

·血管介入 Vascular intervention·

细胞间黏附分子-3 多态性和血浆浓度与
国人布-加综合征关系研究

陈肖肖, 马 赫, 祖茂衡, 陆召军

【摘要】 目的 探讨国人布-加综合征(BCS)发病机制与细胞间黏附分子(ICAM)-3 基因单核苷酸多态性(SNP)位点 rs117942573 基因型分布和 ICAM-3 血浆浓度的关系。**方法** 收集纳入 2011 年 1 月至 2015 年 1 月徐州医科大学附属医院确诊为原发性 BCS 患者 300 例(BCS 组),同期纳入体检中心体检的健康人 300 例(对照组)。采用自制问卷对纳入对象进行面对面流行病学调查,收集 BCS 患者病案信息。采用试剂盒提取全血基因组 DNA,竞争性等位基因特异性聚合酶链反应(KASP)检测 rs117942573 基因型。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆中 ICAM-3。**结果** BCS 组、对照组基因型分布差异有统计学意义($\chi^2=4.754, P=0.029$)。BCS 组血浆 ICAM-3 浓度中位值为 875.99 pg/mL(P25=648.87 pg/mL, P75=1 435.22 pg/mL),高于对照组(中位数为 601.81 pg/mL, P25=502.89 pg/mL, P75=888.90 pg/mL),差异有显著统计学意义($Z=-7.342, P<0.001$)。**结论** BCS 组与对照组 ICAM-3 基因型分布及血浆浓度存在显著性差异,提示 rs117942573 可增加 BCS 风险,ICAM-3 表达增加可能与 BCS 肝脏损害有关。

【关键词】 布-加综合征; 病例对照研究; 细胞间黏附分子-3

中图分类号:R445.1 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2019)-04-0319-05

Study on the relationship of intercellular adhesion molecule-3 polymorphism and its plasma concentration with the occurrence of Budd-Chiari syndrome in Chinese CHEN Xiaoxiao, MA He, ZU Maoheng, LU Zhaojun. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu Province 221004, China

Corresponding author: LU Zhaojun, E-mail: l23zj@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of the pathogenesis of Budd-Chiari syndrome (BCS) in Chinese with the genotype distribution of the intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) gene single nucleotide polymorphism (SNP) loci (rs117942573) and the plasma concentration of ICAM-3. **Methods** A total of 300 patients with confirmed primary BCS (BCS group), who were encountered in the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, China, during the period from January 2011 to January 2015, were enrolled in this study. A total of 300 healthy subjects, who made the physical examination at the health screening center during the same period, were collected and used as control group. By using self-made questionnaire, face to face epidemiological investigation of participants was conducted, and the medical record information of BCS patients were collected. The reagent kit was used to extract the genomic DNA from whole blood, and the genotyping of rs117942573 was detected by competitive allele-specific polymerase chain reaction (KASP). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to test plasma ICAM-3 concentration. **Results** The difference in genotype distribution between BCS group and control group was statistically significant ($\chi^2=4.754, P=0.029$). The median plasma ICAM-3 concentration in BCS group was 875.99 pg/mL (P25=648.87 pg/mL, P75=1 435.22 pg/mL), which was higher than 601.81 pg/mL (P25=502.89 pg/mL, P75=888.90 pg/mL) in the control group, the difference between BCS group and the control group was statistically significant ($Z=-7.342, P<0.001$). **Conclusion** Statistically significant differences in

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2019.04.004

基金项目:江苏省徐州市科技创新专项基金(KC15SX002)、江苏省大学生创新计划重点项目(201610313028Z)

作者单位:221004 江苏 徐州医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室(陈肖肖、陆召军);徐州医科大学附属医院病案科(马 赫)、介入科(祖茂衡)

通信作者:陆召军 E-mail: l23zj@163.com

the genotype distribution and the plasma concentration of ICAM-3 exist between BCS group and the control group, which indicate that the rs117942573 may increase the risk of BCS and the increased expression of ICAM-3 may be related to the liver damage in BCS patients. (J Intervent Radiol, 2019, 28: 319-323)

【Key words】 Budd-Chiari syndrome; case-control study; intercellular adhesion molecule-3

布-加综合征(Budd-Chiari syndrome,BCS)是多种原因引起的肝静脉和/或下腔静脉阻塞,引起肝静脉回流障碍,从而导致门静脉高压症和/或下腔静脉高压症^[1]。临床症状复杂多样,以腹痛、腹水、淤血性肝脾肿大、肝功能损害为主,无特异性且易误诊^[2-3]。BCS 在西方国家发病率不足 1/10 万,在中国、印度和尼泊尔等东方国家则较为常见^[4],甚至有学者认为中国拥有最多 BCS 病例(至少有 20 191 例报道)^[5-6]。该病在我国黄河和淮河中下游区域已成为一种较常见疾病,发病率在江苏、山东、河南及安徽省交界地区已高达 10/10 万^[7]。国内研究显示 BCS 是一种具有多基因效应的复杂疾病,全基因组外显子测序筛选出细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule,ICAM)-3 基因第 10340660 位碱基胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)取代。ICAM-3 与炎症反应中细胞黏附、增殖和迁移直接相关^[8],也可以其它方式触发 ICAM-1 黏附途径,这已证实与肝损伤有关。BCS 患者也有不同程度肝损伤。本研究探索 ICAM-3 基因 rs117942573 对 ICAM-3 血浆浓度及 BCS 发生发展的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2011 年 1 月至 2015 年 1 月徐州医科大学附属医院诊断为原发性 BCS 连续患者 300 例。病例纳入标准:①经 BCS 诊断金标准彩色多普勒超声筛查,肝静脉/下腔静脉造影确诊并确认疾病分型;②可采集到较完整病历信息及流行病学调查资料。排除标准:①肿瘤、妊娠、囊肿压迫、手术等所致继发性 BCS;②伴发重度营养不良、冠心病、糖尿病、肾病综合征、肝炎活动期等严重器质性疾病;③采血前服用过阿司匹林和华法林等抗凝药物。根据多普勒超声、CT、MRI 和 DSA 诊断,BCS 肝静脉阻塞型(HV 型)56 例,下腔静脉阻塞型(IVC 型)119 例和混合型(MIX 型)125 例。按照频数匹配原则,选取同期于徐州医科大学附属医院体检中心体检的健康者 300 例,作为对照组。

1.2 数据采集

患者入院当天即进行面对面问卷调查,主要内

容为个人基本信息、生活习惯等;从医院病案信息系统查询现病史、既往史和医院各项化验指标。健康对照组同样进行面对面问卷调查,除现病史外其余内容同病例组问卷。

1.3 检测方法

在上述两组中选取相对较新入院的 BCS 患者 200 例和 200 例健康人,每例抽取 2 mL 静脉血,采用树脂型 TM 基因组提取全血基因组 DNA。基于荧光读数末端,且原则上类似于 TaqMan 探针方法,采用竞争性等位基因特异性聚合酶链反应(kompetitive allele specific PCR,KASP)对 rs117942573 基因型进行分类。用于扩增的引物序列:正向引物 1-GAGCGGCAGGTGGAGCTCTCACCGTG;正向引物 2-GAGCGGCAGGTGGAGCTCTCACCGTA;反向引物-GACGACGGACGCAGCTTCTTCTGCA。KASP 循环包括 95℃预变性 45 s、95℃ 5 s 和 60℃ 30 s 循环参数,进行 40 个循环。

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 RayBiotech 公司)检测血浆中 ICAM-3。所有 ELISA 标准曲线 r^2 均 >0.99 提示试剂盒良好,结果稳定,符合实验要求。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件作统计学分析。定性资料以构成比、率表示;定量资料分析前经正态性和方差齐性检验,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)或中位数与 4 分位数表示。对照组基因型分布作 Hardy-Weinberg 平衡定律(HWE)检验,确保具代表性。定量资料 2 组比较用独立样本 t 检验或 Mann-Whitney U 检验,3 组及 3 组以上比较用方差分析或 Kruskal-Wallis H 检验;定性资料比较用卡方检验或 Fisher 确切概率检验。患病危险用 logistic 回归分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象基线数据比较

BCS 组($n=300$)、对照组($n=300$)平均年龄分别为 (45.7 ± 12.5) 岁、 (45.3 ± 12.3) 岁,均为男 160 例,女 140 例,男女性别比 1.14:1;两组年龄、性别分布差异无统计学意义($P>0.05$)。BCS 组疾病分型 IVC

型 119 例(39.6%),HV 型 56 例(18.8%),MIX 型 125 例(41.6%),不同性别间疾病分型差异无统计学意义($P>0.05$)。将病例年龄划分为 0~20 岁、21~40 岁、41~60 岁、61~80 岁等 4 个年龄段,IVC 型与 MIX 型多见于 41~60 岁年龄段,分别占 56.3%、61.6%,HV 型在 21~60 岁段皆有出现,占 82.1%。总体上,HV 型发病年龄较 IVC 型和 MIX 型小,不同年龄段疾病分型差异有显著统计学意义($P<0.01$)(表 1)。300 例患者分别来自全国 22 个省份,其中江苏、山东、河南、安徽 4 省最多,占全部病例 84.1%(图 1)。患者文化程度以小学及以下为主,为 150 例(50.0%),初中 87 例(29.0%),高中 28 例(9.3%),中专及大专 20 例(6.7%),本科及以上 15 例(5.0%);职业分布以

农民为主,为 187 例(62.4%),另有工人 52 例(17.3%),干部 3 例(1.0%),商人 3 例(1.0%),学生 12 例(4%),其它职业 43 例(14.3%)。

表 1 不同疾病分型患者性别、年龄情况比较

变量参数	IVC 型 (n=119)	HV 型 (n=56)	MIX 型 (n=125)	χ^2 值	P 值
性别				0.544	0.762
男	60	30	70		
女	59	26	55		
年龄					0.001*
0~20 岁	3	6	0		
21~40 岁	33	25	33		
41~60 岁	67	21	77		
61~80 岁	16	4	15		

* 由于>20%单元格理论频数<5,采用 Fisher 确切概率法

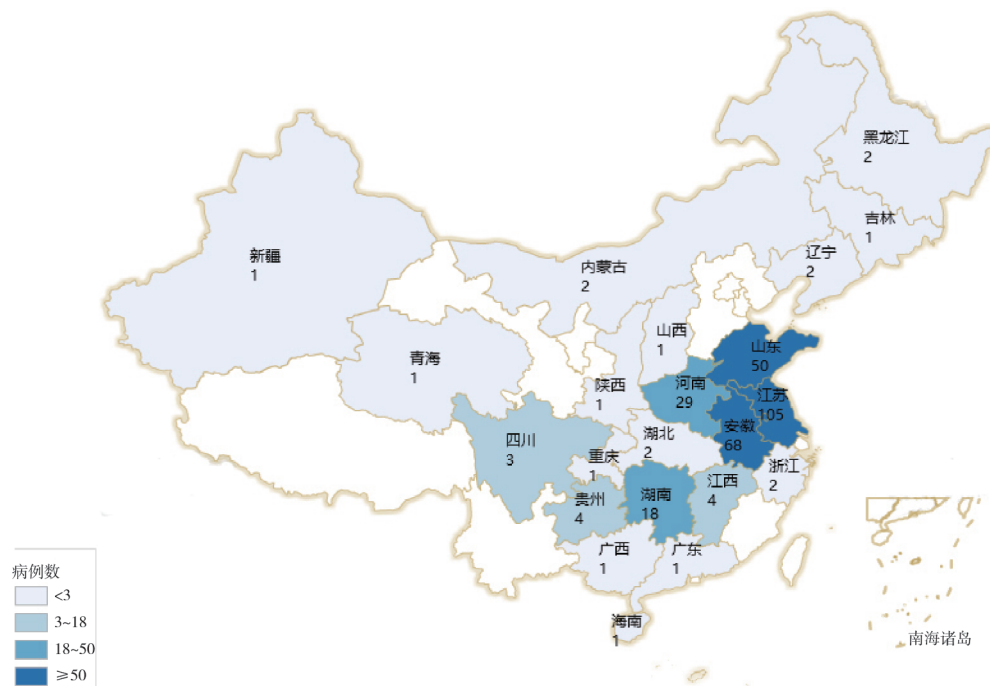


图 1 本研究纳入 BCS 患者省份分布

2.2 两组生活习惯比较

两组饮酒、睡眠质量差和长时间站立比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但吸烟差异有显著统计学意义($P<0.001$)(表 2)。

表 2 病例组与对照组生活习惯情况

参数	BCS 组 (n/N)	对照组 (n/N)	P 值	OR(95%CI)
吸烟	90/234	73/294	<0.001	1.892(1.303~2.748)
饮酒	41/231	55/270	0.457	0.844(0.538~1.322)
睡眠质量差	187/220	240/283	0.952	1.015(0.621~1.661)
长时间站立	83/207	103/280	0.457	1.150(0.795~1.664)

2.3 ICAM-3 rs117942573 基因型分析

BCS 组、对照组 CC 基因型分别有 278 例(92.7%)、290 例(96.7%),CT 基因型分别有 22 例(7.3%)、

10 例(3.3%),均无 TT 基因型,两组基因型分布差异有统计学意义($\chi^2=4.754, P=0.029$)(表 3);采用等位基因模型比较(T 对 C),BCS 组、对照组 C 等位基因携带率分别为 96.3%(578/600)、98.3%(590/600),T 等位基因携带率分别为 3.7%(22/600)、1.7%(10/600),差异有统计学意义($\chi^2=4.623, P=0.032$)。以野生 CC 基因型为参照组,采用 logistic 回归分析 CT 基因型与 BCS 关联,应变量为是否患病,结果显示 OR=2.295,95%CI=1.068~4.934, $P=0.033$;以 C 等位基因为参照组,分析 T 等位基因与 BCS 关联,结果显示 OR=2.200,95%CI=1.051~4.606)。按照阻塞部位不同分成不同疾病亚型,BCS 组 22 个 CT 突变型中 IVC 型 12 个(54.6%),HV 型 3 个(13.6%),

MIX 型 7 个 (31.8%); 3 种亚型患者基因分型比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=2.199, P=0.333$) (表 4)。

表 3 两组 ICAM-3 rs117942573 分布

组别	基因型			χ^2 值	P 值
	CC	CT	TT		
BCS 组/n	278	22	0	0.435	0.510
对照组/n	290	10	0	0.086	0.770

表 4 BCS 组不同疾病亚组间基因型比较

组别	基因型/n		突变率/%	χ^2 值	P 值
	CC	CT			
IVC 型	107	12	10.1	2.199	0.333
HV 型	53	3	5.4		
MIX 型	118	7	5.6		

2.4 血浆 ICAM-3 检测分析

BCS 组 200 例中男 108 例 (54.0%), 女 72 例 (46.0%), 平均年龄 (46.0±12.6) 岁; 对照组 200 名中男 110 名 (55.0%), 女 90 名 (45.0%), 平均年龄 (46.5±9.0) 岁; 两组性别比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。ELISA 检测显示, ICAM-3 血浆浓度呈非正态分布, BCS 组中位数为 875.99 pg/mL ($P_{25}=648.87$ pg/mL, $P_{75}=1\ 435.22$ pg/mL), 高于健康对照组 (中位数为 601.81 pg/mL, $P_{25}=502.89$ pg/mL, $P_{75}=888.90$ pg/mL), 差异有显著统计学意义 ($Z=-7.342, P<0.001$); 不同 BCS 疾病分类中 ICAM-3 血浆浓度差异无统计学意义 ($P>0.05$), CT 基因型 ICAM-3 血浆浓度高于 CC 基因型, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 5)。

表 5 BCS 组不同亚组血浆 ICAM-3 水平检测结果比较

分组	ICAM-3/(pg/mL)	χ^2 值	P 值
疾病分型		1.994	0.369
IVC 型	1 086.57 (608.85~1 804.10)		
HV 型	1 105.06 (729.81~1 702.04)		
MIX 型	875.03 (657.61~1 238.55)		
基因分型		-0.799	0.424
CC 型	924.76 (680.75~1 523.93)		
CT 型	1 197.10 (589.88~3 295.53)		

3 讨论

我国 BCS 病因很复杂, 患者大多为隔膜性阻塞。有几种理论可以解释膜的形成, 主要有机械损伤理论^[9]和血栓形成理论^[10]。这两种理论对隔膜形成原因有不同观点, 均认为血管内皮细胞损伤可能通过一系列炎症反应直接或间接导致隔膜形成, 最终促进 BCS 发生。也有研究表明, BCS 发病与环境中某些微量元素, 如碘、氟等有关。本研究纳入 300 例患者的地区分布与碘、氟等微量元素分布一致。高杰等^[11]研究发现山东菏泽地区隔膜型 BCS 空间分布呈空间聚集性和异质性特征, 该地区 BCS 空间

分布与该地区饮用水碘浓度分布呈正相关^[12]。氟对兔内皮细胞作用的实验提示, 过量氟暴露可导致内皮细胞损伤、胸主动脉硬化和血浆内皮素-1 升高^[13]。高氟致血管内皮损伤实验提示, 高剂量氟能降低抗氧化酶活性, 使一氧化氮代谢紊乱, 细胞因子异常表达, 最终抑制血管内皮细胞生长、结构改变并导致细胞凋亡^[14]。应当加强水源性高碘、高氟地区监测, 改善水源质量, 降低高碘、高氟等因素对血管的危害。

ICAM-3 在肝脏部位表达相对较多, 属免疫球蛋白超家族成员, 主要介导细胞-细胞、细胞-基质间产生黏附作用, 同时参与细胞定向运动、活化、信号转导及增殖, 是凝血、炎症反应、创伤愈合等一系列生理反应的分子基础^[15]。正常情况下, ICAM-3 表达于静息期白细胞及非黏附上皮形成细胞, 在内皮细胞中表达较少^[16]。但有研究表明, 某些肝脏疾病如急性肝衰竭、肝肺综合征患者血管内皮损坏导致细胞表面和血浆 ICAM-3 浓度上升, 在 L 选择素、P 选择素辅助下, 可使白细胞定位于损伤部位, 引发血管新生, 诱导血管内壁修复^[17]。值得注意的是, 这些疾病中内皮细胞上 ICAM-3 表达浓度也大幅上调^[18]。另有研究观察到平滑肌区域动脉血栓发生中血小板表达升高, 引起血小板趋化因子上升, 趋化因子随之导致多种 ICAM 表达升高, 升高的 ICAM 招募炎症细胞并在血管壁大量聚集, 细胞聚集过量会导致新内膜生成并促进血管重塑, 发生功能和结构上改变, 期间导致强烈炎症反应和能量利用异常^[19]。对于同属肝部疾病的 BCS, ICAM-3 可能与其发病存在关联。

关于 rs117942573 突变型 CT 在 BCS 患者中分布的普遍性, 本研究中该基因型突变率为 7.3%, 虽显著高于健康对照组, 但总体上仍然较低。究其原因, 可能是本研究样本量不大所造成, 或该突变基因型本身不足以致病, 但其存在可使某种直接致病因素促发概率增加, 促进 BCS 发生。因此, 后期还应开展更大样本量验证研究, 同时探索其它环境和基因因素与 BCS 的关系, 以发现与 BCS 相关性更为密切的致病因素。

本研究 BCS 组和对照组 rs117942573 基因型分布差异存在统计学意义, 且分析基因型 CT 与 BCS 患病关联时 OR 值为 2.295, 同时比较血浆中 ICAM-3 浓度显示, BCS 组显著高于对照组。以上结果提示, rs117942573 可能是 BCS 的一种危险因素, 携带 CT 突变型人群对 BCS 的易感性增高, 且血浆 ICAM-3

表达上调可能与 BCS 肝脏损害有关,影响 BCS 发生。目前 rs117942573 单核苷酸多态性(SNP)及 ICAM-3 本身影响 BCS 的具体途径尚不清楚,本研究认为可能与白细胞和内皮细胞之间黏附有关。

[参 考 文 献]

- [1] Qi X, Ren W, Liu L, et al. Prevalence of covert duplicate publications in Budd-Chiari syndrome articles in China: a systematic analysis[J]. *Am J Med*, 2013, 126: 633-639.
- [2] 田 浩, 徐 浩, 祖茂衡, 等. MTHFR C677T 多态性、血浆 Hey 及青年肝静脉型布-加综合征的相关性研究[J]. *介入放射学杂志*, 2012, 21: 62-65.
- [3] Shin N, Kim YH, Xu H, et al. redefining Budd-Chiari syndrome: a systematic review[J]. *World J Hepatol*, 2016, 8: 691-702.
- [4] Harmanci O, Kav T, Peynircioglu B, et al. Long-term follow-up study in Budd-Chiari syndrome: single-center experience in 22 years[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2013, 47: 706-712.
- [5] Qi X, Han G, Guo X, et al. Review article: the aetiology of primary Budd-Chiari syndrome-differences between the West and China[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 44: 1152-1167.
- [6] 中国医师协会腔内血管学专业委员会腔静脉阻塞专家委员会. 布-加综合征亚型分型的专家共识[J]. *介入放射学杂志*, 2017, 26: 195-201.
- [7] 祖茂衡. Budd-Chiari 综合征的影像综合诊断与介入治疗[J]. *中国医学计算机成像杂志*, 2002, 8: 108-115.
- [8] Kim YG, Kim MJ, Lim JS, et al. ICAM-3-induced cancer cell proliferation through the PI3K/Akt pathway[J]. *Cancer Lett*, 2006, 239: 103-110.
- [9] 乔师师, 党晓卫, 徐大千, 等. 布-加综合征下腔静脉病变隔膜形态学特征研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29: 1598-1600.
- [10] 韩新强, 祖茂衡. 血管性血友病因子、内皮素-1 和血管内皮生长因子在下腔静脉隔膜型布-加综合征中异常表达的意义[J]. *中华放射学杂志*, 2011, 45: 580-583.
- [11] 高 杰, 肖培瑞, 薛付忠, 等. 山东省菏泽市隔膜型布加综合征的空间聚集性分析[J]. *中华地方病学杂志*, 2013, 32: 632-635.
- [12] 肖培瑞, 蒯新英, 郭成浩, 等. 布-加综合征分布与饮用水碘含量关系探讨[A]. 中国布加综合征与静脉疾病介入治疗大会[C]. 郑州, 2010 年.
- [13] Sun L, Gao Y, Zhang W, et al. Mechanisms underlying endothelin-1 level elevations caused by excessive fluoride exposure[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40: 861-873.
- [14] 边建朝, 蒯新英, 杨晓霞, 等. 氟致体外培养人脐静脉血管内皮细胞损伤的实验观察[J]. *中国地方病学杂志*, 2011, 30: 142-147.
- [15] 李金丽, 翟心慧. 整合素 LFA-1 与其配体 ICAM-1 的生理功能及相关疾病[J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35: 1225-1231.
- [16] Romme Christensen J, Bornsen L, Ratzer R, et al. Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-Helper, Th17 -and activated B-cells and correlates with progression[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e57820.
- [17] Raevens S, Coulon S, Van Steenkiste CA, et al. Role of angiogenic factors/cell adhesion markers in serum of cirrhotic patients with hepatopulmonary syndrome[J]. *Liver Int*, 2015, 35: 1499-1507.
- [18] Wautier JL, Wautier MP. Molecular basis of erythrocyte adhesion to endothelial cells in diseases[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013, 53: 11-21.
- [19] van Buul JD, Mul FP, van der Schoot CE, et al. ICAM-3 activation modulates cell-cell contacts of human bone marrow endothelial cells[J]. *J Vasc Res*, 2004, 41: 28-37.

(收稿日期:2018-06-21)

(本文编辑:边 皓)