

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.20.009

文章编号: 1005-8982(2017)20-0046-05

血清抵抗素水平及抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性与川崎病的相关性研究

姜海英, 马千里, 王金星, 陈登峰, 石秋林

(河北省衡水市哈励逊国际和平医院 心胸外科, 河北 衡水 053000)

摘要:目的 观察血清中抵抗素水平及抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性在川崎病的表达水平,并对其进行相关性分析。**方法** 随机选择 60 例川崎病(KD)患儿为 KD 组,另设 60 例健康儿童为对照组。两组均采用酶联免疫吸附实验检测儿童血清抵抗素水平,应用多聚酶链反应限制性片段长度多态性技术检测不同组别患儿抵抗素基因 -420C/G 位点多态性的差异,同时检测统计其血液学相关指标,包括血白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白水平(Hb),红细胞压积(Hct)。**结果** 与对照组比较,KD 患儿外周血液中 WBC、RBC、Hb 及 Hct 表达水平均降低($P < 0.05$),而血小板计数(PLT)表达水平升高($P < 0.05$),差异有统计学意义;血清抵抗素检测结果显示,与对照组相比,KD 患儿血清抵抗素水平升高;限制性核酸内切酶试剂盒 Bpi I 检测血清抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性,与对照组相比,KD 组患儿 GG 较 CC 基因频率较低($P < 0.05$)。Pearson 相关分析显示,KD 患儿血浆抵抗素水平与 WBC、RBC、Hb 及 Hct 呈负相关($P < 0.05$),而与 PLT 表达水平呈正相关($P < 0.05$);KD 患儿组的 GG 基因型的 WBC、RBC、PLT、Hct 及血清抵抗素比 CC 基因型高,GG、CC 基因型均高于 CC 基因型。**结论** 在川崎病患儿血清抵抗素水平升高,提示血清抵抗素水平的检测可作为川崎病诊断的潜在可靠指标。

关键词: 血清抵抗素;基因多态性;川崎病;儿童

中图分类号: R725.4

文献标识码: A

Serum resistin level and correlation of resistin gene promoter 420 C/G polymorphism with Kawasaki disease

Hai-ying Xian, Qian-li Ma, Jin-xing Wang, Deng-feng Chen, Qiu-lin Shi

(Department of Cardiothoracic Surgery, Hengshui Halison International Peace Hospital, Hengshui, Hebei 053000, China)

Abstract: Objective To observe the serum resistin level and resistin gene promoter 420 C/G polymorphism in Kawasaki disease (KD), and to analyze its relevance. **Methods** Sixty children with Kawasaki disease (KD) were randomly selected for KD group, the same number of healthy children were included into control group. ELISA was used to detect serum resistin level in the children. PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was utilized to detect the polymorphisms of resistin gene-420 C/G locus. The related parameters of hematology including blood leucocyte count (WBC), red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb), and hematocrit (Hct) were also tested. **Results** Compared with the control group, the peripheral blood levels of WBC, RBC, Hb and Hct were significantly decreased, and the platelet count was significantly increased in the KD group ($P < 0.05$). The serum resistin level of the KD group was significantly higher than that of the control group. Detection of serum resistin gene promoter 420 C/G polymorphism showed that compared with the control group, the gene frequency of GG was relatively lower than that of CC in the KD group ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that in the children with KD, the plasma resistin

收稿日期:2016-09-07

[通信作者] 石秋林, E-mail: shiqiulin521@126.com; Tel: 13184769688

level was in negative correlation with WBC, RBC, Hb and Hct ($P < 0.05$); but in positive correlation with platelet count ($P < 0.05$). WBC, RBC, platelet, Hct and resistin levels in the KD children with GG genotype were significantly higher than those in the KD children with CG genotype, which were in turn significantly higher than those in the KD children with CC genotype. **Conclusions** Serum resistin level significantly increases in children with Kawasaki disease, which suggests serum resistin level can be used as a potential indicator for diagnosis of Kawasaki disease.

Keywords: serum resistin; gene polymorphism; Kawasaki disease; children

川崎病(kawasaki disease, KD)是一种急性发热性疾病,好发于婴幼儿及年龄较小的儿童,其中有15%~25%的患儿常伴有冠状动脉的损伤,对患儿及其家庭带来了极大的伤害,因此近年来引起儿科医生以及社会的极大关注^[1-2]。抵抗素来源为脂肪细胞的肽类,为分泌性蛋白家族,富含半胱氨酸残基。基因多态性位点(以下简称 SNP)-420 与血清抵抗素的水平密切相关,并且 SNP-420 与抵抗素的关系从强到弱依次为 GG>CG>CC。有研究表明,抵抗素和 SNP-420 与 KD 及冠脉动脉钙化过程密切相关^[3-4]。本研究旨在探讨血清中抵抗素水平及抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性与川崎病发病的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 1 月 -2016 年 6 月河北省衡水市哈励逊国际和平医院就诊的 60 例 KD 患儿作为 KD 组。其中,男性 35 例,女性 25 例;平均年龄(3.65 ± 1.33)岁。KD 患儿的诊断标准严格按照 1984 年日本小儿皮肤黏膜淋巴结综合征研究委员会决定的典型川崎病诊断标准:①持续发热 ≥ 5 d 且原因不明;②双侧眼结膜充血;③咽部及口腔黏膜呈弥漫性充血,唇发红干裂,呈杨梅舌;④发病初期出现手足硬肿及掌跖红斑,恢复期伴趾端膜状脱皮;⑤躯干部位有多形性红斑,无水疱及结痂;⑥颈部淋巴结肿大,而非化脓性,其直径 ≥ 1.5 cm^[5-6]。此外经冠状动脉造影或者二维超声心动图如果提示有冠状动脉损伤,除发热症状以外,同时伴有其他 5 项中 2~3 项,即可确诊不典型川崎病。随机选取 60 例同期健康体检儿童作为对照组。其中,男性 34 例,女性 26 例;平均年龄(3.35 ± 1.62)岁。两组观察对象的年龄及性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。所有观察对象签署知情同意书并获得本院医学伦理委员会批准。

1.2 试剂及仪器

人抵抗素酶联免疫吸附实验试剂盒(美国 R&D

公司),限制性核酸内切酶试剂盒 Bpi I (立陶宛 Fermentas 公司),琼脂糖 Agarose 和 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司)。37℃孵箱和 -80℃低温冰箱(日本 SANYO 公司),酶标仪(美国 Thermo 公司),全自动生化分析仪(AU2700 型,日本 Olympus 公司),自动电化学发光免疫分析仪(德国 Centaur Immunoassay Bayer 公司),B 型超声诊断仪(探头频率为 3.5 MHz,日本东芝公司),PCR 扩增仪(LIFE EXPRESS,杭州博日科技有限公司),凝胶分析仪(GSG-2000,珠海黑马医学仪器)。

1.3 血液学指标检测

所有实验对象均于清晨空腹 12 h 后取外周血 10 ml,3 ml 用于常规检测外周血白细胞计数(white blood cells counts, WBC)、红细胞计数(red blood cells counts, RBC)、血红蛋白(Hemoglobin, Hb)、血小板计数(platelet count, PLT)及红细胞压积(Hematocrit, Hct);3 ml 用于检测血清中抵抗素水平;4 ml 用于全血 DNA 的提取及血清中抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性检测。

1.4 实验方法

血清中抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性检测:从人类基因库中检索出人抵抗素的 DNA 序列,引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。正向引物:5'-CTGCTTGCTACCTGTTCTCT-3',反向引物:5'-GGGCTTCCTGGCTTGGCTAAA-3',常规操作提取 DNA,取血液样品 300 μ l,加入 900 μ l \times Buffer,立即颠倒混匀,14 000 r/min 离心 30 s,留下沉淀细胞核,弃去上清液;向细胞核沉淀中加 Buffer WTL 240 μ l,彻底混匀;加入 Buffer BL 250 μ l,然后充分颠倒混匀,于 65℃放置 10 min,其间需颠倒混匀数次,直至溶液变为清亮为止;加入无水乙醇 250 μ l,混匀后加入吸附柱(以下简称 CB3)中,8 000 r/min 离心 1 min 后弃废液;然后向 CB3 中加入 HB Buffer 500 μ l,8 000 r/min 离心 1 min 后弃废液;向 CB3 中加入 DNA 650 μ l 漂洗液(乙醇稀释),8 000 r/min 离心 1 min 后弃废液;再次向 CB3 中加

入 DNA 漂洗液 650 μ l (乙醇稀释), 8 000 r/min 离心 1 min 后弃废液; 13 000 r/min 离心 2 min 弃废液, 将 CB3 在室温条件下放置数分钟, 吸附材料中残余的漂洗液彻底晾干为止; 将 CB3 换到另一个干净的离心管中, 在吸附膜中间位置悬空滴加 50 μ l 洗脱缓冲液 (洗脱缓冲液在 65 $^{\circ}$ C 水预热), 室温放置 5 min, 10 000 r/min 离心 1 min, 收集溶液到离心管中。如若基因组 DNA 的产量需增加, 可将离心收集得到的溶液再次加入到 CB3 中, 于室温条件下放置 2 min, 10 000 r/min 离心 2 min, 所需的 DNA 即在所得溶液中。置入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱贮存待用。紫外分光光度法检查 DNA 浓度和纯度。在 20 μ l 的反应体系扩增基因组的 DNA。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 共 39 个循环。酶切: 采用限制性核酸内切酶试剂盒 Bpi I 将 PCR 产物酶切。将酶切体系放入 37 $^{\circ}$ C 的水浴箱中恒温水浴 14 h。将 6 μ l 酶切产物加样于琼脂凝胶电泳中, 电压为 90 V, 电泳 25 min, 以 100 ~ 2 000 bp DNA Marker 为分子量标准, 确定 PCR 扩增产物是否为目的基因片断, 在紫外灯下观察结果, 凝胶成像系统上照相保存。其 PCR 产物为 219 bp, 以 100 ~ 2000 bp DNA Marker 为参考标准, 并判断基因型。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 F 检验; 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, Pearson 相关分析用于相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般血液学指标比较

两组 WBC、RBC、Hb、Hct 及 PLT 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), KD 组 WBC、RBC、Hb 以及 Hct 表达水平比对照组低 ($P < 0.05$), 而 PLT 表达水平比对照组高 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 血清抵抗素水平比较

检测血清抵抗素水平结果显示: KD 组 (21.98 ± 9.33) μ g/L, 对照组 (11.13 ± 3.98) μ g/L, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.286, P = 0.000$), KD 组抵抗素水平升高。

2.3 血清抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性

应用限制性核酸内切酶试剂盒 Bpi I 检测血清抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性, 结果显示: 两组等位基因、基因型比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), KD 组 GG 较 CC 基因频率低。见表 2 和附图。

2.4 KD 组血浆中抵抗素水平与其他指标的相关性分析

Pearson 相关分析结果显示, KD 患儿血浆抵抗素的水平与 WBC、RBC、Hb 及 Hct 呈负相关 ($r = -0.243, -0.225, -0.336$ 和 $-0.544, P = 0.041, 0.038, 0.046$ 和 0.034); 而与 PLT 表达水平呈正相关 ($r = 0.431, P = 0.031$)。

2.5 不同基因型患儿的生化指标比较

不同基因型患儿的 WBC、RBC、Hb 及 Hct 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), GG 基因型的 WBC、RBC、PLT、Hct、血清抵抗素比 CG 基因型高, GG 和 CG 基因型均高于 CC 基因型。见表 3。

表 1 两组一般血液指标比较 ($n = 60, \bar{x} \pm s$)

组别	WBC/($\times 10^9/L$)	RBC/($\times 10^{12}/L$)	Hb/(g/L)	PLT/($\times 10^9/L$)	Hct/%
对照组	13.00 \pm 0.99	4.78 \pm 0.89	111.78 \pm 8.11	410.13 \pm 55.98	38.88 \pm 6.88
KD 组	11.34 \pm 0.84	3.77 \pm 1.11	91.36 \pm 8.90	449.11 \pm 69.33	31.45 \pm 7.66
t 值	10.006	5.499	13.136	3.388	5.590
P 值	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

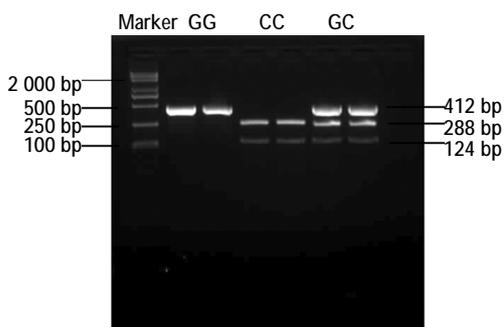
表 2 两组一般血液指标比较 [$n = 60$, 例(%)]

组别	等位基因		基因型		
	C	G	CC	CG	GG
对照组	50(83.33)	50(83.33)	8(13.33)	28(46.67)	22(36.68)
KD 组	35(58.33)	38(63.33)	18(30.00) [†]	14(23.33)	34(56.67) [†]
χ^2 值	9.076	6.016	4.910	7.179	4.821
P 值	0.003	0.013	0.027	0.007	0.028

表 3 不同基因型患儿的生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	WBC/($\times 10^9/L$)	RBC/($\times 10^{12}/L$)	Hb/(g/L)	PLT/($\times 10^9/L$)	Hct/%	血清抵抗素 I ($\mu\text{g/L}$)
CC(10)	10.33 \pm 0.64	3.58 \pm 1.12	92.36 \pm 7.90	429.13 \pm 59.32	30.45 \pm 5.66	18.98 \pm 5.33
CG(28)	11.33 \pm 0.54 ¹⁾	3.67 \pm 1.14 ¹⁾	91.27 \pm 7.08	434.14 \pm 56.33 ¹⁾	33.46 \pm 6.67 ¹⁾	21.97 \pm 6.37 ¹⁾
GG(22)	12.43 \pm 0.53 ¹⁾²⁾	3.71 \pm 1.01 ¹⁾²⁾	91.26 \pm 7.03	449.19 \pm 59.57 ¹⁾²⁾	35.47 \pm 5.68 ¹⁾²⁾	26.91 \pm 5.34 ¹⁾²⁾
F 值	11.397	5.328	2.875	24.765	7.436	8.954
P 值	0.000	0.013	0.089	0.000	0.002	0.000

注:1)与 CC 基因型比较, $P < 0.05$;2)与 GC 基因型比较, $P < 0.05$



附图 限制性核酸内切酶酶切后琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论

KD 主要发生于婴幼儿时期,主要是由免疫介导引起的急性血管炎,其发病可累及到中小动脉,尤其是冠状动脉,易导致冠状动脉瘤扩张及冠状动脉狭窄或血栓,病情严重者甚至可导致心肌梗死等疾病。在欧美部分发达国家,KD 发病率已超过风湿热,已然成为危及婴幼儿时期后天性心脏病的首位病因。尽管已有多种学说的深入研究,取得一些可喜的研究进展,但目前关于 KD 的发病病因以及发病机制仍不明确。关于 KD 的诊断方法,目前尚无特异的实验室诊断指标,主要根据患儿的临床表现做出诊断,在 KD 的临床诊断过程中主要有以下特征:①出现单侧或双侧眼球结膜充血;②出现口腔溃疡、口唇或口腔伴咽扁桃体的渗出性改变;③常见伴有皮疹以斑丘疹为主,也可见多形性红斑,且会阴部较为明显,而在发病的急性期可能会出现会阴部脱皮现象;④在发病的急性期可见手掌和足底的硬性水肿、红斑及在手掌、腕关节或足底与踝关节之间有分界线;⑤颈淋巴结肿大,多伴有单侧无痛性^[7-8]。以上临床诊断指标都具有一定的客观性,因此探讨出可信的具有高度应用价值的诊断 KD 患儿的实验指标迫在眉睫。

抵抗素是于 2001 年首次在小鼠体内发现的,又名胰岛素抵抗因子,由脂肪细胞特异性分泌而得,

主要位于炎症基因的区域 3,具有多种表达模式和生物学特征。在研究的初期结果显示抵抗素主要涉及人类胰岛素抵抗以及糖尿病的疾病过程,并在其中发挥着重要作用,但目前多项研究结果显示其在肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病等疾病过程中的地位仍存在很大的争议。近些年以来有不少研究结果显示抵抗素与动脉硬化、心血管疾病等疾病的发生密切相关^[9-10]。提示抵抗素可能参与到代谢性疾病、心血管疾病以及自身免疫性疾病分子机制的调节过程中,也有可能参与到血管平滑肌细胞的迁移与增殖过程,诱导血管疾病的发生,导致血栓形成,从而最终发生动脉硬化的发生^[11-12]。有诸多研究表明,人体内抵抗素基因存在多种单核苷酸多态性,OSAWA 和 CHO 等^[13-14]研究结果均显示,单核苷酸多态性 -420 与血清中抵抗素水平密切相关,单核苷酸的多态性与抵抗素的水平关系从弱到强依次为 CC<CG<GG。本研究检测血清抵抗素水平结果显示,与对照组相比,KD 患儿血清抵抗素水平升高。在 KD 患儿血清中抵抗素呈高表达水平。应用限制性核酸内切酶试剂盒 Bpi I 检测血清抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性,结果显示与对照组相比,KD 组患儿 GG 较 CC 基因频率较低,提示,在 KD 患儿血清中 GG 较 CC 基因出现频率降低。经 Pearson 相关分析,KD 患儿血清抵抗素水平与 WBC、RBC、Hb 及 Hct 呈负相关;而与 PLT 表达水平呈正相关。KD 患儿组的 GG 基因型的 WBC、RBC、PLT、Hct 和血清抗素比 CG 基因型升高,两组基因型均高于 CC 基因型。这与付淑芳等^[15]人的研究结果相一致。

综上所述,在 KD 患儿的血清抵抗素水平升高,抵抗素基因启动子 -420C/G 多态性随之发生变化。提示抵抗素可作为 KD 诊断过程中的有效指标。

参 考 文 献:

- [1] PANG S S, LE Y Y. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2006, 3(1): 29-34.
- [2] HIROKI N, HIRONORI I, HISAKO S, et al. Serum resistin concentrations in children with Kawasaki disease[J]. Inflamm Res, 2010, 59(11): 915-920.
- [3] TILG H, MOSCHEN A R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(10): 772-783.
- [4] PAGANO C, SOARDO G, PILON C, et al. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006, 91(3): 1081-1086.
- [5] KOWALCZYK M, TURSKA-KMIEC A, ZIOLKOWSKA L, et al. Symptoms, diagnosis and characteristic abnormalities in the coronary arteries in Kawasaki disease in children[J]. Med Wieku Rozwoj, 2010, 14(4): 344-349.
- [6] 胡亚美, 江载芳. 实用儿科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 698-704.
- [7] NEWBURGER J W, TAKAHASHI M, GERBER M A, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease[J]. Circulation, 2004, 110(17): 2747-2771.
- [8] FREEMAN A F, SHULMAN S T. Issues in the diagnosis of Kawasaki disease[J]. Prog Pediatr Cardiol, 2004, 19(2): 123-128.
- [9] FILKOVA M, HALUZIK M, GAY S, et al. The role of resistin as a regulator of inflammation: implications for various human pathologies[J]. Clin Immunol, 2009, 133(2): 157-170.
- [10] WANG H, CHEN D Y, CAO J, et al. High serum resistin level may be an indicator of the severity of coronary disease in acute coronary syndrome[J]. Chin Med Sci J, 2009, 24(3): 161-166.
- [11] GNACINSKA M, MALGORZEWICZ S, STOJEK M, et al. Role of adipokines in complications related to obesity: a review[J]. Adv Med Sci, 2009, 54(2): 150-157.
- [12] HU W L, QIAO S B, HOU Q, et al. Plasma resistin is increased in patients with unstable angina[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(10): 871-875.
- [13] OSAWA H, OCHI M, HIROTA Y, et al. Frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 appears to be increased in younger-onset type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2007, 56(11): 2834-2838.
- [14] CHO J Y, CHUNG J Y, YU K S, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of lorazepam and valproic acid in relation to UGT2B7 genetic polymorphism in healthy subjects[J]. Clinical Pharmacology Therapeutics, 2008, 83(4): 595-600.
- [15] 付淑芳, 俞大亮, 吕典一, 等. 川崎病患者治疗前后血清抵抗素和内脂素的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 年, 16(1): 44-48.

(李科 编辑)