

论著·临床研究

TARC/CCL17 基因多态性与川崎病及其临床特征的相关性分析

刘凡 丁艳 尹薇

(武汉市儿童医院, 湖北 武汉 430016)

[摘要] **目的** 探讨我国中部汉族人群中 TARC/CCL17 基因的 SNP 位点 (rs223895、rs223899) 多态性与川崎病 (Kawasaki disease, KD) 及其临床特点的关系。**方法** 采用病例对照研究方法, 选取 218 例典型 KD 患儿和 248 例体检正常儿童作为研究对象。利用 PCR-RFLP 的方法测定 SNP 位点多态性分布; 评估 TARC/CCL17 基因多态性与 KD 临床特点的相关性。**结果** KD 患儿 SNP 位点 (rs223895) 的基因型 (CC、CT、TT) 频率及等位基因频率与正常对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 C 等位基因为风险因子 ($OR = 1.379$)。SNP 位点 (rs223899) 的基因型频率及等位基因频率与对照组相比差异无统计学意义。SNP 位点 (rs223895) CC 基因型患儿的血红蛋白以及白蛋白水平低于其他基因型 (CT+TT) 的患儿 ($P < 0.05$); 而血沉高于其他基因型患儿 ($P < 0.05$)。**结论** TARC/CCL17 基因 SNP 位点 (rs223895) 与 KD 的易感性相关, C 等位基因为风险因子; 且该 SNP 位点多态性可能影响患者血红蛋白、白蛋白及血沉水平。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(7): 668-671]

[关键词] 川崎病; TARC/CCL17 基因; 易感性; 临床特征; 儿童

Association of single nucleotide polymorphisms in TARC/CCL17 gene with Kawasaki disease and its clinical characteristics

LIU Fan, DING Yan, YIN Wei. Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, China (Ding Y, Email: dingyanmx@163.com)

Abstract: Objective To study the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs, rs223895 and rs223899) in TARC/CCL17 gene with Kawasaki disease (KD) and its clinical characteristics in Han children from Central China. **Methods** A case-control study was performed on 218 children with KD and 248 normal control children. The genotypes of SNPs (rs223895 and rs223899) in TARC/CCL17 gene were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. The association between the SNPs in TARC/CCL17 gene and the clinical characteristics of KD was assessed. **Results** There were significant differences in the genotype (CC, CT, TT) and allele frequencies of SNP rs223895 between children with KD and controls ($P < 0.05$), and C allele was a risk factor ($OR = 1.397$). However, no significant differences were found between the two groups in the genotype and allele frequencies of SNP rs223899. Compared with those with other genotypes (CT+TT) of SNP rs223895, patients with CC genotype had significantly lower hemoglobin (Hb) and albumin (Alb) levels ($P < 0.05$) and a significantly higher erythrocyte sedimentation rate (ESR) ($P < 0.05$). **Conclusions** The SNP rs223895 in TARC/CCL17 gene is associated with the susceptibility to KD, and C allele is a risk factor. Moreover, SNP rs223895 may influence the levels of Hb, Alb, and ESR.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(7): 668-671]

Key words: Kawasaki disease; TARC/CCL17 gene; Susceptibility; Clinical characteristics; Child

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 又称为皮肤黏膜淋巴结综合征, 是一种病因不明, 以急性发热、皮肤黏膜病损和淋巴结肿大为临床表现的全身性

血管炎综合征, 好发于 5 岁以下的幼儿^[1]。该疾病是一种病因复杂的多因素疾病, 而家族聚集现象提示遗传因素在疾病的发生发展过程中起着重要

[收稿日期] 2014-11-12; [接受日期] 2015-01-10

[作者简介] 刘凡, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 丁艳, 女, 主任医师。

作用^[2]。TARC/CCL17是Th2(T helper 2)细胞的趋化因子,且研究认为TARC/CCL17是Th2相关的过敏性疾病易感性的候选基因^[3]。Lee等^[4]研究发现在我国台湾人群中该基因多态性可能与KD的易感性相关。本研究以我国中部地区汉族KD患儿为研究对象,探讨TARC/CCL17基因的标签SNP(Tag SNP)位点rs223895与rs223899的多态性与KD易感性及其临床特点的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例组选取2011年6月至2014年3月在我院感染免疫科住院的KD患儿218例,均是典型KD患儿;248名同时体检正常儿童作为对照组。KD组的纳入标准:(1)符合日本川崎病研究委员会2002年修订的川崎病诊断标准^[2],且均是典型KD患儿;(2)排除猩红热、葡萄球菌烫伤样皮肤综合征、药物过敏及幼年性类风湿性疾病等疾病。

病例组纳入的218例患儿中,男148例,女70例,平均年龄 3.4 ± 2.5 岁(范围4个月~8岁7个月);其中经超声心动图检查,冠状动脉存在异常的患儿48例。对照组248例中,男161例,女87例,平均年龄 3.3 ± 2.7 岁(范围6个月~9岁)。病例组和对照组之间年龄和性别比例的差异无统计学意义(P 分别为0.218、0.458)。两组儿童均来自湖北及其周边地区。

本研究得到两组儿童家属知情同意以及我院医学伦理委员会的批准。

1.2 TARC/CCL17基因多态性分析

抽取KD患儿及正常对照儿童静脉血2 mL,利用酚氯仿抽提以及乙醇沉淀的方法提取基因组DNA。以DNA为模版分别扩增含有SNP位点的DNA片段。设计的引物分

别为F1:GTAATGATTCCAGAGCCTCTGC,R1:CCTTTCATTCATGACCAAAGTGC;F2:CCTATGGGATGGATGCCAAGGGA,R2:GAGGAAGTGGCAGTGAGGCAG。PCR总反应体系为20 μ L,含有10倍PCR反应缓冲液2.0 μ L,10 mM dNTP混合液1 μ L,10 μ M引物各1 μ L,TAKARA公司Taq酶1 U。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min预变性;94 $^{\circ}$ C 30 s变性,56 $^{\circ}$ C 30 s退火,72 $^{\circ}$ C 30 s延伸,共34个循环。分别取6 μ L扩增的产物利用内切酶Eco53kI以及AvaII进行酶切电泳分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析。利用Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验病例组及对照组是否具有群体代表性。基因型频率分布和等位基因频率分布用频数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TARC/CCL17基因SNP位点基因型的确定及分布

Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验示两组均具有群体代表性。两个SNP位点多态性确定如图1所示,其中SNP位点(rs223895)的3种基因型为CC、CT和TT;rs223899的3种基因型为CC、CA和AA。统计结果显示病例组中SNP位点(rs223895)的3种基因型分布与对照相比差异具有统计意义($P=0.031$),且在隐性模式下(CC vs CT+TT)相关($P=0.019$),显性模式(CC+CT vs TT)不相关($P=0.062$),且C等位基因与KD易感性相关($P=0.012$),说明该位点与KD的易感性相关;而两组间SNP位点(rs223899)基因型分布及等位基因频率差异均无统计学意义(表1)。

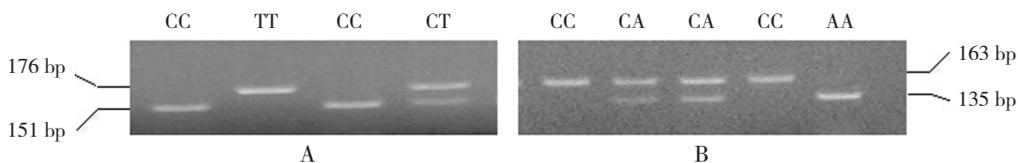


图1 两个SNP位点的基因型确定 A: SNP位点(rs223895)的3种基因型为CC、CT和TT; B: SNP位点(rs223899)位点的3种基因型为CC、CA和AA。

表1 病例组和对照组两个 SNP 位点的基因型分布的比较 [n (%)]

组别	例数	rs223895				rs223899			
		CC	CT	TT	C	CC	AC	AA	C
对照组	248	65(26.2)	138(55.6)	45(18.2)	268(54.1)	101(40.7)	113(45.6)	34(13.7)	315(63.5)
病例组	218	79(36.2)	113(51.8)	26(12.0)	271(62.2)	104(47.7)	92(42.2)	22(10.1)	300(68.8)
χ^2 值			7.033		6.279		2.847		2.903
OR(95%CI)		2.104 (1.173~3.771)	1.417 (0.823~2.439)	1.000	1.397 (1.075~1.816)	1.591 (0.871~2.906)	1.258 (0.689~2.299)	1.000	1.268 (0.965~1.665)
P 值			0.031		0.012		0.241		0.096

2.2 TARC/CCL17 基因多态性与 KD 临床特点的相关性

病例组纳入的 KD 患儿在初诊时多有结膜充血 (188 例, 86.2%)、皮疹 (138 例, 63.3%)、口腔黏膜病变 (185 例, 84.9%)、淋巴结肿大 (161 例, 73.9%) 等症状, 部分患儿有冠状动脉损伤的特征 (48 例, 21.9%), 且多数患儿存在白细胞计数异常 (156 例, 71.6%)、血小板升高 (178 例, 81.6%)、血沉加快 (195 例, 89.4%)、C 反应蛋白水平升高 (215 例, 98.6%) 以及血红蛋白降低

(123 例, 56.4%) 和白蛋白水平降低 (153 例, 70.2%) 的现象。统计结果显示, TARC/CCL17 基因的 SNP 位点 (rs223895) CC 基因型的 KD 患儿血红蛋白以及白蛋白水平低于其他基因型的 KD 患儿, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与其他基因型患儿相比, CC 基因型的患儿血沉水平较高 ($P < 0.05$), 见表 2; 但该多态性与结膜充血、淋巴结肿大、口腔黏膜病变、冠状动脉损伤等指标不具有相关性 ($P > 0.05$) (表 3)。

表2 TARC/CCL17 基因 SNP rs223895 位点多态性与 KD 患儿实验室指标的相关性 ($\bar{x} \pm s$)

基因型分组	例数	白细胞 ($\times 10^9/L$)	血红蛋白 (g/L)	血小板 ($\times 10^9/L$)	血沉 (mm/L)	C 反应蛋白 (mg/L)	白蛋白 (g/L)
CC	79	15 ± 6	97 ± 15	507 ± 173	71 ± 22	79 ± 46	35 ± 3
CT+TT	139	14 ± 6	105 ± 9	449 ± 135	59 ± 28	74 ± 39	37 ± 4
t 值		0.856	2.158	1.578	2.251	0.382	2.167
P 值		0.406	0.045	0.137	0.038	0.709	0.044

表3 TARC/CCL17 基因 SNP rs223895 位点多态性与 KD 患儿临床表现的相关性 [n (%)]

基因型分组	例数	结膜充血	皮疹	口腔黏膜病变	淋巴结肿大	冠状动脉损伤
CC	79	70(88.6)	52(65.8)	63(79.7)	62(78.5)	17(21.5)
CT+TT	139	118(84.9)	86(61.9)	122(87.8)	99(71.2)	31(22.3)
t 值		0.586	0.339	2.524	1.374	0.018
P 值		0.444	0.561	0.112	0.241	0.893

3 讨论

TARC/CCL17 基因位于 16 号染色体 q13 区域, 含有 4 个外显子, 编码趋化因子蛋白, 在 T 细胞的发育成熟过程中起着重要作用。TARC/CCL17 是 CC 趋化因子组中的重要组成之一, 是 CC 趋化因子 4 (CCR4) 受体的一个配体基因^[5], 而 CCR4 选

择性地在 Th2 细胞中表达; TARC/CCL17 可在细胞中结合到 CCR4 和 CCR8 受体上行使功能^[6]。TARC/CCL17 基因被认为是 Th2 细胞相关的过敏性反应疾病的候选基因, 与特应性皮炎以及支气管哮喘的病理过程密切相关, 在特应性皮炎中 TARC/CCL17 的水平明显高于健康对照组^[7]。研究表明在 KD 患者中存在 Th1/Th2 比例异常的现象^[8];

且有证据表明KD患者中发生特应性皮炎以及支气管哮喘的比例比正常对照组高9倍^[9]。在动物实验中发现Th2细胞产生的IL-4可通过IL-4/STAT6通路调控TARC/CCL17的表达水平^[10]。

在台湾人群中研究发现,两个SNP位点(rs223895和rs223899)均与KD的易感性相关,C和A等位基因分别为危险因素^[4]。本研究发现SNP位点rs223895的基因多态性与KD的易感性相关,而rs223899与KD不相关。导致这种结果不同的可能原因是地域及人群的差异。本研究通过对KD患儿的生化指标分析发现,rs223895位点的多态性与一些生化指标相关,其中CC基因型患儿血沉明显高于CT和TT型的患儿;而CC基因型患儿血红蛋白以及白蛋白含量低于其他基因型患儿,并且有研究表明患儿血红蛋白及白蛋白低是KD以及KD并发冠状动脉损伤的危险因素^[11],提示CC基因型为KD易感性的风险因子。但本研究结果显示该多态性与冠状动脉损伤不存在相关性,可能与病例数较少有关,需要进一步的验证。

总之,本研究发现SNP位点(rs223895)的多态性与KD的易感性相关,C等位基因为风险因子;且在临床检验中发现CC基因型的患儿的血红蛋白、白蛋白以及血沉水平与其他基因型患儿存在差异。该结果对更好地认识KD提供了一定的帮助,但由于本研究存在冠状动脉损伤病例数较少的缺陷,因此应在收集更大样本量以后再进一步统计分析该基因多态性与冠状动脉损伤的相关性;此外,今后应测定患儿血清中CCL17的水平,进一步探讨该基因不同的基因型与血清中CCL17因子的关系。

[参 考 文 献]

[1] Bayers S, Shulman ST, Paller AS. Kawasaki disease: part I.

Diagnosis, clinical features, and pathogenesis[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2013, 69(4): 1-11.

[2] 彭茜, 陈昌辉, 吴青, 等. CAPS3 基因单核苷酸多态性与中国儿童川崎病的相关性研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(2): 180-184.

[3] Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, et al. Identification of thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) as a potential marker for early indication of disease and prediction of disease activity in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) [J]. *J Dermatol Sci*, 2013, 69(1): 38-43.

[4] Lee C, Huang YH, Hsu Y, et al. TARC/CCL17 gene polymorphisms and expression associated with susceptibility and coronary artery aneurysm formation in Kawasaki disease[J]. *Pediatr Res*, 2013, 74(5): 545-551.

[5] Moriyama M, Hayashida JN, Yoyoshima T, et al. Cytokine/chemokine profiles contribute to understanding the pathogenesis and diagnosis of primary Sjögren's syndrome[J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 169(1): 17-26.

[6] Imai T, Nagira M, Takagi S, et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine[J]. *Int Immunol*, 1999, 11(1): 81-88.

[7] Kataoka Y. Thymus and activation-regulated chemokine as a clinical biomarker in atopic dermatitis[J]. *J Dermatol*, 2014, 41(3): 221-229.

[8] Kuo HC, Wang CL, Liang CD, et al. Association of lower eosinophil-related T helper (Th2) cytokines with coronary artery lesions in Kawasaki disease[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009, 20(3): 266-272.

[9] Webster RJ, Carter KW, Warrington NM, et al. Hospitalisation with infection, asthma and allergy in Kawasaki disease patients and their families: genealogical analysis using linked population data[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e28004.

[10] Maier E, Duschi A, Horejs-Hoeck J, et al. STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(11): 2827-2833.

[11] Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, et al. Prediction of intravenous immunoglobulin unresponsiveness in patients with Kawasaki disease[J]. *Circulation*, 2006, 113(22): 2606-2612.

(本文编辑: 邓芳明)