

论著 · 临床研究

川崎病冠状动脉损伤与纤维蛋白原 B β -148C/T 基因多态性的关系

高捷¹ 王红阳¹ 吴乃君¹ 张树华²

(华北煤炭医学院附属医院 1. 儿科; 2. 超声诊断科, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的 探讨纤维蛋白原 B β -148C/T 基因多态性与川崎病冠状动脉损伤的关系。方法 收集 36 例川崎病患者与 49 例健康对照儿童的空腹静脉血, 用辅助血浆纤维蛋白原活性测定系统测定纤维蛋白原水平和纤维蛋白原的分子功能; 采用多聚酶链反应, 限制性酶切方法对纤维蛋白原 B β -148C/T 位点的基因型进行测定。结果 川崎病儿童冠状动脉扩张组血浆纤维蛋白原水平明显高于非扩张组及健康对照组 ($P < 0.01$); 川崎病儿童冠状动脉扩张组 T 等位基因频率明显高于健康对照组及非扩张组 ($P < 0.01$)。结论 纤维蛋白原 β -148 基因多态性及血浆纤维蛋白原水平与川崎病患者儿冠状动脉扩张有相关性。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(7): 518-520]

[关键词] 纤维蛋白原; 基因多态性; 川崎病; 儿童

[中图分类号] R72 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)07-0518-03

Relationship between fibrinogen B β -148C/T polymorphism and coronary artery lesions in children with Kawasaki disease

GAO Jie, WANG Hong-Yang, WU Nai-Jun, ZHANG Shu-Hua. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000, China (Email: gaojiecong1997@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the possible relationship between coronary artery lesions and fibrinogen B β -148 C/T polymorphism in children with Kawasaki disease. **Methods** Fast blood samples were taken from 36 children with Kawasaki disease (21 had coronary artery lesions) and 49 age- and gender-matched healthy children (control group). Plasma levels and molecular reactivity of fibrinogen were measured with Assist Plasma Fibrinogen Activity Assay System. Polymerize chain reaction and restriction enzyme digestion were used to detect the genotypes of fibrinogen B β -148C/T gene polymorphism. **Results** The plasma fibrinogen levels in patients with coronary artery lesions were significantly higher than those in patients without coronary artery lesions and in the control group. T allele frequency in patients with Kawasaki disease was significantly higher than that in the control group. The patients with coronary artery lesions had more increased T allele frequency compared with the patients without coronary artery lesions. **Conclusions** Plasma fibrinogen levels and fibrinogen B β -148C/T polymorphism are associated with coronary artery lesions in children with Kawasaki disease.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (7): 518-520]

Key words: Fibrinogen; Gene polymorphism; Kawasaki disease; Child

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 又名皮肤粘膜淋巴结综合征, 是儿童常见的原因不明的自身免疫性血管炎综合征, 主要损害小、中动脉, 特别是冠状动脉, 目前已成为儿童后天性心脏病的主要病因, 有发生心肌梗死和猝死可能^[1]。川崎病急性期高凝状态是造成血管炎症的主要因素。纤维蛋白原 (fibrinogen) 的水平与分子功能是反映血液高凝状态的一个重要指标, 纤维蛋白原 B β -148C/T 基因多态性被认为是导致个体间血浆纤维蛋白原水平差异的遗传决定性因素^[2]。因此对 KD 患儿进行纤维蛋白原及其基因多态性检测, 探讨其与 KD 及并发冠状动脉损伤 (coronary artery lesions, CAL) 的关系, 及时采取临床干预, 对降低 KD 并发 CAL 发生率和死亡率是有益的。

[收稿日期] 2009-09-24; [修回日期] 2009-12-16
[基金项目] 2007 唐山市新药与临床医学研究计划项目 (课题编号: 07130206A-4-4)。
[作者简介] 高捷, 女, 硕士研究生, 副主任医师。

1 对象与方法

1.1 研究对象

来源于我院儿科2005年5月至2009年3月初发的KD住院患儿,共36例,男21例,女15例;年龄为6个月至5岁,平均年龄为 2.93 ± 1.63 岁;分冠状动脉扩张组21人和冠状动脉正常组15人。均符合KD诊断标准及冠状动脉扩张的诊断标准^[3-4]。同期普查健康儿童作为正常对照组(家属知情同意),年龄、性别与病例组基本配对,共49例,男30例,女19例,平均年龄 3.05 ± 1.52 岁。

1.2 研究方法

1.2.1 血样的采集 健康对照组及病例组(尚未输注丙种球蛋白及口服抗凝药物治疗)空腹抽取静脉血5 mL,平均分成2份,一份用于检测纤维蛋白原水平及分子功能(FM PV/ODmax),一份用于检测纤维蛋白原B β -148C/T基因型。

1.2.2 纤维蛋白原水平及分子功能(FMPV/ODmax)测定 测定方法参照文献^[5]。吸取蕲蛇酶(CVVA)试剂(福建汇天生物药业有限公司)1 mL与Tris-Hcl缓冲液200 mL混合成1/200 CVVA水平的反应混合液,置于37℃水浴箱中备用,用加样器分别移取950 μ L反应混合液及50 μ L血浆在0.5 cm光路比色杯中充分混合,立即置入722型分光光度计色室中(成都广普科学仪器有限公司),340 nm处检测纤维蛋白单体聚合反应过程,通过微机分析系统(西安第四军医大学血液研究室)给出以下参数:纤维蛋白原水平、纤维蛋白原单体聚合速度(fibrin monomer polymerize velocity FMPV)、最大光密度值(oculus dehter ODmax)。FMPV/ODmax为纤维蛋白单体的聚合速率与最大光密度之比是反映纤维蛋白原分子功能的参数。

1.2.3 DNA的提取 空腹静脉血2.5 mL,加2% EDTA 0.5 mL,低渗法分离白细胞。然后用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,乙醇沉淀,提取DNA。

1.2.4 基因多态性分析 PCR扩增目的DNA:引物序列根据NCBI GenBank人类纤维蛋白原序列基因编码GeneID:373926 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)合成(北京塞百盛生物技术有限公司),采用PCR技术对纤维蛋白原基因启动子区B β -148C/T位点的目的片段进行扩增。上游引物:5'-CCTA-ACTTCCCATCATTTTGTG-3',下游引物:5'-ATG-GTTTTTAAGTTTGTGGAAGC-3'。总反应体积为25 μ L:无菌去离子水15.4 μ L,10 $\times$ 反应缓冲液(不

含MgCl₂)2.5 μ L,MgCl₂溶液(2.5 mM)1.5 μ L,4 $\times$ dNTP混合物2 μ L,上游引物和下游引物各2 μ L,Taq酶(华美生物工程公司)0.6 μ L,模板DNA 1 μ L。PCR循环条件:94℃ 4 min;94℃ 1 min;58℃ 1 min;72℃ 1.5 min;循环30次;72℃ 5 min。

1.2.5 限制性内切酶酶切 总体积20 μ L,无菌去离子水5.8 μ L,Buffer G反应缓冲液2 μ L,BSA(10 μ g/ μ L)(美国Promega公司)2 μ L,Hind III内切酶(华美生物工程公司)8 IU,37℃水浴12 h过夜。

1.2.6 纤维蛋白原B β -148C/T基因型的判定 DNA样本经限制性内切酶酶切后以2%琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭染色,在紫外灯下观察结果。

1.3 统计学方法

所得数据Microsoft Excel建数据库,SPSS 13.0软件进行数据分析,三组计量资料纤维蛋白原水平及分子功能的比较采用F检验,计数资料纤维蛋白原基因型及等位基因频率采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纤维蛋白原B β -148 C/T基因型

电泳显示纤维蛋白原B β -148 C/T位点的TT基因型在300 bp处出现一条带;CC基因型在202 bp、98 bp处出现两条带;CT基因型分别在300 bp、202 bp和98 bp处出现三条带,为杂合子。见图1。

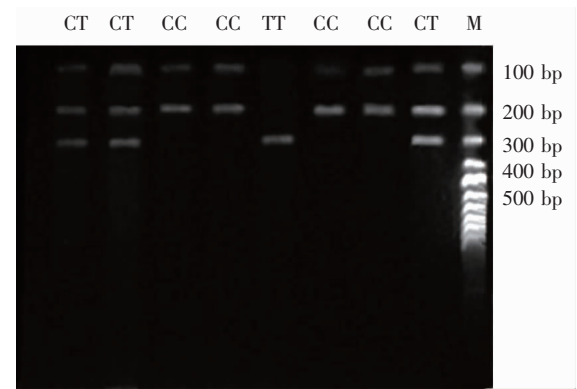


图1 纤维蛋白原B β -148 HindIII酶切产物电泳图

2.2 基因型频率及等位基因频率

川崎病组(包括冠状动脉扩张组与非扩张组)突变基因型(TT型、CT型)频率及T等位基因频率高于对照组($P < 0.01$),并且冠状动脉扩张组高于非扩张组($P < 0.01$)。见表1。

表 1 川崎病组与对照组纤维蛋白原 Bβ-148 基因型频率及等位基因频率的比较 [例(%)]						
组别	例数	Bβ-148 基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	49	38(77)	9(18)	2(5)	85(87)	13(13)
KD 组						
无冠脉扩张	15	9(60)	3(20)	3(20)	21(70)	9(30)
并冠脉扩张	21	8(38)	5(24)	8(38)	21(50)	21(50)
χ ² 值		20.85			21.42	
P 值		<0.01			<0.01	

2.3 对照组与川崎病组纤维蛋白原及功能比较

川崎病冠状动脉扩张组患儿血浆纤维蛋白原浓度明显高于非扩张组及对照组($P<0.01$)。FMPV/ODmax 是反映纤维蛋白原分子功能的参数。从表中可见川崎病冠状动脉扩张组患儿 FMPV/ODmax 高于非扩张组及对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 川崎病组与对照组纤维蛋白原及功能比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	纤维蛋白原(g/L)	FMPV/ODmax
对照组	49	3.73 ± 0.72	3.81 ± 0.56
KD 组			
无冠脉扩张	15	3.74 ± 0.54	3.87 ± 0.31
并冠脉扩张	21	5.51 ± 0.98 ^a	3.99 ± 0.50
F 值		12.66	0.79
P 值		<0.01	>0.05

a: 与对照组及无冠脉扩张 KD 组比较, $P<0.01$

2.4 纤维蛋白原 Bβ-148 不同基因型的纤维蛋白原含量及分子功能的比较

纤维蛋白原突变基因型 TT 基因型及 CT 型纤维蛋白原浓度明显高于 CC 基因型组($P<0.01$),纤维蛋白原分子功能 FMPV/ODmax 在 3 组基因型中差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 纤维蛋白原 Bβ-148 不同基因型的纤维蛋白原含量及分子功能的比较 ($\bar{x} \pm s$)			
基因型	例数	纤维蛋白原(g/L)	FMPV/ODmax
CC	55	3.73 ± 0.80	3.74 ± 0.43
CT	17	3.78 ± 0.57 ^a	3.87 ± 0.57
TT	13	4.96 ± 1.20 ^a	3.92 ± 0.38
F 值		11.72	0.61
P 值		<0.01	>0.05

a: 与 CC 基因型组比较, $P<0.01$

3 讨论

KD 是一种迄今原因不明的急性发热出疹性疾病,其主要病理改变是全身性血管炎。有研究表明,KD 的冠脉损伤后遗症是儿童青少年心肌梗死和猝

死发生的重要原因^[6]。纤维蛋白原是由肝细胞合成和分泌的重要凝血因子,血浆纤维蛋白原水平增加可引起血液流变学改变,增加血液粘滞度,促进血小板聚集和血凝块的形成。纤维蛋白原通过转变为纤维蛋白,刺激血管平滑肌细胞增生,促进炎症介质的释放^[7]。有文献报道成人纤维蛋白原 Bβ-148C/T 基因多态性与成人冠脉疾病密切相关,该基因位点中 T 等位基因与纤维蛋白原水平及分子功能密切相关^[8]。冠状动脉损伤是 KD 的最主要的严重并发症,对于纤维蛋白原 Bβ-148C/T 基因多态性与川崎病冠脉损伤的关系目前国内外研究不多。本研究观察了川崎病冠脉损伤患儿、非冠脉损伤患儿与正常儿童纤维蛋白原 Bβ-148C/T 基因型和等位基因频率,以及纤维蛋白原水平及分子功能变化,结果发现:川崎病冠脉损伤患儿 TT 基因型及 T 等位基因频率显著高于正常儿童;川崎病冠脉损伤组纤维蛋白原水平明显高于非冠脉损伤组及正常对照组,并且纤维蛋白原突变基因型 TT 基因型及 CT 型纤维蛋白原浓度明显高于 CC 基因型组。因此推测纤维蛋白原 Bβ-148C/T 基因多态性可能与川崎病的发病有相关性,其中等位基因 T 可能是川崎病冠状动脉损伤的遗传易感基因;携带等位基因 T 的个体可能通过影响纤维蛋白原的水平而不是其分子功能增加了冠脉损伤的风险。因此在临床上检测纤维蛋白原的水平并测定其 Bβ-148C/T 基因型对于早期预测川崎病患儿是否发生冠状动脉损伤的风险有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] 杨冰,周启昌,范平,章鸣,周杏君. 彩色多普勒超声心动图检测小儿川崎病冠状动脉病变 [J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(3): 25-26.

[2] Kuo HC, Lin IC, Sheen JM, Wang CL, Wang L, Yang KD, et al. A unique plasma proteomic profiling with imbalanced fibrinogen cascade in patients with Kawasaki disease [J]. Pediatr Allergy Immunol. 2009, 20(7):699-707.

[3] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学 [M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1698-7051.

[4] 王新房. 超声心动图学 [M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,1999:17-61.

[5] 周立红,刘敏涓,马西. 血浆纤维蛋白原水平与纤维蛋白单体聚合功能的测定 [J]. 陕西医学检验, 2000,15(1):35-36.

[6] 彭茜,关青,陈昌辉,洪华,张玲英. 血清 sIL-2R IL-6 与 hs-CRP 水平的测定在川崎病早期诊断中的临床意义 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(3): 208-230.

[7] Lord ST. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis [J]. Curr Opin Hematol, 2007,14(3): 236-241.

[8] Kov FM, Marsik C, Jilma B, Mann C, Que P. The fibrinogen-148 C/T polymorphism influences inflam matory response in experimental endotoxemia in vivo [J]. Thromb Res, 2007, 120(5): 727-731.

(本文编辑:黄 榕)