

肿瘤坏死因子- α 基因多态性与急性冠脉综合征发病关系的研究

潘文麒 刘 艳 金 玮 陈秋静 陆 林 沈卫峰

【摘要】 目的:探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因启动子区域的 G-238A 和 G-308A 多态对急性冠脉综合征发病的影响。 方法:利用 DNA 直接测序法,入选急性冠脉综合征患者(ACS 组)70 例及汉族正常对照组 64 例,对 TNF- α 基因启动子区域的 G-238A 和 G-308A 多态位点分别进行检测。 结果:在 ACS 组中,TNF- α 基因启动子区域 G-308A 多态的基因型分布(GG = 31、GA = 9、AA = 30)及其等位基因频率(G = 50.71%、A = 49.29%)与正常对照组(GG = 47、GA = 4、AA = 13;76.56%、23.44%)相比均有显著性差异($P < 0.01$);G-238A 多态的基因型分布(GG = 44、GA = 8、AA = 18)与正常对照组(GG = 55、GA = 2、AA = 7)相比,统计学上有显著性差异($P < 0.01$),等位基因频率(G = 68.57%、A = 41.43%)与正常对照组(G = 87.50%、A = 12.50%)相比也有显著差异($P < 0.01$)。 结论:TNF- α 基因启动子区域 G-238A 和 G-308A 多态可能与急性冠脉综合征的发生相关,TNF- α 基因变异可能是急性冠脉综合征的重要遗传危险因素。

【关键词】 基因多态性;急性冠脉综合征;单核苷酸多态

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.01.019

Relation between genetic variants of TNF- α and acute coronary syndrome PAN Wen-qi, LIU Yan, JIN Wei, CHEN Qiu-jing, LU Lin, SHEN Wei-feng. Department of Cardiology, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

【Abstract】 Objective: To clarify the possible susceptible locus associated with the pathogenesis of acute coronary syndrome (ACS). **Methods:** A total of 70 ACS cases as well as 64 healthy controls were enrolled. G-238A and G-308A polymorphisms were genotyped in the promoter region of TNF- α gene by direct sequencing. **Results:** Significant differences of genotype distribution and allele frequency of G-308A polymorphism were observed in the ACS group (GG = 31, GA = 9, AA = 30; G = 50.71%, A = 49.29%) compared with the healthy controls (GG = 47, GA = 4, AA = 13; G = 76.56%, A = 23.44%; $P < 0.01$). Moreover, the distribution frequencies of genotypes and alleles of G-238A polymorphism showed statistically differences between ACS group (GG = 44, GA = 8, AA = 18; G = 68.57%, A = 41.43%) and controls group (GG = 55, GA = 2, AA = 7; G = 87.50%, A = 12.50%; $P < 0.01$).

Conclusion: G-238A and G-308A polymorphisms in the promoter region of TNF- α gene might be associated with the risk of ACS. The TNF- α gene variations might be a genetic risk factor for the pathogenesis of ACS in Chinese Han population.

【Key words】 Genetic polymorphism; Acute coronary syndrome; Single nucleotide polymorphism

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是一种重要的炎性细胞因子^[1],与动脉粥样硬化的形成、进展及斑块破裂密切相关。TNF- α 具有双重效应,在炎症反应的早期为致炎症作用;在后期则具有抗炎症和免疫调节作用^[2]。TNF- α 基因多态可以影响 TNF- α 基因产

物的表达量及生物活性,参与急性冠脉综合征(ACS)的发生和发展。深入了解和认识TNF- α 基因多态,将有助于研究 ACS 的发病机制。

本研究采用候选基因关联分析策略,利用 DNA 直接测序法,对 ACS 组和正常对照组 TNF- α 基因启动子区域的 G-238A 和 G-308A 多态性进行检测,并比较分析。

1 材料和方法

1.1 研究对象

ACS 组 70 例均为瑞金医院心内科住院患者,平均年龄(65.6±11.7)岁,男性 51 例,女性 19 例。ACS 诊断主要根据病史、心电图和血清心肌酶谱的动态变化,包括不稳定型心绞痛(UA)、非 ST 段抬高型心肌梗死(NSTEMI)和 ST 段抬高型心肌梗死(STEMI)。正常对照组 64 例,均来自门诊健康体检者,平均年龄(63.1±7.5)岁,其中男性 43 例,女性 21 例。排除冠心病、高血压病、糖尿病、脑梗死、免疫性疾病、神经系统性疾病、恶性肿瘤和肝肾疾病患者。

所有入选者均详细记录病史、既往史、心脑血管、糖尿病、肿瘤等家族史,吸烟和饮酒史。记录的临床、生化检查包括血压、心率、心电图、血脂和空腹血糖等。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 制备 采取外周静脉血 5 ml,经酚-氯仿法抽提白细胞中的基因组 DNA,稀释至 10 ng/μl 备用。

1.2.2 基因型的鉴定 PCR 扩增 PCR 反应体系(5μl),包括 10×缓冲液 0.625 μl,dNTP 混合物(10 mmol/L)0.25 μl,MgCl₂(25 mmol/L)0.325 μl,Hotstar Taq DNA 聚合酶 0.03 μl,引物(10 μmol/L)各 0.125 μl,DNA 模板(10 ng/μl)1 μl,引物由 MassARRAY™ Assay Design 2.0 软件设计,G-308A F: 5' ACGTTGGATGGATTTGTGTGT-AG-GACCCTG-3', R: 5' ACGTTGGATGGGTCCCC-AAAAGAAATGGAG-3',G-238A F: 5' ACGTTGGATGATCAAGGATACCCCTCACAC-3', R:5' ACGTTGGATGGGGTCCTACACACAAATCAG-3'。反应程序:95℃变性 15 min;95℃变性 20 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,45 个循环;72℃延伸 3 min。PCR 产物用虾碱性磷酸酶(SAP)纯化。延伸反应:延伸反应体系(9 μl),包括 SAP 纯化的 PCR 产物 7 μl、延伸引物(50 μmol/L)各 0.36 μl、MassEXTEND 酶 0.018 μl 和延伸混合物(缓冲液和 50 μmol/L d/ddNTP 混合物)0.2 μl。(G-308A F:5' AGGTTTTTGAGGGGCATG-3';G-238A F:5' AGACCCCCCTCGGAATC-3')。反应程序:94℃变性 2 min;94℃变性 5 min,52℃退火 5 min,72℃延伸 5 min,55 个循环;72℃延伸 3 min。延伸产物用 Resin 树脂纯化。基质辅助激光解吸附电

离飞行时间质谱(MALDI-TOF)检测:将纯化产物移至芯片,以 MassARRAY™ Typer 3.0.1 软件进行分析。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行数据分析和统计。应用 ARLEQUIN 软件对入选单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism,SNP)进行连锁不平衡分析,以明确各 SNP 是否符合 Hardy Weinberg 平衡。组间均数比较采用 *t* 检验,组间频数分布比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

与正常对照组比较,ACS 组的年龄、血压、三酰甘油水平明显升高,而血浆高密度脂蛋白水平明显降低($P<0.01$)。

2.2 TNF-α 基因 G-238A 和 G-308A 多态与 ACS 的关系

ACS 组,TNFG-238A、TNFG-308A 多态的基因型分布及其等位基因频率与正常对照组相比均有显著性差异($P<0.01$,见表 1、2)。

表 1 各组 TNF-α 基因 SNPs 基因型频率比较(n,%)				
	GG	GA	AA	P 值
TNF G-238A				
正常对照组	55(86.0)	2(3.1)	7(10.9)	
ACS 组	44(62.9)	8(11.4)	18(25.7)	<0.01
TNF G-308A				
正常对照组	47(73.4)	4(6.3)	13(20.3)	
ACS 组	31(44.3)	9(12.9)	30(42.8)	<0.01

表 2 各组 TNF-α 基因 SNPs 等位基因频率比较(n,%)			
	G	A	P 值
TNF G-238A			
正常对照组	112(87.50)	16(12.50)	
ACS 组	96(68.57)	44(41.43)	<0.01
TNF G-308A			
正常对照组	98(76.56)	30(23.44)	
ACS 组	71(50.71)	69(49.29)	<0.01

3 讨论

TNF-α 基因位于染色体 6p21.3,长约 4.0 kb,含 4 个外显子、3 个内含子。本研究采用 PCR 直接测序法对 TNF-α 基因启动子区域的 G-238A 和 G-308A 多态检测后发现,在华东地区健康汉族人群

中, G-308A 等位基因的频率为 23.44%, 明显高于韩国(8.8%)、高加索人(13.1%~16.0%), 与北爱尔兰白人(24.0%)相似, 提示 G-308A 多态存在种族和地区差异^[2-7]。

TNF- α 基因 G-308A 多态可能与动脉粥样硬化、冠脉病变程度、粥样斑块稳定性、心脏移植排异反应等相关^[6,8-11], 但结果尚存争议。有研究认为 G-308A 多态是冠心病的独立危险因素, 糖尿病患者 A 等位基因携带者冠心病的相对危险增加 2.86 倍^[12,13]; 但有研究提出截然相反的观点, 认为 G-308A 多态的 A 等位基因可以降低发病危险性^[9,12,14]。G-308A 多态的功能及其作用机制目前尚不清楚, 可能与其基因的转录活性有关^[15,16]。

本研究发现, ACS 组 G-308A 多态的 AA 基因型及 A 等位基因频率较正常对照组明显增加, 提示 G-308A 等位基因可能与 ACS 的发生有关, 与既往研究的结论一致^[6,10]。

ACS 组 TNF-G-238A 多态的 AA 基因型及 A 等位基因频率较对照组明显增加, 提示 G-238A 多态可能与 ACS 发病相关。

TNF- α 基因 G-238A 和 G-308A 多态与 ACS 相关, 可能是多位点之间存在协同作用, 也可能是与其他炎症因子共同作用, 具体的致病机制还有待于深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Lei L, Xiong Y, Chen J, et al. TNF alpha stimulates the ACAT1 expression in differentiating monocytes to promote the CE-laden cell formation[J]. J Lipid Res, 2009, 50 (6): 1057-1067.
- [2] Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications[J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(3): 216-228.
- [3] Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators[J]. Circulation, 2003, 108(20): 2460-2466.
- [4] Navarro Gonzalez J, Mora-Fernandez C, Gomez-Chinchon M, et al. Serum and gene expression profile of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in hypertensive diabetic patients: effect of amlodipine administration [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23 (1): 51 - 59.
- [5] Syrjanen J, Hurme M, Lehtimäki T, et al. Polymorphism of the cytokine genes and IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 2002, 61(3): 1079-1085.
- [6] Vendrell J, Fernandez-Real JM, Gutierrez C, et al. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients[J]. Atherosclerosis, 2003, 167(2): 257-264.
- [7] Nicaud V, Raoux S, Poirier O, et al. The TNF alpha/G-308A polymorphism influences insulin sensitivity in offspring of patients with coronary heart disease: the European Atherosclerosis Research Study II [J]. Atherosclerosis, 2002, 161(2): 317-325.
- [8] Zhang HF, Xie SL, Wang JF, et al. Tumor necrosis factor-alpha G-308A gene polymorphism and coronary heart disease susceptibility: an updated meta-analysis[J]. 2011, 127(5): 400-405.
- [9] Endo M, Tai H, Tabeta K, et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis [J]. J Periodontol, 2001, 72 (11): 1554-1559.
- [10] Bernard V, Pillois X, Dubus I, et al. The -308 G/A tumor necrosis factor-alpha gene dimorphism: a risk factor for unstable angina [J]. Clin Chem Lab Med, 2003, 41(4): 511-516.
- [11] Um JY, An NH, Kim HM. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in cerebral infarction[J]. J Mol Neurosci, 2003, 21(2): 167-171.
- [12] Lee BC, Ahn SY, Doo HK, et al. Susceptibility for ischemic stroke in Korean population is associated with polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha genes, but not the interleukin-1beta gene[J]. Neurosci Lett, 2004, 357(1): 33-36.
- [13] Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, et al. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes[J]. J Rheumatol, 2002, 29(2): 212-219.
- [14] Sbarsi I, Falcone C, Boiocchi C, et al. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007, 20(1): 145-154.
- [15] Banerjee I, Pandey U, Hasan OM, et al. Association between inflammatory gene polymorphisms and coronary artery disease in an Indian population [J]. J Thromb Thrombolysis, 2009, 27(1): 88-94.
- [16] Fargion S, Valenti L, Dongiovanni P, et al. TNFalpha promoter polymorphisms[J]. Methods Mol Med, 2004, 98: 47-58.

(收稿: 2012-09-05 修回: 2012-12-07)

(本文编辑: 丁媛媛)