

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.01.011
文章编号: 1005-8982 (2022) 01-0057-06

临床研究·论著

对氧磷酶1基因位点多态性与川崎病的关系研究*

陈芳, 王曼知, 危松青, 李嘉, 石家云, 张小佛
(南华大学附属长沙中心医院 儿科, 湖南 长沙 410004)

摘要: 目的 探讨对氧磷酶1(*PON1*)基因rs662、rs3917541、rs3917539位点多态性与儿童川崎病(KD)的发病风险及其并发冠状动脉损害之间的相关性。**方法** 利用聚合酶链反应-直接测序法(PCR-SBT)分析93例KD患儿(KD组)和94例健康儿童(对照组)*PON1*基因的rs662、rs3917541、rs3917539位点多态性。**结果** KD组*PON1*基因rs662、rs3917541、rs3917539位点基因型频率分布和等位基因频率分布与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。KD组中的合并冠状动脉损害组与未合并冠状动脉损害组*PON1*基因rs662、rs3917541、rs3917539位点基因型频率分布和等位基因频率分布比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 尚未发现*PON1*基因rs662、rs3917541、rs3917539位点多态性与KD及其冠状动脉损害的发生有关。

关键词: 川崎病; 对氧磷酶1基因; 基因多态性

中图分类号: R725.4

文献标识码: A

Association of *PON1* gene loci polymorphism with Kawasaki disease*

Fang Chen, Man-zhi Wang, Song-qing Wei, Jia Li, Jia-yun Shi, Xiao-fo Zhang
(Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of the polymorphism of locus *rs662*, *rs3917541*, and *rs3917539* of *PON1* gene with the risk of Kawasaki disease (KD) and the complications of coronary artery damage (CAL). **Methods** There were 93 patients with KD and 94 healthy subjects in this study. The polymorphism of locus *rs662*, *rs3917541*, and *rs3917539* of *PON1* gene were detected by polymerase chain reaction-sequence based typing (PCR-SBT) method. **Results** For the polymorphism of locus *rs662*, *rs3917541*, and *rs3917539* of *PON1* gene, there were no significant differences between KD patients and the controls in genotype frequencies and allele frequencies ($P>0.05$), and there were no significant differences between KD patients with CAL and without CAL in genotype and allele frequencies ($P>0.05$). **Conclusions** No association was found between the polymorphisms of locus *rs662*, *rs3917541*, and *rs3917539* of *PON1* gene and the risk of KD or its complication of CAL in this study.

Keywords: mucocutaneous lymph node syndrome; *PON1* gene; polymorphism, genetic

川崎病(Kawasaki disease, KD)是一种急性发热性、血管炎症疾病,最常累及冠状动脉,是儿童后天获得性心脏病的主要原因之一。虽然从日本学者首次发现KD至今已有50多年的历史,但KD及其引起的心血管并发症的发病机制仍未完全阐

明,可能与氧化应激有关。氧化应激可损伤血管内皮细胞功能,引起内皮下层及中膜组织变薄,导致血管紧张度降低及远期心血管事件的发生^[1-2]。氧化应激是一种由各种原因所致的氧化和抗氧化的失衡状态,在KD及其并发冠状动脉损害的发病

收稿日期: 2021-04-02

* 基金项目: 湖南省卫生计生委科研课题项目(No.: B20180391)

[通信作者] 张小佛, E-mail: tonger2007725@sina.com

机制中有重要作用^[2]。而对氧磷酶 1 (Paraoxonase-1, PON1) 是一种抗氧化酶, 在维持体内氧化-抗氧化平衡中起关键作用。国内外研究^[3-4]发现, PON1 部分基因多态性与全身氧化应激和心血管事件相关, 但有关 PON1 与 KD 及其并发冠状动脉损害的关系研究甚少。本研究选取 *PON1* 基因多态性的位点 rs662、rs3917541、rs3917539, 探讨 *PON1* 基因位点多态性与 KD 及其并发冠状动脉损害的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 1 月—2018 年 12 月在南华大学附属长沙中心医院儿科住院的 93 例 KD 患儿 (KD 组), 男:女为 1.58:1, 年龄 2 个月~7 岁。纳入标准: ①所有患儿均符合 KD 诊断标准^[5]; ②年龄 ≤ 14 岁; ③入院前均未使用丙种球蛋白及阿司匹林治疗; ④能接受规律门诊复诊。排除标准: ①临床资料不完善; ②既往有 KD、感染性疾病、心血管疾病、风湿免疫性疾病史。根据超声心动图结果, KD 组又分为合并冠状动脉损害组 (15 例) 和未合并冠状动脉损害组 (78 例)。KD 合并冠状动脉损害的诊断标准^[5]: Z 值 < 2 , 为无受累; $2 \leq Z$ 值 < 2.5 , 或初始 Z 值 < 2 、随访时 Z 值下降幅度 ≥ 1 , 为仅扩张; $2.5 \leq Z$ 值 < 5 , 为小型冠状动脉瘤; $5 \leq Z$ 值 < 10 , 同时内径绝对值 < 8 mm, 为中型冠状动脉瘤; Z 值 ≥ 10 或内径绝对值 ≥ 8 mm, 为巨大冠状动脉瘤。选取同时间段在该院体检的 94 例正常儿童为对照组, 男:女为 1.69:1, 年龄 3 个月~9 岁。排除既往 KD、感染性疾病、心血管疾病、风湿免疫性疾病等病史。本研究经医院医学伦理委员会批准, 患儿监护人均签订知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 提取基因组 DNA 采用含 5% 的 EDTA-Na₂ 抗凝剂的一次性采血管, 抽取所有研究对象的外周静脉血 2 mL, 置于 -80℃ 冰箱冷冻保存。应用 DNA 试剂盒 (美国 Promega 公司) 提取血液标本中的基因组 DNA, 并测定其浓度和纯度, 合格样本置于 -80℃ 冰箱冷冻保存。

1.2.2 基因多态性检测 从 PubMed 网站 GenBank 系统中查询 *PON1* 基因的碱基序列, 采用 Premier 5.0 软件设计包含 *PON1* 基因 rs662、rs3917541、

rs3917539 位点的 PCR 扩增特异性引物。应用聚合酶链反应-直接测序法 (PCR-SBT) 检测所有研究对象 *PON1* 基因 rs662、rs3917541、rs3917539 位点的基因型。引物序列由擎科生物技术有限公司合成, 正向 5'-GTATCCAGGCTGCTGGTTCA-3', 反向 5'-CGAGTGGTGGCAGAAGGATT-3'。PCR 反应体系为 25 μ L: 模板 DNA 2.0 μ L, 正向引物 0.5 μ L (10 μ mol/L), 反向引物 0.5 μ L (10 μ mol/L), 2 \times Taq PCR Green Mix 12.5 μ L, 去离子水 9.5 μ L。采用美国 ABI PCR 9700 扩增仪 (上海赛默科技发展有限公司) 进行扩增。反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 72℃ 终末延伸 10 min。扩增产物行琼脂糖凝胶电泳后, 于紫外灯下照相并记录电泳图谱, 扩增成功的 PCR 产物由长沙贝博生物科技有限公司进行基因测序。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0 统计软件。采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验组间基因型频率平衡吻合度; 以直接计数法计算 *PON1* 基因 rs662、rs3917541、rs3917539 位点各种基因型频率和等位基因频率; 计数资料以百分比表示, 比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *PON1* 基因的 PCR 扩增产物

采用 PCR 扩增 *PON1* 基因, 该产物为 618 bp, 结果与预期一致。见图 1。



1~3 泳道: *PON1* 基因的 PCR 扩增产物; M: DNA Marker。

图 1 *PON1* 基因 PCR 扩增产物电泳图

2.2 *PON1* 基因 rs662 位点多态性

PON1 基因 rs662 位点多态性表现为 A 突变为 G, AA 型、AG 型、GG 型均可见。见图 2。

2.3 *PON1* 基因 rs3917541 位点多态性

PON1 基因 rs3917541 位点多态性表现为 C 突变为 T, CC 型、CT 型、TT 型均可见。见图 3。

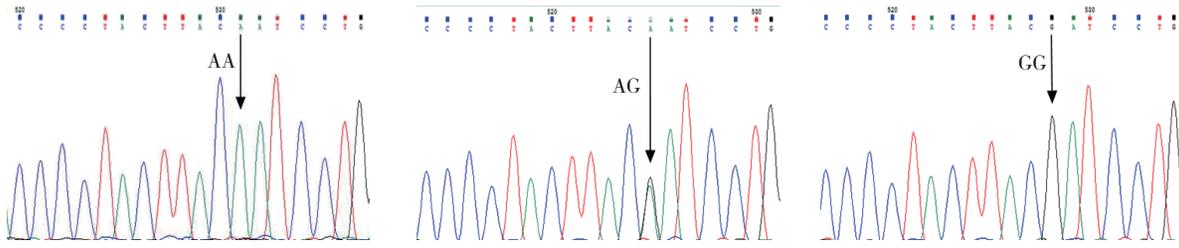


图2 PON1基因 rs662位点测序图

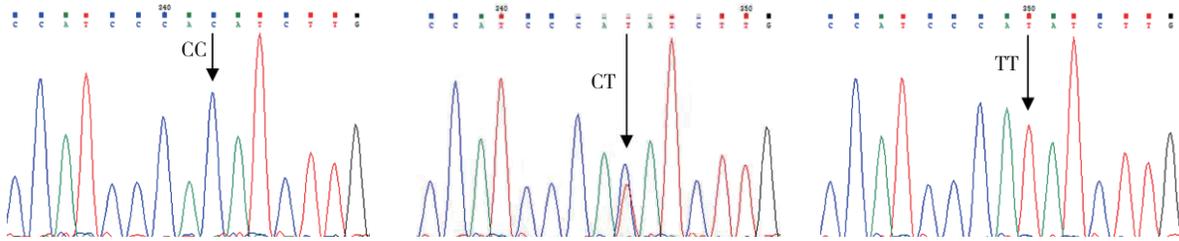


图3 PON1基因 rs3917541位点测序图

2.4 PON1基因 rs3917539位点多态性

PON1 基因 rs3917539 位点多态性表现为 TT 型 (插入型)、-- (缺陷型)、-T 型 (缺陷/插入型) 均可见。见图4。

2.5 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检查组间基因型频率平衡吻合度。KD 组 PON1 基因 rs662、rs3917541、rs3917539 位点基因型频率分布 ($\chi^2=0.036、0.001 和 0.020, P=0.981、0.999 和 0.990$), 对照组 PON1 基因 rs662、rs3917541、rs3917539 位点基因型频率分布 ($\chi^2=0.118、0.187 和 0.009, P=0.942、0.910 和 0.995$), 均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 具有群体代表性。

2.6 PON1 基因 rs662、rs3917541、rs3917539 位点基因型频率及等位基因频率分布的比较

2.6.1 rs662 位点基因型频率及等位基因频率分布 KD 组与对照组 PON1 基因 rs662 位点 AA、AG、GG 基因型频率分布和 A、G 等位基因频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见表1)。KD 组中合

并冠状动脉损害组与未合并冠状动脉损害组 PON1 基因 rs662 位点 AA、AG、GG 基因型频率分布和 A、G 等位基因频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见表2)。

2.6.2 rs3917541 位点基因型频率及等位基因频率分布 KD 组与对照组 PON1 基因 rs3917541 位点 CC、CT、TT 基因型频率分布和 C、T 等位基因频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见表3); KD 组中合并冠状动脉损害组与未合并冠状动脉损害组 PON1 基因 rs3917541 位点 CC、CT、TT 基因型频率分布和 C、T 等位基因频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见表4)。

2.6.3 rs3917539 位点基因型频率及等位基因频率分布 KD 组与对照组 PON1 基因 rs3917539 位点 TT、--、-T 基因型频率分布和 -、T 等位基因频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见表5)。KD 组中合并冠状动脉损害组和未合并冠状动脉损害组 PON1 基因 rs3917539 位点 TT、--、-T 基因型频率分布和 -、T 等位基因频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见表6)。

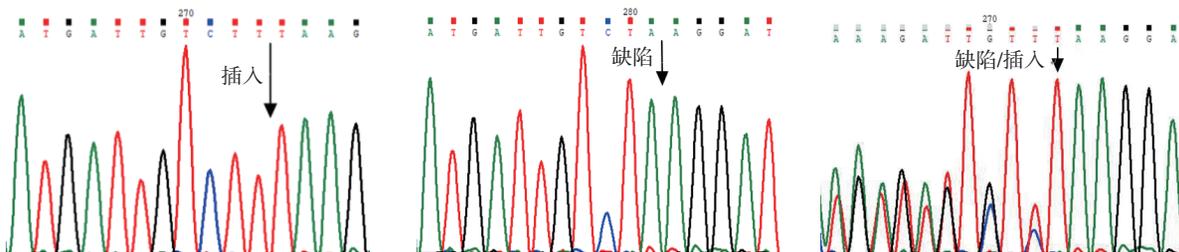


图4 PON1基因 rs3917539位点 PCR产物测序图

表 1 KD组和对照组 rs662 位点基因型频率及等位基因频率分布比较 例(%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
KD组	93	12(12.90)	44(47.31)	37(39.78)	68(36.56)	118(63.44)
对照组	94	13(13.83)	46(48.94)	35(37.23)	72(38.30)	116(61.70)
χ^2 值			0.135			0.121
P 值			0.935			0.728

表 2 合并冠状动脉损害组和未合并冠状动脉损害组 rs662 位点基因型频率及等位基因频率分布比较 例(%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
合并冠状动脉损害组	15	2(13.33)	7(46.67)	6(40.00)	11(36.67)	19(63.33)
未合并冠状动脉损害组	78	10(12.82)	37(47.44)	31(39.74)	57(36.54)	99(63.46)
χ^2 值			0.004			0.000
P 值			0.998			0.989

表 3 KD组和对照组 rs3917541 位点基因型频率及等位基因频率分布比较 例(%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
KD组	93	68(73.12)	23(24.73)	2(2.15)	159(85.48)	27(14.52)
对照组	94	72(76.59)	20(21.28)	2(2.13)	164(87.23)	24(12.77)
χ^2 值			0.318			0.243
P 值			0.853			0.622

表 4 合并冠状动脉损害组和未合并冠状动脉损害组 rs3917541 位点基因型频率及等位基因频率分布比较 例(%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
合并冠状动脉损害组	15	12(80.00)	3(20.00)	0(0.00)	27(90.00)	3(10.00)
未合并冠状动脉损害组	78	56(71.79)	20(25.65)	2(2.56)	132(84.62)	24(15.38)
χ^2 值			0.662			0.234
P 值			0.718			0.629

表 5 KD组和对照组 rs3917539 位点基因型频率及等位基因频率分布比较 例(%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		TT	--	-T	-	T
KD组	93	34(36.56)	14(15.05)	45(48.39)	73(39.25)	113(60.75)
对照组	94	33(35.11)	16(17.02)	45(47.87)	77(40.96)	111(59.04)
χ^2 值			0.143			0.114
P 值			0.931			0.736

表 6 合并冠状动脉损害组和未合并冠状动脉损害组的 rs3917539 位点基因型频率及等位基因频率分布比较 例(%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		TT	--	-T	-	T
合并冠状动脉损害组	15	5(33.34)	2(13.33)	8(53.33)	12(40.00)	18(60.00)
未合并冠状动脉损害组	78	29(37.18)	12(15.38)	37(47.44)	61(39.10)	95(60.90)
χ^2 值			0.176			0.008
P 值			0.916			0.927

3 讨论

氧化与抗氧化失衡可以导致多种疾病,如冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)、糖尿病、川崎病等。川崎病是一种儿童常见的急性发热出疹性疾病,已成为小儿后天性心脏病的主要病因,且与成年后心血管疾病关系密切^[5]。KD的主要危害是心血管并发症,特别是冠状动脉,如不经及时治疗,20%~25%的患儿会发生心血管病变,主要包括冠状动脉扩张、冠状动脉瘤、冠状动脉狭窄,甚至心肌梗死等^[6]。目前KD的病因及发病机制未明,近年来研究发现KD及其冠状动脉损害可能与氧化应激有关,KD患儿体内长时间处于氧化应激状态,且并发冠状动脉损害患儿的活性氧类物质含量明显升高^[2,7]。

PON1是一种具有抗氧化作用的内酯酶,广泛分布于机体各组织中,当机体处于氧化应激状态时,PON1能阻止机体的过度氧化反应,保护机体免于氧化损伤^[8]。许多研究表明PON1可以通过多种途径参与心血管疾病的调控。首先,PON1可能通过调节巨噬细胞的胆固醇流出来发挥心血管保护作用^[9]。其次,PON1还可能在调节内皮血管扩张中起作用,PON1可以穿透内皮细胞,通过调节Ca²⁺内流显著降低血管舒张^[10]。再次,过度的氧化应激状态是心血管疾病重要的病理生理事件,PON1可以通过抗氧化作用,对过度的氧化应激具有很好的调节作用^[11]。

临床研究也提示,PON1在心血管疾病的发生、发展中起着重要的作用。VAISAR等^[12]通过对1型糖尿病患者横断面研究发现,1型糖尿病长期无心血管并发症患者较合并心血管并发症患者PON1水平更高,表明PON1可能具有心血管保护作用。严为宏等^[13]通过选择接受颈动脉超声检查的老年人112例,并将其分为动脉粥样硬化组和非动脉粥样硬化组,老年人颈动脉粥样硬化患者中血清PON1活性明显低于对照组。在实验动物模型中,还发现高糖诱导的PON1糖基化是通过内质网应激诱导血管内皮功能障碍,抑制氧化应激可以减轻糖尿病血管并发症^[14]。因此,PON1与心血管疾病密切相关,PON1基因的改变也将影响心血管疾病的发生、发展。

PON1基因多态性与冠心病、动脉粥样硬化、

心肌梗死、2型糖尿病心血管并发症相关。MURILLO-GONZÁLEZ等^[15]通过比较分析心血管疾病组、心血管危险因素组和正常对照组的PON1基因多态性,发现PON1的CC-108基因型与心血管疾病相关,提示PON1基因多态性与心血管疾病相关。ZHANG等^[16]对PON1 Q192R基因多态性与冠心病患者的关系进行了Meta分析,发现PON1 Q192R基因多态性与中国冠心病患者有相关性。另外,有研究报道,PON1基因多态性是冠心病的独立危险因素之一^[17]。胡道军等^[18]通过Meta分析发现2型糖尿病患者并发冠心病的风险与PON1 192Gln/Arg基因多态性呈正相关,携带R等位基因2型糖尿病患者与携带Q等位基因患者相比,前者更容易并发冠心病。RAHMAN等^[19]通过病例对照研究发现192R等位基因是早期心肌梗死的独立危险因素。这些均表明PON1基因多态性与心血管疾病、某些自身免疫性疾病的心血管并发症相关,而KD正是一种自身免疫性血管炎症疾病,心血管病变是其主要的并发症,其发病可能与氧化应激有关。故而推测,PON1基因多态性亦可能与KD及其心血管并发症有关。

本研究采用PCR-SBT法分析93例KD患儿和94例健康儿童PON1基因rs662、rs3917541、rs3917539位点单核苷酸多态性发现,KD组和对照组比较、合并冠状动脉损害组和未合并冠状动脉损害组比较,基因型频率分布及等位基因频率分布差异均无统计学意义。故PON1基因rs662、rs3917541和rs3917539位点多态性可能与KD的发病及其冠状动脉损害的发生无关,也可能是因为本研究样本量不够大、存在抽样误差、种族和环境因素等差异所致。因此,PON1基因多态性是否与KD的发病及其引发的冠状动脉损害有关,还需要对其他多态性位点进行研究,或通过增加样本量进行多中心的研究。

参考文献:

- [1] NAGATA S. Causes of kawasaki disease-from past to present[J]. *Frontiers in Pediatrics*. 2019, 7: 18.
- [2] YAHATA T, HAMAOKA K. Oxidative stress and Kawasaki disease: how is oxidative stress involved from the acute stage to the chronic stage[J]. *Rheumatology*, 2017, 56(1): 6-13.
- [3] 张珊,张亮,丁洁颖,等.血清同型半胱氨酸水平与对氧磷酶1活性及颈动脉粥样硬化的关系[J]. *心血管康复医学杂志*. 2017,

- 26(1): 8-12.
- [4] PLOCINICZAK A, BASZCZUK A, LUDZIEJEWSKA A, et al. Paraoxonase 1 gene L55M polymorphism and paraoxonase 1 activity in obstructive sleep apnea patients[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1150: 17-24.
- [5] McCRINDLE B W, ROWLEY A H, NEWBURGER J W, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American heart association[J]. *Circulation*, 2017, 135(17): e927-e929.
- [6] SKOCHKO S M, JAIN S, SUN X, et al. Kawasaki disease outcomes and response to therapy in a multiethnic community: a 10-year experience[J]. *Journal of Cardiovascular Imaging*, 2018, 203: 408-415.
- [7] ISHIKAWA T, SEKI K. The association between oxidative stress and endothelial dysfunction in early childhood patients with Kawasaki disease[J]. *BioMed Central Cardiovascular Disorders Cardiovascular Disorders*, 2018, 18(1): 30.
- [8] ERTURK C, ALTAY M A, BILGE A, et al. Is there a relationship between serum ox-LDL, oxidative stress, and PON1 in knee osteoarthritis[J]. *Clinical Rheumatology*, 2017, 36(12): 2775-2780.
- [9] CERVELLATI C, VIGNA G B, TRENTINI A, et al. Paraoxonase-1 activities in individuals with different HDL circulating levels: implication in reverse cholesterol transport and early vascular damage[J]. *Atherosclerosis*. 2019, 285: 64-70.
- [10] GILAD D, ATIYA S, MOZES-AUTMAZGIN Z, et al. Paraoxonase 1 in endothelial cells impairs vasodilation induced by arachidonic acid lactone metabolite[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 1864(3): 386-393.
- [11] ROSENBLAT M, VOLKOVA N, AVIRAM M. Selective oxidative stress and cholesterol metabolism in lipid-metabolizing cell classes: distinct regulatory roles for pro-oxidants and antioxidants[J]. *Bio Factors*, 2015, 41(4): 273-288.
- [12] VAISAR T, KANTER JE, WIMBERGER J, et al. High concentration of medium-sized HDL particles and enrichment in HDL Paraoxonase 1 associate with protection from vascular complications in people with long-standing type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(1): 1-9.
- [13] 严为宏, 张亮, 陆寒英, 等. 老年人颈动脉粥样硬化与血清对氧磷酶 1 活性的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(9): 2064-2066.
- [14] YU W, LIU X L, FENG L R, et al. Glycation of paraoxonase 1 by high glucose instigates endoplasmic reticulum stress to induce endothelial dysfunction in vivo[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45827.
- [15] MURILLO-GONZÁLEZ F E, PONCE-RUIZ N, ROJAS-GARCIA A E, et al. PON1 lactonase activity and its association with cardiovascular disease[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2020, 500: 47-53.
- [16] ZHANG Z, OU J K, CAI P L, et al. Association between the PON1 Q192R polymorphism and coronary heart disease in Chinese: a meta-analysis[J]. *Medicine*, 2018, 97(26): e11151.
- [17] MORENO-GODÍNEZ M E, GALARCE-SOSA C, CAHUA-PABLO J Á, et al. Genotypes of common polymorphisms in the PON1 gene associated with paraoxonase activity as cardiovascular risk factor[J]. *Archives of Medical Research*, 2018, 49(7): 486-496.
- [18] 胡道军, 张莉, 郁森, 等. Arg 基因多态性与 2 型糖尿病并发冠心病风险的 Meta 分析[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(7): 100-104.
- [19] RAHMAN M F, HASHAD I M, ABOU-AISHA K, et al. Addressing the link between paraoxonase-1 gene variants and the incidence of early onset myocardial infarction[J]. *Archives of Medical Science*, 2015, 11(3): 513-520.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 陈芳, 王曼知, 危松青, 等. 对氧磷酶 1 基因位点多态性与川崎病的关系研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(1): 57-62.

Cite this article as: CHEN F, WANG M Z, WEI S Q, et al. Association of *PON1* gene loci polymorphism with Kawasaki disease[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(1): 57-62.