

蛋白 C 基因 -1654C/T 和 -1641A/G 位点多态性与严重脓毒症的关系研究

王洪霞 何新彪 宋诗铎

【摘要】 目的 探讨蛋白 C(PC)-1654C/T、-1641A/G 位点基因多态性与严重脓毒症易感性及预后的关系。方法 选择 80 例严重脓毒症患者,并按 28 d 预后分为存活组(47 例)和死亡组(33 例);同时选择 72 例健康对照者。采用等位基因特异性聚合酶链反应(AS-PCR)方法分析 PC 基因 -1654C/T、-1641A/G 位点的多态性,对含有等位基因多态性的片段进行 DNA 测序分析。结果 PC 基因 -1654C/T 位点 3 种基因型,严重脓毒症组 80 例中,16 例纯合子 CC 型,44 例杂合子 CT 型,20 例纯合子 TT 型;健康对照组 72 例中,17 例 CC 型,34 例 CT 型,21 例 TT 型;PC 基因 -1654C/T 位点基因型及等位基因频率分布在严重脓毒症组和健康对照组之间、存活组和死亡组之间差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。PC 基因 -1641A/G 位点 3 种基因型,严重脓毒症组 80 例中,60 例纯合子 AA 型,12 例杂合子 AG 型,8 例纯合子 GG 型;健康对照组 72 例中,57 例 AA 型,10 例 AG 型,5 例 GG 型;PC 基因 -1641A/G 位点基因型及等位基因频率分布在严重脓毒症组和健康对照组之间、存活组和死亡组之间差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。共发现 -1654T/-1641A、-1654C/-1641A、-1654C/-1641G 3 种单倍体型,未见 -1654T/-1641G 型。-1654C/-1641A 单倍体型频率在存活组、死亡组之间差异有统计学意义[21.28% (10/47)比 42.42% (14/33), $P=0.038$]。结论 PC 基因 -1654C/-1641A 单倍体型与严重脓毒症不良预后相关。

【关键词】 严重脓毒症; 蛋白 C; 基因多态性

Association between -1654C/T and -1641A/G gene polymorphism of protein C susceptibility and prognosis in severe sepsis WANG Hong-xia*, HE Xin-biao, SONG Shi-duo. *Department of Emergency Medicine, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China
Corresponding author: SONG Shi-duo, Institute of Infectious Disease, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China, Email: shiduosongl@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To approach the allele frequency and genotypic distribution of protein C (PC) gene polymorphism on the susceptibility and prognosis in severe sepsis patients. **Methods** Eighty patients with severe sepsis were enrolled. They were divided into survival group ($n=47$) and non-survival group ($n=33$) according to 28-day prognosis. Seventy-two healthy volunteers were enrolled as controls. Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) was used to analyze -1654C/T and -1641A/G site genotypes polymorphism of PC gene, fragments containing alleles was analyzed by using DNA sequencing. **Results** All the samples of the PC gene in the -1654C/T site had three kinds of genotypes: in 80 cases of severe sepsis group, there were 16 homozygous CC type, 44 heterozygous CT type, 20 homozygous TT type. In 72 cases of healthy control group, there were 17 CC type, 34 CT type, 21 TT type. The -1654C/T allele frequency and genotypic distribution in the patients with severe sepsis was not significantly different from those in the healthy control group, and no statistically significant difference was observed between the survival group and the non-survival group (all $P>0.05$). All the samples of the PC gene in the -1641A/G site had three kinds of genotypes: in 80 cases of severe sepsis group, there were 60 homozygous AA type, 12 heterozygous AG type, 8 homozygous GG type. In 72 cases of healthy control group, there were 57 AA type, 10 AG type, 5 GG type. No statistically significant difference was observed between severe sepsis group and healthy control group, the survival group and the non-survival group (all $P>0.05$) in -1641A/G allele frequency and genotypic distribution (all $P>0.05$). Three kinds of haploid, including -1654T/-1641A, -1654C/-1641A, and -1654C/-1641G were found except -1654T/-1641G. The frequency of haploid -1654C/-1641A was significant higher in non-survival group than that in the survival group [42.42% (14/33) vs. 21.28% (10/47), $P=0.038$]. **Conclusion** The correlation between PC haploid -1654C/-1641A gene polymorphisms and prognosis of severe sepsis was found.

【Key words】 Severe sepsis; Protein C; Gene polymorphism

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.08.004

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划(09JCYBJC11300)

作者单位:300211 天津医科大学第二医院急诊科(王洪霞、何新彪),天津市感染性疾病研究所(宋诗铎)

通信作者:宋诗铎,Email:shiduosongl@yahoo.com.cn

脓毒症是由感染导致的全身炎症反应综合征(SIRS),严重脓毒症时常合并急性器官功能障碍,是重症监护病房(ICU)患者死亡的重要原因^[1-2]。随着研究的深入,目前认为基因多态性参与了脓毒症的病理生理过程,并可能对其易感性和结局起作用^[3-5]。

脓毒症的一个重要病理生理改变是凝血功能异常,蛋白 C(PC)途径是天然抗凝系统之一,是脓毒症病理生理过程中的主要分子^[6],严重脓症患者 PC 水平显著降低,低 PC 水平与不良预后相关^[7-10]。已有研究显示,PC 基因多态性与成人深静脉血栓形成(DVT)相关^[11-15],但关于 PC 启动子区基因多态性是否与严重脓毒症易感性和预后相关的报道不多。本研究旨在探讨 PC 基因 -1654C/T、-1641A/G 位点多态性与严重脓毒症易感性及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象:选择 2010 年 1 月至 2012 年 2 月天津医科大学第二医院 ICU 收治的 80 例严重脓症患者为病例组,收集其临床资料,进行急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分,根据住院 28 d 转归分为生存组和死亡组。严重脓毒症诊断标准参照 2001 年美国胸科医师协会 / 危重病医学会 (ACCP/SCCM) 共识会议标准^[1]。剔除住院时间 < 24 h 的患者,肿瘤、严重外伤、重大手术患者。健康对照组为门诊健康体检者,近期均无感染史、遗传病史、自身免疫系统疾病史和其他病史。

本研究符合医学伦理学标准,并经医院伦理委员会批准,所有检测获得患者或家属知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 全血基因组 DNA 提取:收集静脉血 1~2 ml, 2% 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,采用加拿大 Sangon 公司基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取(蛋白酶 K 法),于 -80 °C 冻存。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR)扩增目的片段:引物根据 Genbank 所发布的目的基因序列,用 Generunner 引物设计软件自行设计,由北京奥科生物公司合成[聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化,纯度 99%]:通用引物为 5'-CATGTGTCTTATAATTAATGGTATTTAGATTTGACGA-3'。应用两次等位基因特异性 PCR (AS-PCR) 方法分析 PC 启动子区 -1654C/T、-1641A/G 变异。第一次 PCR 体系中,加入通用引物和 -1654T、-1641A 等位基因特异引物;在第二次 PCR 体系中,加入通用引物和 -1654C、-1641G 等位基因特异引物。参照文献^[16]引物序列:-1654T 为 5'-TCTGCCTACCAAGGATGGCA-3'; -1641A 为 5'-CCGAAGCCCACCTCTCCCT-3'; -1654C 为 5'-GCC CACCATTGCCTACCAAGGATTCCG-3'; -1641G 为 5'-TGTTCTTACCGAAGCCCACCTCTGTCC-3'。PCR 反应总体积为 25 μ l,反应条件:94 °C 预变性 4 min, 然后进行 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸

20 s, 共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,经紫外凝胶成像分析仪(美国基因公司,GDS-8000 型)分析。

1.2.3 DNA 序列分析:选择不同基因型的 PCR 产物进行 DNA 序列分析,结果与 NCBI 数据库进行比对。委托上海生工生物公司完成测序。

1.3 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行数据处理。计数资料用百分数表示,组间差异采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用 *t* 检验。群体数据用 Hardy-Weinberg 平衡方程检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料:严重脓毒症组 80 例中男性 41 例,女性 39 例;年龄 20~91 岁,平均(68.3 \pm 17.1)岁;APACHE II 评分(18.3 \pm 4.9)分;住院 28 d 存活 47 例,死亡 33 例,病死率 41.25%,存活组 APACHE II 评分(16.7 \pm 4.1)分,死亡组 APACHE II 评分(22.1 \pm 5.7)分,两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。健康对照组 72 例中男性 42 例,女性 30 例;年龄 22~83 岁,平均(63.9 \pm 13.5)岁。

2.2 PCR 扩增片段分析(图 1):-1654T PCR 产物长度为 227 bp,-1654C 为 234 bp,-1641A 为 240 bp,-1641G 为 247 bp。

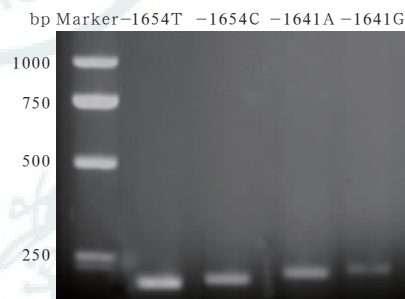


图 1 聚合酶链反应扩增蛋白 C 基因片段

2.3 PC 基因 -1654C/T 位点多态性与严重脓毒症易感性和预后的关系(表 1):严重脓毒症组和健康对照组基因型频率的分布经 Hardy-Weinberg 平衡方程检验,有群体代表性。严重脓毒症组和健康对照组全部样本 3 种基因型中,CT 基因型最多(78 例),TT 基因型次之(41 例),CC 基因型最少(33 例);严重脓毒症组 C 等位基因携带率为 47.50%,健康对照组为 47.22%。-1654C/T 位点基因型及等位基因频率在严重脓毒症组和健康对照组、严重脓毒症存活组和死亡组之间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 严重脓毒症组及其亚组、健康对照组 -1654C/T 位点基因型及等位基因频率比较

组别	例数	基因型频率[例(%)]			等位基因频率[例(%)]	
		CC	CT	TT	C	T
健康对照组	72	17(23.61)	34(47.22)	21(29.17)	68(47.22)	76(52.78)
严重脓毒症组	80	16(20.00)	44(55.00)	20(25.00)	76(47.50)	84(52.50)
存活组	47	6(12.77)	28(59.57)	13(27.66)	40(42.55)	54(57.45)
死亡组	33	9(27.27)	18(54.55)	6(18.18)	36(54.55)	30(45.45)

表 2 严重脓毒症组及其亚组、健康对照组 -1641A/G 位点基因型及等位基因频率比较

组别	例数	基因型频率[例(%)]			等位基因频率[例(%)]	
		AA	AG	GG	G	A
健康对照组	72	57(79.17)	10(13.89)	5(6.94)	20(13.89)	124(86.11)
严重脓毒症组	80	60(75.00)	12(15.00)	8(10.00)	28(17.50)	132(82.50)
存活组	47	32(68.09)	10(21.28)	5(10.64)	20(21.28)	74(78.72)
死亡组	33	27(81.82)	4(12.12)	2(6.06)	8(12.12)	58(87.88)

2.4 PC 基因 -1641A/G 位点多态性与严重脓毒症易感性和预后的关系(表 2):严重脓毒症组和健康对照组全部样本 3 种基因型中,GG 基因型最少,AG 基因型次之,AA 基因型最多;严重脓毒症组 A 等位基因携带率为 82.50%,健康对照组为 86.11%。-1641A/G 位点基因型及等位基因频率在严重脓毒症组和健康对照组、严重脓毒症存活组和死亡组之间比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.5 PC 基因 -1654/-1641 单倍体与严重脓毒症易感性和预后的关系(表 3):共发现 -1654T/-1641A、-1654C/-1641A、-1654C/-1641G 3 种单倍体型,未见 -1654T/-1641G 型。-1654C/-1641A 单倍体频率在严重脓毒症存活组和死亡组之间差异有统计学意义($P=0.038$)。

表 3 严重脓毒症组及其亚组、健康对照组 -1654/-1641 位点单倍体型频率比较

组别	例数	-1654/-1641 单倍体型[例(%)]		
		TA	CA	CG
健康对照组	72	38(52.78)	24(33.33)	10(13.89)
严重脓毒症组	80	42(52.50)	24(30.00)	14(17.50)
存活组	47	27(57.45)	10(21.28)	10(21.28)
死亡组	33	15(45.45)	14(42.42) ^a	4(12.12)

注:与存活组比较,^a $P<0.05$

3 讨论

PC 是肝脏合成的维生素 K 依赖性糖蛋白,以酶原形式分泌,属丝氨酸蛋白酶家族。人类 PC 基因位于 2q13-14,基因 DNA 全长 11 kb,含 9 个外显子。PC 启动子区 -1654T>C、-1641A>G 位点基因多态性对 DVT 患者的 PC 水平有明显的影

响。带 -1654C/-1641G 者的 PC 水平减低,可以增加 DVT 和肺栓塞患者血栓形成事件的危险性^[12-13]。然而,关于 PC 启动子区基因多态性与严重脓毒症易感性和预后关系的数据却很有限。Walley 和 Russell^[17]对 3 组严重脓毒症患者进行了研究,第一组 62 例为合并严重脓毒症的危重患者,第二组患者的构成与第一组相似,但样本量增加至 402 例,第三组 61 例为心脏分流术后患者。结果显示,第一组 PC 基因 -1641AA 携带者 28 d 生存率显著降低,这一点在第二组中再次得到验证,另外,PC 基因 -1641AA 携带者器官功能障碍的发生率显著增加;在心脏分流术后 4 h、24 h,PC 基因 -1641AA 携带者血清白细胞介素 -6 (IL-6)水平升高。这些结果说明,严重脓毒症 PC 基因 -1641AA 携带者 28 d 生存率降低,并易出现急性器官功能障碍。本研究未发现 PC 基因 -1641AA 与预后相关;PC 基因 -1641A/G 位点基因型及等位基因频率在严重脓毒症组和健康对照组、严重脓毒症存活组和死亡组之间比较差异无统计学意义,说明 -1641A/G 位点基因多态性与严重脓毒症易感性和预后可能不相关。主要原因可能与种族、地区差异有关。

PC 基因 -1654C/-1641G 型是欧洲人中出现频率最高的基因型,与低 PC 活性相关,携带者容易出现血栓^[12-13]。Binder 等^[16]报道,-1654C/-1641G 等位基因携带患儿发展为脓毒症的相对危险性上升了 3.43 倍,并且血压明显降低,需要肾上腺素能药物支持的比例显著升高,而 TA-TA 基因型是发展为脓毒症的保护性因素。本研究共发现 -1654T/-1641A、-1654C/-1641A、-1654C/-1641G 3 种单倍体型,未见 -1654T/-1641G 型,与以往报道^[12-13]不同。主要原因可能与种族、地区差异有关。本研究结果显示,-1654C/-1641A 基因型频率在严重脓毒症存活组、死亡组之间差异有统计学意义,-1654C/-1641A 携带者预后差,未见 CG 等位基因携带者预后不良,与 Chen 等^[18]报道的结果一致。但本研究严重脓毒症死亡组 -1654C/-1641A 携带者比例为 42.42%,高于 Chen 等^[18]报道的 34.6%,考虑与本研究样本量小有关。另外,Russell 等^[19]研究表明,严重脓毒症患者 PC 基因 673 T/C 位点 C 等位基因携带者易出现器官功能障碍,病死率高。

PC 途径是天然抗凝系统之一,其活性受年龄和性别影响^[20]。研究表明,严重脓毒症存在凝血功能

紊乱^[11,21-22],近来这方面治疗已取得较大进展^[23-26]。本研究未同时检测 PC 活性,尚不能明确 PC 基因 -1654C/T、-1641A/G 位点多态性与 PC 活性的关系。

综上所述,PC 基因 -1654C/T、-1641A/G 位点多态性存在于当地健康人群,-1654C/1641A 单倍体与严重脓毒症不良预后相关。鉴于本研究所选人群的局限性和其他多种因素的干扰,要揭示 PC 基因多态性与脓毒症的关系及其在脓毒症发生发展中的作用,还有待更大样本的深入研究。

参考文献

- [1] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med, 2003, 31: 1250-1256.
- [2] Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med, 2006, 34: 344-353.
- [3] Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. Chest, 2003, 124: 1103-1115.
- [4] Michalek J, Svetlikova P, Fedora M, et al. Bactericidal permeability increasing protein gene variants in children with sepsis. Intensive Care Med, 2007, 33: 2158-2164.
- [5] Pinsky MR. Genetics of individualizing patient care. Crit Care Med, 2007, 35: 287-290.
- [6] Mann HJ, Short MA, Schlichting DE. Protein C in critical illness. Am J Health Syst Pharm, 2009, 66: 1089-1096.
- [7] Kinasevitz GT, Yan SB, Basson B, et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. Crit Care, 2004, 8: R82-90.
- [8] Stephenson DA, Tolt LJ, Beaudin S, et al. Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant. J Immunol, 2006, 177: 2115-2122.
- [9] Brunkhorst F, Sakr Y, Hagel S, et al. Protein C concentrations correlate with organ dysfunction and predict outcome independent of the presence of sepsis. Anesthesiology, 2007, 107: 15-23.
- [10] Perés Wingeyer SD, Cunto ER, Noguera CM, et al. Biomarkers in sepsis at time zero: intensive care unit scores, plasma measurements and polymorphisms in Argentina. J Infect Dev Ctries, 2012, 6: 555-562.
- [11] Tassin M, Llaena P, Laffaye F, et al. Protein C deficiency in patient with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and deep vein thrombosis. Arch Argent Pediatr, 2013, 111: e28-30.
- [12] Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, et al. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15: 214-218.
- [13] Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, et al. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 1573-1576.
- [14] 沈薇, 顾怡, 张岚, 等. 20 例蛋白 C 缺陷静脉血栓患者的 PROC 基因调查. 中华医学杂志, 2012, 92: 1603-1606.
- [15] Brouwer JL, Lijfering WM, Ten Kate MK, et al. High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. Thromb Haemost, 2009, 101: 93-99.
- [16] Binder A, Endler G, Rieger S, et al. Protein C promoter polymorphisms associate with sepsis in children with systemic meningococemia. Hum Genet, 2007, 122: 183-190.
- [17] Walley KR, Russell JA. Protein C -1641 AA is associated with decreased survival and more organ dysfunction in severe sepsis. Crit Care Med, 2007, 35: 12-17.
- [18] Chen QX, Wu SJ, Wang HH, et al. Protein C -1641A/-1654C haplotype is associated with organ dysfunction and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population. Hum Genet, 2008, 123: 281-287.
- [19] Russell JA, Wellman H, Walley KR. Protein C rs2069912 C allele is associated with increased mortality from severe sepsis in North Americans of East Asian ancestry. Hum Genet, 2008, 123: 661-663.
- [20] 王晓燕, 朱铁楠, 赵永强, 等. 汉族人群蛋白 C、蛋白 S 和抗凝血酶活性水平及活性缺乏发生率的研究. 中华血液学杂志, 2012, 33: 127-130.
- [21] 郑贵军, 武子霞, 朱海云, 等. 活化蛋白 C 对脂多糖诱导大鼠主动脉内皮细胞表达血管性血友病因子及其裂解酶的影响. 中国危重病急救医学, 2012, 24: 487-489.
- [22] Russell JA. Management of sepsis. N Engl J Med, 2006, 355: 1699-1713.
- [23] Iba T, Nagaoka I, Boulat M. The anticoagulant therapy for sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. Thromb Res, 2013, 131: 383-389.
- [24] Shorr AF, Nelson DR, Wyncoll DL, et al. Protein C: a potential biomarker in severe sepsis and a possible tool for monitoring treatment with drotrecogin alfa (activated). Crit Care, 2008, 12: R45.
- [25] Tolt LJ, Shin LY, Liaw PC. Activated protein C in sepsis and beyond: update 2006. Front Biosci, 2007, 12: 1963-1972.
- [26] Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. Blood, 2007, 109: 3161-3172.

(收稿日期: 2013-07-01) (本文编辑: 李银平)

· 科研新闻速递 ·

过表达可溶性 ST2 的人类间充质干细胞疗法能减轻内毒素引起的急性肺损伤

肺泡上皮-间质-内皮损伤导致肺水肿合并严重的炎症反应和呼吸功能障碍是急性肺损伤(ALI)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的病理生理学特点,其中白细胞介素-33及其受体 ST2(IL-33/ST2)信号通路在肺部免疫炎症反应的进展中起关键作用。有研究认为细胞疗法可作为治疗 ALI/ARDS 的有效手段之一。最近巴塞罗那人类分子遗传学研究组的学者建立了过度表达可溶性 ST2(sST2, IL-33 的一种拮抗型受体)的人脂肪组织源性间充质干细胞(hASC-sST2),并将其应用于小鼠 ALI 模型,旨在增强其免疫调节和抗炎的特性。在脂多糖(LPS)滴入鼻内 6 h 后,研究人员将 hASC-sST2 注入小鼠体内,通过生物发光成像、免疫组化和聚焦转录谱等技术证实,在内毒素损伤 48 h 后肺组织中 hASC 数量明显升高,同时 hASC 免疫调节信号通路活性增强;sST2 过度表达可抑制 IL-33、Toll 样受 4、IL-1 β 和 γ -干扰素的表达,同时能促进 IL-10 的表达。这种协同作用可明显减轻肺部的炎症反应并降低血管通透性。这些结果表明,全身性应用 hASC-sST2 有可能成为 ALI/ARDS 一个有效治疗策略。

喻文, 胡森, 编译自《Am J Respir Cell Mol Biol》, 2013-05-08(电子版)