

# 谷胱甘肽过氧化物酶 1 基因多态性与川崎病的关联性分析

陈芳, 江杰, 李卓颖, 陈佳, 田朗, 李欣, 伍志翔, 黄利华, 杨作成

(中南大学湘雅三医院儿科, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 谷胱甘肽过氧化物酶 1; 川崎病; 基因多态性

[摘要] 目的 探讨谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX-1)基因多态性与中国汉族儿童川崎病(kawasaki disease, KD)并冠状动脉损害(CAL)的相关性。方法 采用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性分析(PCR-RFLP)检测 92 例川崎病患者及 108 例健康儿童 GPX-1 基因的 -46C/T 位点和 599C/T 位点多态性。结果 川崎病组 GPX-1 基因 -46C/T 位点 CC、CT、TT 基因型分布和 C、T 等位基因频率与正常对照组比较差异无显著性意义( $\chi^2 = 0.174$  和  $0.166, P$  均  $>0.05$ )。川崎病组 GPX-1 基因 599C/T 位点 CC、CT、TT 基因型分布和 C、T 等位基因频率与正常对照组比较差异亦无显著性意义( $\chi^2 = 0.429$  和  $0.368, P$  均  $>0.05$ )。川崎病患者合并 CAL 组与无冠状动脉损害(NCAL)组 GPX-1 基因 -46C/T 位点基因型分布和等位基因频率比较差异亦无显著性意义( $\chi^2 = 0.507$  和  $0.487, P$  均  $>0.05$ )。川崎病患者合并 CAL 组与 NCAL 组 GPX-1 基因 599C/T 位点基因型分布和等位基因频率比较差异亦无显著性意义( $\chi^2 = 0.635$  和  $0.535, P$  均  $>0.05$ )。结论 尚未发现 GPX-1 基因 -46C/T 位点多态性以及 599C/T 位点多态性与川崎病及其 CAL 的发生存在明显关联性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Association of Glutathione Peroxidase-1 Gene Polymorphism with Kawasaki Disease

CHEN Fang, JIANG Jie, LI Zhuo-Ying, CHEN Jia, TIAN Lang, LI Xin, WU Zhi-Xiang, HUANG Li-Hua, and YANG Zuo-Cheng

(Department of Pediatrics, The 3rd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

[KEY WORDS] Glutathione Peroxidase-1; Kawasaki Disease; Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the genetic association of glutathione peroxidase-1 (GPX-1) gene polymorphism in patients with kawasaki disease (KD), and coronary artery lesions (CAL). **Methods** There were 92 patients with KD and 108 healthy subjects in this study. The genotype of locus -46C/T and locus 599C/T of GPX-1 were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** For -46C/T polymorphism and 599C/T polymorphism in GPX-1 gene, there were no significant differences between KD patients and the controls in genotype frequencies of CC, CT and TT, and allele frequencies of C and T ( $\chi^2 = 0.174$  and  $0.166$ , both  $P > 0.05$ ;  $\chi^2 = 0.429$  and  $0.368$ , both  $P > 0.05$ ); For -46C/T polymorphism and 599C/T polymorphism in GPX-1 gene, there were no significant differences between KD patients with CAL and without CAL in genotype and allele frequencies of C and T ( $\chi^2 = 0.507$  and  $0.487$ , both  $P > 0.05$ ;  $\chi^2 = 0.635$  and  $0.535$ , both  $P > 0.05$ ). **Conclusion** No association was found in -46C/T polymorphism and 599C/T polymorphism between GPX-1 gene and the risk of KD or its complication of CAL in this study.

川崎病(kawasaki disease, KD)是一种好发于婴幼儿的全身性血管炎综合征。目前 KD 患儿血管损伤的发病机制未明,可能与氧化应激所致的血管内皮功能障碍有关<sup>[1]</sup>。正常情况下,机体产生少量活

性氧类物质(reactive oxygen species, ROS),体内的抗氧化系统正常时,能够及时清除 ROS 以维持二者之间的平衡。但在一些损伤因素的作用下或抗氧化系统缺陷时,体内大量的 ROS 堆积,导致氧化和

[收稿日期] 2014-06-19

[修回日期] 2014-01-05

[基金项目] 湖南省自然科学基金(12JJ3108)

[作者简介] 陈芳,硕士研究生,研究方向为小儿心血管疾病,E-mail 为 chen\_fang@csu.edu.cn。通讯作者杨作成,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为小儿心血管疾病,E-mail 为 yang\_zer@126.com。

抗氧化的失衡状态,这种状态称为氧化应激。谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase-1, GPX-1) 是体内最主要的抗氧化酶之一,广泛存在于机体内各个组织,可清除组织中可溶性自由基,从而减轻血管内皮细胞和其他生物组织的过氧化损伤,维持体内氧化和抗氧化之间的平衡<sup>[2,3]</sup>。近年研究证实,高血压、动脉粥样硬化、高脂血症、糖尿病及冠心病等存在的系统性血管内皮功能障碍与 GPX-1 基因多态性密切相关<sup>[4-7]</sup>,而是否与 KD 所存在血管病变有关,国内外尚未见研究报道。本研究通过聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 方法检测 KD 患儿 GPX-1 基因多态性的分布,探讨 GPX-1 基因多态性与 KD 之间的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

2006 年~2014 年在本院就诊的 92 例 KD 患儿,均符合《诸福棠实用儿科学》KD 诊断标准<sup>[8]</sup>。所有患儿均为汉族,年龄 4 月~7 岁,其中男 66 例,女 26 例,平均年龄  $2.49 \pm 1.49$  岁。所有患儿均调查其年龄、性别,同时检测血常规、血清免疫球蛋白、补体 C3、肝功能、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR), 并进行动态心脏彩超多普勒检查 (表 1)。其中 KD 合并冠状动脉损害 (coronary artery lesions, CAL) 的诊断指标参考日本 KD 研究委员会标准: <2 岁,冠状动脉主干内径  $\geq 2.5$  mm; <5 岁,冠状动脉主干内径  $\geq 3.0$  mm;  $\geq 5$  岁,冠状动脉主干内径  $\geq 4.0$  mm; 某段管径为邻近段的 1.5 倍及以上; 冠状动脉内径与主动脉根部内径之比  $> 0.3$ ; 管壁明显不规则<sup>[9]</sup>。根据有无合并 CAL, 将 KD 组患儿分为 KD 合并 CAL 组和无冠状动脉损害组 (NCAL 组)。

108 例在本院体检的中国汉族儿童为健康对照组,排除感染性疾病、心血管疾病、风湿性疾病以及既往 KD 病史等,年龄 1 岁至 6 岁 4 月,其中男 56 例,女 52 例,平均年龄  $2.62 \pm 2.02$  岁。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

应用 Pure Gene DNA 提取试剂盒,提取各组外周血基因 DNA,贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.3 GPX-1 基因 -46C/T 位点与 599C/T 位点基因多态性检测

应用 PCR-RFLP 检测 GPX-1 基因 -46C/T 位点与 599C/T 位点多态性,引物设计分别参照文献

[10, 11], 即上游为 5'-GATAAGTAGTACCTTGC-CCCGCAGG-3', 下游为 5'-AGACCAGACATGCCT-GCTGCCTCTT-3' (上海生物工程技术有限公司合成)<sup>[10]</sup>; 及上游为 5'-CGCTCTCAGACCATTGACACT-3', 下游为 5'-CGAGGTGGTATTTCTTGTA-AGACTA-3' (上海生物工程技术有限公司合成)<sup>[11]</sup>。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包括模板 DNA 1.6  $\mu\text{L}$  (约 200 ng), 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{mol/L}$ ), 2  $\times$  Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 去离子水加至 20  $\mu\text{L}$ 。反应在 PCR 扩增仪 (美国基因公司, PCR system 9700) 上进行。-46C/T 位点的 PCR 反应条件为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min 后,  $94^{\circ}\text{C}$  30 s  $\rightarrow$   $70^{\circ}\text{C}$  30 s  $\rightarrow$   $72^{\circ}\text{C}$  30 s (35 个循环), 终末  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。599C/T 位点的反应条件为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min 后,  $94^{\circ}\text{C}$  30 s  $\rightarrow$   $60^{\circ}\text{C}$  30 s  $\rightarrow$   $72^{\circ}\text{C}$  30 s (35 个循环), 终末  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 扩增产物用限制性内切酶消化后,用琼脂糖凝胶电泳分离消化产物,Goldview 染色,参照 DNA 分子量标记确定各位点的基因型。

表 1. 92 例 KD 患儿临床资料

Table 1. The clinical data of 92 cases of children with KD

临床表现	例数(例)	百分比
发热	92	100%
四肢变化	50	54.3%
眼结膜充血	52	56.5%
多形性红斑	51	55.4%
口唇充血皲裂、杨梅舌	74	80.4%
颈部非化脓性淋巴结肿大	64	69.6%
血沉增快 (ESR > 20 mm/h)	82	89.1%
CRP > 8 mg/L	64	69.6%
冠状动脉损害	38	41.3%

注:系入院 5 天内所收集的资料。

### 1.4 统计学分析

采用直接计数法计算出 KD 组和健康对照组 GPX-1 基因 -46C/T 位点与 599C/T 位点各种基因型频率和等位基因频率,然后经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,表明各基因型频率已达遗传平衡,具有群体代表性。各组间构成比差异采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  代表差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 GPX-1 基因 -46C/T 位点多态性的基因型检测

GPX-1 基因 -46C/T 位点 PCR 扩增片段为 383 bp, PCR 产物经 HpyCH4 III 酶切后,酶切产物经 3%

琼脂糖凝胶电泳可产生 1 个片段的 TT 型(383 bp 一条电泳带), 2 个片段的 CC 型(170 bp 和 213 bp 两条电泳带)和 3 个片段的杂合状态为 CT 型(170 bp, 213 bp 和 383 bp 三条电泳带)(图 1)。

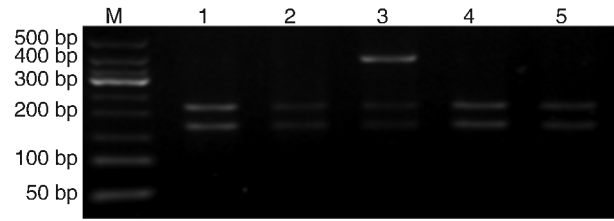


图 1. GPX-1 基因 -46C/T 多态性酶切后电泳图 M 为 DNA-Marker, 1, 2, 4, 5 为 CC 型, 3 为 CT 型。

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of the GPX-1 gene -46C/T polymorphisms

## 2.2 GPX-1 基因 599C/T 位点多态性的基因型检测

GPX-1 基因 599C/T 位点 PCR 扩增片段为 197 bp, 被 Hae III 酶切后, 酶切产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳可产生 1 个片段的 TT 型(197 bp 一条电泳带), 2 个片段的 CC 型(54 bp 和 143 bp 两条电泳带)和 3 个片段的杂合状态为 CT 型(197 bp, 143 bp 和 54 bp 三条电泳带)(图 2)。

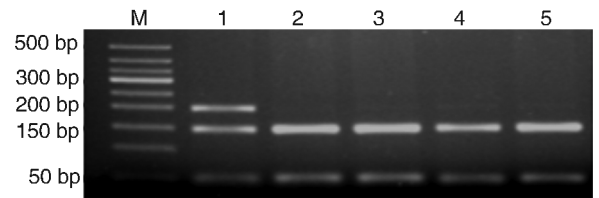


图 2. GPX-1 基因 599C/T 多态性酶切后电泳图 M 为 DNA-Marker, 1 为 CT 型, 2, 3, 4, 5 为 CC 型。

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the GPX-1 gene 599C/T polymorphisms

## 2.3 GPX-1 基因 -46C/T 及 599C/T 的基因型分布及等位基因频率

KD 组 GPX-1 基因 -46C/T 位点 CC、CT、TT 基因型分布和 C、T 等位基因频率与健康对照组比较差异无显著性( $\chi^2 = 0.174$  和  $0.166$ ,  $P$  均  $> 0.05$ ); KD 合并 CAL 组与 NCAL 组基因型分布和等位基因频率比较差异亦无显著性( $\chi^2 = 0.507$  和  $0.487$ ,  $P$  均  $> 0.05$ ; 表 2)。

KD 组 GPX-1 基因 599C/T 位点 CC、CT、TT 基因型分布和 C、T 等位基因频率与健康对照组比较差异无显著性( $\chi^2 = 0.429$  和  $0.368$ ,  $P$  均  $> 0.05$ ); KD 合并 CAL 组与 NCAL 组基因型分布和等位基因频率比较差异亦无显著性( $\chi^2 = 0.635$  和  $0.535$ ,  $P$  均  $> 0.05$ ; 表 3)。

表 2. KD 组与健康对照组 GPX-1 基因 -46C/T 位点基因型分布及等位基因频率

Table 2. The distribution and the allele frequency of GPX-1 gene -46C/T polymorphism between KD group and control group

分 组	n	基因型(例)			等位基因频率(例)	
		CC	CT	TT	C	T
健康对照组	108	98(90.7%)	10(9.2%)	0(0%)	206(95.4%)	10(4.6%)
KD 组	92	85(92.3%)	7(7.6%)	0(0%)	177(96.2%)	7(3.8%)
KD 合并 CAL 组	38	36(94.7%)	2(5.3%)	0(0%)	74(97.4%)	2(2.6%)
NCAL 组	54	49(90.7%)	5(9.3%)	0(0%)	103(95.4%)	5(4.6%)

表 3. KD 组与健康对照组 GPX-1 基因 599C/T 位点基因型分布及等位基因频率比较

Table 3. The distribution and the allele frequency of GPX-1 gene 599C/T polymorphism between KD group and control group

分 组	n	基因型(例)			等位基因频率(例)	
		CC	CT	TT	C	T
健康对照组	108	83(76.9%)	25(23.1%)	0(0%)	191(88.4%)	25(11.6%)
KD 组	92	67(72.8%)	25(27.2%)	0(0%)	159(86.4%)	25(13.6%)
KD 合并 CAL 组	38	26(68.4%)	12(31.6%)	0(0%)	64(84.2%)	12(15.8%)
NCAL 组	54	41(75.9%)	13(24.1%)	0(0%)	95(88.0%)	13(12.0%)

### 3 讨 论

机体内氧化应激与抗氧化防御系统失衡在心血管疾病中起着重要的作用<sup>[12-14]</sup>, GPX-1 是一种硒依赖性酶, 广泛存在于机体各个组织中, 可通过清除过氧化氢等可溶性自由基和一些脂肪酸过氧化物等有机过氧化物, 从而减轻细胞膜多不饱和酸的过氧化作用, 具有平衡氧化应激的功能。GPX-1<sup>[15]</sup> 是体内最重要的抗氧化酶, 在大部分细胞中表达, 包括内皮细胞, 是人体内源性抗氧化防御系统的一个重要组成部分。GPX-1 基因位于 3 号染色体的短臂(3p21.3), 包括 2 个外显子和 1 个内含子, 迄今研究较多的是 pro200leu(又称 pro198leu, pro197leu) 单核苷酸多态性, 即在 200 密码处的 C-T 单核苷酸突变会导致亮氨酸替代脯氨酸, 然而大量的研究已经发现, GPX-1 基因突变型酶活性远低于野生型酶活性<sup>[15,16]</sup>, 这可能增加氧化应激的产生, 最终导致某些心血管疾病的发生、发展。研究表明, GPX-1 基因多态性在冠心病、动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管并发症等心血管疾病的发生发展中起着重要作用<sup>[4-7]</sup>。KD 是一种全身性血管炎性疾病<sup>[17]</sup>, CAL 是其重要并发症之一, 因此, GPX-1 基因与 KD 之间亦可能存在一定的关联。Najafi 等<sup>[10]</sup> 研究认为, GPX-1 的 -46C/T 位点基因多态性可使 GPX-1 活性下降, 导致氧化和抗氧化平衡失调, 可能导致各种血管炎症事件的发生、发展。杜训波等<sup>[18]</sup> 通过探讨 GPX-1 基因 pro200leu 多态性与冠心病的关系发现, GPX-1 基因 pro200leu 多态性 T 等位基因可能是早发冠心病的一个危险因素。研究表明<sup>[19]</sup>, GPX-1 的 599C/T 位点基因多态性, 使 GPX-1 的含量或活性下降, 与颈动脉内膜中膜厚度、2 型糖尿病大血管病变的发生、发展密切相关。一项包含 636 例疑似冠状动脉疾病的前瞻性研究表明, GPX-1 的活性与 5 年后复发性冠状动脉事件的风险呈负相关<sup>[20]</sup>。Nemoto 等<sup>[21]</sup> 通过对 91 例 2 型糖尿病患者采用多螺旋 CT 评估冠状动脉钙化程度, 并对所有患者进行基因分型, 结果发现, GPX-1 的 pro197leu 基因多态性在 2 型糖尿病冠状动脉粥样硬化遗传易感性中起着关键作用。由此可见, GPX-1 基因多态性可导致血管氧化损伤的易感性增加、内皮细胞功能障碍、血管炎症以及加速冠状动脉粥样硬化的发生、发展。GPX-1 基因 -46C/T 和 599C/T 位点多态性可能与某些人群冠心病、动脉粥样硬化、高血压和糖尿病血管并发症等心血管疾病有关, 但目前关于 GPX-1 基因 -46C/T 和 599C/T 位点多态性与 KD

的关系国内外暂无报道。

本研究利用 PCR-RFLP 技术对 92 例 KD 患儿和 108 例健康儿童进行了 GPX-1 基因 -46C/T 和 599C/T 位点多态性分析。结果显示, KD 组与健康对照组比较, 基因型分布和等位基因频率差异无统计学意义。合并 CAL 组与 NCAL 组比较, 基因型分布和等位基因频率亦无统计学差异。可能由于 GPX-1 基因的 -46C/T 和 599C/T 位点多态性未参与 KD 及其 CAL 的发生, 亦可能受本研究样本量偏小、种族差异、试验条件等因素所限。因此, 有关 GPX-1 基因多态性与 KD 及其 CAL 的关系有待进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, et al. Dynamics of reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in the acute stage of Kawasaki disease[J]. *Circ J*, 2011, 75(10): 2 453-459.
- [2] Bai X, Fernandez E, Gould G, et al. Homozygous deletion of glutathione peroxidase 1 and aldehyde dehydrogenase 1a1 genes is not associated with Schizophrenia-like behavior in mice [J]. *J Biochem Pharmacol Res*, 2013, 1(4): 228-235.
- [3] Yang X, Feng L, Li C, et al. Tranilast alleviates endothelial dysfunctions and insulin resistance via preserving glutathione peroxidase 1 in rats fed a high-fat emulsion[J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124(1): 18-30.
- [4] Ahmad A, Singhal U, Hossain MM, et al. The role of the endogenous antioxidant enzymes and malondialdehyde in essential hypertension [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(6): 987-990.
- [5] Buijsse B, Lee DH, Steffen L, et al. Low serum glutathione peroxidase activity is associated with increased cardiovascular mortality in individuals with low HDLc[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38 901.
- [6] Mansego ML, Redon J, Martinez-Hervas S, et al. Different impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(9): 6 146-163.
- [7] Kumawat M, Sharma TK, Singh I, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus patients with and without nephropathy[J]. *N Am J Med Sci*, 2013, 5(3): 213-219.
- [8] 诸福棠. 实用儿科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002; 698-704.
- [9] Cho MA, Choi YJ, Jung JW. Affects of "age at diagnosis" on coronary artery lesions in patients with incomplete kawasaki disease [J]. *Korean Circ J*, 2010, 40(6): 283-287.

- [10] Najafi M, Ghasemi H, Roustazadeh A, et al. Phenotype and genotype relationship of glutathione peroxidase1 (GPx1) and rs 1800668 variant: the homozygote effect on kinetic parameters[J]. *Gene*, 2012, 505(1): 19-22.
- [11] Yang P, Bamlet WR, Ebbert JO, et al. Glutathione pathway genes and lung cancer risk in young and old populations[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(10): 1 935-944.
- [12] Song BC, Joo NS, Aldini G, et al. Biological functions of histidine-dipeptides and metabolic syndrome [J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(1): 3-10.
- [13] Soltani R, Hakimi M, Asgary S, et al. Evaluation of the effects of vaccinium arctostaphylos L. Fruit extract on serum lipids and hs-CRP levels and oxidative stress in adult patients with hyperlipidemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 217 451.
- [14] Inoue N. Stress and atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2014, 21 (5): 391-401.
- [15] Miller JC, Thomson CD, Williams SM, et al. Influence of the glutathione peroxidase 1 Pro200Leu polymorphism on the response of glutathione peroxidase activity to selenium supplementation: a randomized controlled trial[J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 96(4): 923-931.
- [16] Takata Y, King IB, Lampe JW, et al. Genetic variation in GPX1 is associated with GPX1 activity in a comprehensive analysis of genetic variations in selenoenzyme genes and their activity and oxidative stress in humans [J]. *J Nutr*, 2012, 142(3): 419-426.
- [17] 黄麟, 杨作成. 川崎病发病机制的研究进展[J]. *中华儿科杂志*, 2009, 47(4): 265-267.
- [18] 杜训波, 刘同涛, 田昌伟, 等. 冠心病与谷胱甘肽过氧化物酶 1 基因 pro200leu 多态性[J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2012, 2(50): 152-156.
- [19] Hamanishi T, Furuta H, Kato H, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes*, 2004, 53(9): 2 455-460.
- [20] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(17): 1 605-613.
- [21] Nemoto M, Nishimura R, Sasaki T, et al. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2007, 6: 23.

(此文编辑 许雪梅)