

·论著·

甘露糖结合凝集素基因多态性与中国汉族儿童 过敏性紫癜的相关性研究

杨军,李成荣,李永柏,黄惠君,王国兵

(深圳市儿童医院儿科研究所,广东 深圳 518026)

[摘要] 目的 近来有研究认为某些自身免疫性疾病可能与甘露糖结合凝集素(MBL)缺陷有关。MBL基因多态性影响MBL水平。过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)是一种全身性血管炎综合征,其病因被认为可能与免疫损伤有关。该研究探讨MBL基因第54号密码子多态性与中国汉族儿童过敏性紫癜(HSP)的关系。方法 应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性分析,对160例健康中国汉族儿童及104例过敏性紫癜(HSP)患儿的MBL基因多态性进行检测。结果 ①HSP患儿MBL基因GGC/GAC基因型频率明显高于健康对照组(51.9% vs 25.0%) ($P < 0.05$),而GGC/GGC基因型频率显著低于健康对照组(46.2% vs 73.8%) ($P < 0.05$)。HSP患儿GAC等位基因频率明显高于健康对照组(0.279 vs 0.138) ($P < 0.05$),而GGC等位基因频率明显低于健康对照组(0.721 vs 0.862) ($P < 0.05$);GAC等位基因与HSP的发病明显相关($OR = 2.46$, 95% $CI = 1.32 - 4.48$, $P < 0.05$)。②在HSP患儿中,GAC型等位基因携带者中有前驱感染史者明显多于GGC纯合子($P < 0.05$)。结论 HSP发病受遗传背景影响,MBL第54号密码子基因多态性可能是HSP易感性标志。

[中国当代儿科杂志,2003,5(6):523-526]

[关键词] 甘露糖结合凝集素;过敏性紫癜;基因多态性

[中图分类号] R554⁺.6;Q343.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)06-0523-04

Correlation Between Mannose-Binding Lectin Gene Condon 54 Polymorphism and Henoch-Schönlein Purpura in the Han Children

Jun YANG, Cheng-Rong LI, Yong-Bai LI, Hui-Jun HUANG, Guo-Bin WANG. Department of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Email: yymmx @163.net)

Abstract: **Objective** Henoch-Schönlein purpura (HSP) is an autoimmune vasculitis syndrome of unknown etiology. Recently, some research has shown that the polymorphisms of Mannose-binding lectin (MBL) gene can decrease the serum MBL level, and MBL deficiency may be associated with increased susceptibility to infection and autoimmune diseases. This study aims at exploring the correlation between MBL codon 54 polymorphism and HSP in Han nationality children. **Methods** One hundred and four children with HSP and 160 healthy controls were enrolled in this study. The genotypes of MBL gene 54 codon were detected by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The genotype frequency of heterozygote (GGC/GAC) in the HSP group was significantly higher than that in the healthy controls (51.9% vs 25.0%) ($P < 0.05$), whereas that of homozygote (GGC/GGC) in the former was significantly lower than that of the latter (46.2% vs 73.8%) ($P < 0.05$). The allele frequency of GAC was higher in HSP patients than that in controls (0.279 vs 0.138) ($P < 0.05$), whereas that of GGC in HSP patients was lower than that in controls (0.721 vs 0.862) ($P < 0.05$). The variant allele (GAC) was markedly associated with onset of HSP ($OR = 2.46$, 95% $CI = 1.32 - 4.48$; $P < 0.05$). In addition, in the HSP group more patients carrying the variant allele (GAC) had episodes of upper respiratory or gastrointestinal infections before onset of HSP compared with those with GGC homozygote ($P < 0.05$). **Conclusions** MBL gene condon 54 mutation might be related to the pathogenesis of HSP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(6): 523-526]

[收稿日期] 2003-03-14; [修回日期] 2003-06-06

[作者简介] 杨军(1971-),男,硕士,主治医师。主攻方向:小儿肾脏与免疫性疾病。

[通讯作者] 李成荣,广东省深圳市儿童医院,邮编:518026。

Key words: Mannose-binding lectin; Henoch-Schönlein purpura; gene polymorphism

甘露糖结合凝集素 (mannose-binding lectin, MBL) 是一种钙离子依赖型凝集素,在机体免疫防御和免疫监视过程中发挥重要作用。MBL 基因突变可干扰形成稳定性和功能性的蛋白多聚体,导致体内 MBL 血清水平大幅度降低,削弱机体的免疫防御和免疫监视能力,使人体对多种细菌及病毒感染的遗传易感性增加^[1-3]。此外,近年来亦有研究注意到某些自身免疫性疾病可能与 MBL 缺陷有关。过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura, HSP) 是一种以皮肤、关节、胃肠和肾脏损害为主的儿童自身免疫性疾病,其发病机制仍未完全清楚,多种因素可能参与其发病。而 MBL 基因多态性与 HSP 发病间的关联国内外未见文献报道。本研究利用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性分析 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP), 观察 HSP 患儿 MBL 基因第 54 号密码子多态性分布,探讨 MBL 基因多态性与 HSP 之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 过敏性紫癜组 104 例 1999 年至 2002 年在本院就诊的 HSP 患儿,均符合美国风湿病协会制定的诊断标准^[4]。所有患儿均为汉族,年龄 10 月~14 岁,其中男 58 例,女 46 例。对所有 HSP 患儿均调查性别、年龄、起病时上呼吸道或胃肠道前驱感染史,同时检测 C-反应蛋白,血清免疫球蛋白 IgA, IgG, IgM 和补体 C3, C4。

1.1.2 健康对照组 160 例 1999 年至 2002 年在本院体检的中国汉族健康儿童,年龄 10 个月至 14 岁,其中男 89 例,女 71 例。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 应用 PUREGENE DNA 提取试剂盒 (Gentra, 购自晶美公司) 提取各组外周血基因组 DNA,贮存于 -20℃ 备用。

1.2.2 MBL 基因多态性分析 应用 PCR-RFLP 方法检测 MBL 基因第 54 号密码子的多态性,具体方法参见文献^[3]。

1.1.3 结果判断 酶切产物经 2.5% 琼脂糖溴化乙锭电泳分离,紫外灯下判断结果。PCR 扩增产物 329 bp,经 BanI 酶切后,GGC/GGC 型表现为 245 bp 和 84 bp 两个片段,而 GAC/GAC 型表现为 329 bp

单一片段,杂合型 GGC/GAC 则表现为 329 bp, 245 bp 和 84 bp 三个片段。见图 1。

1.3 统计学处理

计算出健康对照组和过敏性紫癜组 MBL 基因第 54 号密码子的各基因型频率和等位基因频率,然后经 Hardy-Weinburg 遗传平衡定律检验,表明各基因型频率已达遗传平衡,具有群体代表性。各组间构成比差异采用 χ^2 检验。各组与 MBL 基因型的关联强度以比值比 (odds ratio, OR) 代表,OR 值 95% 置信区间 (confidence interval, CI) 的计算采用 Woolf 法。

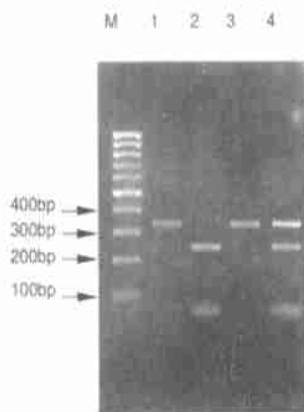


图1 MBL 基因第 54 号密码子 GGC/GAC 多态性

Figure 1 Agarose gel electrophoresis results of PCR-RFLP analysis of MBL gene polymorphism

1. 未经酶切的 PCR 产物; 2. GGC/GGC 基因型; 3. GAC/GAC 基因型; 4. GGC/GAC 基因型; M. 100 bp DNA 分子量标准

2 结果

2.1 MBL 基因多态性在健康儿童和 HSP 患儿中的分布

MBL 基因各基因型在健康对照组中的分布频率与文献报道的香港华人^[5]和丹麦高加索人群^[6]中的基因型频率及等位基因频率接近,差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。HSP 患儿中 MBL 各基因型频率与健康对照组相比,GGC/GAC 基因型频率明显增高,而 GGC/GGC 基因型频率明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。HSP 患者中 GAC 等位基因频率高于健康对照组,而 GGC 等位基因频率低于健康对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。HSP 与 MBL 基因的突变基因型 GAC 显著相关 (OR = 2.46, 95% CI = 1.32 - 4.48, $P < 0.05$)。

表 1 MBL 基因多态性在不同人群中的分布

Table 1 Distribution of MBL gene polymorphism in various populations						例 (%)
组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		GGC/ GGC	GGC/ GAC	GAC/ GAC	GGC	GAC
健康对照组	160	118 (73. 8)	40 (25. 0)	2 (1. 3)	0. 862	0. 138
香港华人 ^[5]	123	95 (77. 2)	28 (22. 8)	0	0. 886	0. 114
高加索人 ^[6]	123	93 (75. 6)	28 (22. 8)	2 (1. 6)	0. 870	0. 130
过敏性紫癜	104	48 (46. 2) ^a	54 (51. 9) ^a	2 (1. 9)	0. 721 ^a	0. 279 ^a

注 :a 与健康对照组比较 $P < 0. 05$

2.2 HSP 患儿临床表现与 MBL 基因多态性的关系
在所观察的临床症候中 ,HSP 患儿 GAC 型等位基因携带者发病前有上呼吸道或胃肠道前驱感染

史者明显多于 GGC 型纯合子 ($P < 0. 05$) ;其它症状和实验室检测资料并未显示与 MBL 基因多态性相关 ($P > 0. 05$) 。见表 2 ,3。

表 2 MBL 基因多态性与过敏性紫癜患儿临床表现的关系

Table 2 Correlation between clinical phenotypes and MBL gene codon-54 polymorphism in children with HSP (%)							
组别	n	男 女	前驱感染	皮肤症状	消化道症状	关节症状	神经症状
GGC/ GGC	48	28/ 20	29. 2	100. 0	50. 0	39. 6	4. 1
GGC/ GAC 或 GAC/ GAC	56	30/ 26	50. 0 ^a	100. 0	53. 6	41. 1	3. 6

注 :a 与 GGC/ GGC 组比较 $P < 0. 05$

表 3 MBL 基因多态性与过敏性紫癜患儿实验室检查的关系

Table 3 Correlation between laboratory findings and MBL gene codon-54 polymorphism in children with HSP ($\bar{x} \pm s$)							
组别	n	IgA (g/ L)	IgG (g/ L)	IgM (g/ L)	C3 (g/ L)	C4 (g/ L)	CRP (mg/ L)
GGC/ GGC	48	0. 77 $\pm$ 0. 35	9. 05 $\pm$ 2. 88	1. 21 $\pm$ 0. 30	1. 30 $\pm$ 0. 37	0. 40 $\pm$ 0. 15	48. 5 $\pm$ 18. 72
GGC/ GAC 或 GAC/ GAC	56	0. 75 $\pm$ 0. 28	8. 66 $\pm$ 3. 07	1. 18 $\pm$ 0. 38	1. 26 $\pm$ 0. 32	0. 41 $\pm$ 0. 17	51. 28 $\pm$ 18. 86

3 讨论

过敏性紫癜 (HSP) 是一种由免疫复合物介导的系统性小血管炎 ,病因至今尚未完全阐明 ,流行病学资料提示其发病可能与感染有关。目前认为补体的激活导致膜攻击复合物在皮肤和肾脏聚集 ,是 HSP 病理损伤的重要因素。HSP 补体激活的途径主要为旁途径已为多数学者所认可。最近的研究表明 ,该病也可通过植物凝集素途径活化补体 ,Endo^[7]在对患儿肾组织的免疫组化及血液分析中发现 ,此途径的补体活性产物包括甘露糖结合凝集素及其相关的丝氨酸蛋白酶、C3b/ 3C、C5b-9、C4 结合蛋白、血浆 C4d、C4 活化片段、C4 调节蛋白 C4-bp 均显著升高 ,提示凝集素途径在该病发病中可能具有重要作用。此外 ,研究还发现不同种族的人群 HSP 的发病率不同 ,处在相同的环境中在相同的感染之

后也并非每个人都会患 HSP ,提示个体遗传因素在 HSP 的发病过程中起重要作用。血管紧张素转换酶基因 ,IL-1ra 基因 ,HLA-DR 基因 ,载脂蛋白 E 基因 ,神经肽 Y1 受体基因及一氧化氮合酶基因的多态性均证实与 HSP 及其器官损伤相关。
MBL 是一种钙离子依赖型凝集素 ,能够识别、结合多种微生物或异体抗原表面糖蛋白糖链末端的甘露糖残基和 (或) N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine ,Glc NAC) ,进一步通过胶原样区域调理吞噬作用清除致病原 ,同时还可以通过凝集素补体途径活化补体 ,在机体免疫防疫和免疫监视中具有重要作用^[8,9]。编码 MBL 的基因位于 10q11. 2-q21 ,含 4 个外显子。迄今发现的 MBL 基因编码区突变均为第 1 个外显子的点突变 ,分别是密码子 52 (CGT $\rightarrow$ TGT) 、密码子 54 (GGC $\rightarrow$ GAC) 及密码子 57 (GGA $\rightarrow$ GAA) ,其中第 54 号密码子 GGC $\rightarrow$ GAC 变异在高加索人和东方人中相当常见 ,发生频率高

达0.11~0.17。该基因突变使得 MBL 肽链胶原样结构域 Gly-X-Y 重复序列中 N 端第 6 个序列的 Gly 为 Asp 所替代,胶原样结构被中断,从而不能形成完整性、功能性的 MBL 蛋白。有文献报道,变异型杂合子(GGC/GAC)血清 MBL 水平仅为野生型纯合子(GGC/GGC)的 1/8,而变异型纯合子(GAC/GAC)在人群中相当少见,其血清 MBL 水平接近于零^[5,6]。根据 MBL 在先天性抗感染以及清除循环免疫复合物中的作用,本文选择对 MBL 产生有确定影响的基因第 54 号密码子,探讨其多态性与 HSP 发病的关系。

本研究结果显示:HSP 组 MBL 突变基因型频率显著高于健康对照组,MBL 突变型等位基因(GAC)与 HSP 显著相关,HSP 患儿 GAC 型等位基因携带者发病前有上呼吸道或胃肠道前驱感染史者均显著高于 GGC 型纯合子。GAC 型等位基因携带者患儿可能因其血清 MBL 基础水平减低而削弱机体免疫防御功能,导致机体对多种病原微生物易感,致病原侵入血循环,刺激机体产生多种特异性抗体,形成大量循环免疫复合物沉积于血管壁及肾小球系膜区而致病。此外,人类免疫球蛋白均为糖蛋白,IgA、IgM、IgG 均不同程度的含有以甘露糖残基/Glc NAC 为末端糖基的糖链,因此都能为 MBL 识别和结合。当免疫球蛋白与抗原形成循环免疫复合物时,MBL 与 C1q 类似,可能与循环免疫复合物上多个免疫球蛋白糖链末端的甘露糖残基/Glc NAC 形成多价稳定结合,进而激活 MBL 胶原样尾部的调理作用,或活化 MBL 相关的丝氨酸蛋白酶(MBL associated serine proteinase, MASP)途径,通过调理吞噬或免疫粘附作用清除循环免疫复合物。本研究中 HSP 患儿 MBL 突变基因型 GAC 的发生频率明显增高,推测可能因此所致的小儿血清 MBL 水平降低,经 MASP 途径的循环免疫复合物清除减少,导致循环免疫复合物广泛沉积于小血管壁及肾小球系膜区,从而加重免疫复合物性血管炎的发生和发展。最近亦有研究发现,系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎患者血清 MBL 水平及 MBL 基因 GGC 等位基因频率均显著低于正常人群,推测其发病可能与 MBL 缺陷后循环免疫复合物清除障碍,大量沉积于组织有关^[10,11]。本研究结果表明,机体先天性免疫

防御机制可能影响 HSP 的发病,MBL 基因多态性可能是 HSP 易感性标志之一。

[参 考 文 献]

- [1] Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children [J]. *Lancet*, 1991, 337(8757): 1569 - 1570.
- [2] Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene [J]. *Hum Mol Genet*, 1992, 1(9): 709 - 715.
- [3] Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannann-binding protein [J]. *Immunogenetics*, 1994, 40(1): 37 - 44.
- [4] Mills JA, Michel BA, Bloch DA, Calabrese LH, Hunder GG, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schonlein purpura [J]. *Arthritis Rheum*, 1990, 33(8): 1114 - 1121.
- [5] Lau YL, Lau CS, Chan SY, Karlberg J, Turner MW. Mannose-binding protein in chinese patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(4): 706 - 708.
- [6] Garred P, Thiel S, Madsen HO, Ryder LP, Jensenius JC, Svejgaard A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannann binding protein associated with low serum concentration [J]. *Clin Exp Immunol*, 1992, 90(3): 517 - 521.
- [7] Endo M, Ohi H, Ohasawa I, Fujita T, Matsushita M. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schonlein purpura nephritis [J]. *Am J kidney Dis*, 2000, 35(3): 401 - 407.
- [8] Kurata H, Sannoh T, Kozntsumi Y, Yokota Y, Kawasaki T. Structure and function of mannann-binding proteins isolated from human liver and serum [J]. *J Biochem*, 1994, 115(6): 1148 - 1154.
- [9] Matsushita M. The lectin pathway of the complement system [J]. *Microbiol Immunol*, 1996, 40(12): 887 - 893.
- [10] Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein [J]. *Nat Med*, 1995, 1(3): 237 - 243.
- [11] Garred P, Madsen HO, Halberg P, Petersen J, Kronborg G, Svejgaard A, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(10): 2145 - 2152.

(本文编辑:谢岷)