

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.09.014

论著·临床研究

TGFBR2 基因多态性与川崎病和 冠状动脉损伤相关性的研究

史翠平¹ 张宏艳²

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市儿童医院儿科, 天津 300074)

[摘要] 目的 检测儿童转化生长因子β受体2(TGFBR2)基因多态性(rs1495592)的分布情况,并探讨其与川崎病及冠状动脉损伤的相关性。方法 应用基因测序技术对35例川崎病患者(14例并发冠脉损害)的TGFBR2基因多态性(rs1495592)进行研究,另取25例正常同龄儿作对照。结合测序结果分析此多态性与川崎病及冠状动脉损伤的相关性。结果 病例组中基因型分布和等位基因频率分布与对照组相比差异均无统计学意义(分别 $\chi^2=0.566$ 、 0.216 , 分别 $P=0.452$ 、 0.642)。冠状动脉损害组基因型分布(CC 21.4%, CT+TT 78.6%)与非冠状动脉损害组基因型分布(CC 61.9%, CT+TT 38.1%)差异有统计学意义($\chi^2=5.546$, $P=0.019$),而两组等位基因频率分布差异无统计学意义($\chi^2=3.673$, $P=0.055$)。结论 儿童中TGFBR2基因多态性(rs1495592)可能与川崎病的发生无相关性,但与川崎病患者的冠脉损害发生相关。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(9): 767-770]

[关键词] 转化生长因子β受体2; 单核苷酸多态性; 川崎病; 冠状动脉损伤; 儿童

Association of single nucleotide polymorphism in TGFBR2 gene with Kawasaki disease and coronary artery lesions

SHI Cui-Ping, ZHANG Hong-Yan. Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China (Zhang H-Y, Email: etzhy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To examine the single nucleotide polymorphism (SNP) (rs1495592) in transforming growth factor-beta receptor 2 (TGFBR2) gene in children, and to investigate its association with Kawasaki disease (KD) and coronary artery lesions (CALs). **Methods** Thirty-five KD patients, 14 of whom had CALs (CAL subgroup), were selected as the case group, and 25 healthy age-matched children were selected as the control group. The SNP (rs1495592) in TGFBR2 gene was studied by gene sequencing. The association of SNP (rs1495592) with KD and (CALs) was analyzed based on the sequencing results. **Results** There were no significant differences in genotype frequency distribution ($\chi^2=0.566$, $P=0.452$) and allele frequency distribution ($\chi^2=0.216$, $P=0.642$) between the two groups. Genotypes in the CAL subgroup included CC (21.4%) and CT+TT (78.6%), while genotypes in the non-CAL subgroup included CC (61.9%) and CT+TT (38.1%). There was significant difference in genotype frequency distribution between the two groups ($\chi^2=5.546$, $P=0.019$), but without significant difference in allele frequency distribution ($\chi^2=3.673$, $P=0.055$). **Conclusions** The SNP (rs1495592) in TGFBR2 gene may not be associated with development of KD in children, but it is associated with CALs in children with KD. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(9):767-770]

Key words: Transforming growth factor-beta receptor 2; Single nucleotide polymorphism; Kawasaki disease; Coronary artery lesion; Child

川崎病又称皮肤黏膜淋巴结综合征,是以全身性血管炎为主要病变的小儿急性发热性疾病,具有自限性。目前病因不明,可能与感染引起的免疫反

应有关^[1]。早期(发热后第9~10天)约30%~50%的患儿会出现一过性冠状动脉扩张,若不治疗约有15%~25%的患儿发展成为冠状动脉瘤,可导致心

[收稿日期] 2013-01-02; [修回日期] 2013-02-16
[基金项目] 天津市卫生局科技基金攻关项目(11KG119)。
[作者简介] 史翠平,女,硕士研究生。
[通信作者] 张宏艳,主任医师。

肌梗死、猝死^[2]。因而研究其发病机理从而实现早期诊断具有重要的临床意义。

转化生长因子β受体2(TGFBR2)与TGF-β配体、TGFBR1、Smad蛋白共同组成TGF-β信号传导通路。TGF-β基因可防止细胞生长和分化过速以及生长不规律,其在细胞外基质形成、横纹肌细胞的分化和冠状动脉的重塑过程中都发挥了重要作用。在心血管系统中TGF-β能够减少血管增生、心肌细胞肥大、血管的钙化和纤维化^[3-4],与之相关功能的丧失与川崎病的发生有着密切的联系。TGF-β配体与细胞膜表面的相应受体结合并激活细胞内的Smad蛋白磷酸化,使其转移到核内实现对靶基因表达的调控^[5-6]。近年来研究表明TGFBR2基因多态性与多种疾病密切相关,如胃癌、马方综合征^[7-9]。此研究通过检测TGFBR2基因多态性(rs1495592)在汉族儿童中的分布,研究此多态性与川崎病和冠状动脉损伤的相关性,以期为川崎病的治疗及冠状动脉损伤的风险评估提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年9月至2012年5月于天津市儿童医院住院的川崎病患者35例为研究对象,其中男23例,女12例,年龄 24 ± 20 个月。对照组为门诊健康儿童25例,其中男15例,女10例,年龄 14 ± 28 个月,临床检查和实验室指标均正常。病例组及对照组均为汉族儿童,两组间年龄和性别比均匹配。病例组中14例合并冠脉损害,年龄 15 ± 18 个月,21例无冠脉损害,年龄 19 ± 29 个月)。川崎病患者根据2004年美国心脏病学会(AHA)提出的KD的诊断、治疗和长期管理的建议确诊^[10]。冠状动脉损伤采用第7版实用儿科学提供的冠脉扩张的诊断标准^[11]。本研究获得天津医科大学伦理委员会批准及家属书面知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有儿童均于清晨空腹采集血样, -20°C 冷藏备用,其中川崎病患者均在发病急性期取血。

1.2.2 DNA的提取和PCR扩增 采用改良NaI法提取外周血DNA^[12]。以外周血DNA为模板PCR扩增含有rs1495592位点的基因片段,上游引物为:5'-CCTGAGAGGAGATTTGAAGTAG-3',下游引物为:5'-CTTAAAGTATCAGAGCCTGCA-3',片段长度为167bp^[12]。反应体系为25μL:模板2μL,上

下游引物各0.5μL,蒸馏水11μL,MIX液(500μM dNTP,0.1U/μL Taq DNA多聚酶,100mM KCl,3mM MgCl₂,20mM Tris-HCl)11μL。扩增条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸30s,共循环40次;最后72℃延伸10min。

1.2.3 基因测序 将PCR产物送到上海生工生物工程有限公司反向测序,以确定多态性位点和基因型。

1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件进行统计学分析。基因型频率采用频率计数法计算,单个基因型频率比较采用四格表 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR扩增基因片段

PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示阴性对照中并未出现条带且标本2~8产物片段大小介于150bp与200bp之间,表明实验不存在污染,扩增产物为rs1495592基因序列。见图1。

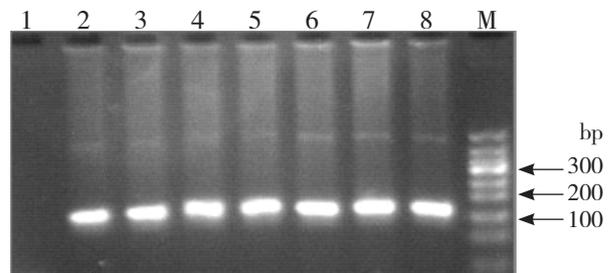


图1 PCR产物电泳图 1:阴性对照;2~8:标本;M:500bp Marker。

2.2 PCR产物测序结果

通过NCBI数据库查询得rs1495592基因序列反向基因序列为CGGGGGCAAATGAATCTGACGT AAGACTTTGAGGTTTTTATGTAACCATTCT(C/T) CCTGGAAGTGCCCTTGAAGTCCTTGTTCCTACCTC TCCTAGGCACATTGCTGCTAGGAGAGAGACACTA CTTCAAATCTCCTCTCAGGA,本实验PCR扩增产物进行反向测序所得基因序列与之吻合。由于基因突变造成测序结果出现3种基因型CC、CT和TT,突变点截图见图2。

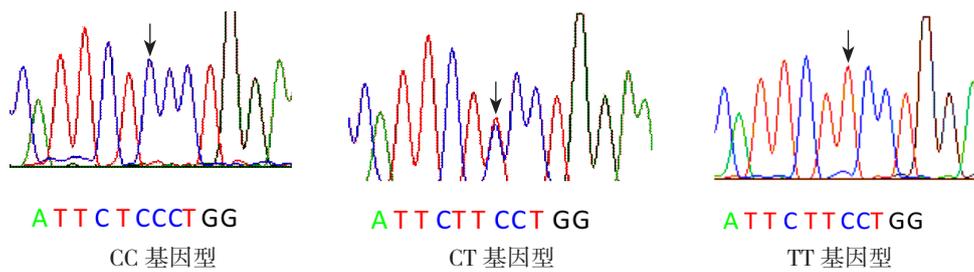


图2 基因型测序图 箭头所示为突变位点。

2.3 等位基因及基因型频率分析

病例组与对照组基因型频率差异无统计学意义 ($P=0.452$), 提示 rs1495592 与川崎病易感性无相关 ($OR=1.497$, 95% CI : 0.522~4.292)。冠状动脉损害组与非冠状动脉损害组基因型频率差异有统计学意义 ($P=0.019$), 提示 rs1495592 与川崎病冠状动脉损害发生相关 ($OR=0.168$, 95% CI : 0.036~0.791)。病例组与对照组、冠状动脉损害组与非冠状动脉损害组的等位基因频率差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。见表1~2。

表1 病例组与对照组 TGFBR2 (rs1495592) 基因型及等位基因频率比较 [例(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		CC	CT+TT	C	T
对照组	25	9(36)	16(64)	33(66)	17(34)
病例组	35	16(46)	19(54)	49(70)	21(30)
χ^2 值		0.566		0.216	
P 值		0.452		0.642	

表2 冠状动脉损害组与非冠状动脉损害组 TGFBR2 (rs1495592) 基因型及等位基因频率比较 [例(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		CC	CT+TT	C	T
非冠状动脉损害组	21	13(62)	8(38)	33(79)	9(21)
冠状动脉损害组	14	3(21)	11(79)	16(57)	12(43)
χ^2 值		5.546		3.673	
P 值		0.019		0.055	

3 讨论

川崎病合并冠状动脉损伤可致患儿猝死, 更是亚洲地区儿童后天获得性心脏病的首位病因, 但其发病机理至今不明, 本研究证明 TGFBR2 基因多态性 (rs1495592) 可能与川崎病患者冠脉损害发生相关。

据报道 TGF- β 信号通路依赖 Smad 蛋白途径, 与川崎病发生相关。其通路始于 TGF- β 配体

与 TGFBR2 的结合, 随后 TGFBR2 与 TGFBR1 形成四聚体复合物。该复合物通过磷酸化激活胞内 Smad 复合物, 从而促使其与胞内的另一 Smad 发生侧位结合, 并一起转移到核内对细胞的转录功能发挥调节作用^[13-14]。相关文献表明参与 TGF- β 信号转导通路的 TGF- β 配体、TGFBR2、Smad3 的遗传变异与川崎病的易感性、冠脉损害的形成、川崎病患者对静脉注射两种球蛋白的反应都具有相关性^[15]。TGF- β 1 在 TGFBR2 的协助下诱导 Foxp3 在原始 CD4⁺ T 细胞中表达, 同时维持 Foxp3 在 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞中的表达^[16]。据文献报道川崎病患者外周血中 CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T 表达水平在急性期较亚急性期明显降低, 而 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ 表达水平与之相反^[17]。结合 CD25⁺Foxp3⁺ 抑制免疫的功能, 可推断川崎病的发生可能与患儿 TGF- β 信号通路异常导致自身免疫过度表达相关。因而证明川崎病的发病机制与 TGF- β 信号通路传导异常有关。

川崎病冠状动脉损伤包括冠脉扩张, 动脉瘤形成, 晚期的冠脉狭窄。其病理基础是细胞外基质的代谢紊乱, 造成血管基底膜、内弹力膜破坏, 中膜变薄, 细胞 (包括内皮细胞及平滑肌细胞) 的凋亡和迁移, 血管结构重建^[18]。有文献报道 TGF- β 信号传导通路对心血管系统平滑肌结构和功能的维持至关重要, 正常情况下, 平滑肌细胞在主动脉和大动脉是静止细胞, 用以维持血管收缩蛋白的正常功能, TGF- β 信号通路传导异常, 使得血管平滑肌分化和表型都发生变化, 进而引起多种血管扩张样疾病^[19]。据相关文献可知主动脉平滑肌细胞发生表型转换, 收缩型分子表达降低是主动脉瘤的发病机制之一, 结合促进收缩分子的表达, 维持平滑肌细胞的收缩表型的功能, 因此, 如果能够维持 TGF- β 信号途径功能稳定, 逆转收缩型平滑肌细胞收缩分子的降低, 逆转平滑肌细胞的表型转换, 将可能阻止动脉瘤发生^[20], 鉴于

川崎病并发动脉瘤的患儿具有猝死的风险, 相关研究具有深刻的临床意义。另外国内外多篇文献曾有报道 TGF- β 信号通路异常除与马方综合征相关还与主动脉夹层动脉瘤、2型遗传性出血性毛细血管扩张、腹主动脉瘤的发生发展有关^[19-22]。也近而证明 TGF- β 信号通路异常可能与川崎病患儿冠脉损害相关。

本研究证明 TGFBR2 基因多态性 (rs1495592) 与汉族川崎病患儿冠脉损害具有相关性, 与川崎病的易感性不相关, 可能与样本例数少有关。本研究为川崎病冠脉损害危险程度的评估提供了实验依据, 但需要更大样本的后续研究进一步证实, 另外本研究未涉及 rs1495592 基因型不同的川崎病个体对静脉注射丙种球蛋白的疗效是否具有差异, 相关研究仍需继续。

[参 考 文 献]

- [1] 李瑞燕, 李晓辉. 川崎病病因学研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2010, 31(4): 616-620.
- [2] 李焰, 王献民, 柳颀龄, 石坤, 杨艳峰, 郭永宏. 川崎病患儿并发冠状动脉病变的危险因素分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(12): 938-941.
- [3] Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egidio J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis[J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2): 196-206.
- [4] Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, Narula NR, Rapoport HS, Mohler ER 3rd, et al. Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events[J]. Ann Thorac Surg, 2007, 83(3): 946-953.
- [5] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584.
- [6] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus[J]. Cell, 2003, 113(6): 685-700.
- [7] Wu Y, Li Q, Zhou X, Yu J, Mu Y, Munker S, et al. Decreased Levels of Active SMAD2 Correlate with Poor Prognosis in Gastric Cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35684.
- [8] 周炎, 靳光付, 蒋国军, 王洪敏, 谈永飞, 丁伟良, 等. TGFBI 和 TGFBR2 基因多态与胃癌遗传易感性的关系 [J]. 癌症 (英文版), 2007, 26(6): 581-585.
- [9] Yuan SM, Ma HH, Zhang RS, Jing H. Transforming growth factor-beta signaling pathway in Marfan's syndrome: a preliminary histopathological study[J]. Vasa, 2011, 40(5): 369-374.
- [10] 阮瑜, 赵晓东. 川崎病诊断标准的变迁 [J]. 儿科药学杂志, 2012, 18(1): 1-4.
- [11] 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: 698-703.
- [12] Choi YM, Shim KS, Yoon KL, Han MY, Cha SH, Kim SK, et al. Transforming growth factor beta receptor II polymorphisms are associated with Kawasaki disease[J]. Korean J Pediatr, 2012, 55(1): 18-23.
- [13] 朱宏斌, 杨云生, 郭明洲. 肝癌中转化生长因子 (TGF)- β 信号转导通路的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2012, 21(3): 206-209.
- [14] 黄越龙, 周春光, 陈燕, 张谊, 张启瑜. TGF/Smad 信号通路及肝纤维化的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2011(10): 1883-1884.
- [15] Shimizu C, Jain S, Davila S, Hibberd ML, Lin KO, Molkara D, et al. Transforming growth factor-beta signaling pathway in patients with Kawasaki disease[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(1): 16-25.
- [16] Gilbert RS, Kobayashi R, Sekine S, Fujihashi K. Functional Transforming Growth Factor- β Receptor Type II Expression by CD4⁺ T Cells in Peyer's Patches Is Essential for Oral Tolerance Induction[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27501.
- [17] Sohn SY, Song YW, Yeo YK, Kim YK, Jang GY, Woo CW, et al. Alteration of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3 T cell level in kawasaki disease[J]. Korean J Pediatr, 2011, 54(4): 157-162.
- [18] 张园海, 何跃娥, 项如莲, 吴蓉洲, 徐强, 荣星, 等. 川崎病急性期血清对血管内皮 MMP-2、MMP-9 和 TNF- α 分泌的影响及 IVIG 的干预机制探讨 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14 (5): 586-590.
- [19] Inamoto S, Kwartler CS, Lafont AL, Liang YY, Fadulu VT, Duraisamy S, et al. TGFBR2 mutations alter smooth muscle cell phenotype and predispose to thoracic aortic aneurysms and dissections[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(3): 520-529.
- [20] 句仁杰, 张继帅, 张鹏, 杨晓, 吴长德. 转化生长因子 β 调节血管平滑肌细胞分化和表型转换的研究进展 [J]. 生物技术通讯. 2012, 23(5): 746-705.
- [21] Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong KH, Fliess N, Jiang Z, et al. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2[J]. Blood, 2008, 111(2): 633-642.
- [22] Baas AF, Medic J, van't Slot R, de Kovel CG, Zhernakova A, Geelkerken RH, et al. Association of the TGF-beta receptor genes with abdominal aortic aneurysm[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(2): 240-244.

(本文编辑: 王庆红)