doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.04.004

论著·临床研究

血小板活化因子乙酰水解酶基因多态性与过敏性紫癜消化道出血的相关性研究

王宝香¹ 梅红¹ 彭罕鸣¹ 高源¹ 丁艳²

(华中科技大学同济医学院附属武汉市儿童医院 / 武汉市妇幼保健院

1. 消化内科; 2. 风湿免疫科, 湖北 武汉 430016)

[摘要] **目的** 从基因水平探讨血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)基因第9号外显子Val297Phe单核苷酸多态性与过敏性紫癜(HSP)消化道出血的关系。**方法** 选取516例HSP患者,其中合并消化道出血的182例、非消化道出血的334例,应用聚合酶链式反应(PCR)检测Val279Phe多态性位点的基因型及等位基因分布情况,并测定血浆PAF-AH活性、血小板活化因子(PAF)、 α 颗粒膜糖蛋白140(GMP-140)、 β -血小板球蛋白(β -TG)和血小板第4因子(PF4)的水平。**结果** Val279Phe基因型及等位基因频率分布符合Hardy-Weinberg平衡,纯合突变基因型TT占0.97%、杂合子占6.05%。等位基因频率在消化道出血组为5.22%,明显高于对照组(3.33%),差异有统计学意义($P<0.01$)。合并消化道出血的GG基因型HSP患者的血浆PAF和GMP-140水平高于非出血组($P<0.05$),PAF-AH活性以非出血组较高($P<0.01$),而 β -TG和PF4在两组间的差异没有统计学意义($P>0.05$)。**结论** PAF-AH Val279Phe基因多态性与血浆PAF-AH活性、PAF及GMP-140水平有关,PAF-AH Val279Phe基因多态性可能是HSP合并消化道出血的一个风险因素。

[中国当代儿科杂志, 2017, 19(4): 385-388]

[关键词] 过敏性紫癜; 消化道出血; 血小板活化因子乙酰水解酶; 多态性; 儿童

Association between platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphisms and gastrointestinal bleeding in children with Henoch-Schönlein purpura

WANG Bao-Xiang, MEI Hong, PENG Han-Ming, GAO Yuan, DING Yan. Department of Gastroenterology, Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, China (Email: dingyanrh@126.com)

Abstract: Objective To study the association between the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the ninth exon Val279Phe of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) gene and gastrointestinal bleeding in children with Henoch-Schönlein purpura (HSP). **Methods** A total 516 children with HSP were enrolled, among whom 182 had gastrointestinal bleeding and 334 had no gastrointestinal bleeding. PCR was used to investigate the distribution of genotypes and alleles in the SNPs of Val279Phe. The plasma PAF-AH activity was measured, as well as the levels of platelet-activating factor (PAF), granular membrane protein-140 (GMP-140), β -thromboglobulin (β -TG), and platelet factor 4 (PF4). **Results** The Val279Phe genotype and allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium, and the homozygous genotype TT and heterozygotes accounted for 0.97% and 6.05% respectively. The gastrointestinal bleeding group had a significantly higher allele frequency than the control group (5.22% vs 3.33%; $P<0.01$). The HSP patients with GG genotype in the gastrointestinal bleeding group had significantly higher levels of plasma PAF and GMP-140 than those in the non-gastrointestinal bleeding group ($P<0.05$), while the non-gastrointestinal bleeding group had a significantly higher PAF-AH activity than the gastrointestinal bleeding group ($P<0.05$). There were no significant differences in β -TG and PF4 between the two groups ($P>0.05$). **Conclusions** Val279Phe gene polymorphisms in PAF-AH are associated with PAF-AH activity and PAF and GMP-140 levels and may be a risk factor for HSP with gastrointestinal bleeding.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(4): 385-388]

Key words: Henoch-Schönlein purpura; Gastrointestinal bleeding; Platelet-activating factor acetylhydrolase; Polymorphism; Child

[收稿日期] 2016-10-09; [接受日期] 2017-01-30

[作者简介] 王宝香,女,硕士,副主任医师。

[通信作者] 丁艳,女,主任医师。

过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura, HSP) 是儿童时期最常见的一种自身免疫性系统性血管炎性疾病, 主要表现为非血小板减少性紫癜、关节炎、腹痛, 或者胃肠道出血以及肾脏损害^[1], 在学龄前儿童多见, 其中 20% 的患儿发生消化道出血。由于发病机制不明确, 主要采用对症治疗, 疗效欠佳。血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 可诱导血小板和中性粒细胞聚集, 促使细胞产生趋化性, 调节白介素分泌。经血小板活化因子乙酰水解酶 (platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH) 水解后失去生物活性, 所以 PAF-AH 的浓度直接影响 PAF 活性。近年来研究发现, PAF-AH 基因多态性与 PAF-AH 的表达水平密切相关, 而且 PAF 及 PAF-AH 水平与肾脏损害相关^[2-3], 但是关于 PAF-AH 活性及其基因多态性与 HSP 消化道症状的关系尚未见报道。本研究拟分析 PAF-AH 基因多态位点 Val279Phe (G>T) 及 PAF 和血小板活化标志物 α 颗粒膜糖蛋白 140 (platelet α -granule membrane glycoprotein-140, GMP-140)、 β -血小板球蛋白 (β -thromboglobulin, β -TG) 和血小板第 4 因子 (platelet factor, PF4) 水平与过敏性紫癜消化道出血的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2012 年 3 月至 2014 年 12 月武汉市儿童医院确诊的 HSP 患儿 516 例作为研究对象, 均符合 2006 年欧洲抗风湿病联盟 / 欧洲儿科风湿协会的 HSP 诊断标准^[4], 且排除血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、肝脏疾病等全身性疾病。根据患儿是否呕血、便血以及大便潜血试验分为消化道出血组和非消化道出血组, 本研究分类不考虑肾脏及关节累及情况。

收集所有患儿的一般资料包括性别、年龄、临床症状、相关病史等。

本研究获患儿监护人知情同意及医院伦理委员会批准。

1.2 基因组 DNA 提取

所有 HSP 患者入院次日采集空腹静脉抗凝血 5 mL, 分离血浆于 -20°C 保存待检测。并提取样本基因组 DNA, -20°C 保存。

1.3 血浆 PAF、GMP-140、 β -TG 及 PF4 检测

采用 ELISA 方法检测所有患儿血浆 PAF、GMP-140、 β -TG 及 PF4 水平, 试剂由美国 Rapidbio 公司和武汉优尔生有限公司提供。

1.4 PAF-AH 活性测定

对 82 例患儿采用 PAF-AH 活性检测试剂盒 (Cayman Chemical 公司, 美国) 进行血浆 PAF-AH 活性测定。操作根据试剂盒说明书进行。酶标仪读取不同时间 (1、5、10、15、20、25、30 min) 各样本在 405 nm 波长下的吸光度值 (A405), 计算各样本 PAF-AH 活性。

1.5 PAF-AH 基因 Val279Phe 多态位点检测

利用引物 (5'-TGGGTAACAAGAATGAGG-3' 和 5'-TCTTCTAACACCACGAAAT-3') 通过 PCR 分别扩增包含 Val279Phe 的基因片段, 产物长度为 384 bp, 限制性内切酶 AclI 在 37°C 消化, 2% 琼脂糖胶电泳, 紫外灯下观察结果并确定基因型: 纯合子 TT 为 109bp、275bp 两条带; 纯合子 GG 只有 384bp 一条带; 而杂合子 GT 显示 109bp、275bp 和 384bp 三条带。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。利用频率计数法计算各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的比较采用卡方检验, 等位基因频率的比较采用 Z 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共纳入 516 例患儿, 男 309 例、女 207 例; 平均年龄 6.8 ± 2.6 岁 (1.1~14.2 岁); 其中表现为肾脏损害者 212 例 (41.1%), 关节痛症状者 163 例 (31.6%), 腹痛的 298 例 (57.8%), 消化道出血的 182 例 (35.3%)。

2.2 两组患儿的血小板活化标志物水平比较

与非消化道出血组比较, 消化道出血组的血浆 PAF 及 GMP-140 水平显著增高 (P<0.05); 而两组间 β -TG 及 PF4 水平差异无统计学意义 (P>0.05)。见表 1。

表 1 两组血浆 PAF、GMP-140、β-TG 和 PF4 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PAF (ng/L)	GMP-140 (μg/L)	β-TG (μg/L)	PF4 (μg/L)
非消化道出血组	334	105 ± 15	29 ± 21	35 ± 19	33 ± 18
消化道出血组	182	122 ± 22	34 ± 12	37 ± 23	35 ± 28
<i>t</i> 值		14.21	16.54	1.88	0.47
<i>P</i> 值		0.024	0.019	0.154	0.361

注: [PAF] 血小板活化因子; [GMP-140] 血小板活化标志物 α 颗粒膜糖蛋白 140; [β-TG] β-血小板球蛋白; [PF4] 血小板第 4 因子。

2.3 两组患儿的 PAF-AH 活性比较

与非消化道出血组相比, 消化道出血组的血浆 PAF-AH 水平较低 [40 ± 31 nmol/(min · mL) vs 45 ± 24 nmol/(min · mL)], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 Val279Phe 基因型 (GG、GT、TT) 分布情况

Val279Phe 基因型及等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡, 具有群组代表性, 其中纯合突变基因型 TT 占 0.97%, 杂合子占 6.05%。三种基因型 GG、GT 和 TT 的分布在消化道出血组 (182 例) 和非出血组 (334 例中 4 例未扩增出来) 的差异没有统计学意义 ($P = 0.296$), 见表 2。T 等位基因频率在出血组为 5.22%, 高于对照组 (3.33%), 差异具有统计学意义 ($Z = 5.95, P < 0.01$)。

表 2 两组基因型比较 [例 (%)]

组别	例数	基因型		
		GG 型	GT 型	TT 型
非消化道出血组	330	311(94.2)	16(4.85)	3(0.09)
消化道出血组	182	165(90.7)	15(8.24)	2(1.10)
χ^2 值		2.44		
<i>P</i> 值		0.296		

2.5 消化道出血组 Val279Phe 基因型与各生化指标的关系

由于 TT 基因型患者数目较少, 所以并入 GT 组比较 GG 基因型和 GT+TT 基因型与各生化指标的关系。T 等位基因携带者 (GT 和 TT 基因型) 的血浆 PAF 和 GMP-140 水平高于野生型 (GG 基因型) ($P < 0.05$), 两组间 β-TG 和 PF4 表达的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。PAF-AH 活性在 T 等位基因携带者 (GT 和 TT 基因型) 低于 GG

基因型患者 [44 ± 30 nmol/(min · mL) vs 48 ± 27 nmol/(min · mL)], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 消化道出血组不同基因型患者的血浆 PAF、GMP-140、β-TG 和 PF4 比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	PAF (ng/L)	GMP-140 (μg/L)	β-TG (μg/L)	PF4 (μg/L)
GG 型	165	103 ± 36	28 ± 18	36 ± 26	34 ± 28
GT+TT 型	17	127 ± 65	38 ± 24	36 ± 24	35 ± 21
<i>t</i> 值		8.61	34.21	0.015	5.23
<i>P</i> 值		0.037	0.009	0.49	0.06

注: [PAF] 血小板活化因子; [GMP-140] 血小板活化标志物 α 颗粒膜糖蛋白 140; [β-TG] β-血小板球蛋白; [PF4] 血小板第 4 因子。

3 讨论

HSP 是累及全身小血管的变态反应性疾病, 如累及胃肠黏膜毛细血管可出现各种消化道症状, 包括腹痛、呕吐和消化道出血, 甚至少数患儿以消化道出血为首发症状, 但是引起消化道出血的具体机制不清楚。

PAF 是一种具有广泛生物活性的炎性介质, 中性粒细胞、单核巨噬细胞、肥大细胞、血小板和内皮细胞等在一定条件下均可产生, 并促进血小板和中性粒细胞聚集, 刺激这些细胞产生肿瘤坏死因子、白介素、前列腺素、血管内皮生长因子等, 引起血管扩张或血管内皮细胞通透性增加, 促进水肿发生, 引起粘膜微循环障碍而发生坏死、出血和溃疡^[5]。PAF 还可刺激胃壁细胞分泌胃酸, 加重对胃粘膜的损害; PAF 通过活化花生四烯酸类物质的代谢促进氧自由基产生, 氧自由基与胞膜上的酶及受体进行共价结合, 或直接引起胞膜多聚未饱和脂肪酸过氧化而影响膜结构, 致使膜的孔隙扩大、通透性增加, 毛细血管内皮细胞损伤, 加重炎症反应, 导致细胞广泛性损害和病变^[6-8]。

PAF 在 PAF-AH 作用下水解乙酰基团后产生无活性的 lyso-PAF。PAF-AH 对 PAF 的水解能力决定了 PAF 在血浆和组织中的水平^[9]。PAF-AH 基因位于 6 号染色体, 由 12 个外显子组成。近年研究发现, 人血浆型 PAF-AH 基因存在多个位点突变类型, 在西欧人主要为第 4、7、11 号外显子的 G275A、T539C 和 T1136C 错义突变^[10], 而东亚人主要为第 9 号外显子的 Val279 Phe 突变, 该位点

位于 PAF-AH 的催化结构域内,是蛋白质适当折叠保持活性的关键。早在 1996 年,Stafforini 等^[11]发现日本人 Val279Phe 位点突变导致 PAF-AH 催化活性降低(杂合突变)或丧失(纯合突变),使 PAF 降解减少。此后在不同种族展开较多关于 PAF-AH 及 Val279Phe 的研究,以在心脑血管疾病的研究较多,认为是成人脑血管病的独立危险因素。有报道显示,该多态位点与过敏、多囊肾等疾病有关,而且 PAF 和 PAF-AH 及其基因型与 HSP 或 HSP 合并肾脏损害的关系也有报道^[12-13]。陆彪等^[3]、张静等^[14]报道,合并肾炎的 HSP 患者 PAF-AH mRNA 及蛋白水平高于不伴有肾脏损害的 HSP 患者,而且 PAF-AH 基因也被报道与紫癜性肾炎有相关性。这些研究均显示 PAF 以及 PAF 的调控因素参与 HSP 的多种病理过程,但 PAF 以及 PAF-AH 是否与 HSP 合并消化道出血有关尚未见相关报道。本研究结果显示,有消化道出血的 HSP 患者血浆 PAF 和 GMP-140 水平高于无消化道出血的 HSP 组,PAF-AH 活性也较低,PAF-AH 基因多态位点 Val270Phe 与 HSP 消化道出血相关;且 GT 和 TT 基因型的 PAF、GMP-140 水平高于 GG 基因型患者,PAF-AH 活性低于 GG 基因型患者,这些均提示 HSP 患儿的血小板活化和 PAF-AH 基因多态性可能与消化道出血有关。

血小板活化状态和 PAF 水平密切相关。本研究结果显示,血小板活化标志物 PAF-AH 和 GMP-140 水平以及 PAF 活性在有消化道出血症状的 HSP 组明显升高,但两组间的另两个血小板活化标志物 β -TG 及 PF4 的差异无统计学意义。这是否受病程等其他因素影响,还需要更大样本的分层研究以总结规律。

综上所述,PAF-AH Val279Phe 基因多态性与血浆 PAF-AH 活性、PAF 及 GMP-140 水平有关,PAF-AH Val279Phe 基因多态性可能是 HSP 消化道出血的一个风险因素。

[参 考 文 献]

[1] Pohl M. Henoch-Schönlein purpura nephritis[J]. *Pediatr*

Nephrol, 2015, 30(2): 245-252.
[2] 张琦,童文娟,孙建新,等. PAF-AH 在过敏性紫癜和紫癜性肾炎中的变化及意义[J]. *现代实用医学*, 2016, 28(07): 931-934.
[3] 陆彪,刘静. 血小板活化因子乙酰水解酶与过敏性紫癜肾脏损害的关联性[J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(5): 331-333.
[4] Ozen S, Ruperto N, Dillon MJ, et al. EULAR/PRES endorsed consensus criteria for the classification of childhood vasculitides[J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(7): 936-941.
[5] Verouti SN, Fragopoulou E, Karantonis HC, et al. PAF effects on MCP-1 and IL-6 secretion in U-937 monocytes in comparison with oxLDL and IL-1 β effects[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(2): 519-525.
[6] Xu LF, Teng X, Guo J, et al. Protective effect of intestinal trefoil factor on injury of intestinal epithelial tight junction induced by platelet activating factor[J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 308-315.
[7] Mazereeuw G, Herrmann N, Xu H, et al. Platelet activating factors are associated with depressive symptoms in coronary artery disease patients: a hypothesis-generating study[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 2309-2314.
[8] Muehlmann LA, Michelotto PV Jr, Nunes EA, et al. PAF increases phagocytic capacity and superoxide anion production in equine alveolar macrophages and blood neutrophils[J]. *Res Vet Sci*, 2012, 93(1): 393-397.
[9] Karasawa K. Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761(11): 1359-1372.
[10] Kruse S, Mao XQ, Heinzmann A, et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasma PAF-acetylhydrolase impair catalytic activities and are associated with atopy and asthma[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(5): 1522-1530.
[11] Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(12): 2784-2791.
[12] Perelman B, Adil A, Vadas P. Relationship between platelet activating factor acetylhydrolase activity and apolipoprotein B levels in patients with peanut allergy[J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2014, 10(1): 20.
[13] Fan P, Liu HW, Wang XS, et al. Identification of the G994T polymorphism in exon 9 of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as a risk factor for polycystic ovary syndrome[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(5): 1288-1294.
[14] 张静,陆彪,刘静,等. EGF、PAF-AH 对过敏性紫癜肾脏损害的临床诊断意义[J]. *重庆医学*, 2015, 44(33): 4627-4629.

(本文编辑: 俞燕)