

文章编号:1003-2754(2019)10-0902-04

血清 sICAM-1 水平及 ICAM-1 基因 K469E 多态性与脑小血管病关系研究

王利军, 王建平, 牛延良, 贺刚锐

摘要: **目的** 探讨血清 sICAM-1 水平及 ICAM-1 基因 K469E 多态性与脑小血管病之间的关系。**方法** 选择脑小血管病(CSVD)患者 158 例为病例组,选择健康体检者 150 例为对照组。利用 ELISA 法检测两组血清 sICAM-1 水平,并对比分析;利用 PCR-RFLP 法对两组 ICAM-1 基因 K469E 多态性位点进行检测和分析。**结果** (1)CSVD 组 sICAM-1 血清水平明显高于对照组($P < 0.001$);(2)CSVD 组 EE 基因型和 E 等位基因频率明显高于对照组($\chi^2 = 6.435, P = 0.011$; $\chi^2 = 9.049, P = 0.003$)。Logistic 回归分析校正后,CSVD 组与对照组之间 ICAM-1 基因 EE 型分布差异仍有统计学意义($OR = 2.649, P = 0.014$)。**结论** 血清 sICAM-1 可以作为 CSVD 的生物学标志物;ICAM-1 K469E 基因 EE 基因型与 CSVD 具有相关性,提示 ICAM-1 K469E 基因多态性可能是 CSVD 发病的遗传学危险因素。

关键词: 脑小血管病; 可溶性细胞间粘附分子 1; 细胞间粘附分子 1; 基因多态性

中图分类号:R743 **文献标识码:**A

Associations of sICAM-1 serum levels and ICAM-1 K469E gene polymorphism with cerebral small vascular disease

WANG Lijun, WAHG Jianping, NIU Yanliang, et al. (Department of Neurology, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: **Objective** To investigate the associations of sICAM-1 serum levels and ICAM-1 K469E gene polymorphism with cerebral small vascular disease. **Methods** A total of 158 patients with cerebral small vascular disease were selected as the observations group and 150 healthy people enrolled as the control group. Serum level of sICAM-1 was tested by ELISA. PCR-RFLP was used to detect and analyze the polymorphism of ICAM-1 K469E gene. **Results** (1)Serum level of sICAM-1 was significantly higher in CSVD group than that in control group ($P < 0.001$). (2)The frequencies of EE genotype and E allele of K469E in CSVD group were significantly higher than that in control group ($\chi^2 = 6.435, P = 0.011$; $\chi^2 = 9.049, P = 0.003$). After correction by conditional logistical regression, the frequency distribution difference of the EE genotype between the CSVD group and controls remained statistically significant ($OR = 2.649, P = 0.014$). **Conclusions** Serum level of sICAM-1 can be used as biological marker of CSVD. The EE genotype of ICAM-1 K469E gene is correlated with CSVD, the polymorphism of ICAM-1 K469E gene may be a genetic risk factor of CSVD.

Key words: Cerebral small vascular disease; Soluble intercellular adhesion molecule 1; Intercellular adhesion molecule 1; Gene polymorphism

脑小血管病(cerebral small vascular disease, CSVD)发病率较高,可导致慢性头晕、认知功能下降、情感障碍、行走不稳、尿便障碍等一系列症状,是老年人生活能力下降的重要原因。其发病机制尚不十分清楚,目前认为可能与氧化应激、 β 淀粉样蛋白沉积、炎症反应、内皮功能障碍、血脑屏障破坏、遗传等因素等有关^[1]。细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)又称为 CD54,是介导黏附反应的粘附分子,参与炎症反应,同时 ICAM-1 也是内皮细胞损伤的生物学标志物。可溶性细胞间粘附分子 1(soluble Intercellular adhesion molecule 1, sICAM-1)是 ICAM-1 在细胞外的存在形式,通常检测血清 sICAM-1 水平来反映 ICAM-1 的表达。有研究发现,较高水平的 sICAM-1 可能是脑白质疏松的危险因素^[2],另有研究发现,腔隙性脑梗死患者内皮功能障碍的指标 sICAM-1 显著升高^[3],我国一项研究发现,ICAM-1 基因 K469E 多态性可能与中国人无症状性脑白质损害相关^[4],以上研究均提示 ICAM-1 可能参与了脑小血管病的发生与发展过程。

目前国内尚未有研究报道 sICAM-1 血清水平及其基因 K469E 多态性是否与有症状的脑小血管病患者相关。本研究通过检测脑小血管病患者血清 sICAM-1 水平及 ICAM-1 基因 K469E 多态性,初步探讨血清 sICAM-1 水平及 ICAM-1 基因 K469E 多态性与脑小血管病之间的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象及临床资料收集 根据入组标准,选择郑大五附院神经内科 2017 年 1 月 - 2018 年 12 月期间住院的脑小血管病患者 158 例为病例组;选择郑大五附院同期体检头部影像学检查无异常者 150 例为对照组。收集病例组临床资料,包括高血压、糖尿病、高脂血症、高同型半胱氨酸血症等病史及烟酒史、体质指数等。入组标准:(1)年龄 ≥ 60 岁;(2)有脑小血管病相关症状,如慢性头晕、认

收稿日期:2019-08-12;修订日期:2019-09-30

作者单位:(郑州大学第五附属医院神经内科,河南 郑州 450052)

通讯作者:王建平, E-mail: wjpzzu@126.com

知功能障碍、步态不稳、情感障碍、泌尿障碍等；(3)符合 CSVD 影像学诊断标准；(4)患者/家属知情并自愿签署知情同意书。排除标准：(1)临床评估不能实施者(如存在视力障碍、听力障碍、失语以及不能配合者)；(2)颅内大动脉粥样硬化明显者；(3)多发性硬化、脑积水、脑辐射伤、结节病、遗传性疾病等导致的脑白质病变者；(4)全身炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤患者等。

1.2 研究方法

1.2.1 血液标本收集 分别抽取病例组及健康对照组外周静脉血 4~5 ml 于红头管中,勿颠倒混匀,静置至血块析出后,4 ℃、3000 × g 离心 15 min,分离血清及血细胞,取上层血清分装成 500 μl 于 1.5 ml EP 管,将上述血清及血细胞分别置于 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2.2 血清 sICAM-1 水平检测 采用 ELISA 法批量检测血清 sICAM-1 水平,采用联科生物公司提供的人可溶性 ICAM-1 ELISA 试剂盒,按试剂盒说明书进行试验操作,以每批实际情况控制检测质量,制作标准曲线,分析对比两组结果。

1.2.3 ICAM-1 基因 K469E 多态性检测 采用上海生工生物工程公司生产的磁珠法微量基因组 DNA 抽提试剂盒提取血细胞基因组 DNA,置 -20 ℃ 保存。PCR-RFLP 法检测 ICAM-1 K469E 基因多态性：(1)引物序列：上游引物：5'-GGAACCCAT-TGCCCGAGC-3'；下游引物：5'-GGTGAGGATTG-CATTAGGTC-3'。反应体系 25 μl：基因组 DNA 0.1~0.15 μg,上下游引物各 10 pmol,2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μl,去离子水适量。(2)PCR 反应：94 ℃ 预变性 5 min,按 94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,循环 35 次,最后一个循环结束后 72 ℃ 再延伸 5 min。(3)RFLP 检测：取 PCR 产物 5 μl,去离子水 17 μl,10 × 内切酶 Buffer 2 μl,BstU I 酶 1 μl,37 ℃ 酶切 6 h。(4)PCR 产物及酶切产物电

泳：取产物 5 μl,在含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳,在 BIO-RAD 凝胶成像系统上观察结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用 *t* 检验;基因型和等位基因频率的差异用 χ^2 检验;3 组基因型间血清 sICAM-1 水平比较采用单因素方差分析;用 Logistic 多元回归分析来控制其他混淆变量的影响;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料对比 CSVD 组和对照组在年龄、性别方面无差异,具有可比性;两组在饮酒史、高脂血症、高同型半胱氨酸方面无差异,在高血压、糖尿病和吸烟史方面有统计学差异(*P* < 0.05)(见表 1)。

2.2 sICAM-1 血清水平对比 CSVD 组 sICAM-1 血清水平为 148.9 ng/ml;对照组 sICAM-1 血清水平为 105.3 ng/ml;CSVD 组 sICAM-1 血清水平明显高于对照组,有显著差异(*P* < 0.001)。

2.3 基因型和等位基因频率分布 电泳结果提示,ICAM-1 K469E 基因共 3 种基因型:KK 型、KE 型、EE 型(见图 1)。两组 EE 基因型和 E 等位基因频率分布相比,CSVD 组(17.7%、37.7%)明显高于对照组(8.0%、26.3%),差异有统计学意义(见表 2)。

2.4 ICAM-1 K469E 基因多态性与 sICAM-1 血清水平关系 两组中各基因型血清 sICAM-1 水平对比,EE 基因型最高,KE 基因型其次,KK 基因型最低,3 种基因型之间血清 sICAM-1 水平对比有统计学差异(*P* < 0.05)(见表 3)。

2.5 脑小血管病相关危险因素的 Logistic 回归分析 Logistic 回归分析提示 EE 基因型是 CSVD 的独立危险因素之一,EE 基因型人群患 CSVD 的相对风险是非 EE 型人群的 2.649 倍(见表 4)。

表 1 CSVD 组和对照组一般临床资料对比

分组	例数	年龄(岁)	性别(男/女)	高血压	糖尿病	吸烟史	饮酒史	高脂血症	高同型半胱氨酸血症
病例组	158	74.7 ± 6.5	101/57	97	49	67	55	44	32
对照组	150	73.9 ± 5.9	94/56	48	21	43	37	35	24
<i>P</i> 值		0.275	0.819	<0.001*	<0.001*	0.012*	0.052	0.364	0.333

CSVD 组与对照组比较 * *P* < 0.05

表 2 基因型和等位基因频率分布

分组	例数(<i>n</i>)	基因型[<i>n</i> (%)]			等位基因(%)	
		KK	KE	EE	K	E
病例组	158	67(42.4)	63(39.9)	28(17.7)	62.3	37.7
对照组	150	83(55.3)	55(36.7)	12(8.0)	73.7	26.3
χ^2 值			6.435			9.049
<i>P</i> 值			<0.05*			0.003#

CSVD 组与对照组基因型频率比较 * *P* < 0.05;等位基因频率比较#*P* < 0.05

表3 两组 ICAM-1 基因 K469E 多态性与血清 sICAM-1 水平关系

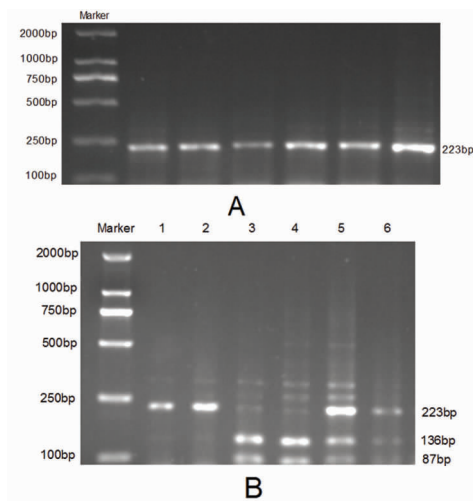
基因型	病例组		对照组	
	例数(n)	sICAM-1 (ng/ml)	例数(n)	sICAM-1 (ng/ml)
KK	67	142.1	83	101.3
KE	63	150.3	55	108.4
EE	28	162.0	12	117.8
F 值		12.994		9.227
P 值		<0.001*		<0.001#

两组各基因型血清 sICAM-1 水平对比, CSVD 组 * $P < 0.001$; 对照组# $P < 0.001$

表4 脑小血管病相关危险因素的 Logistic 回归分析

变量	参数估计	标准误	Wald- χ^2 值	P 值	OR 值	95% CI	
						下限	上限
年龄	-0.012	0.02	0.335	0.563	0.988	0.95	1.029
性别	-0.487	0.33	2.172	0.141	0.615	0.322	1.174
高血压	1.261	0.255	24.448	<0.001*	3.53	2.141	5.819
糖尿病	1.121	0.319	12.311	<0.001*	3.067	1.64	5.736
吸烟史	0.567	0.315	3.237	0.072	1.762	0.951	3.266
饮酒史	0.506	0.319	2.512	0.113	1.658	0.887	3.099
高脂血症	0.196	0.287	0.464	0.496	1.216	0.693	2.136
高同型半胱氨酸血症	-0.113	0.344	0.109	0.742	0.893	0.455	1.751
ICAM-1 基因 EE 型	0.974	0.397	6.025	0.014*	2.649	1.217	5.767

注: * $P < 0.05$ 有统计学意义



A: PCR 产物电泳结果 (223 bp); B: 酶切后产物电泳结果: 1、2 为 KK 型 (223 bp); 3、4 为 EE 型 (136 bp、87 bp); 5、6 为 KE 型 (223 bp、136 bp、87 bp)

图1 ICAM-1 基因 K469E 多态性分析电泳结果

3 讨论

脑小血管病发病机制复杂,多种机制共同作用导致脑小血管病的发生。内皮功能障碍及炎症反应均可能参与了其发病。内皮细胞功能障碍会直接导致髓鞘损伤,其功能受损还会阻断少突胶质前体细胞成熟,从而影响髓鞘的形成和修复^[5]。炎症反应

则可能通过介导内皮功能障碍、破坏紧密连接蛋白、重塑细胞外基质、激活胶质细胞等参与 CSVD 的发病^[6]。ICAM-1 是一种跨膜糖蛋白,主要介导白细胞与内皮细胞的紧密贴附,并诱导白细胞迁移到内皮内,参与免疫应答、炎症反应等生理过程。sICAM-1 可能来自内皮细胞,也可能来自活化的单核细胞/巨噬细胞^[7],是内皮细胞损伤的生物学标志物之一,同时也是血管性炎症因子,在炎症介质的刺激下,其表达明显升高,是多种疾病的炎症标志物,参与多种疾病的发生发展过程。

本研究发现,CSVD 组患者血清 sICAM-1 水平明显高于对照组 ($P < 0.001$),提示 sICAM-1 与 CSVD 的发病可能也相关,这与国内外一些研究结果符合。Han 等研究发现,血清 sICAM-1 水平与脑白质病变的程度相关^[8]。一项横断面研究发现,护骨素、ICAM-1、磷脂酶 A2 水平升高是脑白质疏松 (LA) 的独立危险因素^[2];另有一项荟萃分析发现,腔隙性脑梗死 (LI) 患者的 E 选择素、P 选择素、ICAM-1、VCAM-1 等均显著升高^[3]。这些研究均提示 ICAM-1 参与 CSVD 发病过程。Rouhl RP 研究发现活化的单核/巨噬细胞可能参与脑小血管病发病过程,他们发现 sICAM-1 和 sVCAM-1 等水平在 CSVD 患者中高于无 CSVD 患者,sICAM-1 可能来源于活化的单核/巨噬细胞,参与脑小血管病的炎症反应

过程^[9]。这些研究及本研究均提示 sICAM-1 可能参与了 CSVD 的发生发展过程,可以作为 CSVD 的血清学标志物。

目前研究发现,ICAM-1 基因 K469E 多态性与多种神经系统疾病相关,Nepal Gaurav 的荟萃分析发现 ICAM-1 基因 K469E 多态性可能是白种人缺血性脑卒中的危险因素^[10],我国的一项研究发现,E 等位基因可能在女性患者缺血性脑卒中的发病机制中起重要作用^[11];而另一项研究则认为 ICAM-1 中 K469E 位点的 KK 基因型是急性脑梗死 AIS 的危险因素^[12],Ivana Shawkatova 发现发病年龄较早的多发性硬化患者携带 EE 基因型频率较高^[13],我国一项针对偏头痛的研究发现 ICAM1 K469E 多态性的 E/E 基因型可能是汉族人群偏头痛的重要危险因素^[14]。而关于 ICAM-1 基因 K469E 多态性与脑小血管病的研究较少,国内有研究^[4]发现无症状的 WML 组 KK 基因型和 K 等位基因频率均明显高于对照组,K 等位基因可能与老年人无症状 WML 相关。本研究结果提示,ICAM-1 基因 K469E 多态性可能与 CSVD 相关,本研究中 EE 型频率及 E 等位基因明显高于对照组,提示 EE 基因型可能增加了 CSVD 的发病风险,多因素分析表明 EE 基因型是 CSVD 发生的相关因素 ($OR = 2.649; P = 0.014$)。本研究结果提示,健康人中 EE 基因 8.0%,E 等位基因频率 26.3%,与我国大多数研究相符,与欧美国家有一定区别,说明 ICAM-1 基因 K469E 多态性可能存在种族差异,还可能与样本量大小相关。

通过对不同基因型 sICAM-1 水平对比,发现无论 CSVD 组还是对照组 EE 及 KE 基因型血清 sICAM-1 水平均明显高于 KK 基因型,提示 E 等位基因可能增加血清 sICAM-1 水平,K469E 多态性可能影响血清 sICAM-1 水平,这与 He Qiu 等的研究结果一致^[14]。但这与 CSVD 发病是否相关尚不清楚,ICAM-1 基因型多态性如何参与 CSVD 的发病机制亦不清楚。有研究认为 K469E 多态性位点可能影响 ICAM-1 分子的功能^[15],ICAM-1 基因型多态性是否通过影响 ICAM-1 的分子功能及增加血清 sICAM-1 水平参与 CSVD 的发病尚需基础研究证实。

通过本研究发现,ICAM-1 K469E 基因 EE 基因型可能是 CSVD 的一个危险因素,CSVD 患者血清 sICAM-1 水平明显升高,提示 sICAM-1 参与脑小血管病的发病过程,可以作为 CSVD 的一个生物学标志物,同时本研究发现 E 等位基因可能增加人群中血清 ICAM-1 水平。但本研究不足之处在于样本量不是太大,不能代表中国人群 ICAM-1 基因 K469E 多态性,

本研究结果尚需要进一步增大样本量来验证。

[参考文献]

- [1] 蒋胶胶,杨改清,徐志强,等. 脑小血管病发病机制研究进展[J]. 国际脑血管病杂志,2018,26(8):628-631.
- [2] Shoamanesh A, Preis SR, Beiser AS, et al. Inflammatory biomarkers, cerebral microbleeds, and small vessel disease: Framingham Heart Study[J]. Neurology, 2015, 84(8):825-832.
- [3] Wiseman S, Marlborough F, Doubal F, et al. Blood markers of coagulation, fibrinolysis, endothelial dysfunction and inflammation in lacunar stroke versus non-lacunar stroke and non-stroke: systematic review and meta-analysis[J]. Cerebrovascular Diseases, 2014, 37(1):64-75.
- [4] 韩璟浩,黄延焱,罗玉敏,等. 细胞间黏附分子-1 基因多态性与老年无症状性脑白质损害的相关性[J]. 中华神经科杂志,2005,4:247-250.
- [5] Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Small vessel disease: mechanisms and clinical implications[J]. The Lancet Neurology, 2019, 18(7):684-696.
- [6] 王丽莎,徐艳. 炎症与脑小血管病[J]. 国际脑血管病杂志,2017,25(8):729-733.
- [7] Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease[J]. Clinica Chimica Acta, 2006, 368(1-2):33-47.
- [8] Han JH, Wong KS, Wang YY, et al. Plasma level of sICAM-1 is associated with the extent of white matter lesion among asymptomatic elderly subjects[J]. Clinical Neurology and Neurosurgery, 2009, 111(10):847-851.
- [9] Rouhl RP, Damoiseaux JG, Lodder J, et al. Vascular inflammation in cerebral small vessel disease[J]. Neurobiology of Aging, 2011, 33(8):1800-1806.
- [10] Nepal G, Yadav JK, Kong YH. Association between K469E polymorphism of ICAM-1 gene and susceptibility of ischemic stroke: An updated meta-analysis[J]. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2019, 7(7):E784.
- [11] Li XX, Liu JP, Cheng JQ, et al. Intercellular adhesion molecule-1 gene K469E polymorphism and ischemic stroke: a case-control study in a Chinese population[J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(6):1565-1571.
- [12] Wang D, Zhang FH, Zhao YT, et al. Association of polymorphism in ICAM-1(K469E) and cytology parameters in patients' initial blood test with acute ischemic stroke[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2015, 14(4):15520-15529.
- [13] Shawkatova I, Javor J, Parnicka Z, et al. Analysis of ICAM1 gene polymorphism in Slovak multiple sclerosis patients[J]. Folia Microbiologica, 2017, 62(4):287-293.
- [14] He Q, Lin X, Wang FZ, et al. Associations of a polymorphism in the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) gene and ICAM1 serum levels with migraine in a Chinese Han population[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2014, 345(1-2):148-153.
- [15] 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]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2004, 317(3):729-735.