

白细胞介素 8 - 251A/T 单核苷酸多态性及 其血浆水平与冠心病易感性的关系

候慧娟¹, 巩会平², 赵晖¹, 辛辉¹, 张蕊¹, 刘相萍¹

(1. 青岛大学医学院附属医院, 山东省青岛市 266003; 2. 山东大学第二医院, 山东省济南市 250033)

[关键词] 冠心病易感性; 白细胞介素 8; 单核苷酸多态性

[摘要] **目的** 研究白细胞介素 8 - 251A/T 单核苷酸多态性及其血浆水平与冠心病易感性的关系。**方法** 应用聚合酶链反应限制片长多态性检测冠心病组与对照组白细胞介素 8 - 251A/T 单核苷酸多态性, 酶联免疫吸附法测定白细胞介素 8 血浆水平。**结果** 白细胞介素 8 血浆水平在冠心病组显著高于对照组 ($P < 0.05$), -251A/T 基因型频率、等位基因 A 和 T 频率在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但是与其他冠心病患者相比, 急性冠状动脉综合征患者 AA 基因型明显减少 (OR = 0.43, 95% CI 为 0.2 ~ 0.97, $P < 0.05$)。**结论** 白细胞介素 8 血浆水平与冠状动脉粥样硬化病变有相关性。-251A/T 位点单核苷酸多态性与冠心病无相关性, 但可影响冠心病的临床表现。AA 基因型或许能降低急性冠状动脉综合征的发病风险。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship Between IL-8 - 251A/T Single Nucleotide Polymorphism and Plasma Level with Coronary Heart Disease Susceptibility

HOU Hui-Juan¹, GONG Hui-Ping², ZHAO Hui¹, XIN Hui¹, ZHANG Rui¹, and LIU Xiang-Ping¹

(1. Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China; 2. The Second Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250033, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease Susceptibility; Interleukin-8; Single Nucleotide Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between plasma level of interleukin-8 (IL-8) and the polymorphism of IL-8 single nucleotide with the susceptibility to coronary heart disease (CHD). **Methods** Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect genotype of IL-8 - 251A/T in CHD cases and control subjects. Plasma levels of IL-8 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with that of control subjects, plasma levels of IL-8 of CHD cases were significantly increased ($P < 0.05$). The overall distribution of IL-8 - 251A/T genotype and allelotype in CHD patients and controls were not significantly different ($P > 0.05$). However, a statistically significant lower frequency of AA genotypes was observed in acute coronary syndrome patients compared to other patients (OR = 0.43, 95% CI was 0.2 ~ 0.97, $P = 0.04$). **Conclusions** The results suggest that plasma level of IL-8 may co-relate with the susceptibility of CHD, -251A/T single nucleotide polymorphism is not associated with the susceptibility of CHD, but the genetic diversity may influence the clinical manifestation of CHD. The AA genotype may reduce the risk of acute coronary syndrome.

冠心病是欧美等发达国家的主要死因^[1]。近年来,我国人群冠心病发病和死亡呈明显上升趋势^[2]。动脉粥样硬化是一种由多种环境危险因素与遗传基因相互作用导致的疾病。研究认为慢性炎症在粥样斑块的形成和发展中起重要作用^[3]。白细胞介素 8 (IL-8) 是由中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞产生的

一种重要的趋化因子^[4]。近几年来,越来越多的证据表明 IL-8 在介导粥样斑块进展的炎症反应中起关键作用^[5,6]。国内亦有研究显示血清中 IL-8 水平变化与急性冠状动脉综合征 (ACS) 发病密切相关^[7]。但 IL-8 单核苷酸多态性与冠心病之间的关系还缺乏研究。本研究试图探讨 IL-8 的血浆水平、单核苷酸多

[收稿日期] 2011-11-15

[作者简介] 候慧娟, 硕士研究生。巩会平, 博士, 主治医师, 主要从事代谢综合征及并发症的基础与临床研究。通讯作者辛辉, 博士, 副教授, 主要从事冠心病的诊断和治疗, E-mail 为 xhqy2002@yahoo.com.cn。

态性与冠心病的易感性、传统危险因素和临床表现之间的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

以医院为基础的病例-对照研究。观察对象为山东半岛地区的汉族人群,且无血缘关系。选择2009年5月至2011年8月在青岛大学医学院附属医院急诊科和心内科住院治疗的患者共414例,分两组:冠心病组244例,其中男156例,女88例,年龄 64.06 ± 8.54 岁,经冠状动脉造影显示左主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉中任何一支狭窄程度大于50%,其中诊断为ACS(包括不稳定型心绞痛、非ST段抬高心肌梗死和ST段抬高心肌梗死)的患者124例。对照组170例,其中男92例,女78例,年龄 63.55 ± 8.63 岁,同时期也进行了冠状动脉造影检查,显示没有冠心病的证据。排除标准:①合并严重感染、严重心力衰竭、恶性肿瘤;②合并严重的肝、肾疾病;③合并甲状腺功能紊乱、自身免疫性疾病、慢性结缔组织病、血栓性疾病。

1.2 DNA提取

入选对象均采外周静脉血2 mL, EDTA抗凝,

-20℃保存,应用百泰克离心柱试剂盒提取人基因组DNA。

1.3 基因分型检测

IL-8基因检测应用PCR-RFLP方法进行。PCR反应体系为50 μL,其中模板DNA 2 μL, 2 × Master-Mix 25 μL, 上游引物(5'-TGC CCC TTC ACT CTG TTA AC-3')和下游引物(5'-GAA GTC CCA CAA TTT GGT G-3')各2 μL(10 μmol/L), 双蒸水19 μL。反应条件为:95℃起始模板变性5 min, 然后94℃模板变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环后, 72℃延伸7 min。PCR产物全长343 bp(图1)。PCR产物与限制性内切酶MfeI混合于37℃水浴槽中过夜, 配制20 μL反应体系, 其中10 × NEB缓冲液2 μL, PCR产物10 μL, 内切酶MfeI 0.5 μL, 双蒸水7.5 μL, 酶切产物行2.0%琼脂糖凝胶电泳分析。IL-8转录起始处上游-251A/T位点处碱基T被A代替, 从而产生一个MfeI酶切位点。A等位基因存在该识别, 能够被切开, 消化后的产物为313 bp和30 bp, 而T等位基因不存在能够识别的位点, 反应后仍为343 bp。对IL-8的PCR产物进行直接测序后, 多态性亦得到证实, 结果与该研究一致(图2)。

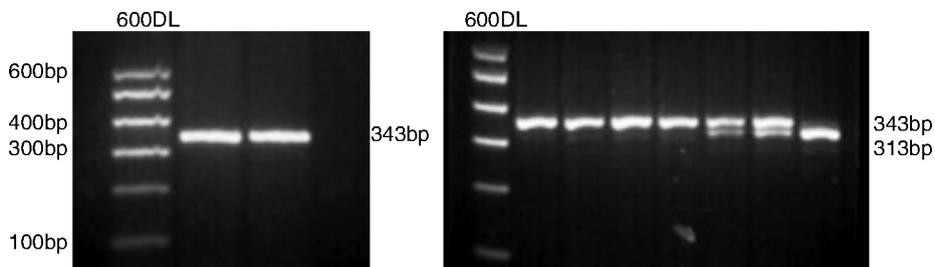


图1. 应用PCR对IL-8基因片段进行扩增

Figure 1. Amplified IL-8 gene fragment with PCR

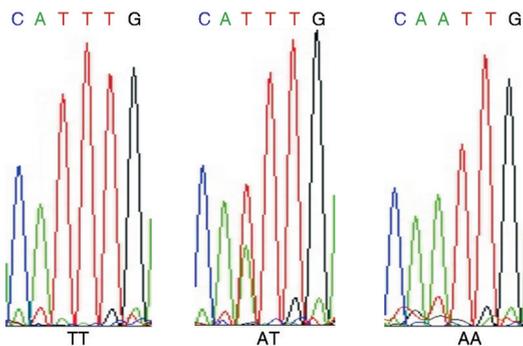


图2. 应用PCR-RFLP进行IL-8 -251A/T基因分型及通过直接测序确认分型

Figure 2. Detecting IL-8 -251A/T genotype with PCR-RFLP and genotypes confirmed by direct sequencing

1.4 血脂检测

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)测定采用双试剂酶法, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL C)测定采用双试剂消除法, 以上测定均在全自动生化分析仪上进行。

1.5 血浆IL-8水平测定

取空腹外周肘静脉血3 mL, 1500 r/min离心15 min, 取上层血浆入EP管, -80℃冰箱低温保存待用。采用ELISA测定IL-8水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学方法

采用SPSS17.0统计分析软件进行数据处理及

统计分析。应用 Hardy-Weinberg 平衡检验基因分布。以 χ^2 检验或 Student's t 检验比较人口学特征、吸烟状况、血压、血糖、血脂水平、IL-8 血浆水平。应用 Logistic 回归进行分析。相关性分析采用 Pearson 检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以百分比表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

该研究入选对象在年龄和性别上无明显差异 ($P > 0.05$), 冠心病组吸烟人数、收缩压、舒张压、体质指数、血糖、TG、TC、LDLC 高于对照组, HDLC 低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 一般临床资料比较

Table 1. Comparison of the clinical data

项 目	冠心病组 ($n = 244$)	对照组 ($n = 170$)
年龄(岁)	64.06 ± 8.54	63.55 ± 8.63
男性(例)	156(63.93%)	92(54.12%)
吸烟(例)	104(42.62%) ^b	32(18.82%)
体质指数(kg/m ²)	25.56 ± 3.20 ^a	23.88 ± 2.77
收缩压(mmHg)	165.3 ± 34.8 ^b	123.9 ± 18.3
舒张压(mmHg)	93.8 ± 20.0 ^b	78.2 ± 12.1
血糖(mmol/L)	6.46 ± 2.49 ^b	5.27 ± 0.66
TC(mmol/L)	4.67 ± 0.66 ^b	4.08 ± 1.04
TG(mmol/L)	1.70 ± 1.27 ^b	1.05 ± 0.64
HDLC(mmol/L)	1.28 ± 0.27 ^a	1.65 ± 0.30
LDLC(mmol/L)	2.32 ± 0.46 ^b	2.15 ± 0.73
冠状动脉病变(例)		
单支病变	38(15.57%)	
多支病变	206(84.43%)	
ACS(例)	124(50.82%)	
治疗措施		
冠状动脉血管成形术	144(59.02%)	
冠状动脉旁路移植术	47(19.26%)	
药物治疗	53(21.72%)	

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 血浆 IL-8 水平

冠心病组与对照组血浆 IL-8 水平差异有统计学意义(分别为 $4.18 \pm 5.06 \mu\text{g/L}$ 和 $0.87 \pm 1.54 \mu\text{g/L}$; $P < 0.05$), 经 Logistic 回归去除其他因素(年龄、性别、吸烟、收缩压、舒张压、体质指数、血糖、TG、TC、LDLC、HDLC、病变支数)后, 差异仍存在统计学意义 ($OR = 1.58$, 95% CI 为 $1.19 \sim 2.09$, $P = 0.002$)。

2.3 基因型和等位基因频率分布

IL-8 -251A/T 基因型和等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$)。IL-8 -251A/T 基因型和等位基因频率分布在冠心病组与对照组之间差异没有统计学意义, 去除了其他因素(同上)后差异仍旧没有统计学意义 ($P > 0.05$; 表 2)。与非 ACS 患者相比, ACS 患者 AA 基因型明显减少 ($OR = 0.43$, 95% CI 为 $0.2 \sim 0.97$, $P = 0.04$; 表 3)。应用 Logistic 回归去除病变支数这一因素之后差别更加明显 ($OR = 0.41$, 95% CI 为 $0.19 \sim 0.95$, $P = 0.03$)。该基因型与冠心病其他的危险因素之间没有相关性 ($P > 0.05$)。

表 2. IL-8 -251 A/T 基因型和等位基因频率比较(例)

Table 2. Comparison of IL-8 -251A/T genotype and allele frequencies

基因型/等位基因	冠心病组	对照组
AA	41(16.80%)	21(12.35%)
AT	130(53.28%)	85(50%)
TT	73(29.92%)	64(37.65%)
A	212(43.44%)	127(37.35%)
T	276(56.56%)	213(62.65%)

表 3. IL-8 -251A/T 基因型在 ACS 组与非 ACS 组中的分布(例)

Table 3. IL-8 -251A/T genotype between ACS group and non-ACS group

分 组	AA	AT	TT
冠心病组($n = 244$)	41(16.80%)	130(53.28%)	73(29.92%)
ACS 组($n = 124$)	12(9.68%) ^a	72(58.06%)	40(32.26%)
非 ACS 组($n = 120$)	29(24.17%)	58(48.33%)	33(27.50%)

a 为 $P < 0.05$, 与非 ACS 组比较。

3 讨论

IL-8 是一种重要的炎性细胞趋化因子, 它主要由中性粒细胞、巨噬细胞及上皮细胞等多种细胞受到脂多糖、肿瘤坏死因子等细胞因子的刺激而产生^[4]。Rus 等^[8]发现在动脉粥样硬化管壁中 IL-6 和 IL-8 的蛋白表达都比正常管壁中高。IL-8 不能被血浆灭活, 因而能在局部累积发挥持续作用^[9]。本研究发现冠心病组 IL-8 血浆水平明显高于对照组。Inoue 等^[10]认为 IL-8 是冠心病患者长期预后的独立预测因子。本研究结果与以上结论一致, 提示冠心病患者体内存在炎症反应, 且 IL-8 可能参与了

冠心病的发病过程。监测血浆 IL-8 水平有助于冠心病患者的早期诊断。IL-8 基因定位于人染色体 4q12-21, 已检测到 IL-8 基因的几个位点存在多态性, 研究比较多的就是处于启动区的 -251 (251A/T, rs4073) 位点。该位点已证实与乳腺癌、多发性硬化等多种炎症疾病的易感性、严重程度和临床进展相关^[11,12]。但本研究中未发现 IL-8 -251A/T 单核苷酸多态性与冠心病有相关性。尽管如此, 研究发现 AA 基因型可以降低 ACS 的发病风险, 且独立于传统的心血管危险因素和冠状动脉病变支数的影响。这一结论与 Vogiatzi 等^[5]的研究结果一致。

ACS 是在冠状动脉粥样硬化的基础上发生斑块破裂或糜烂、溃疡, 并发血栓形成、血管收缩、微血管堵塞等导致急性或亚急性的心肌供血减少, 可导致猝死^[13]。典型的易损斑块由大脂核和薄纤维帽组成, 脂核内富含巨噬细胞等炎症细胞, 平滑肌细胞减少。Yu 等^[14]发现, IL-8 是血管平滑肌的强化学诱导因子, 与血管平滑肌细胞增殖相关。Shin 等^[15]研究表明, IL-8 可以吸引 T 淋巴细胞, 同时它也是血管生长因子, 能诱导平滑肌细胞增殖、移行。而富含平滑肌细胞的纤维帽不容易破裂^[16]。Hacking 等^[17]在呼吸系统上皮发现 -251A/T AA 基因型可提高 IL-8 的转录活性。鉴于以上研究成果, 我们推测, 在血管内皮 -251A/T AA 基因型或许通过提高 IL-8 的转录活性, 增强斑块纤维帽的稳定性, 从而降低患者发生 ACS 的风险。Schömig 等^[18]报道 IL-8 可增加急性心肌梗死循环祖细胞的数量, 后者参与新血管的生成, 继而改善心肌功能。IL-8 是一种多功能细胞因子, 它不仅与炎症有关, 而且具有较强的促血管生成作用, 帮助心肌梗死患者建立侧枝循环, 对心血管有一定程度的保护作用。尽管如此, 我们的研究结果也可能与实验对象数量偏小有关, 进一步扩大样本量进行研究或许会得出不同结果。

总之, 本研究提示冠心病存在炎症反应且 IL-8 可能参与了冠心病的发病过程。IL-8 -251A/T AA 基因型可能通过增强斑块纤维帽的稳定性减少发生 ACS 的风险。ACS 的发病机制包括基因因素、行为因素和环境因素。IL-8 或许通过其他机制参与了 ACS 的病理生理过程, AA 基因型在粥样斑块破裂过程中的作用有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. *PLoS Med*, 2006, 3: 442.

- [2] 中国卫生统计年鉴(2005). 中国协和医科大学出版社, 2005.
- [3] 张全贵, 张莉. 动脉粥样硬化的炎症机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15 (7): 521.
- [4] Boisvert WA, Curtiss LK, Terkeltaub RA. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in atherosclerosis[J]. *Immunol Res*, 2000, 21: 129-137.
- [5] Vogiatzi K, Apostolakis S, Voudris V, et al. Interleukin 8 and susceptibility to coronary artery disease: a population genetics perspective[J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28: 329-335.
- [6] 刘森, 纪求尚, 张运, 等. 不同炎症标志物对冠状动脉病变的预测价值[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (9): 725-728.
- [7] 胡波, 叶少雄, 陈忠诚. 急性心肌梗死患者 IL-8、IL-10 和 TNF- α 的水平变化及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16 (7): 1052-057.
- [8] Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerosis wall[J]. *Atherosclerosis*, 1996, 127 (2): 263.
- [9] Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis[J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300: 729-735.
- [10] Inoue T, Komoda H, Nonaka M, et al. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease[J]. *Cardiology J*, 2008, 124: 319-325.
- [11] Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S. Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8 -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer[J]. *Neoplasma*, 2007, 54: 484-489.
- [12] Kamali-Sarvestani E, Nikseresht AR, Aliparasti MR, et al. IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian Patients[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 404: 159-162.
- [13] Scott IA, Derhy PH, O' Kane D, et al. Discordance between level of risk and intensity of evidence-based treatment in patients with acute coronary syndromes[J]. *Med J Aust*, 2007, 187: 153-159.
- [14] Yu H, Sliedregt K, Overkleef H, et al. Therapeutic potential of a synthetic peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells as antirestenotic agent[J]. *Arteriocler Thromb Vase Biol*, 2006, 10: 1161-175.
- [15] Shin WS, Szuba A, Rockson SG, et al. The role of chemokines human cardiovascular pathology: enhanced biological insights[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 160: 91-102.
- [16] Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque[J]. *Heart*, 2004, 90: 1385-391.
- [17] Hacking D, Knight JC, Rockett K, et al. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease susceptibility[J]. *Genes Immun*, 2004, 5: 274-282.
- [18] Schömig K, Busch G, Steppich B, et al. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27: 1032-037.

(此文编辑 文玉珊)