acuminatum in Chinese population[J]. Braz J Infect Dis, 2019, 23(6):388-394.
- [6] TSUNETO P Y, DE SOUZA V H, DE ALENCAR J B, et al. IL-18 polymorphism and periodontitis susceptibility, regardless of IL-12B, MMP9, and smoking habits[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019:9585964.
- [7] RAJESH KUMAR G, MRUDULA SPURTHI K, KISHORE KUMAR G, et al. Evaluation of hs-CRP levels and interleukin 18 (-137G/C) promoter polymorphism in risk prediction of coronary artery disease in first degree relatives [J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0120359.
- [8] HOSEINI F, MAHMAZI S, MAHMOODI K, et al. Evaluation of the role of -137G/C single nucleotide polymorphism (rs187238) and gene expression levels of the IL-18 in patients with coronary artery disease [J]. Oman Med J, 2018, 33(2):118-125.
- [9] 张效林,裴芳,黄明方,等.中国北方汉族人群IL-18基因-607C/A和-137G/C多态性与心肌梗死的关联性[J].心脏杂志,2011,23(3):331-335.
ZHANG Xiaolin, PEI Fang, HUANG Ming-fang, et al. Association of interleukin-18 gene promoter polymorphisms with myocardial infarction in a Han population of northern China [J]. Chinese Heart Journal, 2011, 23(3):331-335.
- [10] 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J].中华糖尿病杂志,2018, 10(1):4-67.
Diabetes Society of Chinese Medical Association. Chinese guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus (2017 edition)[J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus, 2018,10(1):4-67.
- [11] MALLAT Z, CORBAZ A, SCOAZEC A, et al. Expression of Interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability [J]. Circulation, 2001, 104(14):1598-1603.
- [12] MALLAT Z, CORBAZ A, SCOAZEC A, et al. Interleukin-18/Interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability[J]. Circ Res, 2001, 89(7):e41-e45.
- [13] ELHAGE R, JAWIEN J, RUDING M, et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice[J]. Cardiovasc Res, 2003,59(1):234-240.
- [14] MA J B, CHEN L, GAO B, et al. Effect of polymorphisms in interleukin-18 gene on the susceptibility to coronary artery disease in a Chinese population[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(4):gmr 15048708.

收稿日期:2020-06-04

修回日期:2021-01-21