

论著 · 临床研究

过敏性紫癜 *P*-选择素基因 -2123 位点多态性检测与临床分析

李晶¹ 王一冰¹ 刘华林¹ 蒋玉红² 刘薇² 王亚秋²

(青岛市妇女儿童医疗保健中心 1. 内二科; 2. 检验科, 山东 青岛 266011)

[摘要] 目的 研究 *P*-选择素基因 -2123 位点多态性与儿童过敏性紫癜(HSP)发病的相关性。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析方法对 86 例 HSP 患儿(其中 40 例合并肾炎)和 70 例健康对照进行基因多态性检测。结果 与对照组比较,HSP 患儿 *P*-选择素基因 -2123 位点 GG 基因型频率和 G 等位基因频率均明显增高($P<0.05$)。合并肾炎患儿与未合并肾炎患儿比较,该位点各基因型频率及等位基因频率差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 *P*-选择素基因 -2123 位点多态性可能与儿童 HSP 发病有关。

[中国当代儿科杂志,2011,13(4):278-281]

[关键词] 过敏性紫癜; 肾炎; *P*-选择素; 基因多态性; 儿童

[中图分类号] R554⁺.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0278-04

P-selectin gene -2123 polymorphism in children with Henoch-Schönlein purpura

Li Jing, WANG Yi-Bing, LIU Hua-Lin, JIANG Yu-Hong, LIU Wei, WANG Ya-Qiu. Department of Internal Medicine, Qingdao Medical Care Center for Women and Children, Qingdao, Shandong 266011, China (Liu H-L, Email:lisang1976@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate whether *P*-selectin gene -2123 polymorphism is associated with the pathogenesis of Henoch-Schönlein purpura (HSP) in children. **Methods** Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) is used to identify the distribution of allele and genotype frequencies of *P*-selectin gene promoter -2123 polymorphism in 86 children with HSP(including 40 cases of purpura nephritis) and 70 healthy controls. **Results** Compared with the healthy controls, the frequencies of GG genotype and G allele of *P*-selectin promoter -2123 in children with HSP increased significantly ($P<0.05$). There were no significant differences in *P*-selectin promoter -2123 genotype and allele frequencies between the patients with and without nephritis. **Conclusions** *P*-selectin gene promoter -2123 polymorphism appears to be associated with the pathogenesis of HSP in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4): 278-281]

Key words: Henoch-Schönlein purpura; Nephritis; *P*-selectin; Gene polymorphism; Child

过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)是一种弥漫性血管炎症,为儿科最常见的结缔组织病,多见于2~8岁儿童。近年来发病率增高^[1]。目前发病机制尚不十分明确,临床缺乏特异性药物治疗,肾脏是否受累及损伤程度决定该病远期预后。随着分子生物学发展,基因遗传因素在 HSP 发病中的作用越来越引起学者们重视。国内外已有报道外周血 *P*-选择素浓度与 HSP 有关^[2-3],但 *P*-选择素基因变异在 HSP 发病机制中的作用尚缺乏研究。本研究应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法,通过病例-对照相关分析研究 *P*-选择

素 -2123 位点基因多态性是否与 HSP 相关,以期为 HSP 的治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 HSP 组 2006 年 10 月至 2008 年 10 月于我院治疗的 HSP 患者 86 例(病例组),男 50 例,女 36 例,年龄 3~13 岁。所有患者均为无血缘关系的中国北方地区汉族儿童,符合《诸福棠实用儿科学》

[收稿日期]2010-07-29;[修回日期]2010-10-24

[基金项目]青岛市科技计划项目(06-2-2-5-nsh)。

[作者简介]李晶,女,硕士,主治医师。

[通信作者]刘华林,教授。

关于HSP和HSPN诊断标准^[4]并排除血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、川崎病及合并急性感染、严重心、肝、肾疾病等情况。按照中华医学会儿科学分会肾脏病学组制定的方案治疗^[5],每1~2周复查尿常规,随访6个月后进行病例分组,根据尿常规改变分为:①非肾炎过敏性紫癜组(non-HSPN组):HSP诊断明确,随访6个月,尿常规始终正常;②过敏性紫癜肾炎组(HSPN组):HSP诊断明确,随访6个月,尿常规有血尿和(或)蛋白尿。

1.1.2 对照组 正常对照标本来自70例健康普查中学生,其中男36例,女34例,年龄13~17岁,排除既往HSP和肾脏病病史,血、尿常规检查正常。

所有受试对象监护人知情同意参加本研究,并经我院医学伦理委员会讨论通过。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和设备 包括血液基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN公司),PCR Mix(TIANGEN公司),限制性内切酶Pst I(Fermentas公司),高压灭菌仪(Microm series SA-300VA),微量离心机(SIGMA 1-13, Germany),振荡器(VORTEX-GENIC 2),紫外线分光光度计(DUR640BECKMAN USA),紫外线图象成像系统(VILBER LOURM, USA)。

1.2.2 基因组DNA提取 采集两组儿童的外周血0.5 mL注入EDTA抗凝管,采用微量全血提取法,严格按照试剂盒说明书从EDTA抗凝血中提取人类基因组DNA。

1.2.3 P-选择素基因-2123位点基因型的检测和分析 采用PCR-RFLP方法。PCR引物序列参照基因组数据库提供的序列(GenBank编号:6403)和文献^[6]进行设计,由上海生工生物技术有限公司合成。从基因组DNA中扩增包含-2123位点的P-选择素基因启动子区的目的片段。PCR引物序列:上游引物:5'-GGCATAAGGCTGACATCTCC-3',下游引物:5'-TGGAACAATACCTATCACGCTGT-3'。

PCR反应体系:模板DNA 4 μL(浓度为80~100 ng/μL),PCR Mix 12.5 μL,上、下游引物各1.5 μL(6 μmol/L),用无菌去离子水补足总体积至25 μL。

PCR扩增条件:94℃预变性3 min后,94℃变性30 s,58℃退火1 min,72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃终末延伸6 min。取5 μL PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,110 V恒压,1×TAE缓冲液,电泳40 min,紫外灯下观察结果并拍照,目测结果无杂带后进行限制性内切酶消化。酶切反应:PCR产物10 μL,限制性内切酶Pst I 1 μL, Buffer D 2 μL,灭菌双蒸去离子水7 μL,于37℃水浴,酶切

2.5 h后按常规方法制备2%琼脂糖凝胶,在室温下,110 V恒压,1×TAE缓冲液,电泳40 min,紫外灯下观察结果并拍照,记录实验结果。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件包进行处理,计算P-选择素-2123位点基因型及等位基因频率,然后经Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验,两组间各等位基因及基因型频率的比较采用χ²检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P-选择素基因

C/G置换多态性是指在转录起始上游-2123 bp(5'端启动子区)位点形成突变,均由胞嘧啶(C)→鸟嘌呤(G),表现3种多态性:C/C、C/G和G/G。可以产生3种基因型:CC(野生型纯合子)、CG(杂合子)和GG(突变型纯合子)。P-选择素基因-2123位点的PCR产物为646 bp。PCR产物经Pst I酶切消化后产生不同的特异性片段,形成3种基因型:G/G基因型,无酶切位点,产生646 bp 1条带;C/C基因型,存在1个酶切点,产生319 bp、255 bp 2条带;C/G基因型同时具有646 bp、319 bp、255 bp 3条带。见图1。

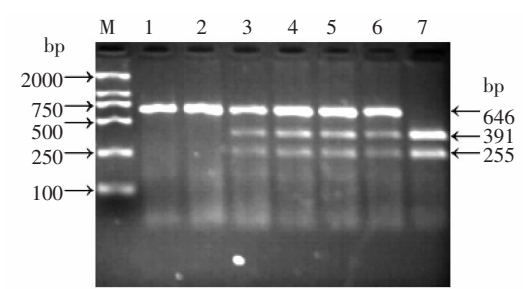


图1 P-选择素基因-2123C/G位点PCR产物酶切后电泳结果 注:M泳道为DNA Marker;1、2号泳道为G/G基因型,具有646 bp 1条带;3、4、5、6号泳道为C/G基因型,具有646 bp、319 bp、255 bp 3条带;7号泳道为C/C基因型,具有319 bp、255 bp 2条带。

2.2 P-选择素基因-2123位点基因型的Hardy-Weinberg平衡检验

结果显示,P-选择素基因-2123位点基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡,χ²检验P>0.05,表示资料的代表性好。

2.3 HSP患儿P-选择素基因-2123位点多态性与对照组比较,病例组P-选择素基因-2123位

点 GG 基因型频率明显增高 ($P < 0.01$), CG 基因型频率明显降低 ($P < 0.01$), 另外, 两组 G 等位基因频率分布差异也有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 两组 *P*-选择素基因 -2123 位点多态性分布 [例(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		GG	CG	CC	G	C
对照组	70	10(14)	46(66)	14(20)	66(47)	74(53)
HSP 组	86	35(41)	37(43)	14(16)	107(62)	65(38)
χ^2 值		13.116	7.98	0.363	7.092	
<i>P</i> 值		<0.001	0.005	0.547	0.008	

2.4 HSPN 患儿 *P*-选择素基因 -2123 位点多态性

HSPN 组 *P*-选择素基因 -2123 位点 GG 基因型频率明显高于对照组 ($\chi^2 = 7.811, P = 0.005$); 而 CG 基因型频率明显低于对照组 ($\chi^2 = 5.606, P = 0.018$)。HSPN 患儿与 non-HSPN 患儿 *P*-选择素基因 -2123 位点多态性比较差异无统计学意义。3 组之间 G 等位基因频率分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组 *P*-选择素基因-2123 位点多态性分布 [例(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		GG	CG	CC	G	C
对照组	70	10(14)	46(66)	14(20)	66(47)	74(53)
HSPN 组	40	15(38) ^a	17(42) ^a	8(20)	47(59)	33(41)
non-HSPN 组	46	20(43)	20(43)	6(13)	60(65)	32(35)

a: 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

P-选择素是黏附分子选择素家族主要成员之一, 1989 年首先在激活的血小板和内皮细胞上发现^[7]。它是一类表达在活化内皮细胞及血小板表面的黏附分子, 主要参与细胞间选择性识别与黏附, 介导血小板、内皮细胞与白细胞等的黏附以及白细胞向炎症部位移动等, 并与免疫损伤、炎症、动脉粥样硬化、血栓形成及肿瘤转移等密切相关^[8]。大量研究表明, *P*-选择素作为炎症病变的启动或促进因素, 在风湿免疫疾病、肾脏疾病发生发展过程中起着十分重要的作用^[9-10]。研究还发现 *P*-选择素在健康肾脏上皮细胞表面不表达, 但在肾小球肾炎患者或动物模型肾脏上皮细胞表达, 且肾小球、肾小管均有明显的表达, 与细胞浸润密切相关^[11]。

编码 *P*-选择素的基因定位于人类 1 号染色体 (1q21-24) 上一段长 41318 bp 的 DNA 序列, 包含 17

个外显子和 16 个内含子。研究表明 *P*-选择素基因启动子区上游 2123 位点基因多态性不引起氨基酸的改变, 但可影响 *P*-选择素基因的转录, 而 *P*-选择素浓度随其基因转录效率不同发生变化, 从而可能影响一些相关疾病发生与发展^[12]。

HSPN 是小儿时期最常见的继发性肾小球肾炎, 部分患儿病情迁延不愈, 可发展成肾衰竭, 国外有报道约 20% 患儿最终发展成慢性肾衰竭^[13]。已有研究发现 *P*-选择素在 HSP 患者肾组织和外周血中表达增强, 且肾组织表达与外周血表达水平密切相关, 并与肾脏病理类型的病变部位相一致^[2-3]。基因遗传研究发现本病发病有种族倾向, 在美国多见于白种人, 而黑人很少发病, 家族发病倾向并不显著^[14]。Amoli 等^[15]研究发现携带 IL1RN-2 者易患 HSPN, 认为该基因可能是 HSPN 的一个遗传标志。杨军等^[16]研究发现 MBL 基因多态性可能是 HSP 易感性标志之一。关于 *P*-选择素基因 C-2123G 多态性和疾病之间的关系目前未见报道。

本研究发现 *P*-选择素基因启动子区 -2123 位点多态性在中国北方地区汉族儿童中普遍存在。与正常对照组比较, HSP 患儿 *P*-选择素基因 -2123 位点 GG 基因型频率和 G 等位基因频率均明显增高。HSPN 患儿与 non-HSPN 患儿比较, *P*-选择素基因 -2123 位点各基因型频率及等位基因频率分布无统计学意义。提示 *P*-选择素基因 -2123 位点 GG 基因型可能为 HSP 发病的危险因素, 从遗传基因水平揭示了 *P*-选择素对 HSP 的作用, 为进一步明确 HSP 病因提供了线索, 为其治疗提供了新的靶点。但同时本研究也存在局限性, 如研究样本量偏小, 性别、病情严重程度等因素未进一步区分考虑。因此结果还需要更大范围的临床调查研究来加以证实, 也是今后继续研究观察的方向。

[参 考 文 献]

[1] Dillon MJ. Henoch-Schönlein purpura: recent advances[J]. Clin Exp Rheumatol, 2007, 25(1 Suppl 44): S66-S68.
[2] 王艳侠, 张爱平, 张颖玮, 张磊. 紫癜性肾炎患者血和肾组织 *P*-选择素的表达及意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(6): 343-345.
[3] Gok F, Ugur Y, Ozen S, Dagdeviren A. Pathogenesis-related adhesion molecules in Henoch-Schonlein vasculitis[J]. Rheumatol Int, 2008, 28(4): 313-316.
[4] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第 7 版. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 250-282.
[5] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(12): 748.
[6] 明凯华, 李艳, 夏尊恩, 熊小泉. 中国汉族人群 *P*-选择素基因多态性的研究[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(4): 285-288.

- [7] McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies[J]. J Clin Invest, 1989, 84(1): 92-99.
- [8] Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin[J]. Blood, 2005, 106(7): 2334-2339.
- [9] 王朝晖, 王伟铭, 周同, 陈晓农, 潘晓霞, 朱杰, 等. P-选择素基因单核苷酸多态性与 IgA 肾病的相关性[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(7): 559-564.
- [10] Turkoz Y, Evereklioglu C, Ozkiris A, Mistik S, Borlu M, Ozerol IH, et al. Serum levels of soluble P-selectin are increased and associated with disease activity in patients with Behcet's syndrome[J]. Mediators Inflamm, 2005(4): 237-241.
- [11] Segawa C, Wada T, Takaeda M, Furuichi K, Matsuda I, Hisada Y, et al. In situ expression and soluble form of P-selectin in human glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 1997, 52(4): 1054-1063.
- [12] Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Genetic disruption of poly (ADP ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Circ Res, 1998, 83(1): 85-90.
- [13] Davin JC, Weening JJ. Henoch-Schönlein purpura nephritis: an update[J]. Eur J Pediatr, 2001, 160(12): 689-695.
- [14] 陈述枚, 莫樱. 过敏性紫癜肾炎的病因和发病机制[J]. 中国实用儿科杂志, 2001, 16(4): 193-194.
- [15] Amoli MM, Thomson W, Hajeer AH, Calvino MC, Garcia-porrúa C, Ollier WE, et al. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with severe renal involvement and renal sequelae in Henoch-Schönlein purpura[J]. J Rheumatol, 2002, 29(7): 1404-1407.
- [16] 杨军, 李成荣, 李永柏, 黄惠君, 王国兵. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(6): 523-526.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

2011 年《中国当代儿科杂志》征订、征稿启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊。同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。本刊也发表国外专家来稿,附有详细的中文摘要。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊,每月 15 日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 12 元,全年 144 元。邮发代号:国内 42-188;国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免收审稿费。审稿周期 4~6 周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-84327402 传真:0731-84327922 Email: ddek7402@163.com

网址: [http:// www. cjcp. org](http://www.cjcp.org)