

湖南汉族人群巨噬细胞移动抑制因子-173G/C 基因多态性及其与脑出血关系的研究

袁宁¹, 许宏伟², 刘学军¹

1. 湖南省脑科医院精神科, 湖南省长沙市 410016

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目的 探讨巨噬细胞移动抑制因子(MIF)-173G/C 基因多态性在中国湖南汉族人群中的分布及其与脑出血的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析法检测 MIF 基因-173G/C 多态性在脑出血组(162例)和对照组(203例)的基因频率。结果 中国湖南地区汉族人群存在 MIF 基因-173G/C 多态性。MIF 基因-173G/C 基因型的频率分布在脑出血组和对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。G、C 两种等位基因频率差异亦无统计学意义($P>0.05$)。分类研究后发现合并糖尿病的脑出血组 GC+CC(C/X) 基因型频率和 C 等位基因频率显著高于对照组和非合并糖尿病的脑出血组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 MIF -173G/C 多态性可能与中国湖南汉族人脑出血发生无关, G/C 等位基因可能不是中国湖南地区汉族人群脑出血发病的独立危险因素。

关键词:脑出血;巨噬细胞移动抑制因子;基因;多态性

Relationship between macrophage migration inhibitory factor -173G/C single nucleotide polymorphism and primary cerebral hemorrhage in Chinese Han population from Hunan Province

YUAN Ning, XU Hong-Wei, LIU Xue-Jun. Department of Psychiatry, Brain Hospital of Hunan Province, Changsha 410016, China

Abstract: Objective To study the relationship between macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C single nucleotide polymorphism and primary cerebral hemorrhage (PICH) in Chinese Han population from Hunan Province. **Methods** The genotypes for the tested MIF SNPs in 162 PICH patients and 203 control subjects were detected by polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequence. **Results** There existed -173G/C polymorphism of MIF among Chinese Han population from Hunan Province. No significant differences were observed in genotypes and allele frequencies between PICH patients and controls for MIF-173G/C polymorphism ($P>0.05$). However, significantly higher frequencies of C allele and C/X genotype were confirmed in PICH patients with diabetes mellitus compared to the control subjects and patients without diabetes mellitus ($P<0.05$). **Conclusions** MIF-173G/C polymorphism is not correlated with PICH in Chinese Han people from Hunan Province. Allele G/C may not be an independent risk factor for PICH.

Key words: cerebral hemorrhage; macrophage migration inhibitory factor; gene; polymorphism

巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 是巨噬细胞自分泌的一种重要的前炎症因子。近年来大量研究发现 MIF 与动脉粥样硬化、糖尿病、肥胖、高血压等心血管及代谢系统疾病密切相关^[1,2], 并可能成为治疗上述疾病的潜在靶点。现在已知 MIF 基因在-173 (G/

C)、+254 (T/C) 和 +656 (C/G) 处存在多态性位点, 以 MIF-173G/CSNPS 与疾病的关系最为密切, 也研究得最多。本研究旨在探讨 MIF-173G/C 基因多态性在中国湖南汉族人群中的分布以及其与脑出血的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

脑出血组为2007年3月至2007年10月在中南大学湘雅医院神经内科住院的湖南地区汉族脑出血病人,共162例,平均年龄(60.96 ± 9.17)岁,男94例,女68例,均经临床及CT和(或)磁共振成像(MRI)确诊(依照第四届全国脑血管病学术会议诊断标准)。排除心律失常、动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤等引起的脑出血;排除肝、肾疾病、自身免疫性疾病、妊娠者、半年内曾有降脂治疗者。

对照组为中南大学湘雅医院健康体检者共203例,平均年龄(61.27 ± 7.80)岁,男121例,女82例,均为湖南地区汉族人,无血缘关系。

1.2 试验方法

1.2.1 引物 MIF-173G/C的PCR引物序列为PCR1^[3];上游引物:5'-ACT-AAG-AAA-GAC-CCGAGGC-3';下游引物:5'-GGG-GCA-CGTTGG-TGT-TTA-C-3'。均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 DNA的制备、PCR扩增及基因型分析

①基因组DNA的制备:采外周静脉血2~3 mL用明胶沉淀红细胞,提取白细胞后用酚/氯仿抽提基因组DNA。②目的基因的PCR扩增:95℃预变性5 min,94℃变性30 s,58.8℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环,72℃充分延伸10 min。最后置于4℃终止反应。③PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定:溴化乙锭染色,凝胶电泳成像分析系统内观察。④酶切产物识别:MIF-173G/C多态性由内切酶Alu I识别,37℃消化10 h。然后均用琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳分离,紫外灯下照相后阅读。

1.2.3 DNA序列分析 选取重复两次有异常条带的标本进行DNA测序,测序结果在Genebank和SNP的数据库中进行比较分析,测序由上海英骏公司完成。

1.3 统计学分析

全部资料均用SPSS 13.0 for windows软件包进行数据处理。研究对象与Hardy-Weinberg平衡的符合程度,基因型和等位基因的组间比较采用 χ^2 检验,并以比值比(OR)和95%可信区间(CI)表示相对风险度。计量资料指标均进行正态性检验,符合正态分布者组间比较用 t 检验,三组及三组以上

比较用方差分析;不符合正态分布数据采用非参数检验。所有的统计检验均为双侧概率检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑出血组与对照组的临床数据比较

2.1.1 脑出血组患者与对照组一般数据的比较

两组在年龄、性别、吸烟史、饮酒史方面差异均无统计学意义($P > 0.05$),脑出血组中有高血压病史和糖尿病史者显著多于对照组($P < 0.05$),见表1。

表1 脑出血组与对照组的一般数据比较 ($\bar{x} \pm s$)

一般数据	脑出血组	对照组
年龄	60.96 ± 9.17	61.27 ± 7.80
BMI	22.63 ± 2.50	22.83 ± 2.84
性别(男/女)	94/68	121/82
高血压病史(有/无)	96/66*	46/157
糖尿病史(有/无)	25/137*	12/191
吸烟史(有/无)	42/120	48/155
饮酒史(有/无)	29/133	34/169

注:*为与对照组进行比较, $P < 0.05$ 。

2.1.2 脑出血组患者与对照组临床生化指标的分别比较 脑出血组与对照组相比除了胆固醇和低密度脂蛋白差异没有统计学意义外,余指标差异皆有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 脑出血组与对照组生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	脑出血组	对照组
FBS(mmol/L)	5.94 ± 1.34*	5.18 ± 1.19
TC(mmol/L)	4.41 ± 0.86	4.39 ± 1.14
TG(mmol/L)	2.37 ± 1.36*	1.66 ± 0.96
HDL(mmol/L)	1.18 ± 0.42*	1.54 ± 0.41
LDL(mmol/L)	2.31 ± 0.76	2.41 ± 0.90
SBP(mmHg)	158 ± 25*	122 ± 16
DBP(mmHg)	95 ± 15*	75 ± 9

注:*为与对照组进行比较, $P < 0.05$ 。

2.2 MIF-173G/C多态位点PCR产物酶切图谱分析

MIF-173G/C多态位点可被限制性内切酶Alu I识别。酶切位点是5'-G、CT-3'。酶切后产生三种基因型:纯合子GG、CC型和杂合子GC型,见图1、图2。

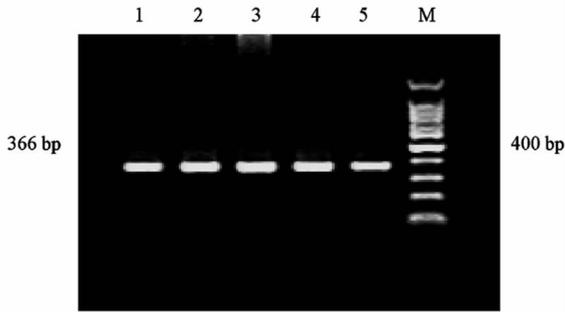


图1 MIF-173 G/C PCR 扩增产物电泳图。M:100 bp Maker,1~5泳道是 PCR 扩增产物。

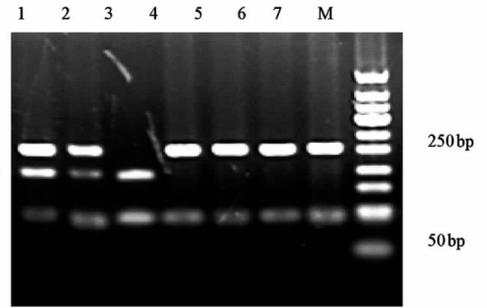


图2 MIF-173 G/C PCR 产物酶切后电泳图。M:50 bp Marker。1、2泳道为杂合子 GC 型;3泳道为纯合子 CC 型;4、5、6、7泳道为纯合子 GG 型。

2.3 MIF-173 G/C 基因多态分布

脑出血组和对照组都有 GG、GC、CC 三种基因型,在研究总人群中(脑出血组+对照组)中的频率分别为:63.01%、31.51%、5.48%;等位基因 G、C 的频率分别为 78.77%、21.23%。按 Hardy-Weinberg 平衡定律对研究人群进行了平衡检验 ($P > 0.05$),证明我们选择的总研究人群基因频率能够代表群体的基因分布。

将例数较少的 CC 基因型与 GC 基因型合并为 GC + CC 基因型,为 C 等位基因携带者组,可记为 C/X。组间比较结果显示,MIF 基因-173 G/C 基因型频率分布在脑出血组和对照组之间差异无统计

学意义($\chi^2 = 1.133, P = 0.287$),两种等位基因频率差异亦无统计学意义($\chi^2 = 0.430, P = 0.512$),见表 3。

将脑出血组按有/无高血压病、有/无糖尿病、有/无家族史进行分类后做比较,发现合并糖尿病的脑出血组 GC + CC 基因型频率和 C 等位基因频率显著高于对照组和非合并糖尿病的脑出血组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其余各亚型 CH 基因型频率和等位基因频率与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 4、表 5、表 6。

表3 脑出血组与对照组 MIF-173 G/C 基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数	基因型[例(%)]		等位基因频率(%)	
		GG	GC + CC	G	C
脑出血组	162	100(61.7)	53 + 9(38.3)	0.781	0.219
对照组	203	130(64.0)	62 + 11(36.0)	0.793	0.207

表4 脑出血各亚组与对照组 MIF-173 G/C 基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数	基因型[例(%)]		等位基因频率(%)	
		GG	GC + CC	G	C
糖尿病 + 脑出血组	25	11(44.0)	10 + 4(56.0) ▲★	0.640	0.360* *
非糖尿病 + 脑出血组	137	89(65.0)	43 + 5(35.0)	0.807	0.193
对照组	203	130(64.0)	62 + 11(36.0)	0.793	0.207

注:▲为与对照组相比, $P = 0.000, \chi^2 = 80.52, OR = 2.263, 95\%$ 可信区间:1.891 ~ 2.708; *为与对照组相比, $P = 0.000, \chi^2 = 57.62, OR = 2.155, 95\%$ 可信区间:1.764 ~ 2.632; ★为与非合并糖尿病患者相比, $P = 0.000, \chi^2 = 88.92, OR = 2.364, 95\%$ 可信区间:1.974 ~ 2.830; ◆为与非合并糖尿病患者相比, $P = 0.000, \chi^2 = 67.706, OR = 2.352, 95\%$ 可信区间:1.909 ~ 2.882。

表5 脑出血各亚组与对照组 MIF-173 G/C 基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数	基因型[例(%)]		等位基因频率(%)	
		GG	GC + CC	G	C
高血压 + 脑出血组	96	59(61.5)	32 + 5(38.5)	0.781	0.219
非高血压 + 脑出血组	66	41(62.1)	21 + 4(37.9)	0.780	0.220
对照组	203	130(64.0)	62 + 11(36.0)	0.793	0.207

表6 脑出血各亚组与对照组 MIF-173G/C 基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数	基因型 [例 (%)]		等位基因频率 (%)	
		GG	GC + CC	G	C
有家族史脑出血组	26	18 (69.2)	7 + 1 (30.8)	0.827	0.173
无家族史脑出血组	136	82 (60.3)	46 + 8 (39.7)	0.772	0.228
对照组	203	130 (64.0)	62 + 11 (36.0)	0.793	0.207

2.4 DNA 序列分析 (见图 3)

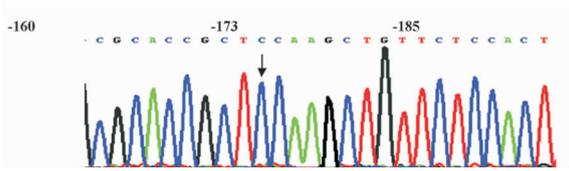


图3 MIF -173G/C 反向测序, 箭头所指为纯合子 CC 型。

3 讨论

巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) 是 1966 年由 Bloom 等^[4] 在豚鼠进行迟发性超敏反应研究中发现的, 它是机体内一种重要的细胞因子。研究表明, 血管发生动脉粥样硬化部位的 MIF 表达水平明显上调, 且随着斑块的发展逐渐上升; 相反, 阻断 MIF 的表达则可以显著延缓动脉粥样硬化的发展并稳定斑块。因此, MIF 可能与动脉粥样硬化的发生和发展密切相关。目前, MIF-173G/C 位点与脑卒中的关系国内外尚未见相关报道。

本研究发现 MIF 基因-173G/C 基因型频率分布在脑出血组和对照组间差异无统计学意义, 两种等位基因频率差异亦无统计学意义。将脑出血组按有/无高血压病、有/无糖尿病、有/无家族史进行分类后做比较, 发现合并糖尿病的脑出血组 GC + CC 基因型频率和 C 等位基因频率显著高于对照组和非合并糖尿病的脑出血组, 差异有统计学意义。其余各亚型脑出血组基因型频率和等位基因频率与对照组相比差异均无统计学意义。下一步我们将对 MIF-173G/C 多态性与血糖、血脂代谢展开深入研究。

目前对 MIF-173G/C 多态性研究结果不尽一致。单志新等^[7] 发现冠心病患者 MIF-173G/C 基因型频率明显高于对照组, C 等位基因可能是汉族人群冠心病的易感性标志。一项对德国人长达 18 年的病例对照研究称 MIF-173G/C 多态性和血清 MIF 蛋白水平及 2 型糖尿病的发生无显著相关性^[8]。MIF-173G/C 多态性等位基因分布频率在意大利有缺血性卒中史患者和健康体健者中差异无统计学意义^[9]。我们认为不同研究结果的差异

可能与试验人群的差异 (包括饮食、环境和方法学等因素) 有关, 也与抽样误差、样本量大小等有关联。

本研究首次报导中国湖南汉族人群 MIF-173G/C 基因多态性分布及其与脑出血的关系, 通过研究我们未发现 MIF-173G/C 基因多态性与中国湖南汉族人脑出血有关, G/C 等位基因可能不是中国湖南汉族人群脑出血发病的独立危险因素。

参 考 文 献

- [1] 高菊华, 高小平. 细胞外基质、基质金属蛋白酶和颈动脉粥样斑块. 国际神经病学神经外科学杂志, 2010, 37(4): 33-35.
- [2] Herder C, Kolb H, Koenig W, et al. Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: Results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg, Survey 4 (KORA S4). Diabetes Care, 2006, 29(2): 368-371.
- [3] Arikian C, Berdeli A, Ozgenç F, et al. Positive Association of Macrophage Migration Inhibitory Factor Gene-173G/C Polymorphism with Biliary Atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006, 42: 77-82.
- [4] Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed type hypersensitivity. Science, 1966, 153(731): 80-82.
- [5] Abe R, Shimizu T, Ohkawara A, et al. Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. Biochim Biophys Acta, 2000, 1500: 1-9.
- [6] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nat Rev Immunol, 2003, 3(10): 791-800.
- [7] 单志新, 符永恒, 余细勇, 等. 巨噬细胞移动抑制因子——173G/C 多态性与冠心病的相关性研究. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(5): 548-550.
- [8] Herde C, Klopp N, Baumert J, et al. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene variants and MIF serum concentrations on the risk of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Case-Cohort Study, 1984-2002. Diabetologia, 2008, 51: 276-284.
- [9] Andrea F, Eleonora G, Pierangelo P, et al. Proinflammatory Genetic Profiles in Subjects With History of Ischemic Stroke. Stroke, 2004, 35: 2270-2275.