

分化抗原簇 14 基因多态性与感染易感性的相关研究

冷伟建 宋勇 于宝军 施毅

【摘要】 目的 通过检测分化抗原簇 14 基因(CD14)单核苷酸多态性(SNP)的频率分布,探讨基因多态性与感染易感性之间的关系。方法 选择 2004 年 12 月—2006 年 3 月进入重症加强治疗病房(ICU)并发全身性感染的患者 112 例,并以 100 名健康自愿献血者为正常对照组。采用聚合酶链反应(PCR)扩增限制性内切酶长度多态性(RFLP)的方法检测 CD14 基因上-159 C/T 及-260 C/T 两个位点的 SNP。结果 全身性感染组与正常对照组比较,两组 CD14-159 基因型分布差异有显著性($P=0.005$),全身性感染组 CD14-159 的 T 等位基因出现频率显著高于正常对照组($P=0.000$);两组 CD14-260 基因型分布及等位基因出现频率差异均无显著性($P=0.912$ 和 $P=0.706$)。死亡组与存活组比较,两组 CD14-159 基因型分布差异有显著性($P=0.000$),死亡组 CD14-159 的 T 等位基因出现频率显著高于存活组($P=0.000$);CD14-260 基因型分布及等位基因出现频率在两组间差异均无显著性($P=0.643$ 和 $P=0.890$)。结论 CD14 基因-159 C/T SNP 的差异可能与全身性感染患者易感性及感染后病死率增高有关。

【关键词】 分化抗原簇 14 基因; 基因多态性; 全身性感染

Association between cluster of differentiation 14 polymorphism and susceptibility of infection LENG Wei-jian*, SONG Yong, YU Bao-jun, SHI Yi. * Department of Respiratory Medicine, Clinical School of Southern Medical University, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China

Corresponding author: SONG Yong

【Abstract】 **Objective** To investigate the association between the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of cluster of differentiation 14 (CD14) and susceptibility in patients with sepsis. **Methods** One hundred and twelve patients with sepsis admitted to the intensive care unit (ICU) from December 2004 to March 2006 were enrolled for study. Another 100 healthy volunteer donors were chosen serving as the normal control group. Genotypes and alleles of CD14-159 C/T, CD14-260 C/T were determined in patients and healthy controls by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. Distributional differences of genotypes and alleles between patients and healthy controls were analyzed. The sepsis patients were divided into survivor group and nonsurvivor group depending on survival for 28 days. Distributional differences of genotypes and alleles between survivor group and nonsurvivor group were determined. **Results** The rates of CD14-159 C/T genotypes and T-alleles in patients with sepsis were significantly higher than those of healthy volunteers ($P=0.005$ and $P=0.000$). There were no significant differences in the rates of CD14-260 C/T genotypes and T-alleles in two groups ($P=0.912$ and $P=0.706$). The rates of CD14-159 C/T genotypes and T-alleles in nonsurvivors were significantly higher than those of survivors (both $P=0.000$). There were no significant differences in the rates of CD14-260 C/T genotypes and T-alleles in two groups ($P=0.643$ and $P=0.890$). **Conclusion** The differences of CD14-159 C/T genotypes of SNPs may be associated with the higher risk of susceptibility and mortality of sepsis.

【Key words】 cluster of differentiation 14; gene polymorphism; sepsis

全身性感染是创伤、感染后机体产生过度炎症反应而引起的临床综合征,与机体个体差异有直接的关系。目前最受关注的主要有遗传基因的差异,国外已有对多基因性疾病研究中部分细胞因子基因多

态性与全身性感染关系的报道^[1-4],也有分化抗原簇 14 基因(CD14)上存在多态性及与全身性感染的相关研究报道^[5-8],国内研究仅证实 CD14-159 C/T 单核苷酸多态性(SNP)与外科感染具有一定相关性^[9,10],尚未见有关 CD14-260 C/T SNP 与感染是否相关的报道。本研究中采用聚合酶链反应(PCR)扩增限制性内切酶长度多态性(RFLP)的方法对 CD14 基因组上 SNP 与全身性感染的关系进行了初步探讨,以阐明中国人中全身性感染的发生率与相应 SNP 之间的关系。

基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金(2003-14)

作者单位:210002 江苏,南京军区南京总医院,南方医科大学临床学院呼吸科(冷伟建,宋勇,施毅);南京军区南京总医院普外科实验室(于宝军)

通讯作者:宋勇,医学博士,教授,博士生导师,主任医师。

作者简介:冷伟建(1969-),男(汉族),江苏省丹阳县人,主治医师,硕士研究生。

1 资料和方法

1.1 病例选择:112 例全身性感染患者均为我院重症加强治疗病房(ICU)2004 年 12 月—2006 年 3 月住院患者,其中男 62 例,女 50 例;年龄 17~79 岁,平均(55.7±16.3)岁。全身性感染的诊断标准^[11]:有明确的感染病灶,并至少满足下列 2 项临床标准:①体温>38℃或<36℃;②心率>90 次/min;③呼吸频率>20 次/min,动脉二氧化碳分压(PaCO₂)<32 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa);④血白细胞(WBC)>12×10⁹/L 或<4×10⁹/L 或成熟杆状细胞>0.10。排除年龄>80 岁或<14 岁、心功能不全、肝功能 Child 分级 C 级、再生障碍性贫血或用免疫抑制剂等影响骨髓造血功能者。按 28 d 内病情转归结果将全身性感染组患者分为存活组(86 例)和死亡组(26 例)。100 名健康自愿献血者作为正常对照组,其中男 52 例,女 48 例;年龄 20~65 岁,平均(52.3±10.3)岁;均为无亲属关系的汉族人。

1.2 基因组 DNA 提取:取静脉全血 2 ml 加 0.5 ml 柠檬酸右旋糖液(ACD,柠檬酸 22.8 mmol/L,柠檬酸钠 45.0 mmol/L,葡萄糖 74.2 mmol/L)缓冲液抗凝,用 Promega 公司提供的 Wizard[®]基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, DNA 置 4℃保存待测。本研究所用引物均由上海申友公司合成。

1.3 CD14-159 C/T 基因型检测:-159 C/T 上游引物为 5'-TGCCAGGAGACACAGAACCC-3',下游引物为 5'-TGTCATTTCAGTTCCTCCTG-3';扩增片段长度为 166 bp。PCR 条件:96℃预变性 2 min;96℃、40 s,54℃、40 s,72℃、30 s,35 个循环;最终延伸 72℃、7 min。经 Hae III 酶切 4 h 后,可根据特异性片段来判定-159 C/T 的基因型。在电泳图上仅出现 166 bp,说明两等位基因均出现了 C 到 T 的突变,为-159 T/T 纯合子;无 166 bp、但出现 86 bp 和 80 bp 两个特异性片段,则为-159 C/C 纯合子;若出现 3 个片段则为 159 C/T 杂合子^[12]。

1.4 CD14-260 C/T 基因型检测:-260 C/T 上游引物为 5'-TCACCTCCCCACCTCTCTT-3',下游引物为 5'-CCTGCAGAATCCTTCCTGTT-3';扩增片段长度 107 bp。PCR 条件:95℃预变性 2 min;

然后 95℃、30 s,59℃、30 s,72℃、1 min,共 35 个循环;最终延伸 72℃、7 min。经 Hae III 酶切 4 h 后,可根据特异性片段来判定-260 C/T 的基因型。在电泳图上仅出现 107 bp,说明两等位基因均出现 C 到 T 的突变,为-260 T/T 纯合子;无 107 bp、但出现 83 bp 和 24 bp 两个特异性片段,则为-260 C/C 纯合子;如果出现 3 个片段,则为-260 C/T 杂合子^[13]。上述 PCR 产物及酶切产物通过质量分数为 5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)鉴定其特定的扩增片段及酶切片段,从而得出每个患者的 SNP。

1.5 统计学分析:采用 SPSS10.0 统计软件进行数据分析,各组基因型及等位基因的分布频率比较均行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 感染情况:112 例患者中,胰腺感染 23 例,胆道感染 7 例,小肠瘘 28 例,大肠瘘 13 例,肺部感染 33 例,胸腔感染 4 例,其他感染 4 例。革兰阴性(G⁻)菌感染 38 例,革兰阳性(G⁺)菌感染 13 例,混合感染 56 例,真菌感染 5 例;培养结果:G⁻菌以铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌感染为主,G⁺菌以金黄色葡萄球菌、肠球菌、凝固酶阴性葡萄球菌感染为主,真菌以白色念珠菌、热带假丝酵母菌及光滑球拟酵母菌感染为主;血培养阳性 41 例,痰培养阳性 62 例,引流液培养阳性 31 例,尖端导管培养阳性 23 例,中段尿液培养阳性 6 例。

2.2 全身性感染患者 CD14 基因 SNP 分布及等位基因出现频率(表 1):全身性感染组与正常对照组 CD14-159 基因型分布差异有显著性($\chi^2=10.739$, $P=0.005$);两组等位基因分布频率差异也有显著性,全身性感染组 CD14-159 T 等位基因出现频率显著高于正常对照组($\chi^2=13.738$, $P=0.000$),而在全身性感染组和正常对照组之间 CD14-260 基因型及等位基因分布差异均无显著性($\chi^2=0.185$, $P=0.912$ 和 $\chi^2=0.142$, $P=0.706$)。

2.3 存活组和死亡组间 CD14 基因 SNP 分布及等位基因出现频率比较(表 2):死亡组与存活组间 CD14-159 基因型分布差异有显著性($\chi^2=19.147$, $P=0.000$);两组等位基因出现频率差异有显著性,

表 1 全身性感染组与正常对照组基因型及等位基因的分布

Table 1 Frequencies of genotypes and alleles of the SNPs in sepsis and normal control groups

组别	例数 (例)	CD14-159 C/T 基因型[例(%)]					CD14-260 C/T 基因型[例(%)]				
		C/C	C/T	T/T	C 等位基因	T 等位基因	C/C	C/T	T/T	C 等位基因	T 等位基因
全身性感染组	112	46(41.1)	39(34.8)	27(24.1)	131(58.5)	93(41.5)	18(16.1)	52(46.4)	42(37.5)	88(39.3)	136(60.7)
正常对照组	100	61(61.0)	29(29.0)	10(10.0)	151(76.0)	49(24.0)	14(14.0)	47(47.0)	39(39.0)	75(38.0)	125(62.0)

表 2 存活组与死亡组基因型及等位基因的分布

Table 2 Frequencies of genotypes and alleles of the SNPs in survivor and nonsurvivor groups

组别	例数 (例)	CD14-159 C/T 基因型[例(%)]					CD14-260 C/T 基因型[例(%)]				
		C/C	C/T	T/T	C 等位基因	T 等位基因	C/C	C/T	T/T	C 等位基因	T 等位基因
存活组	86	44(51.1)	28(32.6)	14(16.3)	116(67.4)	56(32.6)	13(15.1)	42(48.8)	31(36.0)	68(39.5)	104(60.5)
死亡组	26	2(7.6)	11(42.3)	13(50.0)	15(28.8)	37(71.2)	5(19.2)	10(38.5)	11(42.3)	20(38.5)	32(61.5)

死亡组 CD14-159T 等位基因出现频率显著高于存活组($\chi^2=24.496, P=0.000$), 而 CD14-260 基因型分布和等位基因出现频率在存活组和死亡组间差异均无显著性($\chi^2=0.882, P=0.643$ 和 $\chi^2=0.019, P=0.890$)。

3 讨论

CD14 是一种膜锚合蛋白, 主要在巨噬细胞、单核细胞、多形核白细胞及肝细胞膜上表达。CD14 是先天免疫系统对感染及炎症反应调节的关键环节。 G^- 菌主要作用成分脂多糖(LPS) 进入血液循环后, 首先与血液中脂多糖结合蛋白(LBP) 结合, 形成 LPS-LBP 复合物, 再结合到靶细胞的 CD14 上, 然后再与细胞膜上 Toll 样受体 4(TLR4) 相结合, 从而激活免疫细胞的跨膜信号转导。CD14 除了膜锚合 CD14(mCD14) 外, 还有可溶性 CD14(sCD14) 这种形式。sCD14 在无锚合 CD14 的某些细胞如上皮细胞和内皮细胞对细菌产物的反应中起重要作用。Burgmann 等^[14] 研究证实, 血清 sCD14 浓度与全身感染性休克患者的病死率呈正相关。目前已发现, 在 CD14 基因组启动子上有 -159 C/T 和 -260 C/T 两个 SNP, 其中 -159 C/T 对 CD14 表达有促进作用, 在具有 T 等位基因个体的 sCD14 水平明显高于含 C 等位基因的个体^[15]; 而 -260 C/T 则被认为是心肌梗死与中风的危险因素^[16,17]。

关于 CD14-159 C/T SNP 是否与感染易感性相关报道不一致, Sutherland 等^[6] 研究证实, ICU 全身性感染及感染性休克患者中 CD14-159 T/T 与细菌培养阳性率增加及 G^- 菌的发病率相关, 但是该基因多态性与感染性休克发生率及生存率无相关性; Gibot 等^[6] 研究证实, 90 例法国感染性休克患者的 CD14-159 T/T SNP 与感染易感性具有相关性; 而 Hubacek 等^[16] 研究证实, CD14 基因多态性与全身性感染发生率及病死率的增加无相关性; 而 Agnese 等^[8] 研究证实, CD14 基因多态性与外科 ICU 患者 G^- 菌感染风险的增加无相关性。这种不一致有可能是由于人种、感染起因不同及所研究人群不均一性等原因所导致。本研究结果提示, 中国人的 CD14-159 C/T SNP 与感染易感性有一定的相关

性, 全身性感染组与正常对照组 CD14-159 基因型分布差异有显著性, 前者的 CD14-159 T 等位基因出现频率显著高于后者, 表明 CD14-159 T/T 基因型及 T 等位基因可能是全身性感染的易感性因素之一; 而死亡组与存活组 CD14-159 基因型分布差异有显著性, 前者 CD14-159 T 等位基因出现频率显著高于后者, 表明 CD14-159 T/T 基因型及 T 等位基因可能是使病死率增高的危险因素之一, 其原因可能是带有 T 等位基因的患者感染易感性增加, 从而导致预后不佳。CD14-159 T/T 基因型及 T 等位基因与感染易感性增加相关的可能原因是该位点基因多态性影响细胞膜上 CD14 表达及血浆中 sCD14 水平; 而 CD14-260 C/T 的各种基因型分布在全身性感染组和正常对照组中差异无显著性, 提示与全身性感染的发生无相关性。其原因可能为该位点的基因多态性不影响各因子的表达水平, 或者可能是变异等位基因出现的频率不高, 使相应的统计样本例数不足以产生统计学差异。

参考文献:

- Mira J P, Cariou A, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality; a multicenter study [J]. JAMA, 1999, 282(6): 561-568.
- Majetschak M, Flohe S, Oberacke U, et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients [J]. Ann Surg, 1999, 230(2): 207-214.
- Tang G J, Huang S L, Yien H W, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection [J]. Crit Care Med, 2000, 28(8): 2733-2736.
- Stuber F. Effects of genomic polymorphisms on the course of sepsis: is there a concept for gene therapy [J]? J Am Soc Nephrol, 2001, 12(Suppl 17): S60-64.
- Sutherland A M, Walley K R, Russell J A. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults [J]. Crit Care Med, 2005, 33(3): 638-644.
- Gibot S, Cariou A, Drouet L, et al. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate [J]. Crit Care Med, 2002, 30(5): 969-973.
- Hubacek J A, Stuber F, Frohlich D, et al. The common functional C(-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality [J]. Genes Immun, 2000, 1(6):

- 405-407.
- 8 Agnese D M, Calvano J E, Hahn S J, et al. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections [J]. J Infect Dis, 2002, 186(10):1522-1525.
- 9 于宝军, 黎介寿, 张佃良, 等. 肿瘤坏死因子基因组多态性在脓毒症发病中的作用 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83(24):2132-2136.
- 10 蔺静, 姚咏明, 黄志红, 等. CD14 基因多态性与烧伤后严重脓毒症易感性及患者预后的关系 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(5):271-273.
- 11 American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. Crit Care Med, 1992, 20(6):864-874.
- 12 Tarkowski E, Liljeroth A M, Nilsson A, et al. TNF gene polymorphism and its relation to intracerebral production of TNF alpha and TNF beta in AD [J]. Neurology, 2000, 54(11):2077-2081.
- 13 Laine M L, Morre S A, Murillo L S, et al. CD14 and TLR4 Gene polymorphisms in adult periodontitis [J]. J Dent Res, 2005, 84(11):1042-1046.
- 14 Burgmann H, Winkler S, Locker G J, et al. Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1996, 80(3Pt1):307-310.
- 15 Baldini M, Lohman I C, Halonen M, et al. A polymorphism in 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20(5):976-983.
- 16 Hubacek J A, Rothe G, Pitha J, et al. C(-260) T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction [J]. Circulation, 1999, 99(3):3218-3320.
- 17 Lichy C, Meiser H, Grond-Ginsbach C, et al. Lipopolysaccharide receptor CD14 polymorphism and risk of stroke in a South-German population [J]. J Neurol, 2002, 249(7):821-823.

(收稿日期:2006-10-26)

(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

血液灌流联合血液透析治疗慢性肾功能衰竭合并肝性脑病 8 例

张立群 郭俊英 白玲

【关键词】 肾功能衰竭, 慢性; 肝性脑病; 血液灌流; 血液透析

慢性肾功能衰竭(CRF)合并肝功能衰竭(肝衰)患者若出现肝性脑病则预后凶险。2002 年 5 月—2005 年 12 月, 我们采用血液灌流(HP)联合血液透析(HD)救治 8 例患者, 报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料:男 5 例,女 3 例,平均年龄(52.3±10.1)岁;病程均在 1 年以上,且合并肝硬化;血清白蛋白<35 g/L,伴门静脉高压征象。发病前肝功能相对稳定,但均由于感染等诱发肝性脑病,其诊断符合文献[1]标准。均在患者出现肝性脑病 24 h 内行 HP 联合 HD 治疗。

1.2 治疗方法:2 例直接穿刺动静脉,5 例颈内静脉或股静脉留置双腔导管,1 例用动静脉内瘘。血液灌流器与透析器串联,血流量 200~220 ml/min,碳酸氢钠透析液流量 500 ml/min,根据患者容量负荷情况调整脱水量。先行 HP 联合 HD 治疗 2~3 h,再继续透析 1~2 h,总治疗时间 4~5 h,治疗间隔 3~7 d,治

表 1 8 例患者治疗前后各项指标比较($\bar{x} \pm s$)

时间	TBL($\mu\text{mol/L}$)	IBL($\mu\text{mol/L}$)	血氨($\mu\text{mol/L}$)	BUN(mmol/L)	Cr($\mu\text{mol/L}$)	UA($\mu\text{mol/L}$)
治疗前	396.7±10.1	183.9±16.5	205.3±55.6	33.9±8.7	351.4±98.8	802.9±151.7
治疗后	191.3±9.6*	48.9±7.9*	53.2±31.7*	12.4±6.2*	179.6±17.6*	303.5±76.2*

注:与治疗前比较:* $P < 0.05$

疗次数 2~5 次。

1.3 抗凝方式:5 例有出血倾向者用小剂量低分子肝素,首剂 1 500~2 000 U,追加 500~750 U/h;余 3 例首剂 2 000~3 000 U,追加 750~1 500 U/h。采用试管法每 2~24 h 测量 1 次凝血时间,根据结果随时调整肝素追加量。

1.4 检测指标:治疗前后检测肝功能、肾功能、电解质、血氨、血气分析及凝血酶原时间各 1 次。

1.5 统计学方法:检测数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况:1 例治疗过程中出现上消化道出血,经抢救无效死亡;余 7 例经 1~3 次 HD 联合 HP 治疗,于 12~50 h 后意识恢复正常。治疗过程中患者血压、心率、呼吸等生命体征稳定。

2.2 实验室指标(表 1):治疗后血清总

胆红素、间接胆红素、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、血氨、尿酸均较治疗前显著降低(P 均 < 0.05),说明电解质紊乱纠正。

3 讨论

HP 可吸附 CRF 合并肝衰患者血液中的代谢毒物,起到解毒、护肝等作用,从而达到替代部分肝脏功能,阻断肝脏损害恶性循环,使肝细胞得以再生和修复。HP 联合 HD 治疗不但可清除 Cr、BUN 等小分子毒素,而且可吸附中分子物质如血氨、内毒素、胆红素等,对于维持机体内环境稳定、清除毒素、支持肝细胞再生有重要作用,且治疗后血小板未见明显降低,无严重不良反应。

参考文献:

- 1 Haussinger D. Pathogenesis and treatment of chronic hepatic encephalopathy [J]. Digestion, 1998, 59(Suppl 2):25-27.

(收稿日期:2006-10-05)

(本文编辑:李银平)

作者单位:252800 山东省高唐县人民医院透析中心

作者简介:张立群(1967-),女(汉族),山东省高唐人,副主任医师。