MIF 基因启动子区 -173 多态性与冠心病相关性研究

钱　鲁　殷日鹏

摘　要　目的　探讨巨噬细胞移动抑制因子(MIF)基因启动子区 -173 微卫星多态性与冠心病的相关性。**方法**　根据冠脉造影结果,将 347 例住院患者分为对照组 229 例和冠心病组 118 例,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 MIF 浓度,应用聚合酶链反应(PCR)技术及 DNA 测序技术分析基因。**结果**　(1)173C 等位基因在冠心病组中频率较高。(2)173C 等位基因的血清 MIF 浓度较 173G 等位基因高,173C/C 基因型的血清 MIF 浓度较 173C/G 和 173G/G 基因型高。**结论**　本研究发现 MIF -173G/C 基因多态性可能与冠状动脉粥样硬化性心脏病的发展有关。

关键词　巨噬细胞移动抑制因子　启动子　基因多态性　冠状动脉粥样硬化性心脏病

中图分类号　R541.4　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.009

Macrophage Migration Inhibitory Factor Promoter Polymorphisms (-173G/C): Relationship with Coronary Atherosclerotic Disease Subjects.

Qian Lu, Yin Ripeng. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract　Objective　We analyzed the relationship of -173G/C MIF polymorphisms with soluble MIF in Coronary Atherosclerotic Disease (CAD) patients. **Methods**　A total of 347 patients were selected, of which 229 normal - coronary and 118 Coronary artery disease subjects. Genotyping of -173G/C polymorphisms were performed by PCR and DNA sequencing. Serum MIF levels were measured using an ELISA kit. Patients were classified by coronary angiogram. **Results**　(1)The frequency of the C genotype was higher in CAD patients than in the control. (2) Serum MIF levels was higher in 173C subjects than in 173G subjects. In addition, we found an increase in serum MIF levels in carriers of the (C/C) genotypes the -173 MIF polymorphisms. **Conclusion**　These data suggest that MIF -173G/C polymorphism may be related to the development of CAD in a Chinese population.

Key words　Macrophage migration inhibitory factor; Promoter; Gene polymorphisms; Coronary atherosclerotic disease

冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)是指冠状动脉粥样硬化导致管腔狭窄或阻塞,和(或)冠脉功能性改变导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病统称为冠心病。冠心病的发病基础是冠状动脉的粥样硬化,发病的危险因素有很多,其中包括吸烟、高脂血症、高血压和糖尿病等[1]。研究发现,冠心病也是一种慢性炎症性疾病,多种炎性因子在冠心病的发生、发展过程中发挥着重要作用。巨噬细胞移动抑制因子(MIF)是一种同源三聚体蛋白质,最早发现 MIF 的生物学功能是它能够在局部抑制巨噬细胞游走,促进炎性反应的发生[2]。MIF 能在很多细胞和组织中表达,其中包括单核 - 吞噬细胞,血管平滑肌细胞和心肌细胞等[3~5]。

人 MIF 基因位于人第 21 号染色体上(21q 22, 33),总长约 2119bp。MIF 基因上已经发现有 4 个基因多态性位点,分别是 SNP: -173(rs755622)、+254(rs2096525)、+656(rs2070766)和 -794$CATT_{5\sim8}$微卫星多态性,其中 +254 位点和 +656 位点位于内含子中,-173 位点和 -794 位点位于启动子区。目前有研究已经证实,MIF 基因多态性和 MIF 蛋白浓度升高与溃疡性结肠炎、银屑病及肺结核等疾病发病相关。这些疾病多伴随有炎性反应的发生,这阐明了 MIF 促进上述疾病发生、发展的关键作用[6~8]。

有研究证实,在 MIF 基因启动子区中,173 位点在转录过程中起到关键作用,其中 173G/C 与基因表达及外周血 MIF 水平相关[9~11]。本研究的目的主要是探讨巨噬细胞移动抑制因子(MIF)基因启动子区 173G/C 微卫星多态性及血清 MIF 浓度与冠心病的相关性。

对象与方法

1. 研究对象: 取 2012 年 1 月 ~2016 年 11 月温

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573185);浙江省自然科学基金资助项目(2014C33163);温州市科技局基金资助项目(Y20130167)

作者单位:325000　温州医科大学附属第二医院

通讯作者:殷日鹏,电子信箱: qianluwz@163.com

州医科大学附属第二医院 347 例住院人群为研究对象,并行冠脉造影术将其分为冠心病组 118 例(男性 79 例,女性 39 例)和正常组 229 名(男性 125 名,女性 104 名)。所有研究对象均排除肿瘤、炎症、自身免疫性疾病、严重的肝肾功能不全(Ccr≤30%,ALT≥3 倍正常值上限)等。研究对象均为浙江汉族自然人群,无血缘关系。

2. 诊断标准:冠脉造影术诊断冠心病标准:冠脉造影示左主干、前降支、右冠状动脉、回旋支或其他主要分支的血管直径狭窄超过 50%。

3. 人基因组 DNA 提取和血清浓度测定:取桡动脉血 5ml,经 2% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)抗凝,低速离心,取部分血细胞采用人全血 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 产品)提取 DNA。

4. MIF - 173G/C 基因测序:采用聚合酶链反应(PCR)扩增 - 173 位点。- 173 位点引物:上游引物:5′ - ACT AAG AAA GAC CCG AGG C - 3′,下游引物:5′ - GGG GCA CGT TGG TGT TTAC - 3′,扩增长度为 366bp。PCR 反应体系为 25μl,反应条件为 95℃ 预变性 5min,95℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,扩增 35 个循环,72℃ 延伸 10min,冷却 10min。

将上述 PCR 扩增产物送至上海翰宇生物科技有限公司进行基因测序。

5. 血清 MIF 浓度测定:取桡动脉血 5ml,经 2% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)抗凝,低速离心,取血清置 - 80℃ 冰箱保存,统一采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测血清 MIF 浓度。

6. 统计方法:数据用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。- 173 位点基因型和等位基因频率采用基因计算统计法,资料经 *Hardy - Weinberg* 遗传平衡检验,$P>0.05$。两组等位基因和多组基因型分布频率之间比较采用卡方检验或 *Fisher's* 确切概率分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。两组血清 MIF 浓度之间的比较采用 t 检验,多组间采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 冠心病组和对照组 - 173 位点基因型和等位基因的频率分布情况:对照组与冠心病组一般临床资料比较,各组间除性别、高脂血症外,年龄、吸烟、饮酒、高血压等方面差异均无统计学意义。冠心病组和对照组 - 173G/C 基因型分布经 *Hardy - Weinberg* 遗传平衡检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 对照组和冠心病各亚组一般临床资料比较

项目	对照组 ($n=229$)	冠心病组 ($n=118$)	F/χ^2	P
平均年龄(岁)	64.78 ± 8.26	66.46 ± 10.75	1.16	0.122
性别(男性/女性)	125/104	79/39	4.914	0.027
吸烟(%)	32.5	35.2	0.376	0.540
饮酒(%)	22.5	27.3	0.826	0.363
高血压(%)	67.2	70.5	0.343	0.558
高脂血症(%)	18.2	32.2	8.436	0.004
糖尿病(%)	4.5	6.8	0.922	0.337

两组 - 173 位点存在的基因型有 3 种类型,等位基因类型有 2 种,通过 - 173 位点基因分布频率相互比较可知,基因型和等位基因在两组人群中分布频率不同,差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。其中基因型 CC 和 CG 在冠心病组和对照组中的分布频率不同($P<0.05$,OR = 4.212),基因型 CC 相对于 CG 是冠心病的危险因子;基因型 CC 和 GG 在冠心病组和对照组中的分布频率也不同($P<0.05$,OR = 3.000),基因型 CC 相对于 GG 也是冠心病的危险因子(表 3)。但基因型 GG 和 CG 在两组内的分布频率比较,差异无统计学意义,由此可见,MIF - 173C 等位基因可能增加冠心病的易感性。

表 2 MIF - 173G/C 基因型和等位基因在冠心病组与正常组中的分布频率[n(%)]

基因型 等位基因	对照组 ($n=229$)	冠心病组 ($n=118$)	χ^2	P
C/C	14(6.1)	21(17.8)		
C/G	73(31.9)	26(22.0)		
G/G	142(62.0)	71(60.2)	13.226	0.010
G	357(77.9)	168(71.2)		
C	101(22.1)	68(28.8)	5.984	0.014

表 3 MIF - 173G/C 基因型在冠心病组与正常组中的分布频率(%)

基因型	对照组 ($n=229$)	冠心病组 ($n=118$)	χ^2	P	OR (95% CI)
CC	14	21			
CG	73	26	12.92	0.001	4.212 (1.872 ~ 9.476)
CC	14	21			
GG	142	71	7.005	0.002	3.000 (1.440 ~ 6.249)
GG	142	71			
CG	73	26	1.577	0.209	1.404 (0.826 ~ 2.386)

2. MIF－173G/C 等位基因及基因型对血清 MIF 浓度的影响：为了证实 MIF－173G/C 对 MIF 表达的影响，笔者分析了各位点基因型和等位基因。MIF－173C 等位基因的血清 MIF 浓度为 66.18 ± 9.31μg/L，较 MIF－173G 等位基因的 MIF 浓度 56.88 ± 10.63μg/L 高（P = 0.010，图 1）。MIF 基因型对血清 MIF 浓度存在影响（P = 0.05）。MIF－173C/C 基因型的血清 MIF 浓度（65.20 ± 9.76μg/L），较 MIF－173C/G 基因型及 MIF－173G/G 基因型的血清 MIF 浓度（57.05 ± 10.96μg/L，56.92 ± 10.58μg/L）高（P = 0.036，P = 0.015，图 2）。

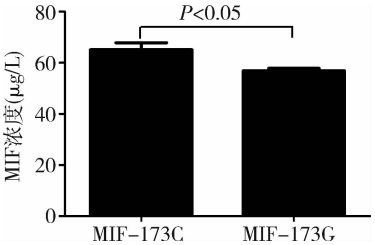


图 1　MIF－173G/C 等位基因对血清 MIF 浓度的影响

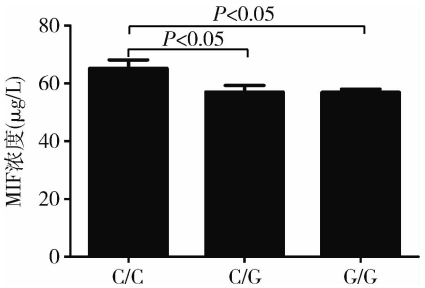


图 2　MIF－173G/C 基因型对血清 MIF 浓度的影响

讨　　论

冠心病是世界范围内致残和死亡的首要原因。动脉粥样硬化是一类由遗传、环境及两者之间相互作用引起的多基因疾病。了解冠心病的遗传基础有助于探索新的疾病通路及预测，为冠心病提供新的诊断和治疗手段。MIF 在冠心病的发病机制中扮演着重要角色，主要影响动脉粥样硬化。在动脉粥样硬化的发生发展中，炎性反应和免疫反应紧密联系。单核－吞噬细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、树突状细胞等促进了动脉粥样硬化的病理进程[12]。MIF 能够活化巨噬细胞、导致微血管出血。在动脉粥样硬化中上调 MIF 的表达，可观察到血管内皮细胞、单核细胞向内皮细胞黏附，巨噬细胞在早期脂质斑块中聚集。由于 MIF 抑制剂具有稳定甚至改善脂质斑块的作用，MIF 成为动脉粥样硬化药物治疗的新目标[13]。

MIF 表达增加与一系列免疫相关性疾病有关。在结肠炎相关实验中，免疫缺陷小鼠难以发生结肠炎，重新给予非特异性免疫细胞后结肠炎发生率明显升高。结肠炎小鼠可以用抗 MIF 球蛋白治疗。因此，固有免疫系统持续合成 MIF 与小鼠结肠炎发生、发展有关[14]。此外，克罗恩病、银屑病患者体内 MIF 浓度明显升高[14, 15]。类风湿关节炎患者体内 MIF 活性也明显升高，MIF 在活动性类风关患者血清和滑膜组织中大量表达。在大鼠和小鼠实验中均发现，抗 MIF 球蛋白或 MIF 基因缺陷都能阻断类风湿性关节炎的发展。

MIF－173 是目前研究中－173 位点最有功能性的基因，突变 C 基因型能够产生 AP－4 转录因子结合部位，而固有的 MIF 基因多态性不能在不同组织中合成不同长度的转录子，因此，目前研究多集中于 MIF－173G/C 位点。有研究发现，MIF－173C 基因负荷与成人炎症性关节炎和幼年特发性关节炎有关。Amoli 等[16]研究表明，MIF－173C 与结节性红斑的发生有关。目前，笔者并没有发现 MIF－173G/C 与冠心病的发病及冠脉病变程度相关的文献报道。笔者研究发现，携带 MIF－173C 等位基因的人群，其血清 MIF 浓度较高，而 MIF－173C/C 基因型相较于其他基因型，其血清 MIF 浓度较高。既往研究发现，相对于对照组，冠心病组血清 MIF 浓度明显升高，因此，笔者推测，携带 MIF－173C 等位基因及 MIF－173C/C 基因型人群能够合成较多 MIF 蛋白，其冠心病的易感性较高[17]。但其机制尚不明确。Donn 等研究表明，MIF－173 位点合成 MIF 多态性，可能与细胞类型有关，不同细胞中存在不同转录因子，与 MIF－173 位点 G、C 等位基因互相作用，导致 MIF 的多态性。

本研究的局限性在于，本研究仅纳入温州医科大学附属第二医院汉族患者，无法代表中国人群，有待于下一步开展多中心、多地区合作研究以完善样本的代表性。综上所述，根据研究结果，本研究发现 MIF－173G/C 基因多态性可能与冠状动脉粥样硬化性心脏病的发展有关。

参考文献

1　Rifai N, Ridker PM. Inflammatory markers and coronary heart disease [J]. Curr Opin Lipidol, 2002, 13(4): 383－389

2　Leng L, Bucala R. Insight into the biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor[J]. Cell Rese, 2006, 16(2): 162－168

3　Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, *et al*. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration

inhibitory factor[J]. J Exp Med,1994,179(6): 1895 - 1902
4 Burger - Kentischer A, Goebel H, Seiler R, *et al*. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis[J]. Circulation,2002,105(13): 1561 - 1566
5 Willis MS, Carlson DL, Dimaio JM, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor mediates late cardiac dysfunction after burn injury[J]. Am J Physiol Heart Circulat Physiol,2005,288 (2): H795 - H804
6 Wu J, Chen F, Zhang X, *et al*. Association of MIF promoter polymorphisms with psoriasis in a Han population in northeastern China[J]. J Dermatol Sci,2009,53 (3): 212 - 215
7 Shiroeda H, Tahara T, Nakamura M, *et al*. Association between functional promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene and ulcerative colitis in Japan[J]. Cytokine, 2010,51(2): 173 - 177
8 Li Y, Zeng Z, Deng S. Study of the relationship between human MIF level, MIF - 794CATT5 - 8 microsatellite polymorphism, and susceptibility of tuberculosis in Southwest China[J]. Brazil J Infect Dis, 2012,16(4): 383 - 386
9 De la Cruz - Mosso U, Bucala R, Palafox - Sanchez CA, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor: association of - 794 CATT5 - 8 and - 173 G > C polymorphisms with TNF - alpha in systemic lupus erythematosus[J]. Human Immunol,2014,75 (5): 433 - 439
10 Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, *et al*. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis[J]. Genes Immunity 2002,3(3):170 - 176
11 Sakaue S, Ishimaru S, Hizawa N, *et al*. Promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is associated with obesity[J]. Int J Obesity,2006,30 (2): 238 - 242
12 Noels H, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis[J]. Trends Cardiovasc Med,2009,19 (3): 76 - 86
13 Burger - Kentischer A, Gobel H, Kleemann R, *et al*. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF)[J]. Atherosclerosis,2006,184 (1): 28 - 38
14 de Jong YP, Abadia - Molina AC, Satoskar AR, *et al*. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF[J]. Nat Immunol, 2001,2 (11): 1061 - 1066
15 Paralkar V, Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF)[J]. Genomics,1994,19(1): 48 - 51
16 Amoli MM, Donn RP, Thomson W, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with sarcoidosis in biopsy proven erythema nodosum[J]. J Rheumatol, 2002, 29 (8): 1671 - 1673
17 王晓燕,朱永金,郭辉辉,等. MIF 与冠心病心绞痛类型相关性分析[J]. 医学研究杂志. 2013, 42 (11): 65 - 68

(收稿日期:2017 - 04 - 07)
(修回日期:2017 - 07 - 22)

维吾尔族老年急性冠脉综合征患者血清胱抑素 C、尿酸、血浆纤维蛋白原水平与冠脉病变程度的相关性

古孜丽 依力哈木·阿不力提甫 穆叶赛·尼加提

摘 要 目的 探讨新疆地区维吾尔族老年 ACS 患者血清胱抑素 C、尿酸、血浆纤维蛋白原水平与冠脉病变严重程度的关系。**方法** 回顾性分析 133 例在新疆维吾尔自治区人民医院诊断考虑急性冠脉综合征并住院行冠脉造影的年龄≥65 岁的维吾尔族患者的基本资料、既往史、生化指标。根据 ACS 组 Gensini 评分将患者分为低分组(0 ~ 29 分)44 例、中分组(30 ~ 59 分)29 例、高分组(≥60 分)60 例,比较 ACS 组胱抑素 C、尿酸、血浆纤维蛋白原水平以及与 Gensini 评分的相关性 。**结果** 随着 Gensini 评分增加,维吾尔族老年 ACS 患者血清胱抑素 C、尿酸、血浆纤维蛋白原水平升高。Gensini 评分与血清胱抑素 C、尿酸、血浆纤维蛋白原水平均呈正相关(r 分别为 0.480、0.514、0.603,P 均为 0.000)。*Logistic* 回归分析提示高血清胱抑素 C、尿酸、血浆纤维蛋白原水平是高 Gensini 评分的独立危险因素。**结论** 维吾尔族老年 ACS 患者血清胱抑素 C、尿酸、血浆纤维蛋白原水平升高与冠脉病变严重程度相关,是冠脉病变程度加重的危险因素,在临床工作中对维吾尔族老年 ACS 患者进行上述指标的检测,早期进行干预治疗,对预防急性冠脉事件的发生具有重要临床意义。

关键词 维吾尔族老年 急性冠脉综合征 血清胱抑素 C 尿酸 血浆纤维蛋白原 冠脉病变程度

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160029);新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2015211C194)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院心内科(古孜丽、穆叶赛·尼加提);新疆医科大学研究生学院(依力哈木·阿不力提甫)

通讯作者:穆叶赛·尼加提,电子信箱:muyassar11@ aliyun. com