

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.03.007

论著·临床研究

儿童噬血细胞性淋巴组织细胞增生症 XIAP 基因突变筛查

欧丹艳¹ 罗建明¹ 袁媛²

(1. 广西医科大学第一附属医院儿科, 广西南宁 530021; 2. 福州儿童医院儿科, 福建福州 350001)

[摘要] **目的** 了解 X 连锁凋亡抑制因子 (XIAP) 基因突变和序列变异在儿童噬血细胞性淋巴组织细胞增生症 (HLH) 中的发生情况。**方法** 应用聚合酶链反应 (PCR) 结合直接测序方法, 对 2009 年 1 月至 2012 年 12 月诊断为 HLH 的 65 例患儿 (病例组) 及 70 例健康儿童 (对照组) XIAP 基因外显子 (1-1、1-2、2~6) 编码区进行序列分析。**结果** 在 HLH 患儿 XIAP 基因外显子编码区未发现突变; 仅在 XIAP 外显子 5 发现 1 个非同义单核苷酸多态性 (SNP) 位点 rs5956583, 但此 SNP 位点的基因型和等位基因频率在病例组和对照组之间的分布差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。**结论** 由 XIAP 基因突变导致的儿童 HLH 可能比较罕见; XIAP 基因 SNP 位点 rs5956583 可能与儿童 HLH 发病关系不大。 [中国当代儿科杂志, 2014, 16(3): 255-258]

[关键词] 噬血细胞性淋巴组织细胞增生症; XIAP 基因; 基因突变; 儿童

XIAP gene mutation screening in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis

OU Dan-Yan, LUO Jian-Ming, YUAN Yuan. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Luo J-M, Email: jmluo@aliyun.com)

Abstract: Objective To investigate the prevalence of mutations and sequence variations in X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) gene among Chinese pediatric patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). **Methods** Sixty-five children who were diagnosed with HLH between January 2009 and December 2012 (case group), as well as 70 healthy children (control group), were enrolled in the study. The exons of XIAP gene (1-1, 1-2, 2-6) were amplified by PCR and directly sequenced. The genotypic and allelic frequencies of single nucleotide polymorphism (SNP) were analyzed. **Results** None of the HLH patients showed mutations in these exons of XIAP gene. Only one nonsynonymous SNP, rs5956583 located in exon 5, was observed, but there were no significant differences in the genotypic and allelic frequencies of this SNP between the case and control groups ($P>0.05$). **Conclusions** HLH caused by XIAP mutations may be rare in children. SNP rs5956583 of XIAP gene may have little contribution to the development of childhood HLH.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(3): 255-258]

Key words: Hemophagocytic lymphohistiocytosis; XIAP gene; Gene mutation; Child

噬血细胞性淋巴组织细胞增生症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH) 是一种致命的因失控而无效的免疫应答所致的过度炎症反应疾病^[1]。该病好发于儿童, 表现为 T 细胞和巨噬细胞的过度增生和活化, 从而导致显著的高细胞因子血症^[2]。该病主要特征是 NK 细胞、CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞 (CTL) 毒性功能的下降甚至缺失^[3]。未

经治疗的 HLH 是致命的, 而即使获得积极的治疗, HLH 死亡率依然很高^[1]。HLH 包括原发性 HLH 和继发性 HLH 两种形式。原发性 HLH 通常发生于原发基因异常的患者, 目前已经证实的 9 个相关基因包括 PRF1、UNC13D、STX11、STXBP2、RAB27A、LYST、AP3B1、SH2D1A 以及 XIAP。其中 X 连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of

[收稿日期] 2013-08-03; [接受日期] 2014-01-26
[基金项目] 国家自然科学基金 (30860308; 81160070)。
[作者简介] 欧丹艳, 女, 博士研究生。
[通信作者] 罗建明, 男, 主任医师, 教授。

apoptosis, XIAP) 基因于2006年首次被发现与HLH有关^[4]。本研究采用直接测序技术,对65例HLH患儿进行XIAP基因突变筛查,并初步探讨基因型与临床表现之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2009年1月至2012年12月于广西医科大学第一附属医院儿科就诊的HLH患儿65例为研究对象,其中男37例,女28例;平均年龄6±4岁。HLH诊断及治疗标准为国际组织细胞协会推荐的HLH-2004方案^[3,5]。同时选取于我院行健康体检的儿童70例作为对照组,其中男40例,女30例;平均年龄6±3岁。两组间年龄、性别比较差异均无统计学意义(均P>0.05)。

1.2 主要试剂与仪器

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, 德国); 2×Master Mix (北京天根生化科技公司, 中国); 引物合成(上海生工生物工程技术有限公司, 中国); 多通道PCR扩增仪(PTC-220, 美国); 恒温水浴箱(DK-420, 中国); 电泳仪(DYY-86型, 中国); Gel Doc EQ凝胶成像系统(Bio-RAD, 美国); 序列分析仪(ABI3100 Genetic Analyzer, 美国)。

1.3 标本采集及基因组DNA提取

采集两组儿童的外周静脉抗凝血1 mL, 按

QIAamp DNA Blood Mini Kit说明书提取基因组DNA, 于-20℃冰箱保存。

1.4 引物设计

应用Primer及Oligo软件对人XIAP基因序列(GenBank序列号: NC_000023.10)进行引物设计, 具体引物序列见表1。

1.5 PCR步骤

PCR反应总体积为50 μL, 其中包含2×Master Mix 25 μL、10 μmol/L上下游引物各2 μL、DNA模板2 μL, 加ddH₂O至50 μL。反应条件: 94℃预变性4 min; 94℃变性30 s, 退火(温度参照表1)30 s, 72℃延伸30 s, 共35个循环; 72℃再延伸7 min。取5 μL PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳, 条件为100 V电泳35 min, 以1000 bp DNA Ladder为相对分子质量标准。将凝胶置于Gel成像系统进行成像并分析。

1.6 PCR产物测序

采用序列分析仪(ABI3100 Genetic Analyzer)对所有PCR产物进行直接测序, 测序结果与人XIAP基因序列(GenBank序列号: NC_000023.10)进行比对。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析, 基因型和等位基因频率采用率(%)表示, 组间比较采用四格表χ²检验和R×C列联表χ²检验, P<0.05为差异有统计学意义。

表1 扩增XIAP基因的引物序列

外显子	引物	序列(5' → 3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
exon1-1	Forward	GAATGTTTCTTAGCGGTCCTG	632	56
	Reverse	AGGGTTCTCGGGTATATGG		
exon1-2	Forward	AGTGCCACGCAGTCTACAAA	669	56
	Reverse	TTACCAGTTCAGGGGGCTAA		
exon 2	Forward	TGGGCAGTTTTATTTTTGTCTTC	388	56
	Reverse	CTGCATGCTATCCAACCTGC		
exon 3	Forward	TGGGATAGGGAATTGGGTAA	469	62
	Reverse	ACACTGCCCCAGCTAGCTCTC		
exon 4	Forward	GTTGCCCCAGTCACTCTAC	436	68
	Reverse	GCAGAGATTGCACTGAGCTG		
exon 5	Forward	CCTTGCATCGTTTCAAACAC	668	56
	Reverse	GAGCCTCCAAAAGTGTGAGAA		
exon 6	Forward	ATATCTCCGGCACTGTGTG	420	56
	Reverse	TTGCTAGCAAATGCTAATGGAA		

2 结果

2.1 XIAP 基因 PCR 产物

XIAP 基因 7 个外显子扩增后，经 2% 琼脂糖凝胶电泳后于凝胶成像分析仪观察，可见各外显子清晰整齐的条带，以 DNA marker 为参照，所扩增的产物均为所需目的条带，见图 1。

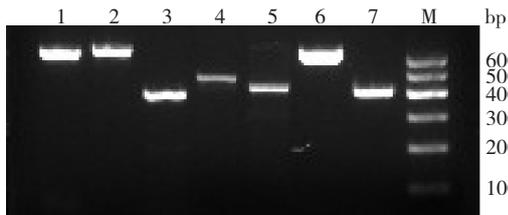


图 1 XIAP 基因 PCR 扩增产物电泳条带图 M: marker; 1~7 分别为外显子 1-1、1-2、2~6。

2.2 XIAP 基因序列分析

在对 XIAP 基因 7 个外显子的 PCR 扩增产物进行测序后，用 Chromas 软件和 GenBank 数据库中人 XIAP 基因序列进行比对，结果全部外显子编码区均未发现突变点。仅在外显子 5 发现 1 个非同义单核苷酸多态性 (SNP) 位点: rs5956583 (42009A>C)。

2.3 两组 rs5956583 基因型频率和等位基因频率比较

rs5956583 基因型频率和等位基因频率在 HLH 患儿和对照组间的分布差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)，见表 2。

表 2 两组 rs5956583 基因型和等位基因频率比较 [例 (%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		AA	CC	AC	A	C
对照组	70	60(86)	5(7)	5(7)	125(89)	15(11)
病例组	65	56(86)	5(8)	4(6)	116(89)	14(11)
χ^2 值			0.005		<0.001	
P 值			0.942		0.988	

3 讨论

XIAP 是凋亡抑制因子家族成员之一，其蛋白结构包含 3 个 BIR 区和 1 个 C 端的 RING 区。XIAP 最主要的生物学功能是抑制 caspase 活性而

达到抗凋亡的作用。此外，XIAP 还在其它多条信号通路中发挥作用，例如 NF- κ B、c-Jun N 端激酶 1、转化生长因子- β 、核酸结合齐聚区域蛋白以及 E3 泛素酶活性等^[6-10]。2006 年，Rigaud 等^[4]首次报道在 HLH 病人中发现 XIAP 基因突变。至今为止全世界共报道 49 例，来自 25 个无关家庭。病例报道来自欧洲 28 例、美国 12 例和日本 9 例。XIAP 基因定位于染色体 Xq25，全长约 54 Kb，含 6 个外显子，编码 497 个氨基酸。迄今，已发现能导致发病的 XIAP 基因突变 25 种，包括位移突变 8 种、无义突变 7 种、缺失突变 5 种及错义突变 5 种。在 XIAP 突变的 HLH 患者中可以检测到不同程度的 XIAP 蛋白表达下降甚至缺失。

原发性 HLH 包括家族性 HLH (FHL) 和其它免疫缺陷相关的 HLH。FHL 按照致病基因不同分为五个亚型: FHL1 (位于 9q21.3-22 的未知基因)、FHL2 (PRF1)、FHL3 (UNC13D)、FHL4 (STX11) 及 FHL5 (STXBP2)。此外还有其它未知基因参与了 HLH 的发生。据 Marsh 等^[11]报道，XIAP 基因突变患者有 90% 发生 HLH，且 50% 的患者有阳性家族史，认为该病应该定义为 X 连锁的 FHL 更为准确，并建议在 HLH 患者中筛选 XIAP 基因突变患者。过去通常认为 EB 病毒感染是 HLH 的触发点，但 XIAP 基因突变患者中却不一定发生 EBV 感染，提示也许存在着其他不明抗原刺激能够诱发 XIAP 表现型的发生^[12]。

据报道，FHL 各亚型的发病率在不同民族之间有不同。Molleran 等^[13]报道在日本 FHL3 发病率几近等于或略高于 FHL2。Zur 等^[14]报道在德国 FHL2 与 FHL3 发病率相等，在 FHL 中约占 25%。有相当多的 FHL2 病例报道来自非裔美国人、白人、西班牙人以及亚洲人，但到目前为止在美国人中尚未见 FHL3 病例的报道。在土耳其人中，FHL 的主要亚型是 FHL2，而 STX11 基因突变所致的 FHL4 型也出现在该民族；与之相反的是，在非土耳其人包括中国人中尚未发现 FHL4 型^[14]。目前尚无各民族 HLH 病例 XIAP 突变发生率的确切数据统计，但推测其很可能与其它类型 HLH 类似，即该基因突变在原发性 HLH 所占比例亦随民族不同而各异。本研究对 65 例中国 HLH 患儿进行了 XIAP 基因突变检测，在外显子编码区未发现任何致病突变，表明 XIAP 基因突变可能仅限于特定的

民族和地域。此外,也不排除部分由于非编码区异常导致的蛋白表达下降,可待进一步蛋白水平的研究,如流式细胞术检测 XIAP 蛋白表达水平等。

FHL 年发病率约 0.12/10 万,若未经治疗其中位生存期仅 2 个月。研究已经发现了影响该病发生发展及预后的诸多因素,其中基因异常是重要的因素之一^[15]。本研究在该组人群发现了 1 个位于编码区的 SNP 位点 rs5956583。此前曾有报道该 SNP 与特发性周期性发热易感性相关,423Q 携带者与高分泌的促炎因子 TNF- α 有关^[16]。本研究首次在中国儿童中进行 XIAP 基因 rs5956583 (42009A>C) 分型,检测到 AA、CC、AC 三种基因型均在该人群中占有一定比例。但未发现各基因型与儿童 HLH 易感性的明显关系,提示其可能并不参与儿童 HLH 的发病过程。未来还需要更多的对 XIAP 其它多态性位点的研究,以期发现能够揭示儿童 HLH 易感性、治疗效果及预后有意义的分子生物学标志。

[参 考 文 献]

- [1] Janka GE. Hemophagocytic syndromes[J]. *Blood Rev*, 2007, 21(5): 245-253.
- [2] Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and related disorders[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006, 6(6):410-415.
- [3] Henter JI, Horne AC, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2007, 48(2): 124-131.
- [4] Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome[J]. *Nature*, 2006, 444(7115): 110-114.
- [5] 中华医学会儿科学分会血液学组. 噬血细胞性淋巴组织细胞增生症诊疗建议 [J]. *中华儿科杂志*, 2012, 50(11): 821-825.
- [6] Lewis J, Burstein E, Reffey SB, et al. Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 9023-9029.
- [7] Birkey Reffey S, Wurthner JU, Parks WT, et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 26542-26549.
- [8] Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Stehlik C, et al. Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 22064-22068.
- [9] Krieg A, Correa RG, Garrison JB, et al. XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(34): 14524-14529.
- [10] Bauler LD, Duckett CS, O'Riordan MX. XIAP regulates cytosol-specific innate immunity to *Listeria* infection[J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(8): e1000142.
- [11] Marsh RA, Madden L, Kitchen BJ, et al. XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease[J]. *Blood*, 2010, 116(7): 1079-1082.
- [12] Filipovich AH, Zhang K, Snow AL, et al. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? [J]. *Blood*, 2010, 116(18): 3398-3408.
- [13] Molleran Lee S, Villanueva J, Sumegi J, et al. Characterization of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *J Med Genet*, 2004, 41(2): 137-144.
- [14] Zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11[J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(6): 827-834.
- [15] 陆文娴, 罗建明. 儿童噬血细胞性淋巴组织细胞增生症的预后因素分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(8): 593-597.
- [16] Ferretti M, Gattorno M, Chiocchetti A, et al. The 423Q polymorphism of the X-linked inhibitor of apoptosis gene influences monocyte function and is associated with periodic fever[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2009, 60(11): 3476-3484.

(本文编辑: 万静)