

# 儿童紫癜性肾炎肿瘤坏死因子 $\alpha$ 基因多态性分析

王建军<sup>1</sup> 史艳平<sup>2</sup> 黄越<sup>1</sup> 吴春<sup>1</sup> 李旭昌<sup>3</sup>

(1. 川北医学院附属医院儿科, 四川 南充 637000; 2. 西安市儿童医院, 陕西 西安 710003;  
3. 遂宁市中心医院, 四川 遂宁 629000)

**[摘要]** 目的 探讨肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-308G/A 基因多态性与儿童紫癜性肾炎 (HSPN) 的关系。方法 应用聚合酶链反应 (PCR) 扩增产物直接测序方法对 110 例过敏性紫癜 (HSP 组) 汉族儿童进行 TNF- $\alpha$ -308G/A 基因型分析, 包括紫癜性肾炎 52 例 (HSPN 组), 无合并肾炎 58 例 (单纯 HSP 组)。酶联免疫吸附法检测血浆 TNF- $\alpha$  水平。90 例健康汉族儿童作为对照组。结果 HSP 组 TNF- $\alpha$ -308 基因型分布频率与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。HSPN 组 GA 基因型 (29%)、A 等位基因频率 (18%) 均明显高于单纯 HSP 组 (分别为 10% 和 7%,  $P < 0.05$ ), 其中 GA + AA 基因型患儿血浆 TNF- $\alpha$  水平 ( $7.1 \pm 2.3$  pg/mL) 较 GG 基因型患儿 ( $5.7 \pm 1.5$  pg/mL) 明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论 TNF- $\alpha$ -308G/A 基因多态性与 HSP 儿童肾脏损害的发生有关, A 等位基因可能是儿童 HSPN 的易感基因。 [中国当代儿科杂志, 2013, 15(2): 88-90]

**[关键词]** 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 基因多态性; 紫癜性肾炎; 儿童

## Association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with Henoch-Schönlein purpura nephritis in children

WANG Jian-Jun, SHI Yan-Ping, HUANG Yue, WU Chun, LI Xu-Chang. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China (Email: wjjsl2003@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To study the relationship of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )-308G/A gene polymorphisms with Henoch-Schönlein purpura nephritis (HSPN) in children. **Methods** Using the direct DNA sequencing method, polymorphisms in the TNF- $\alpha$  promoter region (-308) were genotyped in 110 Han children with Henoch-Schönlein purpura (HSP group), including 52 children with nephritis and 58 children without nephritis. Plasma TNF- $\alpha$  levels were measured using ELISA. Ninety ethnically matched healthy children were used as the control group. **Results** There were no significant differences in the polymorphisms of TNF- $\alpha$  (-308G/A) between the HSP and control groups ( $P > 0.05$ ). The GA genotype (29% vs 10%) and A allele frequency (18% vs 7%) in HSP children with nephritis (HSPN) were more common than in those without nephritis ( $P < 0.05$ ). Plasma TNF- $\alpha$  levels in HSPN children with GA + AA genotype ( $7.1 \pm 2.3$  pg/mL) were significantly higher than those with GG genotype ( $5.7 \pm 1.5$  pg/mL) ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** TNF- $\alpha$ -308GA genotype and A allele may contribute to the increased risk for the development of nephritis in children with HSP. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(2): 88-90]

**Key words:** Tumor necrosis factor-alpha; Gene polymorphism; Henoch-Schönlein purpura nephritis; Child

过敏性紫癜 (HSP) 是以坏死性小血管炎为主要病理改变的系统性疾病, 可累及全身多器官, 肾脏损害程度是决定其远期预后的关键<sup>[1]</sup>, 因此, 研究 HSP 血管炎尤其是肾脏血管受累的发生机制具有重要意义。近年来, TNF- $\alpha$  启动子区多态性被证明与白塞氏病、系统性红斑狼疮等免疫性血管炎存在一定的相关性, TNF- $\alpha$  的表达与其启动子区的多态性

有关<sup>[2-4]</sup>。其中, TNF- $\alpha$ -308 是目前研究的热点位点, 但其基因多态性在儿童 HSP 的分布以及是否与肾脏受累尚无相关报道。本研究以 TNF- $\alpha$  基因启动子-308 作为研究位点, 观察 TNF- $\alpha$ -308 基因多态性在 HSP 患儿中的分布, 探讨其与紫癜性肾炎 (HSPN) 及血浆 TNF- $\alpha$  水平的关系。

# 1 资料与方法

## 1.1 研究对象

来源于川北医学院附属医院儿科2009年12月至2011年12月HSP患儿110例,男68例,女42例,年龄4~14岁,平均年龄 $10.0 \pm 2.8$ 岁;包括HSPN患儿(HSPN组)52例,无合并肾炎患儿(单纯HSP组)58例。HSP及HSPN的诊断标准参照文献<sup>[5-6]</sup>。对照组为同期在该院儿童保健科体检的健康儿童90例,其中男56例,女34例,平均年龄 $9.8 \pm 2.7$ 岁。

## 1.2 研究方法

1.2.1 TNF- $\alpha$ -308G/A 基因多态性分析 采用EDTA抗凝管清晨空腹抽取病例组及对照组静脉血2 mL,用人基因组DNA抽提试剂盒提取DNA;PCR引物通过网址“http://frodo.wi.mit.edu/”在线设计,序列为:P1:5'-CCCAGTGGGTCTGTGAAT-3',P2:5'-GGCGTCTGAGGGGTTGTTT-3';PCR扩增反应总体积50  $\mu$ L,其中模板DNA(100~150 ng/ $\mu$ L)1  $\mu$ L,两端引物各(10  $\mu$ M)2  $\mu$ L,dNTP(10 mM)4  $\mu$ L,Taq DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L,10  $\times$  PCR缓冲液5  $\mu$ L,灭菌双蒸馏水补至50  $\mu$ L;反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min后进行35次循环,每个循环

条件是94 $^{\circ}$ C变性30 s、57 $^{\circ}$ C复性30 s、72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环完成后72 $^{\circ}$ C延伸7 min;PCR产物直接送测序鉴定(塞百盛生物技术有限公司提供)。

1.2.2 血浆TNF- $\alpha$ 水平测定 清晨空腹抽取静脉血2 mL置于枸橼酸钠抗凝管中,离心10 min后取血浆,用ELISA试剂盒检测(武汉博士德生物工程有限公司提供)。

## 1.3 统计学分析

基因型和等位基因分布经Hardy-Weinberg遗传平衡检验后,用SPSS 11.5统计软件分析。两组之间的基因型和等位基因分布频率比较采用 $\chi^2$ 检验。两组基因型血浆TNF- $\alpha$ 水平比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 TNF- $\alpha$ -308G/A 基因型测序鉴定

各基因型测序结果见图1。测序图WW为野生型碱基G单峰(GG基因型),测序图WM为杂合型GA双峰(GA基因型),MM为纯合碱基A单峰(AA基因型)。HSP组和对照组基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡( $\chi^2$ 值分别为0.297、0.465,均 $P > 0.05$ )。

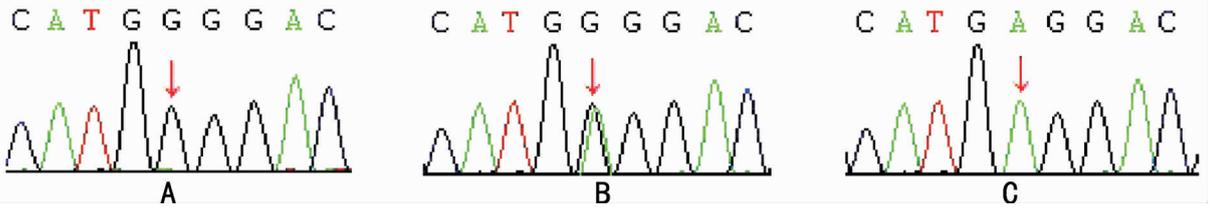


图1 TNF- $\alpha$ -308 基因型直接测序结果 A:WW,野生纯合型(GG型);B:WM,突变杂合型(GA型);C:MM,突变纯合型(AA型)。

## 2.2 HSP组与对照组TNF- $\alpha$ -308G/A基因型及等位基因分布频率比较

HSP组TNF- $\alpha$ -308位点基因型分布中GG型占78.2%、GA型占19.1%、AA型占2.7%,对照组TNF- $\alpha$ -308位点基因型分布中GG型占81.1%、GA型占16.7%、AA型占2.2%,两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。两组等位基因分布频率差异亦无统计学意义。见表1。

## 2.3 单纯HSP组与HSPN组TNF- $\alpha$ -308G/A基因型及等位基因分布频率比较

HSPN组GA基因型频率明显高于单纯HSP组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );HSPN组A等位基因频率亦明显高于单纯HSP组( $P < 0.05$ )。见表2。

## 2.4 HSPN组不同基因型患儿血浆TNF- $\alpha$ 水平比较

HSPN组中GA+AA基因型(携带A等位基因)患儿血浆TNF- $\alpha$ 水平较GG基因型(非携带A等位基因)患儿明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

表1 HSP组与对照组TNF- $\alpha$ (-308A/G)基因型及等位基因频率比较 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	GA	AA	G	A
对照组	90	73(81.1)	15(16.7)	2(2.2)	161(89.4)	19(10.6)
HSP组	110	86(78.2)	21(19.1)	3(2.7)	193(87.7)	27(12.3)
$\chi^2$ 值			0.266			0.287
P值			0.816			0.592

**表2 单纯 HSP 组和 HSPN 组 TNF-α(-308A/G) 基因型及等位基因频率比较 [例(%)]**

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	GA	AA	G	A
单纯 HSP 组	58	51(88)	6(10)	1(2)	108(93)	8(7)
HSPN 组	52	35(67)	15(29)	2(4)	85(82)	19(18)
χ <sup>2</sup> 值		6.860			6.587	
P 值		0.032			0.010	

**表3 HSPN 组不同基因型患儿血浆 TNF-α 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)**

基因型	例数	TNF-α
GG	35	5.7 ± 1.5
GA + AA	17	7.1 ± 2.3
t 值		2.542
P 值		0.014

### 3 讨论

本研究结果显示 HSP 组与对照组 TNF-α-308 位点均以 GG 基因型频率最高, AA 基因型频率最低, 符合 Hardy-Weiberg 遗传平衡定律检验, 表明各遗传基因具有群体代表性。HSP 组与对照组比较, TNF-α-308 位点各基因型及等位基因频率差异无统计学意义, 提示 TNF-α-308 位点多态性与 HSP 的遗传易感性不相关; 而 HSP 病例中, HSPN 组患儿 GA 基因型频率和 A 等位基因频率明显高于单纯 HSP 组, 差异有统计学意义, 提示 HSP 患儿在携带 TNF-α-308A 等位基因遗传背景的基础上, 更容易罹患肾炎。

Cuenca 等<sup>[7]</sup>发现 TNF-α-308 位点携带 A 等位基因型人群与自身免疫炎症性疾病、慢性代谢性疾病发生发展及疾病远期预后相关。但携带 A 等位基因型 HSP 病例为何容易发生肾脏损害, 其病因目前尚不是十分清楚。推测可能与肿瘤坏死因子对组织非平衡的炎症刺激有关。体外实验表明 TNF-α-308 位点多态性可影响 mRNA 转录和产量, 携带 A (GA + AA) 等位基因转录活性比非携带 A (GG 纯合子) 等位基因增强, 在 3'UTR 存在情况下前者比后者转录活性高两倍, 认为 TNF-α-308 位点碱基突变影响了 TNF-α 的产量<sup>[8]</sup>。由于肾血流本身的特点, 肿瘤坏死因子更容易作用于肾小球血管内皮细胞产生血管损伤。国内外相关研究也提示 HSP 病例中肾脏受累组较非肾脏受累组其血清 TNF 水平明显升高, 本研究结果与之基本一致<sup>[9-10]</sup>。

有报道, 致炎细胞因子 TNF-α 可能参与了 HSP 血管炎的形成<sup>[10-12]</sup>。本研究对不同基因型 HSPN 患儿血浆 TNF-α 水平进行了观察, 发现 GA + AA 基因型(携

带 A 等位基因)者 TNF-α 水平比 GG 基因型(非携带 A 等位基因)明显升高, 提示 HSPN 患儿可能通过 TNF-α-308A 等位基因参与调控其 mRNA 转录及 TNF-α 的合成和分泌, 影响肾小球血管炎的发生。但本组资料所研究的对象均为门诊和住院患儿, 多处于疾病急性发作期, 不能排除疾病过程对血浆 TNF-α 水平的影响。

综上所述, TNF-α-308 位点多态性与 HSP 的遗传易感性不相关, 而与疾病是否导致肾脏损害相关, TNF-α A 等位基因 (GA + AA) 频率增加预示血管炎累及肾小球可能性大。但本次观察对象数量有限, 尤其是突变纯合型样本少, 有待进一步扩大样本量深入研究。

### [参 考 文 献]

- [1] Tizard EJ, Hamilton-Ayres MJ. Henoch Schonlein purpura [J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2008, 93(1): 1-8.
- [2] Touma Z, Farra C, Hamda A, Shamseddeen W, Uthman I, Hourani H, et al. TNF polymorphisms in patients with Behcet disease: a meta-analysis [J]. Arch Med Res, 2010, 41(2): 142-146.
- [3] Farid TM, Abd EI Bakry AM, Khalefa ES, Talaat AA, Mohamed AA, Gheita TA, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with juvenile systemic lupus erythematosus nephritis in a cohort of egyptian patients [J]. Iran J Kidney Dis, 2011, 5(6): 392-397.
- [4] Lin YJ, Chen RH, Wan L, Sheu JC, Huang CM, Lin CW, et al. Association of TNF-alpha gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients [J]. Lupus, 2009, 18(11): 974-979.
- [5] 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-Schönlein purpura [J]. Arthritis Rheum, 1990, 33(8): 1114-1121.
- [6] 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): 746-749.
- [7] Cuenca J, Pérez CA, Aguirre AJ, Schiattino I, Aguilón JC. Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population [J]. Biol Res, 2001, 34(3-4): 237-241.
- [8] Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription [J]. Mol Immunol, 1997, 34(5): 391-399.
- [9] 余艳红, 潘凯丽, 李琦, 张宝娟, 黄莹, 张静静, 等. 过敏性紫癜患儿血、尿标本中 IL-13 受体 α2 水平及其他细胞因子的检测分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(1): 37-40.
- [10] Ha TS. The role of tumor necrosis factor-alpha in Henoch-Schönlein purpura [J]. Pediatr Nephrol, 2005, 20(2): 149-153.
- [11] Del Vecchio GC, Penza R, Altomare M, Piacente L, Aceto G, Lassandro G, et al. Cytokine pattern and endothelium damage markers in Henoch-Schönlein purpura [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2008, 30(3): 623-629.
- [12] 江华, 丁甫月, 顾龙君. 过敏性紫癜患儿血清 IFN-α、IL-2、IL-4 TNF-α 水平的变化 [J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(2): 117-118.

(本文编辑: 邓芳明)