

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.07.004

论著·临床研究

不完全川崎病患儿遗传易感性研究

金向群¹ 刘玘² 张秋萍¹

(1. 武汉大学基础医学院, 湖北 武汉 430071; 2. 武汉大学中南医院, 湖北 武汉 430071)

[摘要] **目的** 分析2个与川崎病(Kawasaki disease, KD)相关的基因CD40基因及BLK基因位点在不完全KD中的单核苷酸多态性(SNP)分布特点,并探讨其与不完全KD的遗传易感性以及临床表型的相关性。**方法** 采用病例对照研究方法,选取184例不完全KD患儿和203例体检正常儿童作为研究对象。利用限制性片段长度多态性分析的方法测定CD40基因及BLK基因SNP位点多态性分布,比较两组其SNP位点基因型分布,并分析其基因多态性与不完全KD临床特点的相关性。**结果** 患儿CD40基因SNP位点(rs1569723)的3种基因型(AA, AC, CC)频率及等位基因频率与对照组相比差异均无统计学意义。BLK基因SNP位点(rs2736340)的基因型频率与对照组相比差异有统计学意义($P=0.031$),且KD组T等位基因频率明显高于对照组($P=0.007$)。CD40基因SNP位点(rs1569723)3种不同基因型患儿结膜充血的比例差异有统计学意义($P=0.036$);而BLK基因中SNP位点(rs2736340)的多态性与患儿四肢末端改变相关($P=0.017$)。**结论** BLK基因SNP位点(rs2736340)与不完全KD的易感性相关;BLK基因SNP位点(rs2736340)及CD40基因SNP位点(rs1569723)多态性与部分临床表型相关。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(7): 663-667]

[关键词] 不完全川崎病;单核苷酸多态性;遗传易感性;儿童

Genetic susceptibility in children with incomplete Kawasaki disease

JIN Xiang-Qun, LIU Pin, ZHANG Qiu-Ping. School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China (Zhang Q-P, Email: qpzhang@whu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the frequency distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in two genes associated with incomplete Kawasaki disease (KD) (rs1569723 in CD40 gene and rs2736340 in BLK gene), and to investigate its association with the genetic susceptibility and clinical phenotypes of incomplete KD. **Methods** A total of 184 children with incomplete KD and 203 normal children were recruited to carry out a case-control study. The genotypes of SNPs in CD40 gene and BLK gene were determined using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. The frequency distribution of genotypes was compared between the KD and control groups. The association between gene polymorphisms and clinical features of incomplete KD was analyzed. **Results** There were no significant differences in genotype (AA, AC, CC) and allele frequencies in CD40 SNP rs1569723 between the KD and control groups. There were significant differences in the frequency distribution of three genotypes (TT, CT, CC) in BLK SNP rs2736340 between the KD and control groups ($P=0.031$), and the KD group had a significantly higher frequency of T allele than the control group ($P=0.007$). There were significant differences in the incidence of conjunctival hyperaemia among the patients with different genotypes (rs1569723 in CD40 gene) ($P=0.036$). The SNP rs2736340 in BLK gene was associated with the extremity changes in KD patients ($P=0.017$). **Conclusions** The SNP rs2736340 in BLK gene is associated with the susceptibility to incomplete KD, and the SNP rs1569723 in CD40 gene and SNP rs2736340 in BLK gene are associated with some of clinical phenotypes of incomplete KD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(7): 663-667]

Key words: Incomplete Kawasaki disease; Single nucleotide polymorphism; Genetic susceptibility; Child

[收稿日期] 2015-03-31; [接受日期] 2015-05-23

[作者简介] 金向群,女,硕士研究生。

[通信作者] 张秋萍,女,教授。

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, 临床表现为发热、口腔黏膜病变、颈部淋巴结肿大等症状, 其诊断主要依据患儿发热 ≥ 5 d, 至少具有5项主要临床特征的4项^[1]。但临床上可见到一部分患儿临床特征少于典型KD患儿, 被称为不完全KD, 其定义为: 患儿具有不明原因发热 ≥ 5 d, 但在其他5项临床特点中仅具有2项或3项, 并存在超声心动图异常 (冠状动脉扩张、冠状动脉瘤、左心室功能下降等), 但在疾病的早期患者可能未见超声心动图异常, 则需要根据临床生化指标 (血沉、CRP等) 初步诊断; 并且要排除猩红热、药物过敏、Stevens-Johnson综合征等疾病^[2-3]; 其发生率约占所有KD的10%~36%^[4-5]。全基因组关联分析研究表明, CD40基因以及BLK基因可能与典型KD的易感性相关^[6]。本研究以我国中部地区不完全KD患儿为研究对象, 探讨CD40基因以及BLK基因的多态性与不完全KD及其临床特点的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2008年1月至2014年6月来武汉大学中南医院就诊的184例不完全KD患儿为KD组; 选取203名同时期在中南医院体检正常的儿童作为对照组, 排除了各系统的疾病。KD组与对照组均是来自湖北武汉及周边地区的汉族儿童。患儿不完全KD的诊断符合美国心脏病学会2004年制定的不完全KD的诊断方法, 并结合国内专家制定的评估方法^[2-3]。

KD组184例患儿中, 男119例, 女65例, 年龄5个月至7岁10个月, 中位年龄1.9岁 (四分位间距: 1.1~3.9岁); 患儿热程均 ≥ 5 d (范围5~11 d); 其中有皮疹症状的患者88例 (47.8%), 结膜充血患者128例 (69.6%); 淋巴结肿大的患儿60例 (32.6%)。四肢末端改变的患儿119例 (64.7%), 口唇变化的患儿112例 (60.8%), 冠状动脉损伤的患儿49例 (26.6%)。同时具有以上2种临床特点的患儿80例 (43.5%), 同时具有3种临床特点的104例 (56.5%)。

对照组203例儿童中, 男133例, 女70例,

年龄10个月至8岁, 中位年龄2.1岁 (四分位间距: 1.2~3.7岁)。年龄和性别比例与KD组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

本研究得到两组儿童家属知情同意以及中南医院医学伦理委员会的批准。

1.2 基因多态性分析

抽取KD患儿初诊时及正常对照儿童体检时的外周静脉血2 mL, 利用酚氯仿抽提以及乙醇沉淀的方法提取基因组DNA。以DNA为模版分别扩增含有SNP位点的DNA片段。扩增CD40基因片段 (rs1569723) 的引物分别为F1: AGAACTCGCTTTACACCCAGAGCT, R1: CCATGAGGGACTTCCTTTGAATTTC。扩增BLK基因片段 (rs2736340) 的引物分别为F2: CCCATCGCATTGTATATGTACCG, R2: CAGGGATGCTGATTCTAAGGCATG。所有引物均由华大基因公司合成。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公司Taq酶1 U。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 30 s 变性, 54 $^{\circ}$ C 30 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 30 s 延伸, 共34个循环。分别取5 μ L扩增的产物利用限制性内切酶SacI以及DpnII进行酶切电泳分析。

1.3 统计学分析

利用SPSS 19.0统计软件对数据进行分析处理, 利用Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验KD组及对照组是否具有群体代表性。各组基因型频率和等位基因频率采用频数和百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验。年龄呈非正态分布, 采用中位数 (四分位间距) 表示, 两组间比较采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组SNP位点基因型分布及比较

KD组和对照组儿童均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律, 说明纳入的两组儿童具有群体代表性。两个SNP位点多态性确定如图1所示, 含有SNP位点rs1569723的3种基因型分别为AA、CC、AC; SNP位点rs2736340的3种基因型分别为TT、CT、CC。两组两个SNP位点3种基因型分布见表1。统计结果显示KD组BLK基因SNP位

点 (rs2736340) 的3种基因型 (TT、CT、CC) 分布与对照组相比差异具有统计学意义 ($P=0.031$), 且T等位基因与不完全KD易感性相关 ($P=0.007$);

而两组CD40基因SNP位点 (rs1569723) 3种基因型 (AA、CC、AC) 分布及等位基因分布差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表1。

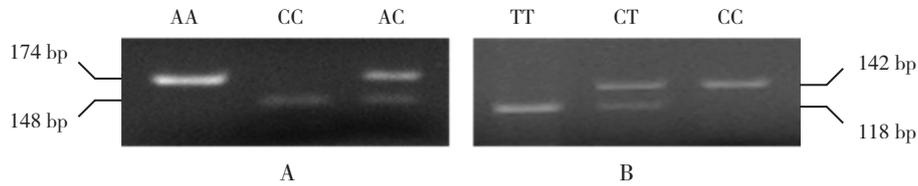


图1 SNP位点基因型 A: SNP位点rs1569723的3种基因型为AA、CC和AC; B: SNP位点rs2736340的3种基因型为TT、CT和CC。

表1 两组两个SNP位点的基因型分布 [n(%)]

组别	例数	CD40 rs1569723			BLK rs2736340				
		AA	AC	CC	A	TT	CT	CC	T
对照组	203	98(48.3)	81(44.0)	24(7.7)	277(68.2)	111(54.7)	71(34.9)	21(10.4)	293(72.2)
KD组	184	99(53.8)	67(36.4)	18(9.8)	265(72.0)	124(67.9)	49(26.6)	11(5.5)	297(80.7)
χ^2 值			1.257		1.317		6.961		7.303
OR(95%CI)		1.347 (0.688~2.637)	1.103 (0.552~2.202)	1.000	1.198 (0.880~1.632)	2.133 (0.984~4.621)	1.318 (0.585~2.977)	1.000	1.613 (1.151~2.262)
P值			0.533		0.251		0.031		0.007

2.2 基因多态性与不完全KD临床特点的相关性分析

CD40基因SNP位点 (rs1569723) 3种不同基因型患儿结膜充血的比例差异有统计学意义 ($P=0.036$), 见表2; 而BLK基因SNP位点

(rs2736340) 的多态性与患儿四肢末端改变相关 ($P=0.017$), 见表3。CD40基因的SNP位点 (rs1569723) 与BLK基因SNP位点 (rs2736340) 的多态性均不与冠状动脉损伤相关 ($P>0.05$), 见表4。

表2 CD40基因SNP位点 (rs1569723) 基因多态性与不完全KD临床特点的相关性 [n(%)]

基因型分组	例数	皮疹	结膜充血	淋巴结肿大	四肢末端改变	口唇变化
AA	99	50(50.5)	74(74.7)	35(35.4)	68(68.7)	63(63.6)
AC	67	32(47.8)	46(68.6)	20(29.8)	43(64.2)	39(58.2)
CC	18	6(33.3)	8(44.4)	5(27.8)	8(44.4)	10(55.6)
χ^2 值		1.801	6.647	0.762	3.929	0.731
P值		0.407	0.036	0.683	0.141	0.694

表3 BLK基因SNP位点 (rs2736340) 基因多态性与不完全KD临床特点的相关性 [n(%)]

基因型分组	例数	皮疹	结膜充血	淋巴结肿大	四肢末端改变	口唇变化
TT	124	57(45.9)	88(70.9)	43(34.7)	86(69.4)	78(62.9)
CT	49	25(51.0)	35(71.4)	14(28.6)	30(61.2)	29(59.2)
CC	11	6(54.5)	5(45.5)	3(27.3)	3(27.3)	5(45.5)
χ^2 值		0.571	3.216	0.747	8.179	1.371
P值		0.752	0.201	0.688	0.017	0.504

表 4 两个 SNP 位点与冠状动脉损伤的相关性 [n (%)]

组别	例数	CD40 rs1569723			BLK rs2736340		
		AA	AC	CC	TT	CT	CC
冠状动脉损伤	49	30(61.2)	15(30.6)	4(8.2)	33(67.3)	14(28.6)	2(4.1)
无冠状动脉损伤	135	69(51.1)	52(38.5)	14(10.4)	91(67.4)	35(25.9)	9(6.7)
χ^2 值			1.481			0.495	
P 值			0.477			0.781	

3 讨论

KD 是一种急性、免疫性、血管炎性的疾病，主要侵犯大中血管，冠状动脉损伤是其主要的并发症。不完全 KD 是一种不能完全满足 KD 的诊断标准，仅具有部分典型 KD 的临床特点，目前不完全 KD 没有诊断的金标准，日本与美国的诊断方法也存在差异^[5,7]。不完全 KD 与 KD 的病因与发病机制相同，但仍不完全清楚，遗传因素在该病的发病过程中起着重要作用^[8]。

BLK 基因为编码络氨酸激酶 BLK 蛋白，该蛋白是 src 络氨酸激酶家族成员之一，BLK 的功能目前并不十分清楚，但有研究人员推断：BLK 把信号转导至 B 细胞受体下游激活核转录因子，BLK 基因表达水平可能影响 B 细胞的耐受机制，从而导致免疫性疾病的发生^[9]。

本研究结果显示，不完全 KD 的 BLK 基因 SNP 位点 (rs2736340) TT 基因型的比例及 T 等位基因频率显著高于对照组，提示 BLK 基因 SNP 位点 (rs2736340) 与不完全 KD 的易感相关。该位点位于 BLK 基因的上游，可能调控该基因的表达，导致自身免疫紊乱；且有研究表明该位点与典型 KD 的易感性相关^[6]，说明典型 KD 与不完全 KD 的致病机制具有一致性。

CD40 基因位于 20q12-q13.2 区域，编码 TNF 受体超家族成员 5，参与炎症应答、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过程^[10]；且 CD40L 基因与 KD 的易感性相关^[11]。因此 CD40 基因的突变或者表达量的变化可能影响该通路的应答过程，从而导致 KD 或不完全 KD 的发生。本研究显示 CD40 基因的 SNP 位点 (rs1569723) 的多态性与不完全 KD 的易感性不相关，提示该多态性不影响不完全 KD 患者 CD40 基因的表达量，进而对该基因参与的信号通

路不产生影响。而 Lee 等^[6]全基因组关联分析发现 CD40 基因该位点与典型 KD 的易感性相关；国内亦有研究发现汉族人群中该位点多态性与 KD 易感性相关^[12]。因此，推测典型 KD 与不典型 KD 的病因或病理过程可能存在一定的差异。

与典型 KD 患儿一样，部分不完全 KD 患儿也存在皮疹、结膜充血、口唇变化以及四肢末端改变等症^[13]。本研究发现 CD40 基因多态性 (rs1569723) 与结膜充血症状相关，推测可能的原因是：结膜充血常见于炎症反应；CD40 为 CD40-CD40L 信号通路中的重要组成部分，而该信号通路在炎症反应中发挥着重要作用，CD40 基因的多态性影响了该信号通路，虽然对信号通路的影响没有导致不完全 KD 的发生，但该多态性可能影响下游炎症因子的水平，从而导致结膜充血的发生。而 BLK 基因的多态性与不完全 KD 患儿四肢末端改变等症^[13]相关，推测可能由于该基因参与炎症以及自身免疫应答过程所致。此外，本研究显示两个 SNP 位点的多态性均不与冠状动脉损伤的易感性相关，但本研究病例数较少，结论需要进一步验证。

综上所述，在汉族人群中 BLK 基因 SNP 位点 (rs2736340) 与不完全 KD 的易感相关，并且发现该多态性与患儿四肢末端改变相关；CD40 基因多态性 (rs1569723) 与患儿结膜充血症状相关。本研究结果对临床医生更好地认识不完全 KD 的发病机制，减少并发症的发生提供帮助。但本研究仍存在一定的缺陷：样本量小，单中心研究，因此研究结果需要多中心合作、更大的样本量来验证。

[参 考 文 献]

[1] Ogiwara Y, Ogata S, Nomoto K, et al. Transcriptional regulation by infliximab therapy in Kawasaki disease patients with

- immunoglobulin resistance[J]. *Pediatr Res*, 2014, 76(3): 287-293.
- [2] Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association[J]. *Circulation*, 2004, 110(17): 2747-2771.
- [3] 黄敏, 杨晓东. 不完全川崎病的诊断与治疗 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2008, 23(1): 76-78.
- [4] 张乾忠. 不典型川崎病的临床表现和诊断 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2006, 21(10): 728-730.
- [5] Sánchez-Manubens J, Bou R, Anton J. Diagnosis and classification of Kawasaki disease[J]. *J Autoimmun*, 2014, 48-49: 113-117.
- [6] Lee YC, Kuo HC, Chang JS, et al. Two new susceptibility loci for Kawasaki disease identified through genome-wide association analysis[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(5): 522-525.
- [7] Sudo D, Monobe Y, Yashiro M, et al. Coronary artery lesions of incomplete Kawasaki disease: a nationwide survey in Japan[J]. *Eur J Pediatr*, 2012, 171(4): 651-656.
- [8] Rowley AH. Kawasaki disease: novel insights into etiology and genetics susceptibility[J]. *Annu Rev Med*, 2011, 62(2): 69-77.
- [9] Peter KG, Chistopher I, Annette TL, et al. REL, encoding a member of the NF-B family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(7): 820-823.
- [10] Lezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, et al. CD40-CD40L cross talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4⁺ T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 876-881.
- [11] Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, et al. CD40L gene and Kawasaki disease[J]. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12(12): 1062-1068.
- [12.] 董启忠, 张超, 李月茹. CD40 基因多态性与川崎病及其临床特点的相关性分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2014, 32(8): 760-762.
- [13] Miller MM, Miller AH. Incomplete Kawasaki disease[J]. *Am J Emerg Med*, 2013, 31(5): e5-37.
- (本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

新生儿颅脑超声诊断学习班通知

为提高对围产期脑损伤及其他中枢神经系统疾病的诊断水平,充分利用已有的医疗资源,推广颅脑超声检查诊断技术,北京大学第一医院儿科按计划于2015年8月25日至8月29日举办为期5天的新生儿颅脑超声诊断学习班。本班属国家级教育项目,授课教师为本科及北京市著名专家教授。学习结束授予10学分。主要授课内容包括:中枢神经系统解剖;新生儿不同颅脑疾病超声诊断;胎儿中枢神经系统的超声诊断;鉴别诊断。招收学员对象:儿科新生儿专业医师,超声专业医师及技师。学费:1300元。报名截止日期2015年8月8日(上课前2周)。

网上报名方法:

1. 登录北医继教管理系统 <http://jjgl.bjmu.edu.cn> 点击“项目报名”进入网站报名项目列表。
2. 选择“新生儿颅脑超声诊断学习班”项目,点击右侧“报名入口”,进入报名界面。
3. 逐项填写完个人信息后,点击“保存”。

网上报名同时联系北京大学第一医院,索要正式通知。

联系方式:北京大学第一医院儿科(邮编100034)王红梅、刘黎黎。电话:010-83573461或83573213。

Email: bdy2002@163.com。我们将在开班前2个月寄去正式通知。

北京大学第一医院儿科

2015年2月11日