

巨噬细胞迁移抑制因子基因多态性与颈动脉粥样硬化及斑块易损性的相关性研究

李文强 贾丽娟 赵锦华 陈鹏 吴雅欣 杨霖崧

【摘要】 目的 探讨巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)基因多态性与颈动脉粥样硬化及斑块易损性的关系。**方法** 收集 2018 年 1 月 - 2019 年 12 月本科收治 475 例缺血性脑卒中患者纳入研究,根据颈部血管超声表现分为无斑块组($n=107$)、稳定斑块组($n=172$)和易损斑块组($n=196$);采用 ELISA 法检测所有入组人员血清 MIF 水平;采用聚合酶链反应联合 DNA 直接测序法检测 MIF 基因-173G/C 位点基因型。**结果** 稳定斑块组和易损斑块组血清 MIF 水平均显著高于无斑块组(P 均 <0.05),易损斑块组血清 MIF 水平显著高于稳定斑块组($P<0.05$);稳定斑块组和易损斑块组 MIF 基因-173G/C 位点基因型和等位基因频率与无斑块组比较均有明显差异(P 均 <0.05);稳定斑块组基因型和等位基因频率与易损斑块组比较均无明显差异(P 均 >0.05);CC 基因型携带者血清 MIF 水平均显著高于 GG 和 GC 基因型携带者(P 均 <0.05)。校正年龄、性别等参数后-173G/C 位点 C 等位基因携带者颈动脉斑块总体发生风险是 T 等位基因携带者的 2.035 倍(95%CI = 1.284~3.227, $P=0.003$)。**结论** MIF 基因-173G/C 位点多态性与颈动脉硬化密切相关,携带 C 等位基因是颈动脉粥样硬化斑块形成的危险因素,但该位点基因多态性与颈动脉斑块易损性无明确相关性。

【关键词】 巨噬细胞迁移抑制因子 基因多态性 颈动脉粥样硬化 斑块易损性

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)05-0599-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.05.009

The relationship between macrophage migration inhibition factor gene polymorphism and carotid atherosclerosis, vulnerability of carotid plaque Li Wenqiang, Jia Lijuan, Zhao Jinhua, et al. Department of Neurology, the First Peoples Hospital of Xianyang, Xianyang Shanxi 712000

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between macrophage migration inhibition factor (MIF) gene polymorphism and carotid atherosclerosis, vulnerability of carotid plaque. **Methods** A total of 475 patients with ischemic stroke hospitalized in our department from January 2018 to December 2019 were recruited in this study. These patients were divided into non-plaque group (107 cases), stable plaque group (172 cases) and vulnerable plaque group (196 cases), according to the manifestations of carotid ultrasonography. ELISA was used to detect serum levels of MIF. Genotype was determined by polymerase chain reaction- direct sequencing for the MIF gene -173G/C polymorphism. **Results** Serum levels of MIF in stable plaque group and vulnerable plaque group were higher than those in non-plaque group (both $P<0.05$). Serum level of MIF in vulnerable plaque group was higher than that in stable plaque group ($P<0.05$). The genotype and allele frequencies of -173G/C in stable plaque group and vulnerable plaque group were significantly different from those in non-plaque group (all $P<0.05$). There was no significant difference in genotype and allele frequencies of -173G/C between stable plaque group and vulnerable plaque group (both $P>0.05$). Serum MIF levels of CC genotype carriers were higher than those of CG and GG genotype carriers (both $P<0.05$). After adjusting risk factors (age, gender, etc), the risk of carotid atherosclerotic plaque in -173G/C C allele carriers was 2.035 times of that in G allele (95%CI = 1.284~3.227, $P=0.003$). **Conclusion** MIF -173G/C gene polymorphism was associated with carotid atherosclerosis, and the -173G/C C allele might act as a risk factor for carotid atherosclerosis plaque. However, -173G/C gene polymorphism might not be associated with vulnerability of carotid plaque.

【Key words】 Macrophage migration inhibition factor Gene polymorphism Carotid atherosclerosis Vulnerability of plaque

越来越多研究证实颈动脉粥样硬化斑块是缺血性脑卒中最主要的危险因素之一,其危害不仅在于可导致血管局部管腔狭窄,影响远端血流灌注;斑块自身的易损性和破裂也是导致缺血性脑卒中的重要因素^[1-2]。巨噬细胞移动抑制因子(Macrophage migration inhibition factor, MIF)是一种内分泌促炎因子,可诱导巨噬细胞募集,活化炎症细胞,促进细胞因子释放,参与机体多种炎症病理生理改变过程^[3-4]。已有大量基础和临床研究证实 MIF 参与动脉粥样硬化的发生发展进程^[5-6]。

近年来,相继有多项研究发现 MIF 基因存在多个单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)位点与临床疾病易感性相关^[7-8]。-173G/C(rs755622)是其中关注较多的 SNP 位点之一,有研究结果显示 -173G/C 位点 C 等位基因是急性冠脉综合症的危险因素^[9-11]。因此,有理由推测 MIF 基因多态性可能与颈动脉粥样硬化密切相关。为此,本研究以缺血性脑卒中患者为研究对象,检测 MIF 基因 -173G/C 位点基因型,探讨其与颈动脉粥样硬化及斑块易损性的关系,旨在为动脉粥样硬化发生发展寻找新的分子遗传学标记物。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究经本院伦理委员会审核批准通过,连续收集 2019 年 1 月-2019 年 12 月于本科就诊的 475 例前循环供些缺血性脑卒中患者纳入研究,包括男 273 例,女 202 例,年龄 44~83 岁,平均年龄(65.12 ± 10.97)岁。纳入标准:①年龄 40~85 岁;②缺血性脑卒中诊断符合 2014 年中华医学会神经病学分会指定的《中国急性缺血性脑卒中诊治指南》^[12];③临床资料完整包括颈动脉超声检查及其他血液检测等;④长期居住陕西地区的汉族人。排除标准:①明确的心源性缺血性脑卒中;②存在动脉炎、梅毒、放射性治疗等可能导致颈动脉斑块因素;③既往接受颈动脉斑块剥脱或支架植入治疗;④合并严重的肝肾疾病、恶性肿瘤;⑤妊娠期女性。

所有纳入的研究对象按照颈动脉彩超表现分为 3 组,即无斑块组、稳定斑块组和易损斑块组,其中无斑块组共 107 例,男 60 例,女 47 例,年龄 44~75 岁,平均年龄(63.28 ± 10.84)岁;稳定斑块组共 172 例,男 110 例,女 62 例,年龄 49~81 岁,平均年龄(66.16 ± 11.35)岁;易损斑块组共 196 例,男 103

例,女 93 例,年龄 48~83 岁,平均年龄(65.20 ± 10.61)岁。

1.2 方法

1.2.1 颈部血管超声检查

采用东芝 Aplio-500 超声诊断仪,检测双侧颈总动脉内径及颈动脉内膜中层厚度(Carotid intima media thickness, CIMT),以 CIMT ≥ 1.5 mm 并凸向管腔内作为诊断颈动脉斑块的标准。采用常规超声联合微血流成像(Superb microvascular imaging, SMI)技术评价颈动脉斑块性质,将颈动脉斑块进一步分为稳定斑块和易损斑块^[13],易损斑块需符合以下超声回声及血流特征:低回声或极低回声、斑块内部含低-无回声区、溃疡斑块、新生血管形成斑块。

1.2.2 血清 MIF 水平检测

采集清晨空腹外周静脉血 3 mL, 3 000 r/min 离心 5 min 留取上清液置于 -20 °C 冰箱保存备用,采用 ELISA 法测定血清 MIF 水平,ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司,酶标仪采用芬兰雷勃公司 MB-530 型,严格按照说明书进行操作。

1.2.3 MIF 基因 -173G/C 位点基因型检测

采用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)-直接测序法检测 MIF 基因 -173G/C 位点基因型;PCR 引物由生工生物工程(武汉)股份有限公司合成,上游引物:5'-ACTAAGAAAGAC-CCGAGG-3',下游引物:5'-GGGGCACGTTGGT-GTTTAC-3'。PCR 扩增反应条件:95 °C 预变性 3 min,然后按照 95 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 60 s 顺序循环 30 周期,最后 72 °C 延长 5 min;扩增产物经虾碱性磷酸酶及 ExonI 纯化;最终产物使用美国 ABI 3730XL 自动测序仪进行检测,使用 SeqScape 软件对测序进行分析。

1.2.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件。对于同时符合正态分布和方差齐性检验的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组均数比较采用方差分析,组间两两均数比较采用 SNK-*q* 检验,2 组均数比较采用 *t* 检验;对于不符合正态分布或方差齐性检验的计量资料采用中位数四分位数间距[M(P25, P75)]表示,组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料以例数(*n*)或构成百分比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。多因素分析采用二分类 Logistic 回归分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

基因型/ 等位基因	无斑块组 (<i>n</i> = 107)	稳定斑块组 (<i>n</i> = 172)	易损斑块组 (<i>n</i> = 196)	无斑块组 <i>vs</i> 稳定斑块组		无斑块组 <i>vs</i> 易损斑块组		稳定斑块组 <i>vs</i> 易损斑块组	
				χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
GG	74(69, 16)	94(54, 65)	101(51, 53)						
GC	28(26, 17)	60(34, 88)	75(38, 27)	6.579	0.037	9.270	0.010	0.460	0.795
CC	5(4, 67)	18(10, 47)	20(10, 20)						
G	176(82, 24)	248(72, 09)	277(70, 66)						
C	38(17, 76)	96(27, 91)	115(29, 34)	7.448	0.006	9.835	0.002	0.183	0.669

化的机制可能在于 MIF 可与其特异性靶分子 Jab-1 结合形成复合物,激活活化蛋白-1,调控相关基因转录,参与炎症信号转导和细胞增殖^[5-6]。Zhao 等^[6]在冠心病患者人群中发现血清 MIF 水平显著升高。Lan 等^[14]研究发现颈动脉粥样硬化患者血清 MIF 水平显著升高,且血清 MIF 水平与颈动脉狭窄程度呈正相关。王三敏等^[15]研究结果显示 MIF 与颈动脉斑块易损性密切相关,易损斑块组血清 MIF 水平显著升高。本研究结果显示稳定斑块组和易损斑块组血清 MIF 水平均显著高于无斑块组,且易损斑块组血清 MIF 水平较稳定斑块组也明显升高。与既往多数研究结果大致相符,再次提示 MIF 与血管炎症反应密切相关,是颈动脉斑块形成和斑块破裂的重要因素。

人类 MIF 基因位于染色体 22q11.2 区,由大约 800 个核苷酸组成,包含 3 个外显子和 2 个内含子^[7]。目前已报道的多态性位点包括 -173G/C、+254(rs2096525)、+656(rs2070766)、-794CATT₅₋₈ 及 rs1007888 等,-173G/C 是其中关注较多且生物学功能较明确的 SNP 位点之一。MIF 基因 -173G/C 位点位于启动子区,该位点突变对 MIF 表达的影响目前仍有争议。Du 等^[9-10]研究发现 CC 基因型携带者血浆 MIF 水平显著高于(GG+GC)基因型携带者。本研究结果与之相似,CC 基因型携带者血清 MIF 水平明显升高。然而,代传芬等^[16]研究结果显示 -173G/C 位点不同基因型携带者血浆 MIF 水平无显著差异。因此,有必要继续深入探讨 -173G/C 位点突变的生物学功能及其与临床疾病的关联性。

国内外已有多项临床研究结果显示 -173G/C 位点多态性与冠心病遗传易感性密切相关^[9-11]。Herder 等^[17]研究发现携带 -173G/C 位点 C 等位基因可能增加冠心病发病风险。Luo 等^[10]以国人为研究对象,研究结论与之相似,该研究还进一步发现 -173G/C 位点多态性与冠脉病变严重程度(Gensini 评分)密切相关。Du 等^[9]研究共收集 699 例急性冠脉综合征患者和 1 153 例健康志愿者,结果显示携带 -173G/C 位点 C 等位基因急性冠脉综合征的患病风险显著升高。然而,MIF 基因多态性与颈动脉硬化及斑块易损性的相关性研究目前仍鲜有报道。本研究结果显示缺血性脑卒中患者 -173G/C 基因多态性与颈动脉粥样硬化斑块形成密切相关,携带 C 等位基因是颈动脉斑块形成的独立危险

因素,前循环供血区缺血性脑卒中人群中 C 等位基因携带者颈动脉斑块发生风险增高 2.035 倍,从分子遗传学角度阐明 MIF 可能参与颈动脉斑块形成过程。但是,本研究易损斑块组和稳定斑块组基因型及等位基因分布频率均无统计学差异,未发现 -173G/C 位点基因多态性与颈动脉斑块易损性存在关联性,提示颈动脉斑块易损性的参与机制十分错综复杂,并不是由单一多态性位点突变决定的。

综上所述,本研究发现 MIF 基因 -173G/C 位点多态性与颈动脉硬化密切相关,携带 CC 基因型可显著增加颈动脉粥样硬化斑块的发生风险,但该位点基因多态性与颈动脉斑块易损性无明确关联性。最后,本研究尚存在以下缺陷:一方面,目前已有研究证据提示不同地区、不同人种可能因遗传背景差异,导致结果存在偏倚,本研究作为单中心研究,纳入研究对象也相对有限,同样存在类似偏倚,期待后续多中心大样本及严格设计的临床试验结果进一步验证;另一方面,基于提高颈动脉斑块检出率的考虑,本研究所纳入的研究对象均为前循环供血区缺血性脑卒中患者,使得其结果适用具有一定限制。

参 考 文 献

- [1] Qin C, Zhang L, Wang X, et al. Evaluation of carotid plaque neovascularization in patients with coronary heart disease on Contrast-Enhanced ultrasonography [J]. J Ultrasound Med, 2018, 37(4): 823-831.
- [2] Lechtman E, Balki I, Thomas K, et al. Cost-effectiveness of magnetic resonance carotid plaque imaging for primary stroke prevention in Canada [J]. Br J Radiol, 2018, 91 (181): 20170518.
- [3] Djudaj S, Martin IV, Buhl EM, et al. Macrophage migration inhibitory factor limits renal inflammation and fibrosis by counteracting tubular cell cycle arrest [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2017, 28(12): 3590-3604.
- [4] Lin Q, Cai JY, Lu C, et al. Macrophage migration inhibitory factor levels in serum from patients with acute intracerebral hemorrhage: Potential contribution to prognosis [J]. Clinica Chimica Acta, 2017, 472: 58-63.
- [5] Yen-Chung L, Yung-Chun C, Chih-Peng C, et al. Minocycline suppresses dengue virus replication by down-regulation of macrophage migration inhibitory factor-induced autophagy [J]. Antiviral Res, 2018, 155: 28-38.
- [6] Qian Z, Li M, Li XM, et al. Circulating MIF levels predict clinical outcomes in patients with ST-Elevation myocardial infarction after percutaneous coronary intervention [J]. Canadian Journal of Cardiology, 2019, 35(10): 1366-1376.
- [7] 杜培儒, 吴伟, 侯学荣, 等. MIF 基因单核苷酸多态性与中国西北地区汉族人群克山病的关联研究 [J]. 中华地方病学杂志,

- 2019,38(5):357-360.
- [8] Merchant S, Nadaraj S, Chowdhury D, et al. Macrophage migration inhibitory factor in pediatric patients undergoing surgery for congenital heart repair[J]. *Molecular Medicine*, 2008, 14(3/4):124-130.
 - [9] Du GL, Luo JY, Wang DL, et al. MIF gene rs755622 polymorphism positively associated with acute coronary syndrome in Chinese Han population: case-control study[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):140.
 - [10] Luo JY, Rui X, Li XM, et al. MIF gene polymorphism rs755622 is associated with coronary artery disease and severity of coronary lesions in a Chinese kazakh population[J]. *Medicine*, 2016, 95(4):e2617.
 - [11] Ji KT, Wang XY, Ji L, et al. Macrophage migration inhibitory factor polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory coronary heart disease[J]. *Biomed Res Int*, 2015;1-6.
 - [12] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(4):246-257.
 - [13] 刘燕, 刘晓辉, 宋艳玲, 等. 急性脑梗死患者血清 I 型胶原羧基末端肽改变及其与颈动脉粥样硬化斑块的关系[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(1):39-41+45.
 - [14] Lan MY, Yung-Yee C, Wei-Hsi C, et al. Association between MIF gene polymorphisms and carotid artery atherosclerosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(2):319-322.
 - [15] 王三敏, 伏兵, 余瑞芳, 等. 血清同型半胱氨酸和巨噬细胞移动抑制因子水平与颈动脉粥样硬化相关性研究[J]. *重庆医学*, 2014, 43(2):182-184.
 - [16] 代传芬, 刘兴德, 罗惠兰, 等. MIF 及其基因 - 173G/C 多态性与飞行员动脉粥样硬化危险因素的相关性研究[J]. *解放军医学杂志*, 2016, 41(2):153-157.
 - [17] Herder C, Illig T, Baumert J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and risk for coronary heart disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 200(2):380-388.

(2020-02-13 收稿)

(上接第 575 页)

- [4] 补娟, 赵宗峰, 王慧琴, 等. 刺槐素的不同给药时间对小鼠局灶性脑缺血的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2016, 23(4):263-266.
- [5] 马志, 补娟, 朱沂. 刺槐素腹腔注射对局灶性脑缺血小鼠脑再灌注损伤的预防作用及其机制[J]. *山东医药*, 2018, 58(39):43-46.
- [6] Eduard Urich, Stanley E L, Juliette Molnos, et al. Transcriptional Profiling of Human Brain Endothelial Cells Reveals Key Properties Crucial for Predictive In Vitro Blood-Brain Barrier Models[J]. *Plos One*, 2012, 7(5):e38149.
- [7] Bhowmick Saurav, D'Mello Veera, Caruso Danielle, et al. Impairment of pericyte-endothelium crosstalk leads to blood-brain barrier dysfunction following traumatic brain injury[J]. *Exp Neurol*, 2019, 317:260-270.
- [8] Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Hashimoto F M, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(3):653-660.
- [9] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation[J]. *Cell*, 2006, 126(4):741-754.
- [10] Rossa J, Ploeger C, Vorreiter F, et al. Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (ECL2) segments[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(11):7641-7653.
- [11] Chen J, Luo Y, Hui H, et al. CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(36):e7622-e7631.
- [12] Castro V, Skowronska M, Lombardi J, et al. Occludin regulates glucose uptake and ATP production in pericytes by influencing AMP-activated protein kinase activity[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(2):317-332.

(2020-04-17 收稿)

(上接第 598 页)

- [12] 陈伟红, 靳玮, 张淑倩, 等. 后循环缺血性卒中颅内动脉粥样硬化的高分辨率磁共振成像特征分析[J]. *中国脑血管病杂志*, 2019, 16(9):461-465.
- [13] 曾庆, 曾宪强, 李义, 等. 3.0T 高分辨率磁共振成像对中青年大脑中动脉狭窄性病变的诊断价值[J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2019, 17(1):50-52.
- [14] 杨丽华, 刘义, 王艳玲, 等. 3.0T 高分辨率磁共振成像评估颅内动脉粥样硬化性狭窄的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(21):3410-3414.
- [15] 赵义, 金灿, 王礼同, 等. 颅内动脉粥样硬化性狭窄患者斑块三维高分辨率磁共振成像强化特征与卒中发生时间的相关性研究[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52(12):1047-1053.
- [16] 赵义, 金灿, 王礼同, 等. 症状性大脑中动脉粥样硬化斑块分布及形态学特征的高分辨率磁共振成像研究[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52(9):724-731.
- [17] 韩柏林, 杨静, 罗彬, 等. 应用 HR-MRI 评价不同性别症状性大脑中动脉粥样硬化患者局部血管及斑块特征[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(12):614-617, 629.
- [18] 任加以, 何贵新, 秦伟彬, 等. 应用血管内超声评价高敏 C 反应蛋白与不稳定型心绞痛患者冠状动脉斑块性质的相关性[J]. *广东医学*, 2019, 40(4):498-502.
- [19] 伍琼, 罗喆, 洪李锋. 中老年冠心病患者超声心外膜脂肪垫厚度与冠状动脉易损斑块的相关性研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(1):34-36.
- [20] Zhang DF, Chen YC, Chen H, et al. A High-Resolution MRI study of relationship between remodeling patterns and ischemic stroke in patients with atherosclerotic middle cerebral artery stenosis[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9(5):140.

(2020-03-30 收稿)