CXCL16 基因 rs2277680 多态性与急性脑梗死颈动脉斑块的研究

周元林 陈 云 朱 敏 朱 峰 胡晓飞 郑 周

摘 要 目的 探讨血清趋化因子 CXC 配体 16(CXCL16)基因 rs2277680 多态性与急性动脉粥样硬化性脑梗死患者的颈动脉斑块易损性的关系。**方法** 476 例急性动脉粥样硬化性脑梗死患者根据 B 型超声检查结果分为稳定斑块组(218 例)和颈动脉易损斑块组(258 例)。采用聚合酶链反应－限制性片段长度多态性(PCR－RFLP)方法分析 CXCL16 基因 rs2277680 多态性。**结果** 稳定斑块组 GA + AA 基因型频率为 80.3%,易损斑块组 GA + AA 基因型频率显著为 87.6%,两组间的 GA + AA 基因型频率比较差异有统计学意义($\chi^2=4.772, P=0.032$),表明易损斑块组 GA + AA 基因型频率显著高于稳定斑块组。A 等位基因频率在稳定斑块组为 63.3% 和易损斑块组为 62.2%,两组间的 A 等位基因频率分布比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.121, P=0.737$)。**结论** CXCL16 基因 rs2277680 多态性 AA + GA 基因型与急性动脉粥样硬化性脑梗死患者颈动脉斑块易损性存在着相关性;但 A 等位基因不是颈动脉斑块易损的遗传易感基因。

关键词 血清趋化因子 CXC16 动脉粥样硬化 脑梗死 多态现象 易损斑块

中图分类号 R74 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.10.017

Research on Chemokine CXC Ligand 16 Gene rs2277680 Polymorphisms and Carotid Artery Plaque with Acute Cerebral Infarction *Zhou Yuanlin, Chen Yun, Zhu Min, et al. Department of Neurology, Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China*

Abstract Objective To investigate the association between the chemokine CXC ligand 16 (CXCL16) gene rs2277680 polymorphisms and instability of carotid plaque in patients with acute atherosclerotic cerebral infarction. **Methods** According to carotid ultrasound examination , 476 patients were divided into two groups, stable plaque group ($n=218$) and vulnerable plaque ($n=258$). And polymerase chain reaction－restriction fragment length polymorphism (PCR－RFLP) was used to detect the rs2277680 polymorphisms in the CXCL16 gene. **Results** The frequency of the GA + AA genotypes was significantly different in the two groups (80.3% vs 87.6%, $\chi^2=4.772, P=0.032$). The frequency of the A allele was also not significantly different in the two groups (63.3% vs 62.2%, $\chi^2=0.121$, $P=0.737$). **Conclusion** There is a correlation between the CXCL16 gene rs2277680 polymorphisms and instability of carotid plaque in patients with acute atherosclerotic cerebral infarction. But the A allele was not a genetic susceptibility gene which leaded to plaque rupture.

Key words Chemokine CXC ligand 16; Atherosclerosis, Cerebral infarction; Polymorphism; Vulnerable plaque

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是脑梗死的最常见原因。颅内外动脉发生动脉粥样硬化,斑块形成及各种继发病变,引起血管狭窄甚至闭塞,导致脑梗死。动脉粥样硬化是一种慢性进展性炎性疾病。炎性被认为在动脉粥样硬化斑块形成和斑块破裂的所有阶段中发挥了核心作用。在动脉粥样硬化病变的过程中,炎性细胞产生一系列的介质,包括促炎性细胞因子、免疫活化的共刺激因子和类花生酸类物质等,发生一系列的生物化学反应[1~4]。趋化因子 CXC 配体 16(chemokine CXC ligand 16, CXCL16)是一种趋化因子,具有趋化炎性细胞、促进细胞增殖、细胞黏附等作用,参与炎性反应、氧化型低密度脂蛋白的吞噬及免疫应答,对动脉粥样硬化的发生、发展起到重要的作用[5~8]。研究表明 CXCL16 在人类动脉粥样硬化斑块中表达,其血清水平与动脉粥样硬化的严重程度呈正相关。还有研究发现动脉粥样硬化性急性脑梗死患者的 CXCL16 水平明显升高[9~11]。rs2277680 多态性位点是位于 CXCL16 基因上的单碱基突变,其突变可升高血清 CXCL16 水平,诱导激活炎性反应,促进动脉粥样硬化的发生、发展,导致斑块的不稳定[12]。本研究通过对 476 例急性动脉粥样硬化性脑梗死的 CXCL16 基因 rs2277680 位点的检测,进行基因分型,以探讨 CXCL16 基因 rs2277680 多态性与急性脑梗死颈动脉斑块的关系。

基金项目:浙江省医药卫生科研计划项目(2013KYB289)
作者单位:317000 温州医科大学附属台州医院神经内科
通讯作者:周元林,电子信箱:zyl@ enzemed. com

资料与方法

1. 研究对象：全部病例均为 2013 年 9 月 ~2015 年 3 月在浙江省台州医院神经内科首次因急性脑梗死住院患者，对所有符合要求的患者行颈动脉 B 超检查。参照 Mathiedsen 等[13] B 超检查定义颈动脉斑块及其分类标准，部分病例经 CTA 或 MRA 验证；将颈动脉斑块呈低回声和混合回声的患者纳入易损斑块组，共 258 例，其中，男性 143 例，女性 115 例，患者年龄 47 ~91 岁，平均年龄 70.61 ±9.15 岁；颈动脉 B 超呈高回声的患者纳入稳定斑块组，共 218 例，其中男性 125 例，女性 93 例，患者年龄 48 ~87 岁，平均年龄 68.41 ±9.23 岁。全部研究对象均为我国浙江省汉族人，彼此间无血缘关系，均符合急性动脉粥样硬化性脑梗死的诊断标准，且均排除患有肿瘤，自身免疫性、感染性、风湿性疾病、血液系统疾病、脑出血、急性冠状动脉综合征、心律失常、严重肝肾功能不全、甲状腺疾病[14]。本研究经浙江省台州医院伦理委员会批准，全部研究对象均知情同意。

2. 主要试剂：外周血基因组 DNA 抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶 PvuⅡ - HF 限制性内切酶及缓冲液为美国 NEB 公司产品，引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

3. 标本的采集：抽取入住者入院第 2 天清晨空腹静脉血 4ml，以 EDTA - Na2 抗凝，用于基因组 DNA 抽提，保存于 -86℃ 冰箱中冻存备用。

4. 实验方法：(1) DNA 的提取：采用血液基因组 DNA 抽提试剂盒从白细胞中提取基因组 DNA，核酸定量分析仪测定 DNA 浓度和 *A*260/*A*280 比值，将比值位于 1.7 ~2.0 者作为 PCR 扩增模板。(2) 引物合成：由上海捷瑞生物工程有限公司合成，上游引物：5′ - TCTTGCACAGCACATAGGAAAG - 3′，下游引物：5′ - CTGCTTTTTCACCTTGTCTCCT - 3′。(3) PCR 扩增目的片段：PCR 反应体系为上下游引物 0.5μl + 0.5μl(各 20μmol/L)，2 × Master Mix12.5(l，DNA 模板 1μl，加双蒸水至总体积 25μl。PCR 反应条件：预变性 95℃，2min；变性 94℃，45s；退火 56℃，30s；延伸 72℃，45s，共 35 个循环，吸取扩增产物 5μl，于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，凝胶成像分析 PCR 产物特异性。(3) 酶切反应：取经纯化后的 PCR 产物进行酶切，反应体系包括 PCR 产物 8μl，10 × 缓冲液 2μl，限制性内切酶 PvuⅡ - HF 0.5U，加双蒸水至总体积 20μl，置 37℃ 水浴酶切 2h 后，终止酶切反应，产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳后，EB 染色，凝胶成像系统判定结果。

5. 统计学方法：采用 SPSS 21.0 统计软件。用基因计数法计算基因型和等位基因频率，等位基因频率 =(2 × 纯合子 + 杂合子数)/(2 × 受检人数)，频率比较采用 χ^2 检验；临床计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 2 个独立样本 t 检验；校正 OR 值采用多因素 *Logistic* 回归方法，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 稳定斑块组和易损斑块组的一般临床资料：两组在年龄、性别比例、高血压病病史、吸烟史、饮酒史、空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、纤维蛋白原、同型半胱氨酸等方面差异无统计学意义，而在糖尿病病史差异有统计学意义($P<0.05$)，说明在易损斑块组中患糖尿病的比例明显高于稳定斑块组，详见表 1。

表 1　研究对象的一般临床资料($\bar{x} \pm s$)

项目	稳定斑块组(n =218)	易损斑块组(n =258)	t/χ^2	P
年龄(岁)	68.41 ±9.23	70.61 ±9.15	1.835	0.068
男性/女性(%)	57.3/42.7	55.4/44.6	0.176	0.711
高血压病(%)	62.79	67.89	1.300	0.287
2 型糖尿病(%)	14.73	24.04	6.521	0.011
吸烟(%)	38.66	43.12	0.985	0.350
饮酒(%)	31.93	30.28	0.111	0.766
空腹血糖(mmol/L)	6.27 ±2.32	6.09 ±2.33	0.569	0.570
甘油三酯(mmol/L)	1.49 ±1.01	1.76 ±1.55	-0.160	0.112
总胆固醇(mmol/L)	4.77 ±1.02	4.72 ±1.08	0.376	0.707
HDL(mmol/L)	1.34 ±0.31	1.27 ±0.32	1.810	0.072
LDL(mmol/L)	2.60 ±0.81	2.59 ±0.77	0.029	0.977
纤维蛋白原(g/L)	3.70 ±1.16	3.48 ±0.85	1.611	0.211
同型半胱氨酸(μmol/L)	12.81 ±6.29	13.14 ±9.06	-0.316	0.109

2. 稳定斑块组和易损斑块组 CXCL16 基因 rs2277680 基因型检测：见图 1。CXCL16 PCR 扩增产物为 440bp，经限制性内切酶 PvuⅡ – HF 酶切后，作基因多态性分析，携带 G 等位基因的 DNA 片段被切为 296bp 和 144bp 2 个片段，携带 A 等位基因的 DNA 片段由于无酶切位点仍为 440bp 1 个片段，因此，凝胶成像分析可得到 3 种基因型：纯合子 GG 基因型可见 296bp 和 144bp 2 个条带，杂合子 GA 基因型可见 440、296、144bp 3 个条带，纯合子 AA 基因型仅见 440bp 1 个条带。

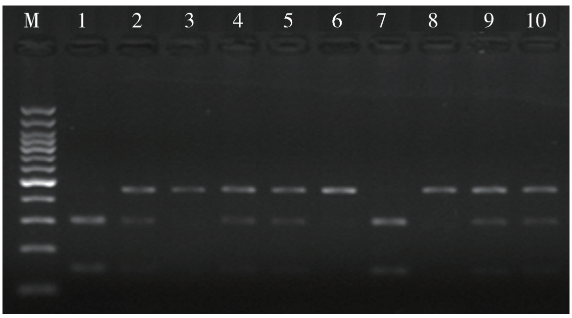

图 1　CXCL16 PCR 扩增产物经限制性内切酶 PvuⅡ – HF 酶切后行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图

泳道 M 为 100bp DNA 梯度；泳道 1、7 为 GG 纯合子（296bp + 144bp）；泳道 2、4、5、9、10 为 GA 杂合子（440 + 296 + 144bp）；3、6、8 为 AA 纯合子（440bp）

3. 两组间各基因频率和等位基因频率：见表 2。稳定斑块组和易损斑块组的 CXCL16 基因型分布，经卡方检验符合 *Hardy – Weinberg* 平衡，表明研究对象具有群体代表性（$\chi^2 = 3.261$ 和 0.418，$P = 0.093$ 和 0.605）。易损斑块组的 GA + AA 基因型频率显著高于稳定斑块组（$\chi^2 = 4.772$，$P = 0.032$），差异有统计学意义（$P < 0.05$），但两组间的 A 等位基因频率分布比较差异无统计学意义（$\chi^2 = 0.121$，$P = 0.737$）。

表 2　3 组间 CXCL16 rs2277680 多态性基因型和等位基因频率的分布 [n(%)]

组别	稳定斑块组（$n = 218$）	易损斑块组（$n = 258$）	χ^2	P
CXCL16 基因型				
GG	43(19.7)	32(12.4)	4.772	0.032
GA + AA	74 + 101(80.3)	131 + 95(87.6)		
CXCL16 等位基因				
G	160(36.7)	195(37.8)	0.121	0.737
A	276(63.3)	321(62.2)		

4. 非条件 *Logistic* 回归分析结果：将稳定斑块组和易损斑块组的临床资料中的年龄、性别、高血压病病史、糖尿病病史、吸烟史、饮酒史、空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、基因型等纳入回归方程，变量筛选采用向后剔除法。结果显示糖尿病病史是急性动脉粥样硬化性脑梗死患者颈动脉易损斑块的危险因素；高密度脂蛋白是急性动脉粥样硬化性脑梗死患者颈动脉易损斑块的保护因素；GA + AA 型基因即不是危险因素，也不是保护因素，详见表 3。

表 3　非条件 *Logistic* 回归分析危险因素结果

变量	β	P	校正 OR	95% CI
糖尿病病史	1.040	0.030	2.829	1.103 ~ 7.255
高密度脂蛋白	–0.687	0.041	0.503	0.261 ~ 0.972
GA + AA 型基因	–0.564	0.224	0.569	0.229 – 1.413
常量	0.393	0.184		

β. 回归系数；OR. 优势比；CI. 置信区间；高密度脂蛋白截止值为 1.15mmol/L

讨　　论

趋化因子 CXC 配体 16（chemokine CXC ligand 16，CXCL16）是由 254 个氨基酸构成的一种跨膜蛋白，其基因位于染色体 17p13。该跨膜蛋白质从结构上可分为 4 部分：包括位于细胞外的含氨基末端信号序列的 CXC 趋化因子功能结构域和黏蛋白样结构域、还有疏水性跨膜结构域和胞质 YXPV 结构域。rs2277680 多态性位点是位于 CXCL16 基因第 4 号外显子上的碱基发生突变，鸟苷酸（G）被腺苷酸（A）替代，使其编码的丙氨酸变为缬氨酸，该氨基酸位于其近膜部位的黏蛋白结构域中，其突变可促进膜结合型 CXCL16 被解整合素样金属蛋白 10（ADAM – 10）等切割，而该切割位点正好位于细胞外贴近细胞膜的黏蛋白样结构域，与 rs2277680 多态性位点一致，使其脱落后成为可溶型，介导炎性细胞向病变部位聚集、浸润，促进 AS 的形成[15~18]。

Huang 等[19]通过冠状动脉造影、血清 CXCL16 水平的测定及基因型的检测，发现 CXCL16 基因内含子多态性会增加中国汉族人群的冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病风险。Lundberg 等[20]通过对急性心肌梗死患者及经冠状动脉成形术和支架置入术的患者的基因检测，发现 CXCL16 基因 rs2277680 多态性与冠状动脉狭窄的程度有关。罗永百等研究认为中国西安汉族人群中 CXCL16 基因 rs2277680 多态性位点可能与中国西安汉族人群中 ACS 发生的遗传易感性密切相关，其 A 等位基因发生 ACS 的风险较 G 等位

基因明显升高。以上研究结果都提示了 rs2277680 多态性与冠状动脉粥样硬化相关。Ma 等通过酶联免疫吸附法测定血清可溶型 CXCL16 水平,发现大动脉粥样硬化性急性缺血性卒患者的 CXCL16 水平明显高于正常对照组。宋双等认为 CXCL16 基因 rs2277680 多态性与血清 CXCL16 水平独立相关,其中 AA 基因型较 GG + GA 基因型血清 CXCL16 水平明显增高,AA 基因型与大动脉粥样硬化性卒中密切相关,A 等位基因是大动脉粥样硬化严重程度的重要标志。以上研究说明 rs2277680 多态性与炎性反应相关,与动脉粥样硬化斑块的稳定性存在一定的关系。

本研究发现,易损斑块组 CXCL16 基因 rs2277680 位点 AA + GA 基因型明显高于稳定斑块组,差异有统计学意义,说明 AA + GA 基因型与斑块的易损性存在着一定的关系;但两组间的 A 等位基因频率无明显差异,可能是由于该位点在群体中的分布存在种族及地域差异,在汉族人群中突变率较高,使杂合子占了绝大部分,使其无统计学意义。

综上所述,本研究表明 CXCL16 基因 rs2277680 多态性 AA + GA 基因型与急性动脉粥样硬化性脑梗死颈动脉斑块易损性存在着一定的相关性;但 A 等位基因不是颈动脉斑块易损的遗传易感基因。动脉粥样斑块的形成、破裂是一种多基因、多因素引起的病理过程,目前已知的 CXCL16 基因多态性序列较多,且存在连锁不平衡,可能与相邻近基因的某个 SNP 有连锁不平衡;本研究只选了 1 个多态性位点,其是否有助于颈动脉易损斑块易患性仍需开展进一步研究。

参考文献

1 Tabas I, Garcia - Gardena G, Owens GK. Recemt insights into the cellular biology of atherosclerosis[J]. J Cell Biol, 2015, 209(1): 13 - 22

2 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. Nature, 2011, 473(7347): 317 - 325

3 Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis [J]. Nat Immunol, 2011, 12(3): 204 - 212

4 P Libby, A Lichtman, G Hansson. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to human[J]. Immunity, 2013, 38 (6): 1092 - 1104

5 Hammad MA , Abdel - Bakky MS, Walker LA, *et al*. Oxidized low - density lipoprotein and tissue factor are involved in monocrotaline / lipopolysaccharide induced hepatotoxicity[J]. Arch Toxicol, 2011, 85 (9): 1079 - 1089

6 Seizer P, Stellos K, Selhorst G, *et al*. CXCL16 is a novel scavenger receptor on platelets and is associated with acute coronary syndrome[J]. Thromb Haemost, 2011, 105(6): 1112 - 1114

7 Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, *et al*. Cell surface anchored SR - PSOX /CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6 - expressing cells[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 267 - 274

8 Sheikine Y, Bang CS, Nilsson L, *et al*. Decreased plasma CXCL16 / SR - PSOX concentration is associated with coronary artery disease [J]. Atherosclerosis, 2006, 188(2): 462 - 466

9 Wang KD, Liu ZZ, Wang RM, *et al*. Chemokine CXC Ligand 16 serum concentration but not A181V genotype is associated with atherosclerotic stroke[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(19/20): 1447 - 1451

10 Ueland T, Smedbakken LM, Hallen J, *et al*. Soluble CXCL16 and long-term outcome in acute ischemic stroke[J]. Atherosclerosis, 2012, 220 (1): 244 - 249

11 Ma A, Pan X, Xing Y, *et al*. Elevation of serum CXCL16 level correlates well with atherosclerotic ischemic stroke[J]. Arch Med Sci, 2014, 10(1): 47 - 52

12 Hundhausen C, Schulte A, Schulz B, *et al*. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes[J]. J Immunol, 2007, 178(12): 8064 - 8072

13 Mathiesen EB, Bonaa KH, Joakimsen O, *et al*. Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: the tromso study[J]. Circulation, 2001, 103(17): 2171 - 2175

14 中华神经科学会中华神经外科学会. 各类脑血管病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379 - 380

15 Hundhausen C, Schulte A, Schulz B, *et al*. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes[J]. J Immunol, 2007, 178(12): 8064 - 8072

16 Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, *et al*. Cell surface - anchored SR - PSOX /CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6 - expressing cells[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2) : 267 - 274

17 Shimaoka T, Kume N, Minami M, *et al*. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR - PSOX, on macrophages[J]. J Biol Chem, 2000, 275(52): 40663 - 40666

18 Zhuge X, Murayama T, AraiH, *et al*. CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331(4): 1295 - 1300

19 Huang M, Han Y, Zhang X, *et al*. An intron polymorphism in the CXCL16 gene is associated with increased risk of coronary artery disease in Chinese Han population: a large angiography based study[J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1): 160 - 165

20 Lundberg GA, Kellin A, Samnegard A, *et al*. Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR - PSOX gene[J]. J Intern Med, 2005, 257(5): 415 - 422

(收稿日期:2016 - 02 - 16)

(修回日期:2016 - 03 - 21)