

TNFSF4 基因多态性 RS3861950 与无症状颈动脉易损斑块易感性研究

黄清 刘小娟 冯洁 文延斌 贺威 刘运海

【摘要】 目的 进一步明确肿瘤坏死因子超家族第4成员(TNFSF4)基因单核苷酸多态性(SNP)在无症状颈动脉易损斑块中的作用,以及对动脉粥样硬化性脑梗死早期预警的意义。方法 利用颈动脉超声筛选无脑卒中症状和体征的颈动脉易损斑块患者510例(病例组),以及性别年龄匹配的无颈动脉易损斑块的健康体检人群485例(对照组),采用TAQMAN-PCR方法检测TNFSF4基因SNP rs3850641、rs3861950基因型。结果 两位点的基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡检验。TNFSF4基因rs3861950位点CC/TT基因型在病例组和对照组中分别为7.1%/57.8%和2.8%/67.6%,两者差异有统计学意义($\chi^2=25.28, P<0.0001$);C/T等位基因频率两组比较差异亦有统计学意义($\chi^2=9.13, P=0.003$; $OR=1.41, 95\%CI: 1.12\sim 1.76$)。TNFSF4基因rs3850641位点AA/GG基因型在病例组和对照组中分别为68.7%/3.4%和64.8%/31.4%,两者差异无统计学意义($\chi^2=1.73, P=0.42$);A/G等位基因频率两组比较差异亦无统计学意义($\chi^2=1.47, P=0.225$; $OR=1.16, 95\%CI: 0.92\sim 1.46$)。结论 TNFSF4基因SNP位点rs3861950可能与中国湖南省人群颈动脉易损斑块形成的发生密切相关。TNFSF4基因多态性可参与大动脉粥样硬化型脑梗死的发生。

【关键词】 颈动脉易损斑块;肿瘤坏死因子超家族第4成员基因;动脉粥样硬化;脑梗死

Association between tumor necrosis factor superfamily member 4 gene polymorphism and risk of asymptomatic carotid vulnerable plaque in a Chinese population Huang Qing^{1,2}, Liu Xiaojuan¹, Feng Jie^{1,2}, Wen Yanbin¹, He Wei¹, Liu Yunhai^{1,2}. 1 The Neurology Department of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Quality Control Center for Stroke of Hunan Province

Corresponding author: Liu Yunhai, Email: xyneuro@126.com

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 81400978).

【Abstract】 Objective Vulnerable plaque of carotid artery is one of the risk factors of atherosclerotic cerebral infarction. Detection and treatment of vulnerable atherosclerotic plaque of carotid artery before symptoms of cerebral infarction is an effective way to prevent atherosclerotic cerebral infarction. Tumor necrosis factor superfamily member 4 (TNFSF4) plays a key role in the process of atherosclerosis, a common risk factor for both myocardial and cerebral infarctions. Studies have indicated that the single nucleotide polymorphism (SNP) rs3850641 in TNFSF4 is associated with higher risk of myocardial infarction and SNP rs3861950 in TNFSF4 is associated with higher risk of atherosclerosis cerebral infarction (ACI), but little is known about the association between TNFSF4 variations and vulnerable plaque of carotid artery. **Methods** A case-control study involving 510 patients with asymptomatic vulnerable plaque of carotid artery and 485 age and sex matched healthy subjects without vulnerable plaque of carotid artery was conducted in Hunan province. Asymptomatic vulnerable plaque of carotid artery means vulnerable plaque of carotid artery without cerebral infarction. Two SNPs of TNFSF4, rs3850641 and rs3861950, were genotyped by the TaqMan SNP genotyping method, and verified partly by Genomic DNA Sequencing. **Results** The results revealed a significant allelic association between rs3861950 and asymptomatic vulnerable plaque of carotid artery in case group ($\chi^2=9.13, P=0.003$; $OR=1.41, 95\%CI: 1.12\sim 1.76$). Compared with control

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.09.019

基金项目:国家自然科学基金(81400978)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院神经内科(黄清、刘小娟、冯洁、文延斌、贺威、刘运海);湖南省脑卒中质量控制中心(黄清、冯洁、刘运海)

通信作者:刘运海, Email: xyneuro@126.com

subjects, the difference in genotype was significant in case group ($\chi^2=25.28, P<0.0001$). However, there was no significant association between rs3850641 and asymptomatic vulnerable plaque of carotid artery ($OR=1.16, 95\%CI: 0.92-1.46; \chi^2=1.47, P=0.225$). **Conclusion** TNFSF4 gene polymorphism rs3861950 was associated with the risk of vulnerable plaques of carotid artery in a Chinese population, which might be middle phenotype indicating higher risk of cerebral infarction.

【Key words】 Carotid vulnerable plaque; Tumor necrosis factor superfamily member 4 gene; Atherosclerosis; Cerebral infarction

肿瘤坏死因子超家族第4成员(tumor necrosis factor superfamily member 4, TNFSF4)基因是动脉粥样硬化的候选基因之一,位于1号染色体第一个被鉴定的动脉粥样硬化的易感基因区域^[1-2],表达OX40L蛋白^[3]。前期研究证实TNFSF4在动脉粥样硬化形成过程中起到重要作用^[4-5]。本课题组前期研究发现湖南省汉族人群TNFSF4基因rs3861950 C→T多态位点与动脉粥样硬化性脑梗死发病风险相关^[6]。但目前缺乏TNFSF4基因多态性与无症状颈动脉易损斑块发生的关联研究。由于颈动脉易损斑块是动脉粥样硬化性脑梗死发生的高危因素之一,无症状颈动脉易损斑块的早期预测干预是降低脑梗死发生的有效手段^[7],因此进一步明确TNFSF4基因多态性在无症状颈动脉易损斑块中的作用,对动脉粥样硬化性脑梗死早期预警有重要意义。

对象与方法

1. 研究对象:采集自2013、2014年参加原卫生部脑卒中筛查防治项目的长沙市裕南街、伍家岭社区人群。所有研究对象均经过标准的既往史询问、体检、血标本采集,本研究通过中南大学伦理委员会审查并签署知情同意书。无症状颈动脉易损斑块组(病例组)入选标准:①50~80岁,汉族,右利手;②存在动脉粥样硬化高危因素中的任意一项(如高血压、糖尿病、血脂异常等);③颈部彩色多普勒超声双侧颈总动脉及颈内动脉任何一侧存在等、低回声斑块;④无脑卒中及短暂性脑缺血发作的临床症状,无脑卒中病史。共入组510人,其中男性316人,年龄41~80岁,平均(61.8±11.2)岁。对照组入选标准:①40~82岁,汉族,右利手;②无头颈部及心脏、外周动脉粥样硬化证据的健康体检人群。共485人,其中男性302人,年龄40~82岁,平均(62.16±10.7)岁。两组均排除左利手、脑卒中病史、存在神经功能缺损的症状及体征、痴呆、其他神经系统变性病、动脉炎、动脉瘤、动静脉畸形,并除外严重血液、肝肾疾病及房颤、风湿性心脏病、扩张性心脏病、肿瘤史、精神疾病或重大精神创伤史(含抑郁症、焦虑症)以及不能耐受或不适宜本项研究者。

2. 研究方法:

(1)一般临床资料收集:包括性别、年龄、吸烟史、饮酒史、高血压史、糖尿病史、高脂血症史、冠心病史、外周动脉疾病史;血压、FPG、血脂检测由医院检验科完成。

(2)人外周血白细胞基因组DNA提取:受试者禁食12h后,于次日清晨采外周静脉血5ml,肝素抗凝,常规酚/氯仿抽提法提取DNA。Taqman-PCR检测基因型, TNFSF4基因多态位点rs3861950、rs3850641。扩增序列的A/T含量较高,选用MGB(minor groove binder)探针。设计引物为rs3861950-FP: 5'-CAG GGT GGA AAC TGC TTT ACC T-3'; RP: 5'-TCC TGA ATC TCA GCC CCA TC-3'。探针:rs3861950-T1: FAM-AGA GGC AAT GCT AAC-MGB, T2: TET- AAG AGG CAA TGT TAA C-MGB。rs3850641-FP: 5'-AAC TGG TCT CTT TCC TAT TTC CTT TTA A-3'; RP: 5'-CAC TTT GAA GCT TTG AGT CAC TGA TAT-3'。探针:rs3850641-T1: FAM-TGG TCT ACC CAT TGT GAT A-MGB, T2: TET-TCT ACC CAC TGT GAT AGT AA-MGB。引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成。

(3)无症状颈动脉易损斑块的检测:采用荷兰皇家Philip公司生产Philip iu22型智能超声诊断系统,频率6~13MHz,超宽频探头。测量包括①颈总动脉、颈内动脉斑块位置、大小、数目、内部回声,观察有无狭窄,两侧是否对称;②以颈动脉内膜-中层厚度IMT≥1.5mm作为诊断斑块的标准。取无脑卒中及短暂性脑缺血发作临床症状、无脑卒中病史者的双侧颈总动脉及颈内动脉任何一侧存在等、低回声斑块为易损斑块。

3. 统计学分析:所有资料采用SPSS 19.0软件包建立数据库。等位基因频率=(2×纯合子+杂合子)/(2×受检人数)。组间等位基因和基因型频率的差异用 χ^2 检验。按Hardy-Weinberg(H-W)平衡法检测样本的群体代表性。组间血压、血糖、血脂差别用Mann-Whitney U检验。不同基因型组间血压、血糖、血脂比较采用ANOVA方差分析,同一基因型不

同组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 则为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组临床特点比较: 两组性别、年龄差异无统计学意义, 提示对照组与病例组具有可比性。对照组 BMI 稍高于病例组; 病例组糖尿病、高血压、冠心病史及吸烟和饮酒史的人数明显高于对照组 ($P < 0.01$); 两组中 TC、LDL-C、TG 水平的差异均有统计学意义(表1)。

表1 两组人群临床特征比较

特 征	对照组(n=485)	病例组(n=510)	P值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	62.16 ± 10.7	61.8 ± 11.2	0.10
性别(男/女)	302/127*	316/194	0.22
BMI (kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	24.18 ± 3.25	23.12 ± 2.86	<0.01
冠心病史	0(0)	103(20.2)	<0.01
高血压史	35(7.2)	350(68.6)	<0.01
糖尿病史	0(0)	294(57.7)	<0.01
FPG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	5.21 ± 1.32	6.60 ± 2.41	<0.01
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.62 ± 0.87	5.11 ± 1.17	<0.01
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.37 ± 0.79	3.84 ± 0.95	<0.01
TG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.51 ± 1.55	2.00 ± 1.24	<0.01
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.30 ± 0.32	1.18 ± 0.40	<0.01
吸烟史	65(13.4)	142(27.7)	<0.01
饮酒史	108(22.3)	160(31.4)	<0.01

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为百分比(%); 吸烟史定义为每天吸烟 > 10 支; 饮酒史定义为每天饮酒 > 1 dri(换算为 ml); * 例数有缺失

2. TNFSF4 基因 rs3861950 (C/T) 多态性分析: 两组均出现 CC、CT、TT 三种基因型。对照组 CC 型 14 例(2.8%), TT 型 396 例(67.6%), CT 型 148 例(30.6%); 病例组 CC 型 36 例(7.1%), TT 型 295 例(57.8%), CT 型 179 例(35.1%)。两组基因型及等位基因频率分布均符合 H-W 平衡检验, 表明选择的样本来自同一人群, 基因频率能够代表群体的基因分布(表2)。病例组 rs3861950 位点的 CC、CT、TT 基因型分布与对照组比较差异有统计学意义, 即病例组 CC 基因型分布明显高于对照组 ($\chi^2 = 25.28, P < 0.000 1$); 同时 C/T 等位基因频率在两组之间比较差异亦有统计学意义 ($\chi^2 = 9.13, P = 0.003; OR = 1.41, 95\%CI: 1.12 \sim 1.76$)。

表2 两组人群 rs3861950 基因型及等位基因频率

组别	例数	基因型(%)			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
病例组*	510	36(7.1)	179(35.1)	295(57.8)	0.247	0.853
对照组	485	14(2.8)	148(30.6)	396(67.6)	0.171	0.829

注: * 基因型与对照组相比

3. TNFSF4 基因 rs3850641 (A/G) 多态性分析: 两组均出现 AA、AG、GG 三种基因型。对照组 AA 型 314 例(64.8%), GG 型 18 例(4.8%), AG 型 153 例(31.4%); 病例组 AA 型 350 例(68.7%), GG 型 18 例(3.4%), AG 型 142 例(27.9%)。两组基因型及等位基因频率分布均符合 H-W 平衡检验, 表明选择的样本来自同一人群, 基因频率能够代表群体的基因分布(表3)。rs3850641 位点的 AA、AG、GG 基因型分布在两组间比较差异无统计学意义, 即病例组 AA/AG/GG 基因型分布与对照组相比差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.73, P = 0.42$), A/G 等位基因频率在病例组为 82.7%/17.3%, 而对照组为 80.5%/19.5%, 两组等位基因频率比较未发现差异有统计学意义 ($\chi^2 = 1.47, P = 0.225; OR = 1.16, 95\%CI: 0.92 \sim 1.46$)。

表3 两组人群 rs3850641 基因型及等位基因频率

组别	例数	基因型(%)			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
病例组*	510	350(68.7)	142(27.9)	18(3.4)	0.827	0.173
对照组	485	314(64.8)	153(31.4)	18(4.8)	0.805	0.195

注: * 基因型与对照组相比

讨 论

TNFSF4 基因属 TNF 超家族成员, 长约 23.48 kb, 由 3 个外显子组成, 位于 1q25, 编码 OX40L 蛋白。目前研究认为 OX40L 蛋白调控动脉粥样硬化斑块形成的机制有: ① OX40/OX40L 是 CD₄⁺T 淋巴细胞的共刺激分子, 促进 T 淋巴细胞的增殖和分化, 参与记忆性 CD₄⁺T 细胞的分化成熟, 介导 T 细胞向炎症部位浸润迁移^[8-9]。② OX40/OX40L 介导早期斑块形成的免疫活性细胞和血管内皮细胞之间的黏附作用。体外培养的人内皮细胞表达 OX40L, 抗 OX40L 的抗体阻断活化 T 细胞与内皮细胞的黏附, 证实 OX40L 参与 T 细胞和内皮细胞的黏附过程^[10]。③ OX40/OX40L 通过信号传导激活 NF- κ B 信号通路, 而 NF- κ B 信号通路在动脉粥样硬化斑块形成中作用显著^[11]。有文献报道, TNFSF4 基因敲除小鼠在高脂饮食中表现出对动脉粥样硬化的抵抗, 而在血浆脂质水平相似的情况下, TNFSF4 基因过表达小鼠更易患上动脉粥样硬化疾病^[6], 因此, TNFSF4 基因是调控动脉粥样硬化斑块的关键候选基因。

本文在既往研究^[12]基础上选取无脑卒中及 TIA 病史的“高危”人群(颈动脉易损斑块组, 即病例组)和对照组, 比较分析 TNFSF4 基因 2 个多态位点 rs3861950 和 rs3850641, 发现在两组间 rs3861950

(C/T)基因型及等位基因频率比较差异有统计学意义,病例组CC基因型个体较对照组明显增多,C等位基因频率也明显高于对照组,提示TNFSF4基因SNP rs3861950可能与本组易损斑块人群发病相关。Olofsson等^[13]分析颈动脉内膜切除标本发现,TNFSF4的mRNA水平在颈动脉溃疡斑块中明显增高。因此本研究推测rs3861950位点的碱基C/T替换影响TNFSF4基因启动子活性和mRNA的表达水平,在某种程度上促进OX40/OX40L信号通路的激活,促进多种细胞因子及黏附分子的分泌。TNFSF4基因潜在调控区域的SNP rs3861950C/T影响颈动脉易损斑块的形成和发展。

rs3850641位于TNFSF4基因1号内含子与1号外显子交界的内含子区域,文献报道该多态位点可能影响TNFSF4基因的mRNA转录水平,与OX40L/OX40信号通路的激活有关^[4]。Wang等^[5]通过分析瑞典两组心肌梗死病例及其对照人群,发现TNFSF4基因单核苷酸多态位点rs3850641携带等位基因G的女性患者更易发生心肌梗死。Yamaguchi等^[14]发现携带rs3850641A→G合并2型糖尿病的日本患者与脑梗死发病相关。本研究试图以TNFSF4 rs3850641(A/G)位点作为候选SNP位点在中国湖南省无症状颈动脉易损斑块人群中寻找发病易感性。然而却未发现rs3850641各基因型及A、G等位基因频率在易损斑块组与对照组差异有统计学意义,未发现G等位基因频率增加与易损斑块的发生密切相关。虽然先前国外的动物实验和部分临床研究认为^[5]“rs3850641A→G与动脉粥样硬化性疾病相关”,本研究的结果却不支持该结论。这与本课题组前期研究认为“rs3850641A→G各基因型可能与湖南省汉族脑梗死发病无关,G等位基因不增加脑梗死发病风险”^[6]的结论一致,即从另一角度印证rs3850641A→G各基因型变异不影响湖南省汉族人群动脉粥样硬化脑梗死及动脉粥样硬化斑块形成,因此推测rs3850641 G等位基因可能不增加该地区颈动脉粥样硬化斑块的易损性。文献报道阻断OX40L/OX40通路,高脂饮食诱导下LDL-C受体缺陷(Ildl^{-/-})小鼠的主动脉斑块面积减少35%,颈动脉粥样硬化斑块面积减少53%^[4]。结合本文和既往研究结果,认为TNFSF4潜在调控区域多态位点rs3861950可能是本研究人群颈动脉易损斑块和动脉粥样硬化性脑梗死的易感位点,rs3850641位点则不是,并推测TNFSF4基因rs3861950(C/T)的多态性可影响TNFSF4基因功能的表达及影响动脉粥样

硬化性疾病的发生和发展。

本研究探讨TNFSF4基因多态位点rs3861950/rs3850641与无症状颈动脉易损斑块发生的相关性,发现TNFSF4基因SNP rs3861950可能是本研究人群颈动脉易损斑块的易感位点,该结果是TNFSF4基因多态性参与大动脉粥样硬化型脑梗死发生的直接有力证据。今后的研究方向可能根据SNP rs3861950的序列特点,着重于基因功能,进一步明确TNFSF4基因/蛋白对动脉粥样硬化性脑梗死的影响,研制易损斑块抑制/稳定剂,对动脉粥样硬化性脑梗死进行早期干预防治。

参考文献

- [1] Smith J. Quantitative trait locus mapping for atherosclerosis susceptibility [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14: 499-504.
- [2] Hauser ER, Crossman DC, Granger CB, et al. A genome-wide scan for early-onset coronary artery disease in 438 families: the GENECARD Study [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75 (3) : 436-447.
- [3] Godfrey WR, Fagnoni FF, Harara MA, et al. Identification of a human OX40 ligand, a costimulator of CD₄⁺T cells with homology to tumor necrosis factor [J]. *J Exp Med*, 1994, 180 (2) : 757-763.
- [4] van Wanrooij EJ, van Puijvelde GH, de Vos P, et al. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1):204-210.
- [5] Wang X, Ria M, Kelmenson PM, et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility [J]. *Nat Genet*, 2005, 37 (4) : 365-372.
- [6] Feng J, Liu YH, Yang QD, et al. TNFSF4 gene polymorphism rs3861950 but not rs3850641 is associated with the risk of cerebral infarction in a Chinese population [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2013, 36(3):307-313.
- [7] Chalela JA. Evaluating the carotid plaque: going beyond stenosis [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2009, 27 Suppl 1: 19-24.
- [8] Soroosh P, Ine S, Sugamura K, et al. OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD₄ T cell longevity [J]. *J Immunol*, 2006, 176(10):5975-5987.
- [9] Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, et al. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology [J]. *Adv Immunol*, 2010, 105:63-98.
- [10] Chen AI, McAdam AJ, Buhlmann JE, et al. OX40 ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell: T cell interactions [J]. *Immunity*, 1999, 11(6):689-698.
- [11] So T, Croft M. Regulation of the PKC θ -NF- κ B axis in T lymphocytes by the tumor necrosis factor receptor family member OX40 [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 133.
- [12] Huang Q, Yang QD, Liu YH, et al. The study on the association between the SNP rs3861950 of TNFSF4 gene and cerebral infarction [J]. *Chin J Neurol*, 2008, 41(6):371-375. (in Chinese) 黄清, 杨期东, 刘运海, 等. 肿瘤坏死因子超家族成员4基因SNP3861950与脑梗死 [J]. *中华神经科杂志*, 2008, 41(6): 371-375.
- [13] Olofsson PS, Söderström LA, Jern C, et al. Genetic variants of TNFSF4 and risk for carotid artery disease and stroke [J]. *J Mol Med*, 2009, 87(4):337-346.
- [14] Yamaguchi S, Yamada Y, Metoki N, et al. Genetic risk for atherothrombotic cerebral infarction in individuals stratified by sex or conventional risk factors for atherosclerosis [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(5):871-883.

(收稿日期:2015-07-03)

(本文编辑:张林东)