

亲环素 A 基因多态性与急性胰腺炎的相关性研究

符自清, 周明黎(湖南省湘西自治州人民医院检验科 416000)

【摘要】 目的 探讨亲环素 A(cyclophilin A, CyPA) 基因 BamH I 多态性与急性胰腺炎的关系。方法 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术分析 101 例急性胰腺炎患者和 123 名健康对照人群的 CyPA 基因型及等位基因频率分布状况, 同时测定白细胞数、血糖、血清钙离子和尿素氮。结果 两组均存在 3 种基因型: AA 型、AG 型和 GG 型; 急性胰腺炎组 AA 型频率高于对照组, GG 型频率低于对照组, 基因型构成比有明显差异($\chi^2=20.206, P<0.05$); 对照组 G 等位基因频率高于急性胰腺炎组, 两组间等位基因频率有明显差异($\chi^2=22.364, P<0.05$)。结论 AA 型可能是致急性胰腺炎的危险因素, G 等位基因可能具有降低正常人群患急性胰腺炎的作用, CyPA 基因多态性可能与急性胰腺炎有相关性。

【关键词】 亲环素 A; 基因多态性; 急性胰腺炎

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.15.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)15-1810-02

The study on the correlation of the cyclophilin A gene polymorphism and acute pancreatitis FU Zi-qing, ZHOU Ming-li (Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture, Hunan 416000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between acute pancreatitis and the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of cyclophilin A gene. Methods 101 patients with acute pancreatitis and 123 normal controls were involved in the present study. The polymorphism of cyclophilin A gene was analyzed by PCR-RFLP and the serum level of glucose, calcium, blood urea nitrogen and white blood cell were measured by automatic biochemical analyzer or automatic blood cell analyzer. Results There were three kinds of genotype: AA, AG and GG; Significant difference was found in genotype and allele frequencies of cyclophilin A gene polymorphism between acute pancreatitis group and the control group. The frequency of AA genotype in acute pancreatitis group was higher than that of control group ($\chi^2=20.206, P<0.05$); The G allele frequency in acute pancreatitis group was lower than that of control group ($\chi^2=22.364, P<0.05$). Conclusion The G allele of cyclophilin A gene may be protective against the acute pancreatitis. It is confirmed that the polymorphism of cyclophilin A gene is associated with acute pancreatitis.

【Key words】 cyclophilin A; gene polymorphism; acute pancreatitis

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发病率呈增高趋势, 早期易并发多器官功能衰竭, 且该疾病的病死率仍较高。目前认为 AP 是一种由多因素、多环节组成的全身炎症综合征。胰液分泌亢进、胰酶异常激活、胰液排泄受阻、胰腺供血不足等不同的治病因子导致胰腺腺泡受损, 引发活性胰酶的释放和白细胞尤其是中性粒细胞的过度激活, 并激发炎症反应因子的大量释放, 导致胰腺炎症坏死^[1]。研究认为探讨亲环素 A(cyclophilin A, CyPA) 是一种新发现的及其重要的中性粒细胞趋化因子, 而由细胞因子引起的中性粒细胞聚集又是 AP 的重要病因^[2-3]。这是国内外研究 AP 致病机制一个新的热点, 但国内少有 CyPA 基因多态性与 AP 相关性的研究。本研究旨在探讨 CyPA 基因 5' 调控区多态性与急性胰腺炎的关系。

1 资料与方法

1.1 对象 选取 2008 年 1 月至 2010 年 10 月确诊的急性胰腺炎患者 101 例, 作为急性胰腺炎组, 其中男 53 例, 女 48 例, 平均年龄(53.1±8.2)岁; 随机选取来本院体检的健康人群 123 名作为健康对照组, 其中男 63 名, 女 60 名, 平均年龄(50.3±7.6)岁。急性胰腺炎诊断标准^[4]: (1) 典型的急性、持续性腹痛(偶无腹痛)临床症状; (2) 血清淀粉酶活性增高并大于正常值上限 3 倍(少数病例正常或轻度增高)等血清酶学改变; (3) 影像学提示胰腺有或无形态改变; (4) 排除由胰腺肿瘤或其他腹部肿瘤、手术、创伤、妊娠等引起的 AP 患者。各组间性别与年龄无差异。

1.2 方法

1.2.1 一般实验数据的收集 各组血常规测定用雅培 CELL3700, 试剂由雅培公司提供; 生物化学指标测定用日立公司 7600, 试剂由日本第一化学株式会社提供。各项目检测前均用雅培或朗道标准品校准, 同时严格执行室内质控程序。

1.2.2 基因组 DNA 提取和基因型分析 (1) 基因组 DNA 提取和基因扩增: 采用 Innogent 试剂盒提取全血基因组 DNA, 用 Primer Premier5 设计 CyPA 基因 BamH I 多态性位点引物, 引物序列为: 正义 5'-TAG GAC GCG ACG TGG TGT TTG-3', 反义 5'-AAT GTC GAA GAA CAC GGT GGG-3'。(2) CyPA 目的片段扩增: PCR 扩增反应体系 50 μ L, 其中 10 \times pcr buffer 5 μ L, 2 mmol/L 三磷酸脱氧核糖核苷 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 引物各 1 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L, 加 ddH₂O 补足 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增完后, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 检测扩增结果。(3) 限制性内切酶分析: 取 PCR 产物 10 μ L, 用 BamH I 内切酶 5 U, 10 \times buffer 2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶解 12 h, 60 $^{\circ}$ C 20 min, 以 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶切产物。

1.3 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两样本间差异采用 *t* 检验, 样本间率的比较 χ^2 检验。采用 SPSS13.0 进行统计学处理, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CyPA 基因 BamH I 多态性位点分布 目的条带长

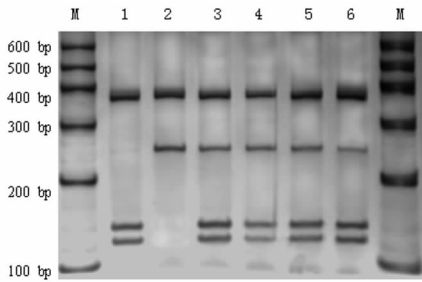
628 bp,用限制性内切酶 BamH I 消化 CyPA 基因的扩增产物,GG 型(野生型)个体有两个酶切位点,可产生 3 条条带,即 120、137、371 bp 条带,GA 型(杂和型)个体则产生 4 条条带,即 120、137、257、371 bp 条带;AA 型(突变型)个体只有一个酶切位点只产生 2 条条带,即 257、371 bp 条带,见图 1。与对照组基因型的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律(急性胰腺炎组 $\chi^2=0.312, P>0.05$;对照组 $\chi^2=0.502, P>0.05$),所选

人群具有代表性。

2.2 急性胰腺炎组与对照组基因型及等位基因频率比较 急性胰腺炎组 AA 型多于对照组,GG 型少于对照组,构成比有明显差异($\chi^2=20.206, P<0.05$);对照组 G 等位基因频率高于急性胰腺炎组,两组间等位基因频率有明显差异($\chi^2=22.364, P<0.05$),见表 1。

表 1 急性胰腺炎组和对照组 CyPA 基因 BamH I 位点基因型构成及等位基因频率[n(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
急性胰腺炎组	101	40(0.396)	45(0.446)	16(0.158)	125(0.619)	77(0.381)
健康对照组	123	21(0.171)	55(0.447)	47(0.382)	97(0.394)	149(0.606)
P			<0.001			<0.001



注:M 为相对相对分子质量标准;1:GG 型 2:AA 型 3~6:GA 型
图 1 CyPA 基因 rs5932 扩增片段的 BamH I 酶切电泳图

2.3 急性胰腺炎组与健康对照组一般临床资料的比较 急性胰腺炎组白细胞数、血糖和尿素氮均高于对照组(t 值分别为 3.352、3.991、3.881, P 值均 <0.05),急性胰腺炎组血清钙离子低于对照组($t=3.112, P<0.05$),差异有统计学意义,见表 2。

表 2 急性胰腺炎组与健康对照组一般临床资料的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	WBC	GLU	Ca	BUN
急性胰腺炎组	101	16.5±4.45	7.16±1.12	1.72±0.82	10.15±4.51
健康对照组	123	6.4±2.59	5.06±1.89	2.24±0.93	4.86±0.92
P		<0.001	<0.002	<0.001	<0.001

注:白细胞(WBC)单位为 $\times 10^9/L$,血糖(GLU)、钙(Ca)、血尿素氮(BUN)单位为 mmol/L。

3 讨论

亲环素 A 基因位于 7p13,由 6 476 bp 组成,由 5 个外显子和 4 个内含子组成,其 5' 调控区存在一个 BamH I (rs3069411)多态性。CyPA 是亲环素家族中含量最丰富的成员,由 165 个氨基酸组成,相对分子质量为 18×10^3 ,存在于细胞质核膜与高尔基体中,约占细胞总蛋白的 0.1%~0.4%。其参与细胞凋亡和细胞间信号传导等生物学过程。Sherry 等^[5]实验证实,注射外源性 CyPA 后,能迅速引起中性粒细胞在炎症部位聚集。在脓毒症及一些炎性反应疾病中,血清 CyPA 表达水平明显增加,且与疾病的严重程度或疾病的活动性呈正相关。近年来 Banks 等^[6]和 Granger 等^[7]提出白细胞过度激活及各种细胞因子级联反应在 AP 发病中的作用,日益受到重视,认为这是急性重症胰腺炎病情重、并发症多、病死率高的主要原因。Coelho 等^[8]实验发现 CyPA 可以因为炎性反应刺激而释放入细胞外,在细胞外参与炎性反应与氧化应激应答。鉴于 CyPA 基因 BamH I 多态性与急性胰腺炎相关性国

内鲜有报道,本研究筛选对基因表达调控紧密相关的 5' 调控区多态性位点,作为 CyPA 基因与 AP 相关性研究的首要多态性位点。

本研采用 PCR-RFLP 技术,发现健康人群 CyPA 基因 5' 调控区存在 BamH I 多态性,分析了该多态性的分布状况,结果显示急性胰腺炎组 CyPA 基因 AA 型频率高于健康对照组(0.396 vs 0.171, $P<0.05$),这提示该 5' 调控区的 BamH I 位点多态性可能与 CyPA 基因的表达调控相关,从而影响蛋白质的生理活性,继而间接参与急性胰腺炎的病理生理调节机制。健康对照组 G 等位基因频率高于急性胰腺炎组(0.619 vs 0.394, $P<0.05$),提示 G 等位基因可能是健康人群的保护因子而降低急性胰腺炎的患病风险。上述结果与 Dambrasukas 等^[9]研究一致,可推测 CyPA 基因 5' 调控区的 BamHI 多态性可能与急性胰腺炎相关,且 AA 型可能是易患急性胰腺炎的危险因子,进一步推测该多态性可能是导致患者发病的遗传因素之一。

基因型分析越来越为临床医师所认同,对 AP 患者的细胞因子基因多态性进行分析鉴定,明确不同个体 CyPA 基因多态性的差异,将临床症状与基因型这两个因素结合起来,对 AP 患者的病情转归趋势与愈后进行预测性判断,从而指导临床医师采取不同的防治措施,及时给予个体化治疗,这对提高临床治愈率和节省有限的卫生医疗资源具有重要意义。本研究通过 CyPA 基因多态性的分析认为其 5' 调控区的 BamH I 多态性与急性胰腺炎相关。接下来的研究应进一步加大样本量,并在性别与病情危重程度等层次深入探讨该多态性与急性胰腺炎的相关性。

参考文献

- [1] Blum T, Maisonneuve P, Lowenfels AB, et al. Fatal outcome in acute pancreatitis: its occurrence and early Prediction [J]. Pancreatolgy, 2001, 1(3): 237-241.
- [2] Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(38): 5043-5051.
- [3] Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins [J]. Immunology, 2006, 117(3): 301-309.
- [4] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案)[J]. 中华内科杂志, 2004, 43(3): 236-238. (下转第 1814 页)

3 讨 论

医院内感染又称医院获得性感染(hospital acquired infections, HAI),它是指任何人员在医院活动期间遭受病原体侵袭而引起的任何诊断明确的感染,其中60%~65%的医院内感染是由革兰阴性杆菌引起,主要为肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属细菌。本次研究主要分离细菌为大肠埃希菌(33.3%)、铜绿假单胞菌(18.7%)、克雷伯菌属细菌(17.7%)、不动杆菌属细菌(16.6%)、肠杆菌属细菌(11.5%)和嗜麦芽寡养假单胞菌(2.1%)。

发生医院获得性感染的主要部位是肺部、手术伤口及尿路感染^[3]。本研究与文献报道基本一致,依次是肺部、尿路、手术伤口(分泌物、胆汁、引流液),造成这种现象的主要原因是创伤性和介入性诊疗措施的使用,如:静脉导管、气管切开或插管、心导管、尿管、T管引流、人工呼吸机、腹膜或血液透析等操作;异物的植入如人工心脏瓣膜或人工关节;脏器或血管移植;污染手术。据国内文献报道,肺部感染约占医院内感染的15%~54%,本研究肺部感染高达60.4%,尿路医院内感染达14.6%。虽然无菌操作手术技术及预防感染等措施在日益改进,但术后引发的感染仍占医院内感染的10%~30%,本研究分泌物占11.5%、胆汁占7.3%、引流液占5.2%。

大肠埃希菌为本院各科分离率最高的医院内感染细菌(33.3%),这与国内相关报道结果基本一致^[4],其他依次为铜绿假单胞菌(18.7%)、克雷伯菌属细菌(17.7%)、不动杆菌属细菌(16.6%)、肠杆菌属细菌(11.5%),嗜麦芽寡养假单胞菌(2.1%)。大肠埃希菌对头孢噻肟的耐药率(41.6%)明显高于头孢他啶(18.7%),提示本院的ESBLs可能主要为CTX-M型,它们对头孢噻肟水解力强,对头孢他啶水解力弱^[5]。目前对大肠埃希菌保持较好抗菌活性的抗生素为亚胺培南、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星、头孢吡肟以及头孢哌酮/舒巴坦。

本院分离的18株铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率为40.6%,呈逐年上升趋势,高于国内其他地区的相关报道^[6],这可能与碳青霉烯类药物较高的使用频率有关。在第三代头孢菌素中,头孢他啶被认为是抗假单胞菌活性最强的抗生素,本研究结果亦证实,18株铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药率仅为26.2%,而对头孢噻肟的耐药率为56.8%。铜绿假单胞菌对头孢哌酮/舒巴坦保持较低的耐药率(23.8%)。

对不动杆菌属细菌保持较高体外抗菌活性的抗生素为头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、阿米卡星和替卡西林/克拉维酸。鲍曼不动杆菌可能因染色体介导的头孢菌素酶(包括AmpC酶)对头孢他啶高度耐药,本研究中不动杆菌对头孢他啶的耐药率达到34.2%。

阴沟肠杆菌是肠杆菌属中分离最多的代表菌,是多重耐药菌株,为产诱导型β-内酰胺酶菌群,对头孢他啶的耐药率高达58.1%。对于肠杆菌属细菌,体外活性最好的是亚胺培南,敏感率为97.8%。

产ESBLs菌株是医院内感染的主要致病菌之一。我国学者发现北京、广州、杭州等地的产ESBLs菌株主要产头孢噻肟酶(CTX-M酶)^[4],这严重影响头孢噻肟和头孢曲松对医院感染的病原菌的治疗。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是产质粒介导的ESBLs的代表菌种。2009年大肠埃希菌的ESBLs阳性率为49%,肺炎克雷伯菌的ESBLs阳性率为38.2%,2010年大肠埃希菌的ESBLs阳性率上升至53.2%,肺炎克雷伯菌的ESBLs阳性率上升至55.1%。由于ESBLs可由质粒携带,很容易在细菌间传递扩散,导致对抗生素耐药的细菌广泛传播。因此尽早检出产ESBLs细菌,有助于控制此类耐药菌的传播^[12]。

综上所述,经呼吸道、尿路、手术等途径产生的医院内感染占有较大比重,医院感染科应加强对环境卫生、介入治疗、手术治疗的监控力度。大肠埃希菌、不动杆菌属细菌和肠杆菌属细菌均对亚胺培南有很高的敏感性,铜绿假单胞菌对头孢他啶和阿米卡星的敏感性也较高,医院感染科应即时向临床医生传达这些信息,使之在临床工作中起到更好的指导和监督作用。同时还要加强对产ESBLs菌的检出和监测工作,以控制其在医院内扩散与流行。

参考文献

- [1] 李影林. 临床微生物学及检验[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1991:580-585.
- [2] 陈民钧,王辉. 中国重症监护病房革兰阴性菌耐药性连续7年监测研究[J]. 中华医学杂志,2003,83(5):375-381.
- [3] 徐南,徐秀华,吴安华,等. 医院感染横断面研究报告[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(1):1-3.
- [4] 张小江,王辉,徐英春,等. 重症监护病房最常见革兰阴性杆菌的耐药变迁[J]. 中华医院感染学杂志,2004,14(10):1179-1182.
- [5] 蔡琰,范新建,吕晓菊,等. 产超广谱β-内酰胺酶肠杆菌属细菌耐药性及基因型检测[J]. 中国抗生素杂志,2003,28(2):82-86.
- [6] 王辉,谢秀丽,徐英春,等. 革兰阴性杆菌对12种抗生素的耐药监测[J]. 中华医学检验杂志,1997,20(5):265-267.

(收稿日期:2011-03-03)

(上接第1811页)

- [5] Sherry B, Yarlett N, Strupp A, et al. Identification of cyclophilin as a proinflammation secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(8):3511-3515.
- [6] Banks RE, Evans SW, Alexander D, et al. Is fatal pancreatitis a consequence of excessive leukocyte stimulation? The role of tumor necrosis factor alpha [J]. Cytokine, 1991, 3(1):12-16.
- [7] Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, mark-

- ers, and mediators [J]. Shock, 2005, 24(1):45-51.
- [8] Coelho AM, Jukemura J, Sampietre SN, et al. Mechanisms of the beneficial effect of hypertonic saline solution in acute pancreatitis [J]. Shock, 2010, 34(5):502-507.
- [9] Dambrauskas Z, Giese N, Gulbinas A, et al. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(15):1845-1853.

(收稿日期:2011-02-22)