

热休克蛋白 70-hom 基因多态性与儿童过敏性紫癜的相关性

徐锦雯¹, 赵丽萍¹, 朱春华², 韩媛², 张爱华², 黄松明^{2*}

(¹南京医科大学附属无锡人民医院儿科, 江苏 无锡 214023; ²南京医科大学附属南京儿童医院儿肾内科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨热休克蛋白 70-hom(heat shock protein 70-hom, HSP70-hom)基因多态性与儿童过敏性紫癜发病的相关性。方法:应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 131 例过敏性紫癜患儿和 66 例正常儿童的 HSP70-hom 基因的+2437 位核苷酸的 *Nco* I 限制性内切酶位点的多态性。结果:HSP70-hom 各基因型频率在过敏性紫癜组中分别为 1.5%(TT)、34.4%(TC)和 64.1%(CC),在对照组中分别为 19.7%(TT)、19.7%(TC)和 60.6%(CC),两组之间基因型分布频率的差异具有统计学意义($\chi^2 = 22.318, P < 0.05$);T 和 C 等位基因频率在过敏性紫癜组中分别为 18.7%(T)和 81.3%(C),在对照组中分别为 29.5%(T)和 70.5%(C),差别亦具有统计学意义($\chi^2 = 5.949, P < 0.05$)。与携带 TT 基因型者比较,携带至少 1 个 C 等位基因(即 TC 和 CC 基因型)的个体患过敏性紫癜的风险增加 18.83 倍(95%CI:3.95~89.75)。过敏性紫癜非肾脏损害组与肾损害组 TT、TC、CC 基因型频率分别为 2.4%、32.1%、65.5%和 0%、38.3%、61.7%,差异不具有统计学意义($\chi^2 = 0.379, P > 0.05$)。结论:HSP70-hom +2437T/C 基因多态性是儿童过敏性紫癜发病的遗传易感因素,但与肾脏损害发生无显著相关性。

[关键词] 热休克蛋白 70; 过敏性紫癜; 多态性

[中图分类号] R554.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1075-04

HSP70-hom polymorphism and susceptibility to childhood Henoch-Schonlein purpura

XU Jin-wen¹, ZHAO Li-ping¹, ZHU Chun-hua², HAN Yuan², ZHANG Ai-hua², HUANG Song-ming^{2*}

(¹Department of Pediatrics, Wuxi People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214023; ²Department of Pediatric Nephrology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the potential involvement of gene variants of heat shock protein 70-hom (HSP70-hom) in childhood Henoch-Schonlein purpura. **Methods:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to analyze the polymorphisms of HSP70-hom +2437T/C in 131 children with Henoch-Schonlein purpura and 66 health controls. **Results:** HSP70-hom gene frequencies in children with Henoch-Schonlein purpura were 1.5% (TT), 34.4% (TC), 64.1% (CC), and 19.7% (TT), 19.7% (TC), 60.6% (CC) in health controls, the differences between two groups were statistically significant. In addition, the T, C allele frequencies were 18.7% (T), 81.3% (C) in Henoch-Schonlein purpura group, and were 29.5% (T), 70.5% (C) in control groups, the differences were statistically significant, too. Children carrying at least one +2437C variant allele (TC+CC genotype) had a significantly increased risk for childhood Henoch-Schonlein purpura compared with the wildtype genotype (+2437TT). However, the differences between children without renal involvement in Henoch-Schonlein purpura and children with renal complications did not reach statistical significance. **Conclusion:** The polymorphisms of HSP70-hom +2437 T/C are genetic predisposing predictors for Henoch-Schonlein purpura in children, but has no relationship with renal complications.

[Key words] heat shock protein 70; Henoch-Schonlein purpura; polymorphism

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1075-1078]

过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP)是儿童时期最常见的血管炎之一,以非血小板减少性

紫癜、关节炎或关节痛、腹痛、胃肠道出血及肾炎为主要临床表现^[1]。该病每年发病率在 10.0/10 万~26.7/10 万之间^[2-5]。众多资料提示 HSP 发病并非单一因素作用的结果,而是病原菌感染、免疫反应异常、发病诱因、遗传因素等多方面综合作用所致。热

[基金项目] 南京市医学重点发展项目(ZKX08007)

*通讯作者, E-mail: smhuang@njmu.edu.cn

休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是机体在应激状态下合成的分子伴侣,在维持组织细胞的自身稳定和环境适应性、自身损伤修复等多方面具有保护作用^[6],其在肾脏疾病发生发展中也起着重要作用^[7]。在人类,HSP70 基因家族定位于 6p21.3,包含 HSP70-1、HSP70-2 和 HSP70-hom 3 个基因。近年来有学者发现 HSP70 基因多态性可能是部分免疫性疾病的危险因素^[8-10]。Barbara 等^[11]在高加索人群中研究发现 HSP70 基因多态性是当地系统性红斑狼疮的易感因素。与系统性红斑狼疮相似,HSP 同样为免疫反应介导的以皮损为主要特征的疾病,国内已有研究发现,HSP 患儿 HSP70 mRNA 水平较健康对照升高^[12],但具体机制尚未十分明确。本研究拟探讨 HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性与儿童 HSP 的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2008 年 9 月~2009 年 9 月南京医科大学附属南京儿童医院肾脏内科新确诊的过敏性紫癜住院患儿 131 例,男 69 例,女 62 例,平均年龄(7.55 ± 2.68)岁。HSP 的诊断符合 1990 年美国风湿协会诊断标准^[13]。其中在过敏性紫癜病程 6 个月以内出现血尿和(或)蛋白尿者作为过敏性紫癜肾脏损害组,共 47 例,其中男 28 例,女 19 例。其余 84 例为非肾脏损害组,其中男 41 例,女 43 例。选择本院普通外科择期手术患者作为对照,所患疾病与肾脏疾病或风湿免疫性疾病均无关,共 66 例,其中男 47 例,女 19 例,平均年龄(6.66 ± 2.98)岁,病例间无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

取 EDTA 抗凝外周静脉血 2 ml,按照试剂盒(Promega 公司,美国)说明书抽提、纯化 DNA。

1.2.2 HSP70-hom 引物设计与合成

采用 Primer5.0 软件设计引物序列,委托上海英骏生物技术有限公司合成,上游序列:5'-GGA-CAAGTCTGAGAAGGTACAG-3',下游序列:5'-GTAACCTAGATTCAGGTCTGG-3',该 PCR 产物为 878 bp,其中包含了在+2437 位的 *Nco*I 限制性内切酶的酶切位点。

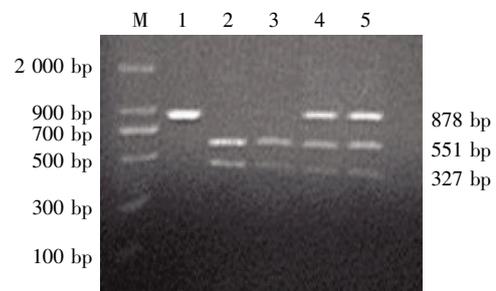
1.2.3 PCR 反应条件

在 20 μl 反应体系中,含有 DNA 模板 1.5 μl,2×Taq PCR MasterMix 10 μl,上、下游引物各 0.25

μl,DEPC 水 8 μl。PCR 反应参数为:95℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,56.5℃退火 40 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环,72℃延伸 5 min。

1.2.4 酶切反应检测 HSP70-hom 基因型

根据酶切说明书,取 PCR 产物 10 μl,限制性内切酶 *Nco*I 1.5 μl(日本 TaKaRa 公司)、DEPC 水 18 μl、10×Buffer Tango 2 μl,37℃酶切 16 h 过夜。取酶切产物 10 μl,1.5%琼脂糖凝胶电泳,荧光染料染色,凝胶成像系统下拍照,完整的 878 bp 片段判定为 TT 纯合基因型,以出现 551、327 bp 2 个片段判定为 CC 纯合基因型,同时出现 878、551、327 bp 的 3 个片段,则判定为 TC 杂合基因型(图 1)。



1:TT 纯合型;2,3:CC 纯合型;4,5:TC 杂合型;M:DL2000。

图 1 PCR-RFLP 电泳图

Figure 1 PCR-RFLP electrophoretogram

1.3 统计学方法

过敏性紫癜组和对照组 HSP70-hom 基因型与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度采用 χ^2 检验,HSP70-hom +2437 T/C 各基因型在过敏性紫癜组和正常对照组之间分布的差异选用 2×3 表卡方检验,单因素 Logistic 回归计算比值比(OR)及其 95%可信区间(CI)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。数据分析在统计软件 SPSS13.0 及 SAS 中完成。

2 结果

本文发现 HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性为儿童 HSP 的遗传学易感因素,但与肾脏受损并无相关性。HSP 组和对照组儿童 HSP70-hom 基因+2437 位点其 TT、TC、CC 基因型频率分别为 1.5%、34.4%、64.1%和 19.7%、19.7%、60.6%,差异有统计学意义($\chi^2 = 22.318, P < 0.05$);C 等位基因频率在 HSP 组高于对照组($P < 0.05$),提示变异的 C 等位基因可能增加儿童发生 HSP 的危险性。在调整年龄和性别后,携带 TC 基因型的个体较 TT 携带者罹患 HSP 的风险显著增加(校正 OR=64.59,95%CI:6.31~661.45),而携带至少 1 个 C(TC+CC)的个体也增加

了患 HSP 的风险 (校正 OR=18.83, 95%CI: 3.95~89.75, 表 1)。HSP 非肾损害组和肾损害组 TT、TC、CC 基因型频率分别为 2.4%、32.1%、65.5% 和 0%、

38.3%、61.7%, 差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。其中 T、C 等位基因频率分别为 18.5%、81.5% 和 19.1%、80.9%, 差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 1 HSP70-hom +2437 位基因型分布与儿童过敏性紫癜的患病风险

	HSP 组 (n = 131)	对照组 (n = 66)	OR(95%CI)	OR*(95%CI)	χ^2 值	P 值
基因型					22.318	0.000
TT	2(1.5)	13(19.7)	1.00	1.00		
TC	45(34.4)	13(19.7)	22.49(4.49~112.71)	64.59(6.31~661.45)		
CC	84(64.1)	40(60.6)	13.646(2.94~63.36)	15.31(3.19~73.43)		
TC+CC	129(98.5)	53(80.3)	15.82(3.45~72.53)	18.83(3.95~89.75)		
等位基因					5.949	0.015
T	49(18.7)	39(29.5)				
C	213(81.3)	93(70.5)				

*为以年龄、性别进行调整校正。

表 2 过敏性紫癜非肾脏损害组与肾脏损害组基因型频率比较

	非肾损害组 (n = 84)	肾损害组 (n = 47)	χ^2 值	P 值
基因型			0.379	0.538
TT	2(2.4)	0(0)		
TC	27(32.1)	18(38.3)		
CC	55(65.5)	29(61.7)		
TC+CC	82(97.6)	47(100.0)		
等位基因			0.019	0.89
T	31(18.5)	18(19.1)		
C	137(81.5)	76(80.9)		

3 讨论

HSP70 家族中 HSP70-1、HSP70-2、HSP70-hom 定位于染色体 6p21.3 区, HSP70-1 和 HSP70-2 编码相似的热诱导蛋白, HSP70-hom 编码非热诱导蛋白, 但与 HSP70-1 和 HSP70-2 的编码产物具有高度同源性。HSP70-1 和 HSP70-2 均不含内含子, 有时可发生沉默突变, 但错义突变不多。HSP70-hom +2437T/C 多态位点位于编码区, 可导致编码产物 493 位蛋氨酸(Met)替换为苏氨酸(Thr)。既往研究表明, 苏氨酸残基(C 等位基因)的中性化可减弱 HSP70-hom 蛋白作为分子伴侣的效率, 这可能通过减弱分子伴侣与其靶蛋白之间的疏水作用来实现。事实上, HSP70 和 HLA I 类分子中苏氨酸结合部分的区域很相似^[14-15], 这从某种程度上解释了 HSP70-hom 的不同单体型可能影响 HSP70 的肽结合特异性从而与疾病易感性相关的原因。因此, HSP70 基因及其编码蛋白生物学性状的改变可能与儿童过敏性紫癜易感性相关。

国内陶娟等^[12]研究发现 HSP70 mRNA 在过敏

性紫癜患者中的表达明显高于正常对照组, 且肾损害组 HSP70 mRNA 表达高于非肾损害组, 在有或无腹痛和关节痛组间均无明显差异, 提示 HSP70 mRNA 异常高表达可能与过敏性紫癜及肾损害的发生发展相关。汤雪晴等^[16]对 37 例过敏性紫癜患儿血浆中 HSP70 抗体检测发现, 过敏性紫癜组 HSP70 抗体阳性率显著高于健康对照组, 且肾炎组高于非肾炎组, 提示 HSP70 参与了过敏性紫癜的发病过程, 且可反映肾脏是否受累。

本实验研究了 HSP70-hom +2437T/C 基因多态性与儿童过敏性紫癜的相关性。结果表明, 与携带 TT 基因型者比较, 携带至少 1 个 C 等位基因者(即 TC 和 CC 基因型)儿童过敏性紫癜风险增加 18.83 倍(95%CI: 3.95~89.75), 这些结果表明 HSP70-hom +2437T/C 基因多态性与儿童过敏性紫癜的发病相关。但本研究结果提示 HSP70-hom 多态性与肾脏损害无明显相关性, 这与国内的报道并不完全相符, 分析原因可能是样本量偏小, 不同种族、不同地区之间也可能存在差异, 这些需要进一步扩大样本量研究。在物种进化的过程中, 体内起关键作用的基因常保

持高度保守性,其编码区多态性往往有限,而且多数导致无义突变。因此,探讨 HSP70 多态性与疾病的关系往往指向了 HSP70 基因附近的一个或多个基因,许多与 HSP70 基因多态性有关的疾病可能与特异性的 HSP70-HLA 扩展单体型相关,因此 HSP70-1 基因多态性与过敏性紫癜的关系及 HSP70 与其他易感基因之间的相互作用等仍有待于研究。

[参考文献]

- [1] 胡亚美,江载芳. 诸福堂实用儿科学[M].北京:人民卫生出版社,2002:688-690
- [2] Gardner-Medwin JM, Dolezalova P, Cummins C, et al. Incidence of Henoch-Schonlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins[J]. *Lancet*, 2002, 360(9341):1197-1202
- [3] Penny K, Fleming M, Kazmierczak D, et al. An epidemiological study of Henoch-Schonlein purpura [J]. *Paediatr Nurs*, 2010, 22(10):30-35
- [4] Calvino MC, Llorca J, Garcia-Porrúa C, et al. Henoch-Schonlein purpura in children from northwestern Spain: a 20-year epidemiologic and clinical study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2001, 80(5):279-290
- [5] Stewart M, Savage JM, Bell B, et al. Long term renal prognosis of Henoch-Schonlein purpura in an unselected childhood population [J]. *Eur J Pediatr*, 1988, 147(2):113-115
- [6] Kelly KJ. Stress response proteins and renal ischemia[J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2002, 54(2):81-91
- [7] Macario AJ, Conway de Macario E. Stress and molecular chaperones in disease [J]. *Int J Clin Lab Res*, 2000, 30(2):49-66
- [8] Wu YR, Wang CK, Chen CM, et al. Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease[J]. *Hum genet*, 2004, 114(3):236-241
- [9] Vargas-Alarcon G, Londono JD, Hernandez-Pacheco G, et al. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies [J]. *Ann Rheumatic Dis*, 2002, 61(1):48-51
- [10] Bogunia-Kubik K, Koscińska K, Suchnicki K, et al. HSP70-hom gene single nucleotide (+2763 G/A and +2437 C/T) polymorphisms in sarcoidosis [J]. *Int J Immunogenet*, 2006, 33(2):135-140
- [11] Furnrohr BG, Wach S, Kelly JA, et al. Polymorphisms in the Hsp70 gene locus are genetically associated with Systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(11):1983-1989
- [12] 陶娟,刘亚强,李延,等.热休克蛋白70在过敏性紫癜中的表达及其临床意义 [J]. *中国皮肤性学杂志*, 2008, 22(2):77-79
- [13] Mills JA, Michel BA, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schonlein purpura[J]. *Arthritis Rheum*, 1990, 33(8):1114-1121
- [14] Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, et al. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA [J]. *EMBO J*, 1991, 10(5):1053-1059
- [15] Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) [J]. *Scand J Immunol*, 1993, 38(5):491-495
- [16] 汤雪晴,孙文平,邹自英,等.过敏性紫癜患儿热休克蛋白70抗体检测的意义[J].*中国优生与传杂志*, 2009, 17(8):125-126

[收稿日期] 2012-03-30