

细胞间黏附分子-1 基因 K469E 多态性与慢性阻塞性肺疾病的相关性

黄河颂, 蒋慧, 孔祥龙, 谭志平, 陈平, 罗红

(中南大学湘雅二医院呼吸科, 长沙 410011)

[摘要]目的: 探讨细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 基因 K469E 多态性与中南地区汉族人群慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的相关性及对 ICAM-1 的影响。方法: 从来自中南地区、主要是湖南地区的汉族人群中收集 COPD 患者 91 例及健康对照者 80 例的血液标本, 提取基因组 DNA, 用 PCR 方法扩增包含 K469E 位点的碱基序列后进行测序确定基因型; 从完成测序的对象中随机抽取 COPD 患者 60 例、正常对照者 26 例的血清进行可溶性细胞间黏附分子-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1) 的检测。结果: COPD 患者的基因型及等位基因分布频率与正常对照组差异没有统计学意义 ($P>0.05$); 但在 16 例极重度患者中, KE+EE 基因型和 E 等位基因频率相对于 75 例非极重度患者增高 (10/16 vs 26/75, 12/30 vs 20/150, $P<0.05$)。COPD 组的 sICAM-1 水平较对照组增高 [(213.8 ± 35.6) ng/mL vs (175.8 ± 22.7) ng/mL, $P<0.05$], 并且与第 1 秒用力呼气容积占预计值的百分比 (forced expiratory volume in one second for the percentage of predicted value, FEV1%) 呈负相关 ($r=-0.591$, $P<0.01$); 但正常对照组和不同严重程度 COPD 亚组中, KE+EE 基因型与 KK 基因型间 sICAM-1 水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论: ICAM-1 基因 K469E 多态性与中南地区汉族人群 COPD 的发病没有明显相关性; 但携带 E 等位基因可能是病情严重程度的危险因素。

[关键词] 细胞间黏附分子-1; 基因多态性; 慢性阻塞性肺疾病

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.01.014

Association of intercellular adhesion molecule-1 gene K469E polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease

HUANG Hesong, JIANG Hui, KONG Xianglong, TAN Zhiping, CHEN Ping, LUO Hong

(Department of Respiratory Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: To test the association of K469E, the common intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and expression of ICAM-1 in Han people of Central and South Region in China.

Methods: A case-control study was done on 91 patients with COPD and 80 matched controls of Han people from central and south region in China, mainly from Hunan Province. Genomic DNA was extracted from white blood cells. ICAM-1 sequences were amplified by PCR and analyzed by agarose gel electrophoresis. Genotypes were defined by base sequencing. In addition, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) serum levels were measured in 86 people picked out randomly from the COPD group and the control group.

Results: There was no difference in the frequency of the genotype and allele between the COPD

收稿日期 (Date of reception): 2011-09-05

作者简介 (Biography): 黄河颂, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事呼吸内科研究。

通信作者 (Corresponding author): 罗红, Email: luohong1003@163.com

基金项目 (Foundation items): 中华医学会临床医学科研专项基金 (08020530131) 和湖南省科技厅科技计划 (2008FJ3151)。This work was supported by Chinese Medical Association Foundation (08020530131) and Department of Science and Technology of Hunan Province (2008FJ311), P.R. China.

group and the controls, but compared with those who were not very severe, the frequency of KE/EE genotypes and E allele in COPD patients at very severe stage was significantly higher (10/16 vs 26/75, 12/30 vs 20/150, $P < 0.05$). The level of sICAM-1 increased in the COPD patients, with negative correlation to forced expiratory volume in one second for the percentage of predicted value (FEV1%). But in both COPD patients and controls, the level of sICAM-1 did not differ significantly in different genotypes ($P > 0.05$).

Conclusion: K469E polymorphism of ICAM-1 may not affect the susceptibility of COPD and the expression of ICAM-1 in Han people from central and south of China in this study, but carriers of E allele are at high risk of developing severe stage of COPD.

KEY WORDS

intercellular adhesion molecule-1; gene polymorphism; chronic obstructive pulmonary disease

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种严重危害人民健康的慢性呼吸系统疾病。普遍认为引起 COPD 的危险因素包括环境因素和个体遗传易感因素两个方面; 然而, 对 COPD 众多候选基因的研究结果显示不同种族和人群存在较大的差异, 提示在基因-环境交互作用模式上不同的种族之间有可能不同。细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 介导了 COPD 发病过程中炎症细胞跨内皮迁徙及向炎症部位积聚、与肺内其他细胞和组织的相互作用过程, 在 COPD 的发生和发展过程中起到重要的作用。人类 ICAM-1 基因定位于 19p13.3-p13.2, 包含 7 个外显子, 存在着多个多态位点, 其中位于第 6 外显子的 G → A 所导致 Glu469Lys 多态性 (等位基因 E/K) 是常见的变异形式, 两种不同的等位基因 K 和 E, 形成 3 种基因型 KK, KE 和 EE。该多态性导致位于 Ig 样结构 5 区的该位点氨基酸发生替代, 即赖氨酸代替谷氨酸, 可能影响 ICAM-1 与淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function associated antigen, LFA-1) 之间的相互识别以及 B 淋巴细胞的黏附。有研究^[1]表明 K469E 多态性与儿童支气管哮喘相关, 但尚未见到该多态性与 COPD 相关性的研究报道。另外, 最近有细胞转染实验证实 K469E 与 ICAM-1 另一个单碱基核苷酸多态性 G241R 共同对 ICAM-1 的表达产生影响^[2], 其有可能是与某些疾病的遗传易感性相关的机制之一。为此, 本研究检测 COPD 患者和正常人群中 ICAM-1 第 6 外显子 469 位点碱基变异情况和血清可溶性细胞间黏附分子-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1) 水平, 探讨我国汉族人群 K469E 基因多态性与 COPD 及 ICAM-1 表达的关系。

1 对象与方法

1.1 对象和分组

对照组: 从 2009 年 5 月到 2009 年 10 月在中南大学湘雅二医院体检中心参加健康体检者中选择的无慢性咳嗽、咳痰、气短病史, 体检无肺气肿、干湿罗音, 结合胸部 X 片、胸部 CT、肺功能检查排除 COPD 诊断的个体 80 例。

COPD 组: 同期在中南大学湘雅二医院门诊随诊、临床诊断为 COPD 的患者 91 例。诊断标准参照中华医学会呼吸病学分会制定的 COPD 诊治指南 (2007 年修订版)^[3]。

所有受试对象为汉族人, 来自于中南地区 (主要是湖南省), 相互之间无血缘关系, 均排除支气管哮喘、支气管扩张、肺结核、肺癌、慢性心脏衰竭等慢性心肺疾病。

该研究经中南大学湘雅二医院伦理委员会批准并获得所有受试对象知情同意书。

1.2 PCR 扩增和测序

基因组 DNA 的提取: 抽取全部对象晨起静脉空腹 EDTA 抗凝静脉血 2 mL, 试管内充分混匀, 通过苯酚/氯仿法手工提取基因组 DNA。引物: 根据 GenBank 公布的人类 ICAM-1 外显子 6 碱基序列用 OLIGO6 软件设计。上游引物, 5'-GGAACCCATTGCCCGAGC-3', 下游引物, 5'-GGTGAGGATTGCATTAGGTC-3', 委托上海生物工程公司合成。扩增的碱基序列如下: GGAACCCATTGCCCGAGCTCAAGTGTCTAAAGGATGGC-ACTTTCCCACTGCCCATCGGGGAATCAGTGACT-GTCACTCGAGATCTTGAGGGCACCTACCTCTGT-CGGGCCAGGAGCACTCAAGGGGAGGTCACCCG-CGAGGTGACCGTGAATGTGCTCTGTGAGTGAG-

CCGGCGGGCAGAGCTGGGTGGGGCCAGGGGCC-
ATGGACCTAATGCAATCCTCACC。

PCR试剂: KOD FX, 由日本 TOYOBO 公司提供。

反应体系和条件: $2 \times$ PCR buffer for KOD FX 12.5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, 10 pmol/ μ L 1 号引物 0.75 μ L, 10 pmol/ μ L 2 号引物 0.75 μ L, 模板 DNA 1 μ L, KOD FX (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L, 加水稀释至 25 μ L, 94 $^{\circ}$ C 2 min, 预变性后, 98 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸。所有 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳确定为目的片段后委托华大生物公司武汉测序部进行碱基测序, 确定基因型。

1.3 sICAM-1 水平的检测

从成功完成 PCR 扩增和测序的 COPD 组和对照组中随机选取部分血清样本, 严格按照操作说明在 ANTHOS 2010 酶标仪上进行 sICAM-1 水平的检测 (ELISA 试剂盒由深圳欣博盛公司提供)。

1.4 统计学处理

所有实验数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行

处理, 计数资料以比数比表示, 两样本间比较采用 $R \times C \chi^2$ 检验, 有预期频数值小于 5 时采用 Fisher 确切概率法。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数比较采用 t 检验 (方差齐) 或 t' 检验 (方差不齐)。两因素相关分析采用简单 Pearson 线性相关, 多因素分析采用 logistic 逐步回归分析。均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电泳、测序和 sICAM-1 水平检测情况

经电泳鉴定的 PCR 产物成功完成测序共 171 例 (COPD 91 例, 正常对照 80 例); 其中 KK (AA) 型 107 例、KE (AG) 型 51 例、EE (GG) 型 13 例 (图 1~3)。根据 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 对对照组和 COPD 组以及总体对象进行检验, 结果均符合遗传平衡, 说明研究对象具有群体代表性。随机抽取 COPD 60 例、正常对照 26 例血清标本进行 sICAM-1 的检测, COPD 组为 (213.8 ± 35.6) ng/mL, 对照组为 (175.8 ± 22.7) ng/mL, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

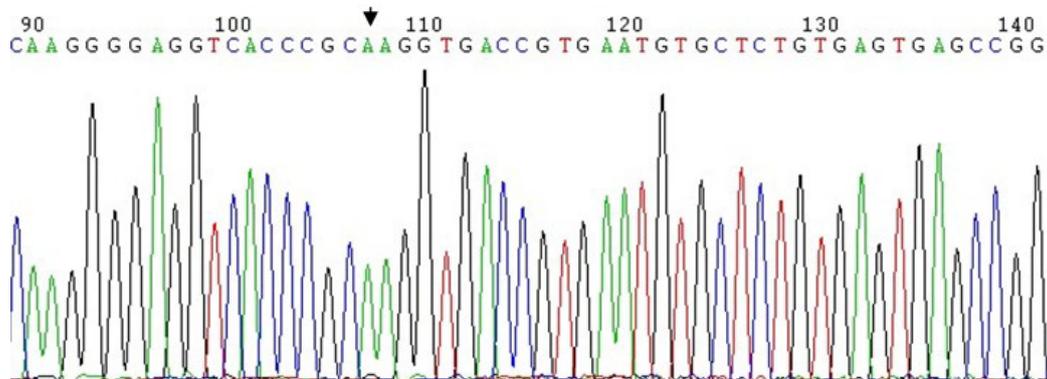


图 1 KK(AA) 型测序图 (箭头标记为多态位点)。

Figure 2 Sequence of KK (AA) genotypes (Arrow presents the polymorphic site).

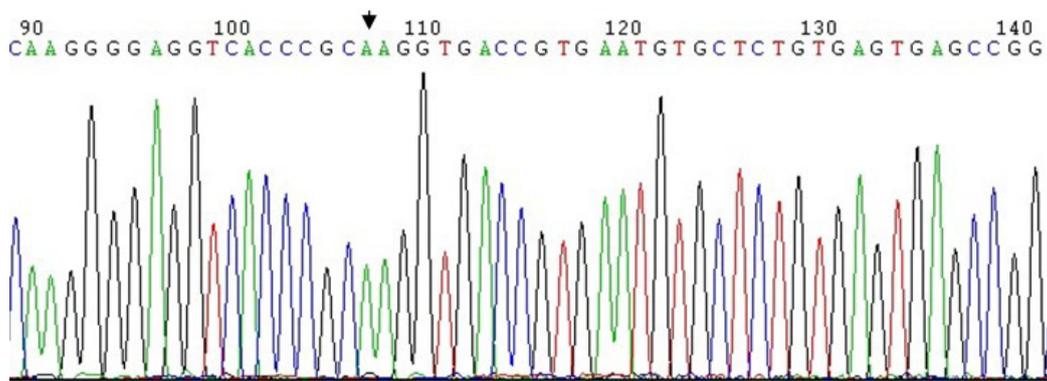


图 2 KE(AG) 型测序图 (箭头标记为多态位点)。

Figure 2 Sequence of KE (AG) genotypes (Arrow presents the polymorphic site).

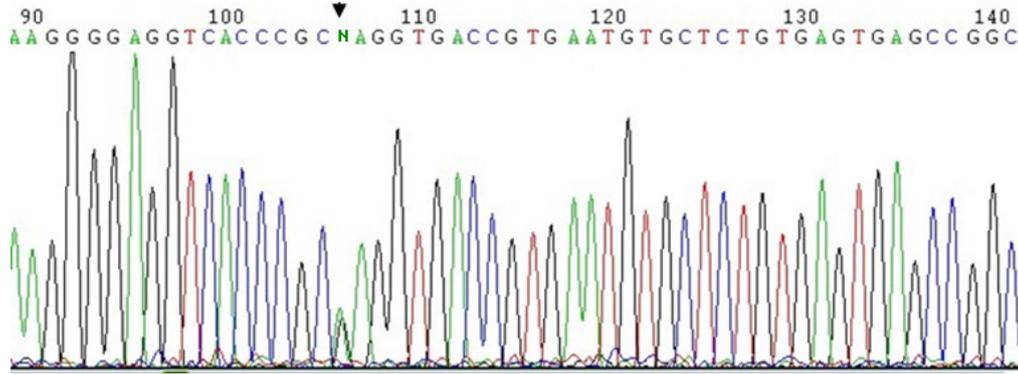


图3 EE(GG)型测序图(箭头标记为多态位点)。

Figure 3 Sequence of EE(GG) genotypes (Arrow presents the polymorphic site).

2.2 对照组和 COPD 组的基因多态性分布比较

对照组和 COPD 组之间的性别比例、年龄分布、基因型及等位基因分布频率差异均没有统计学意义,吸烟指数在两组间的比较差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。按照中华医学会慢性阻塞性肺疾病严重程度分级标准,根据稳定期的肺功能结果,进一步将 COPD 组分为极重度(IV 级)和非极重度(I~III 级)两个亚组,由于 EE 基因型例数太少,将 KE 型和 EE 型合并为 KE+EE 型,进行两个亚组间的比较。两个亚组患者在性别构成比、年龄、吸烟指数方面比较差异均没有统计学意义;在极重度亚组中,携带 E 等位基因的 KE 和 EE 基因型在极重度 COPD 患者中明显增加(表 2),携带 E 等位基因的 KE+EE 基因型相对 KK 基因型是 COPD 病情发展为极重度的危险因素(OR 值 3.141, 95%CI: 1.027~9.610, $P = 0.033$)。为控制性别、年龄和吸烟

状况的混杂因素干扰,进一步应用 logistic 回归分析,结果排除了年龄、性别和吸烟指数的影响,携带 E 等位基因仍然是发展为极重度 COPD 的危险因素 [$\text{Exp}(B) = 3.433$, 95%CI: 1.086~10.850, $P < 0.05$]。

2.3 sICAM-1 水平的比较

sICAM-1 在 26 例对照组和 60 例 COPD 组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。非极重度亚组和极重度亚组间 sICAM-1 水平比较差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。在正常对照组和不同严重程度 COPD 亚组中, KK 基因型和 KE/EE 基因型 sICAM-1 水平比较差异均没有统计学意义($P > 0.05$, 表 3)。对 sICAM-1 与第 1 秒用力呼气容积占预计值的百分比(forced expiratory volume in one second for the percentage of predicted value, FEV1%)进行相关分析,显示 sICAM-1 与 FEV1% 呈负相关($r = -0.591$, $P < 0.01$)。

表 1 对照组和 COPD 组基因多态性的分布比较

Table 1 Comparison of K469E polymorphism of ICAM-1 between COPD patients and controls

组别	n	性别		年龄 / 岁	吸烟指数	基因型			等位基因	
		男	女			KK	KE	EE	K	E
对照组	80	62	18	65.0±7.0	7.6±17.6	52	21	7	125	35
COPD 组	91	73	18	66.3±7.7	40.6±28.9	55	30	6	140	42
P		0.663		0.226	0.000	0.593			0.791	

表 2 不同严重程度 COPD 基因多态性的分布比较

Table 2 Comparison of K469E polymorphism of ICAM-1 between COPD patients at very severe stage and severe stage

组别	n	性别		年龄 / 岁	吸烟指数	基因型		等位基因	
		男	女			KK	KE+EE	K	E
极重度	16	14	2	66.0±5.9	50.1±28.8	6	10	20	12
非极重度	75	59	16	66.4±8.1	38.6±28.7	49	26	120	30
P		0.730*		0.847	0.150	0.039		0.033	

*Fisher 确切概率法。

表3 对照组、非极重度亚组及极重度亚组 sICAM-1 水平的比较 ($\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$)Table 3 Comparison of sICAM-1 level between COPD patients at very severe stage or severe stage and controls ($\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$)

组别	n	KK	n	KK+KE	n	P
对照组	26	171.9±23.2	16	182.0±21.5	10	0.276
非极重度	47	200.0±30.9	32	214.0±30.0	15	0.151
极重度	13	255.0±15.2	6	245.7±23.0	7	0.418

3 讨论

ICAM-1 又称 CD54, 属黏附分子免疫球蛋白超家族 (IgSF) 成员之一。ICAM-1 可以表达于多种类型的细胞, 一些前炎症细胞因子可以上调其表达。正常情况下, 覆盖大部分肺泡基底膜的 I 型肺泡上皮细胞表达大量的 ICAM-1; 而 II 型肺泡上皮细胞缺乏 ICAM-1 的表达, 肺部血管内皮细胞呈弱阳性表达或不表达。刺激因素作用下, 肺内 ICAM-1 表达明显上调, 促进白细胞黏附、扣押于肺泡区域, 导致肺实质细胞损伤及持续的细胞因子释放。sICAM-1 是存在于机体血清中及其他体液中的可溶性的细胞间黏附分子, 可由细胞表达的 ICAM-1 的胞外片段被特异性蛋白酶水解后脱落或是 mRNA 翻译后不表达于细胞表面而直接分泌入血形成, 其与结合状态下的表达情况有高度相关性, 可以反映体内总体 ICAM-1 的表达情况^[4]。本研究中 COPD 患者的 sICAM-1 水平较正常对照者明显增高, 并且与 COPD 患者的肺功能水平呈负相关, 证实 ICAM-1 参与了 COPD 的病理生理过程, 在 COPD 的病理生理过程中, ICAM-1 呈现高表达。

ICAM-1 基因含有多个多态性位点, K469E 多态性 (G → A) 最终改变 ICAM-1 分子免疫球蛋白样 5 区的氨基酸的表达 (Glu → Lys), 可能影响 ICAM-1 与配体之间的相互作用以及 B 淋巴细胞的黏附。有研究^[5]显示该多态性可通过影响 ICAM-1 的短结构域的产生而调节细胞的凋亡。K469E 多态性对疾病易感性的影响近年来受到颇多关注, 在呼吸系统疾病中, 有报道^[1]其与儿童的哮喘发病有关。在本研究中, 该多态性在正常对照人群和 COPD 人群中没有差异, 表明其可能不是我国汉族人群 COPD 的发病危险因素; 但分层分析却发现: 相对于非极重度的 COPD 患者, 携带 E 等位基因的 KE+EE 基因型在极重度 COPD 患者中明显增高, 在排除吸烟、年龄、性别的混杂因素后, 结果仍然具有统计学意义, 提示携带 E 等位基因可能与病情严重程度相关。

K469E 基因多态性对 ICAM-1 表达的影响有少数报道。Puthothu 等^[1,6]在对儿童支气管哮喘的

研究中发现 K469E 多态性可能与 sICAM-1 水平相关; Pola 等^[7]对意大利缺血性脑卒中的研究也提示该位点基因多态性可能影响 ICAM-1 血清水平和 (或) 活性, 并可能是与缺血性脑卒中相关的机制之一。最近, Holder 等^[2]通过细胞转染研究证实携带 K469E 和 ICAM-1 基因另一个多态位点 G241 等位基因的细胞表面高度表达 ICAM-1, 并且介导的白细胞黏附作用明显增强, 但是携带二者之一的单个等位基因并不具有表达增强的作用。本研究调查的中南地区的汉族人群中, KE+EE 基因型相对于 KK 型, 无论在对照组和 COPD 组中, sICAM-1 水平均没有统计学意义上的差别。但由于进行 sICAM-1 水平检测的例数较少, 有待扩大样本量进一步确定。

ICAM-1 除介导炎症细胞和靶细胞的黏附外, 尚可介导 T 细胞与 T 细胞、T 细胞与靶细胞、T 细胞与 B 细胞间的相互作用。T 细胞表面的 ICAM-1 被认为可参与信号转导, 因此可能调节包括 T 细胞激活、增殖、细胞毒作用和细胞因子产生等在内的功能。ICAM-1 也可作为抗原呈递细胞上的协同刺激分子激活主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 类限制性 T 细胞, 在其他与 MHC I 类分子相关的细胞表面激活细胞毒性 T 细胞。由于 COPD 的病理生理过程是一个具有多种机制、多种细胞参与的慢性炎症过程, 而 ICAM-1 在多个可能的环节中均起作用, K469E 多态性除影响 ICAM-1 的表达外, 尚可能对多个环节产生作用, 因此 K469E 多态性对 ICAM-1 表达的影响可能不是与 COPD 病情严重程度相关的唯一机制或主要机制。

参考文献

1. Puthothu B, Krueger M, Bernhardt M, et al. ICAM1 amino-acid variant K469E is associated with paediatric bronchial asthma and elevated sICAM1 levels[J]. *Genes Immun*, 2006, 7(4): 322-326.
2. Holder AL, Wolf S, Walshe C, et al. Expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1 is determined by genotype: effects on efficiency of leukocyte adhesion to human endothelial cells[J].

- Hum Immunol, 2008, 69(2):71-78.
- 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(1): 6-17.
Group of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Committee of Respiratory Disease, Chinese Medical Association. Guideline for Diagnosis and Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2007 Revised Edition) [J]. Chinese Journal of Tuberculosis Respiratory Disease, 2007, 30(1): 6-17.
 - James C, Curtis N, Sessler L, et al. Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(3): 431-437.
 - Iwao M, Morisaki H, Morisaki T. Single-nucleotide polymorphism g.1548G>A(E469K) in human ICAM-1 gene affects mRNA splicing pattern and TPA-induced apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(3):729-735.
 - Li YF, Tsao YH, Gauderman WJ, et al. Intercellular adhesion molecule-1 and childhood asthma[J]. Hum Genet, 2005, 117(5):476-484.
 - Pola R, Flex A, Gaetani E, et al. Synergistic effect of 2174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke[J]. Stroke, 2003, 34(4):881-885.
- (本文编辑 陈丽文)

欢迎订阅 2012 年《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊 (ISSN1005-6947/CN43-1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外及相关领域工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新进展、新观点、新技术、新成果、实用性临床研究及临床经验, 是国内普外学科的权威刊物之一。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

本刊由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、郑树森、夏家辉、黄志强、黎介寿等多位国内外著名普通外科专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。本刊已被多个国内外重要检索系统和大型数据库收录, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中文核心期刊 (中文核心期刊要目总览 2008 年版), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国核心学术期刊 (RCCSE), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 万方数据 - 数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

本刊已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期短, 时效性强。欢迎订阅、赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4 幅面), 每期 112 页, 每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价 20.0 元 / 册, 全年 240 元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。

本刊编辑部全体人员, 向长期以来关心、支持、订阅本刊的广大作者、读者致以诚挚的谢意!

编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731-84327400 网址: <http://www.zpwz.net> Email: pw4327400@126.com;

jcgxxych@126.com