

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.10.013

论著·临床研究

CD40 基因多态性与川崎病及其 冠状动脉损伤的相关性研究

程首超 程衍杨 吴金龙

(咸宁市中心医院儿科, 湖北 咸宁 437100)

[摘要] **目的** 探讨 CD40 基因两个 SNP 位点 rs4810485 和 rs1535045 的多态性与我国中部地区儿童川崎病 (KD) 以及动脉损伤遗传易感性的关系。**方法** 采取病例对照研究方法, 分别选取 184 例 KD 患儿和 206 例正常体检儿童作为研究对象。利用 PCR-RFLP 的方法测定两个 SNP 位点多态性分布。**结果** KD 患儿 SNP 位点 rs4810485 的基因型 (GG、GC、CC) 频率及等位基因频率与正常对照组相比差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) ; SNP 位点 rs1535045 基因型 (TT、TC、CC) 与对照相比差异有统计学意义 ($P=0.011$) , T 等位基因为风险因子 ($OR=1.592$, 95%CI: 1.182~2.144, $P=0.004$) 。患者中两个 SNP 位点多态性均不与冠状动脉损伤相关 (均 $P>0.05$) 。**结论** CD40 基因 SNP 位点 rs4810485 与 KD 无相关性, rs1535045 与 KD 的易感性相关。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(10): 1025-1028]

[关键词] 川崎病; CD40 基因; 多态性; 冠状动脉损伤; 儿童

Association between gene polymorphism of CD40 gene and coronary artery lesion in Kawasaki disease

CHENG Shou-Chao, CHENG Yan-Yang, WU Jin-Long. Department of Pediatrics, Xianning Central Hospital, Xianning, Hubei 437100, China (Email: Chengsc236@126.com)

Abstract: Objective To study the association between two single nucleotide polymorphisms (rs4810485 and rs1535045 in CD40 gene) and Kawasaki disease (KD) in Han Chinese children. **Methods** A case-control study was performed on 184 children with KD and 206 normal controls. The polymorphisms of two SNPs in CD40 gene were detected using PCR-RFLP. **Results** There were no significant differences in the genotype distribution and allele frequency of SNP rs4810485 in CD40 gene between the KD and normal groups ($P>0.05$). The genotype distribution of SNP rs1535045 in CD40 gene in the KD group was significantly different from the control group ($P<0.05$). T allele of SNP rs1535045 was shown as a risk factor for development of KD ($OR=1.592$, 95%CI: 1.182-2.144, $P=0.004$). There were no association between the polymorphisms of the two SNPs and coronary artery lesions ($P>0.05$). **Conclusions** SNP rs1535045 may be associated with the development of KD in Han Chinese children, while SNP rs4810485 may not.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(10): 1025-1028]

Key words: Kawasaki disease; CD40 gene; Polymorphism; Coronary artery lesion; Child

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 是一种以全身血管炎为主要病变的急性发热出疹性疾病, 是一种由免疫介导引起的急性血管炎综合征^[1]; 该病主要累及冠状动脉, 导致冠状动脉扩张 (CAD)、动脉瘤 (CAA) 甚至心肌梗死, 目前 KD 已经成为我国儿童后天性心脏病最主要的病因^[2]。KD 发病具有明显的种族特异性, 在世界不同地区, 发病

率存在差异, 并可能存在遗传易感性^[2]。全基因组关联分析研究表明, CD40 基因可能与 KD 的易感性相关^[3], Kuo 等^[4]研究发现单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 rs4810485 和 rs1535045 为 CD40 基因标签 SNP (tagSNP)。由于地域及人群的差异, 本研究以我国中部地区 KD 患儿为研究对象, 进一步探讨 CD40 基因多态性与

[收稿日期] 2014-03-18; [接受日期] 2014-05-30

[作者简介] 程首超, 男, 硕士, 主治医师。

KD的易感性,以及患儿存在冠状动脉损伤的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2007年6月至2013年6月在我院儿科住院的典型KD患儿184例作为实验组,其中冠状动脉损伤63例;并选取同时期体检正常的206名儿童作为对照组。实验组年龄4个月至6岁7个月,平均年龄 3.1 ± 2.6 岁;其中男131例,女53例;63例冠状动脉损伤的患儿中CAD 58例,CAA 5例;5例CAA患儿均为中、小CAA,未见巨大CAA。对照组平均年龄 3.4 ± 2.8 岁,男138例,女68例。本研究得到医院医学伦理委员会批准及患儿家属知情同意。

入选标准符合第7次世界小儿KD研讨会修订的诊断标准^[5]:(1)发热5d以上,抗生素治疗无效;(2)眼球结膜充血;(3)皮疹,多表现为斑丘疹,无水泡及结痂;(4)口唇干裂,杨梅舌;(5)颈部淋巴结肿大;(6)手足红斑,硬性水肿,恢复期脱皮。以上6条中满足5条就可以诊断KD,仅符合4条加上超声心动图发现CAD也可诊断。

冠状动脉损伤诊断参照日本卫生厅1984年颁布的冠状动脉病变诊断标准^[6]:CAD指冠状动脉5岁以内 >3 mm,5岁以上 >4 mm,或扩大的冠状动脉直径大于其近或远端血管直径的1.5倍;CAA指左冠状动脉(LCA)或右冠状动脉(RCA)主干内径和主动脉根部内径之比 >0.3 。冠状动脉内径4 mm~7 mm,冠状动脉相应部位出现球形、囊性或梭形扩张,或呈串珠样改变,提示CAA;若冠状动脉明显扩张,内径 >8 mm,则为巨大CAA。

1.2 研究方法

取KD患儿及对照组儿童静脉血2 mL,利用酚氯仿抽提的方法提取基因组DNA,并测定浓度。以DNA为模板分别扩增含有两个SNP位点的DNA片段。设计的引物分别为rs4810485位点:F1:5'-GGCTCAGAGCCAACCAAGCATATC-3',R1:5'-ATTCCTGCCAGGCTTCAGTC-3';rs1535045位点:F2:5'-GGAATGACCCATGGTATCAAGG-3',R2:5'-CCCCTTTACCTCTTTCCAGCTG-3'。PCR

总反应体系为25 μ L,含有10倍PCR反应缓冲液2.5 μ L,10 mM dNTP混合液1 μ L,10 μ M引物各1 μ L,TAKARA Taq酶1 U;反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共33个循环。取5 μ L扩增的产物经电泳检测合格以后分别利用内切酶BspEI和HhaI进行酶切分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行分析,频率计数法计算病例组和对照组基因型和等位基因频率,利用Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验。各组间基因型频率分布和等位基因频率分布比较采用 χ^2 检验;计数资料采用优势比(OR)及95%CI表示相对危险度, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD40基因两个SNP位点的基因型PCR酶切电泳结果

各基因型如图1所示。

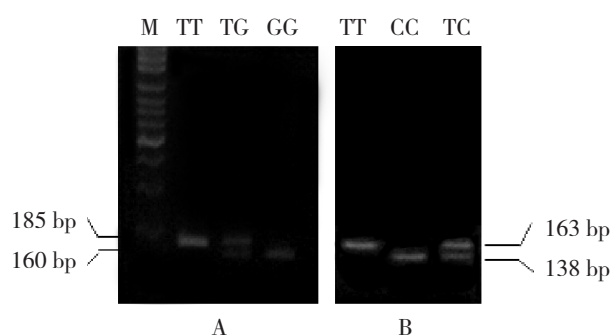


图1 两个SNP位点的基因型确定 A:表示rs4810485的3种基因型;B:表示rs1535045的3种基因型。

2.2 CD40的基因型与等位基因分布

各组的基因型符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律,具有群体代表性。rs4810485的3种基因型在实验组与对照组之间分布差异无统计学意义,等位基因频率在两组间差异也无统计学意义(均 $P>0.05$),说明该SNP位点与KD易感不相关。而rs1535045的3种基因型以及等位基因频率与对照组相比差异具有统计学意义(均 $P<0.05$),说明T等位基因为风险因子,与KD易感性相关(OR=1.592,95%CI:1.182~2.144, $P=0.004$)。见表1。

2.3 CD40 基因多态性与冠状动脉损伤的相关性分析

存在冠状动脉损伤的患儿与未损伤的患儿相

比, CD40 基因两个 SNP 位点的多态性均不与冠状动脉损伤存在相关性 (均 $P>0.05$), 见表 2。

表 1 两组两个 SNP 位点基因型分布情况 [例 (%)]

组别	例数	rs4810485 基因型			rs4810485 等位基因		rs1535045 基因型			rs1535045 等位基因	
		GG	GT	TT	G	T	TT	TC	CC	T	C
对照组	206	85(41.3)	93(45.1)	28(13.6)	263(63.8)	149(36.2)	18(8.8)	86(41.7)	102(49.5)	122(29.6)	290(70.4)
病例组	184	82(44.6)	86(46.7)	16(8.7)	250(67.9)	118(32.1)	27(14.7)	92(50.0)	65(35.3)	146(39.7)	222(60.3)
χ^2 值			2.367			1.145		8.987			9.188
P 值			0.306			0.155		0.011			0.004

表 2 CD40 基因多态性与冠状动脉损伤的相关性分析 [例 (%)]

组别	例数	rs4810485 基因型			rs1535045 基因型		
		GG	GT	TT	TT	TC	CC
冠状动脉损伤组	121	52(42.9)	57(47.1)	12(10.0)	17(14.0)	55(45.5)	49(40.5)
冠状动脉未损伤组	63	30(47.6)	29(46.1)	4(6.3)	10(15.9)	37(58.7)	16(25.4)
χ^2 值			2.367			4.228	
P 值			0.306			0.121	

3 讨论

KD 在世界各国均有发生, 但以亚裔发病率最高, 流行病学调查显示我国 KD 患儿有增加的趋势, 发病率低于日本而高于西方国家^[7-8]。越来越多的研究表明, 一些基因的多态性与 KD 的易感性相关, 如血管紧张素转化酶基因 (ACE)、免疫球蛋白超家族的 FCGR2A、血管内皮生长因子基因 (VEGF) 以及 NRAMP1 基因等与 KD 的易感相关^[9-11]。

CD40 是 TNF 受体超家族成员 5, 分布在质膜, 参与蛋白复合体组装、炎症应答、免疫应答信号转导等过程, 研究表明 CD40-CD40L 信号通路参与炎症反应的病理过程^[12]; 此外 CD40 的表达量增加会导致细胞内的致炎细胞因子的含量增加^[3]。CD40 与 CD40L 的相互作用可促进 CD4⁺ T 细胞的生长, 因此该通路在免疫性疾病中亦有重要作用。且有研究表明 CD40L 基因与 KD 的易感性相关^[13]。因此 CD40 基因的突变或者表达量的改变可能影响该通路的各种应答过程, 从而导致疾病发生发展。

Lee 等^[3]利用全基因组关联分析研究表明 CD40 基因与 KD 存在相关性, 但研究的 SNP 位点与本文不同; Kuo 等^[4]在台湾人群中研究了 CD40 与 KD 的相关性, 与本文结论有不同, 本研究中 SNP 位点 rs1535045 与 KD 的易感性相关, TT 为风

险基因型, 且该基因型的患儿比台湾儿童更容易患 KD, 可能的原因是地域及种族差异所导致。

本研究中的 SNP 位点 rs4810485 位于 CD40 基因内含子上面, 与 KD 的易感性不相关, 可能原因是 SNP 不影响蛋白的功能和表达量。SNP 位点 rs1535045 与 KD 的易感性相关, 推测可能的原因是影响 CD40 的表达量, 进而影响 CD40-CD40L 等炎症信号反应通路, 这一推测需要进一步的实验来证明。

KD 主要危及生命的并发症为冠状动脉损伤, 可导致血栓形成、CAD、CAA 破裂甚至猝死^[14], 因此应早期观察 KD 患儿是否为冠状动脉损伤的易感人群。本研究未发现 CD40 基因两个 SNP 位点多态性与冠状动脉损伤相关; 但本研究中的动脉损伤的 KD 患儿数量较少, 有待今后进一步统计分析。

综上所述, 中国大陆中部地区汉族人群中 CD40 基因 SNP 位点 rs4810485 与 KD 的易感无相关性。而 rs1535045 的 TT 基因型与川崎病的易感性相关, T 等位基因为风险因子, 由于本研究纳入的患儿仅限于我国中部地区, 考虑到人群及地区差异, 该位点的多态性与 KD 的相关性需要大样本、多中心进一步来确定; 此外, 该基因的多态性是否与冠状动脉损伤相关也需要大量标本来证实。

[参 考 文 献]

- [1] Wood LE, Tullon RM. Kawasaki disease in children[J]. Heart, 2009, 95(10): 787-792.
- [2] 刘飞, 李军, 杨世伟, 等. CD14 基因多态性和川崎病冠状动脉损伤之间关系的研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(11): 839-841.
- [3] Lee YC, Kuo HC, Chang JS, et al. Two new susceptibility loci for Kawasaki disease identified through genome-wide association analysis[J]. Nat genetics, 2012, 44(5): 522-525.
- [4] Kuo HC, Chao MC, Hsu YW, et al. CD40 Gene polymorphisms associated with susceptibility and coronary artery lesions of Kawasaki disease in the Taiwanese population[J]. Scientific World Journal, 2012, 2012: 520865.
- [5] Yanagawa HD, Yanagawa HA. Epidemiology of Kawasaki disease: a 30-year achievement[M]. Tokyo: Shindan-To-Chiryosha, 2004: 24-32.
- [6] Research Committee on Kawasaki disease. Report of subcommittee on standardization of diagnostic criteria and reporting of coronary artery lesions in Kawasaki disease Tokyo: ministry of health and welfare[R]. 1984
- [7] 黄麟, 杨作成. 川崎病发病机制的研究进展 [J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(4): 265-267.
- [8] Huang GY, Ma XJ, Huang M, et al. Epidemiologic pictures of Kawasaki disease in Shanghai from 1998 through 2002[J]. J Epidemiol, 2006, 16(1): 9-14.
- [9] Wu SF, Chang JS, Peng CT, et al. Polymorphism of angiotensin-I converting enzyme gene and Kawasaki disease[J]. Pediatr Cardiol, 2004, 25(5): 529-533
- [10] 纪玉晓, 张宏艳, 林书详. 川崎病患儿 FCGR2A 基因单核苷酸多态性的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(3): 196-200.
- [11] Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, et al. Polymorphism of SLC11A1 (NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease[J]. J Infect Dis, 2003, 187(2): 326-329.
- [12] Wang CL, Wu YT, Liu CA, et al. Expression of CD40 ligand on CD4⁺T cell and platelets correlated to the coronary artery lesion and disease progress in Kawasaki disease[J]. Padiatrics, 2003, 111(2): e140-e147.
- [13] Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, et al. CD40 ligand gene and Kawasaki disease[J]. Eur J Humgenet, 2004, 12(12): 1062-1068.
- [14] Rozin L, Koehler SA, Shakir A, et al. Kawasaki disease: a review of pathologic features of stage IV disease and two cases of sudden death among asymptotic young adults[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2003, 24(1): 45-50.

(本文编辑: 王庆红)

· 消息 ·

《国际儿科学杂志》2015 年度征稿征订启事

《国际儿科学杂志》(原刊名国外医学·儿科学分册)是中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办的国家级儿科学专业学术期刊,为中国科技论文统计源期刊,中国科技类核心期刊。曾荣获卫生部首届全国医药卫生优秀期刊二等奖、中华医学会系列杂志优秀期刊三等奖。主要栏目有述评、综述、论著、临床应用研究、名家讲坛、继续医学教育、教学查房等。报道内容涉及儿科各专业,是国内专门介绍国内外儿科学界最新进展的国家级医学学术期刊之一,所刊文章基本代表了国内外近 10 年来,特别是近 5 年儿科学术发展的水平。

杂志为大 16 开本,双月刊,单月 26 日出版,国内外公开发售,刊号为 CN21-1529/R,ISSN1673-4408。每期定价 12 元,全年 72 元。通过邮局发行,邮发代号 8-73。也可随时汇款至《国际儿科学杂志》编辑部,联系地址:沈阳市和平区三好街 36 号,邮编:110004。汇款时,请写清收件人的姓名、详细地址、邮编及所订杂志的期号和册数,不另寄邮费。

本刊网上投稿系统网址: <http://www.cma.org.cn/ywzx/ywzx.asp>; 联系电话: 024-23845727, 024-96615 转 13719; E-mail: gjekxzz@163.com

欢迎广大儿科医生及研究生积极投稿并订阅杂志!

《国际儿科学杂志》编辑部

2014 年 9 月 20 日