

甘露糖结合凝集素的基因多态性与复发性肾病综合征的关系*

黄远航, 范立明, 胡 静, 谭江平 (广州军区广州总医院肾脏内科 510010)

【摘要】 目的 探讨甘露糖结合凝集素(MBL)的基因多态性与复发性肾病综合征的关系。**方法** 对 66 例复发的肾病综合征患者和 40 例健康成人用序列特异性引物聚合酶链反应(SSP-PCR)和实时定量荧光聚合酶链反应分别检测 MBL 启动子和外显子 1 第 54 号密码子的基因多态性位点,同时采用酶联免疫吸附试验检测血清中 MBL 浓度。**结果** 复发性肾病综合征患者和健康对照组中高表达 MBL 的基因型血清 MBL 浓度均高于低表达 MBL 的基因型,差异有统计学意义($P<0.05$);复发的肾病综合征患者血清 MBL 浓度低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。复发性肾病综合征患者有前驱感染病史者,MBL 的基因型低表达者多于高表达者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 推测 MBL 的基因变异导致血清 MBL 浓度降低,诱发感染发生,引起肾病综合征患者经常复发。

【关键词】 甘露糖结合凝集素; 基因; 复发性肾病综合征

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.24.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)24-3255-03

Correlation between mannose binding lectin gene polymorphism and relapsed nephrotic syndrome* HUANG Yuan-hang, FAN Li-ming, HU Jing, TAN Jiang-ping (Department of Nephrology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and the recurrent nephrotic syndrome. **Methods** 66 cases of recurrent nephrotic syndrome patients and 40 healthy adults with SSP-PCR and Real-time PCR were used to detect MBL promoter and exon 1 codon 54 polymorphism loci, whilst detected by ELISA in serum MBL concentration. **Results** Recurrent nephrotic syndrome patients and healthy controls in patients with high expression of serum MBL genotypes were higher than those with low expression MBL genotypes, the difference was statistically significant ($P<0.05$); recurrence of nephrotic syndrome serum MBL concentration lower than the control group, the difference was significant ($P<0.05$). Recurrent nephrotic syndrome patients with a history of precursor infection, the MBL genotypes lower expression was more than the high expression, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Gene mutation could lead to decrease of serum MBL concentration so as to be susceptible to infection, causing nephrotic syndrome patients often relapse.

【Key words】 mannose-binding lectin; gene; recurrent nephrotic syndrome

甘露糖结合凝集素(MBL)是一种天然免疫防御分子,具有重要生物学功能,研究发现血浆 MBL 浓度降低或功能异常导致免疫机能缺陷,增加多种感染性疾病及自身免疫疾病的发病风险^[1-2]。感染是原发性肾病综合征患者复发的常见诱因,其是否与 MBL 的基因突变有关尚无循证医学证据。欧洲人群及华人最常见的点突变是第 54 位密码子,启动子区的基因突变也有相关性,二态性 H/L 和 X/Y 位点可以在转录水平调节 MBL 产量。本文采用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR)检测 MBL 的基因启动子区域 H/L,用实时定量荧光聚合酶链反应检测 MBL 的基因启动子区域 X/Y 多肽位点及第 54 号密码子变异多态性,探讨其与成人原发性肾病综合征复发的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 66 例复发性肾病综合征患者为 2010 年 6 月至 2012 年 12 月在本院肾脏内科住院,排除狼疮性肾炎、乙型肝炎相关性肾炎、紫癜相关性肾炎、肿瘤、药物或毒物引起的肾病综合征等继发因素。其中男 35 例,女 31 例,年龄 19~45 岁,患者均行肾穿刺检查,其中微小病变 26 例,轻度系膜增生性 24 例,局灶节段硬化 9 例,膜性肾病 7 例。所有患者经治疗

后均多次复发。40 例健康对照组为本院同期健康体检者,其中男 22 例,女 18 例,年龄 18~46 岁。

1.2 方法

1.2.1 样本采集方法 采样当天早晨空腹,收集抗凝静脉血 1.5 mL 及干管血 2.0 mL。抗凝血置于 4℃ 保存提取基因组 DNA,干管血在 37℃ 静置待血块形成,之后分离血清,−70℃ 保存待测。

1.2.2 DNA 的提取 采用南方医科大学免疫学教研室改进的人抗凝全血提取方法进行提取,提取白细胞基因组 DNA,测定其浓度及 OD260/OD280 比值后,置−70℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 血清 MBL 浓度测定 MBL 生物功能的发挥必须是三聚体以上的寡聚体 MBL,MBL 单体并没有任何生物学功能。因此,有必要通过不同的配体来检测血浆中总 MBL 水平以及具有生物活性的 MBL 水平。复发性肾病综合征患者及健康人群血浆总 MBL 水平及具有生物活性的 MBL 水平的检测均采用酶联免疫吸附试验,采用商品化试剂盒进行,其操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 MBL 启动子序列多态性分析 SSP-PCR 检测 H/L 等位基因。MBL 的基因启动子区 SNP-550H/L(G/C)位点,

* 基金项目:广东省科学技术资助项目(2011B031800318)。

设计针对等位基因 H/L 1 对序列特异性引物。对 SSP-PCR 扩增产物采用琼脂糖凝胶进行电泳分析。

Real time PCR 分子灯塔技术检测等位基因 X/Y。按照分子灯塔(MB)设计原则设计 1 对特异于 X/Y 多态位点的 MB (图 1、2)。序列如下,带下划线的碱基为 MB 互补茎部,带框的碱基为 MB 特异性识别碱基为 MB-Y:FAM-5'-CGC TCA CAC TGC CAC [G] GA AAG CAT GTT GAG CG-3'-DAB-CYL;MB-X:HEX-5'-CGC TCA CAC TGC CAC [C] GA AAG CAT GTT GAG CG-3'- DABCYL。为探讨 MB 探针杂交条件及其特异性,设计 2 条分别与 MB-Y 和 MB-X 互补的寡核苷酸标准靶序列为 TY:5'-AGA CTA TAA ACA TGC TTT C [C] G TGG CAG TGA GAA CAA AT-3';TX:5'-AGA CTA TAA ACA TGC TTT C [G] G TGG CAG TGA GAA CAA AT-3'。根据 MBL 的基因序列及 MB-X/Y 的探针序列,设计 1 对内引物以扩增 H/L~P/Q 等位基因 SSP-PCR 阳性产物,其扩增产物长为 110 bp,包含了 X/Y 多态性位点,引物序列为 XY-F: 5'-CTC ATT CCC TAA GCT AAC AGG C-3';XY-R: 5'-AGA CAC CTG GCG TTG CTG-3'。

对 MB 探针 MB-X、MB-Y 退火温度及结合能力通过探针与互补序列的杂交试验进行验证,同时检测该探针辨别特异性寡核苷酸序列与非特异性寡核苷酸序列的能力。采用 Real-time PCR 结合 SYBR Green I 染料来直观地确定 PCR 最佳的 Mg²⁺ 浓度和引物浓度,以期在使用 MB 检测 SNP 位点时达到最佳的效果。最后,根据以上优化组合确定单管 Real-time PCR-MB 荧光检测反应体系。在 Bio-RAD iCycler 或 ABI PRISM 5700/7700 荧光定量 PCR 仪上进行反应和检测。设定 iCycler 荧光定量 PCR 仪对每一个反应管同时选择 FAM 及 HEX 双色荧光信号检测通道,于 PCR 退火阶段实时检测荧光信号强度。

据相关文献报道,外显子多态性位点与启动子区多态位点之间存在完全连锁不平衡,X 只与 A 连锁,L 只与 B 连锁,所以可推出以下几种单倍型:HYA,LYA,LXA,LYB,基因型 HYA /HYA,LYA/LYA,LXA/LXA,HYA/LYA,HYA/LXA,LYA/LXA,LYA/LYB,HYA/LYB,LYB/LXA,LYB/LYB。MBL 的基因启动子及第 54 号密码子的突变均可影响血清 MBL 浓度,根据基因型将受试者分为高表达 MBL 的基因型组 (high 组),包括基因型 HYA/HYA,HYA/LYA,HYA/LXA;低表达 MBL 的基因型组 (low 组),包括基因型 LYA/LYA,LXA/LXA,LYB/LXA,LYA/LYB,HYA/LYB,LYB/LXA,LYB/LYB^[3]。

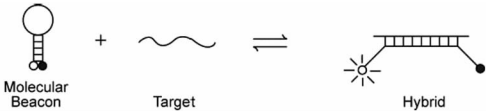


图 1 MB 技术的原理^[3]

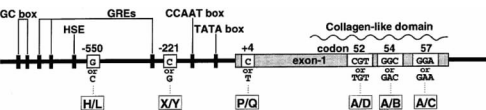


图 2 人 MBL 的基因启动子区及第 1 外显子主要基因多态性示意图

1.2.5 MBL 第 54 号密码子基因多态性分析 MBL 的基因第 54 号密码子 GGC/GAC 变异在东方人中多见,表现为野生

纯合子 A/A(GGC/GGC),杂合子 A/B(GGC/GAC),变异型纯合子 B/B(GAC/GAC),采用 Real-time PCR-MB 检测。

1.2.6 基因分型结果验证 在肾病综合征患者及健康对照人群样本中各随机抽取一定 DNA 样本,采用一对测序引物,采用高保真 DNA 聚合酶 Probest 进行 PCR 扩增后,将经过电泳鉴定的 PCR 产物送生物公司进行双向测序。引物序列为上游引物序列 S1-F:5'-GAG GAG GAT TCA AGG CAA GT-3';下游引物序列 S1-R:5'-GAG ATG CCA GAG AAT GAG AG-3'。扩增产物长 1 111 bp,6 个 SNP 位点均在双向测序准确范围内。

1.3 统计学方法 采用 SPSS12.0 软件包进行数据统计,采用 χ^2 检验等相关检验方法,比较各等位基因及其单倍型、基因型在常复发的肾病综合征组及健康人群中的分布差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MBL 的基因多态性与血清 MBL 浓度 复发的肾病综合征患者启动子 HY/HY 型血清 MBL 浓度与 LY/LX 型比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但高于 LY/LY 型、HY/LY 型和 LY/LX 型 ($P < 0.05$)。54 号密码子 A/A 型血清 MBL 浓度与 A/B 型比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),B/B 基因型在本研究中肾病综合征组血清 MBL 浓度远低于另两种基因型,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),复发的肾病综合征组中高表达 MBL 基因型者血清 MBL 浓度高于低表达 MBL 基因型者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组血清 MBL 浓度高于复发的肾病综合征组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1、2。

2.2 MBL 的基因多态性与肾病综合征患者前驱感染的关系 本研究中肾病综合征患者复发时前驱感染史与 MBL 的基因多态性有关,低表达 mbl 基因型组有前驱感染者多于高表达 mbl 基因型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1、2。

2.3 MBL 的基因多态性分布情况 复发的肾病综合征组 MBL 第 54 号密码子 A/A 型发生频率 (54.54%) 与对照组 (72.50%)、A/B 型发生频率 (40.91%) 与对照组 (25.00%) 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。复发的肾病综合征组变异型等位基因 B 型发生频率与对照组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MBL 启动子各基因型及等位基因发生频率两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

表 1 两组启动子血清 MBL 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	启动子	n	MBL 浓度
肾病综合征组	HY/LY	31	1 821 ± 1 106
	LY/LX	13	2 079 ± 811
	LX/LX	1	572
	LY/LY	10	319 ± 185
	HY/HY	7	3 218 ± 869
健康对照组	HY/LX	4	1 087 ± 941
	HY/LY	13	1 956 ± 1 314
	LY/LX	8	1 786 ± 1 298
	LX/LX	1	277
	LY/LY	9	1 602 ± 1 087
	HY/HY	6	3 771 ± 632
	HY/LX	3	2 309 ± 997

表 2 两组第 54 号密码子分布及 MBL 浓度比较			
组别	启动子	n	MBL 浓度($\bar{x}\pm s$,ng/mL)
肾病综合征组	A/A	36	2 316±976
	A/B	27	978±753
	B/B	3	275±189
健康对照组	A/A	29	2 465±1 135
	A/B	10	1 315±798
	B/B	1	219

3 讨 论

原发性肾病综合征临床多见,是肾小球疾病的常见临床表现,临床上是一个复杂的慢性病理生理过程,治疗上应针对免疫炎性反应介导肾小球滤过膜通透性增加所致大量蛋白尿丢失及低蛋白血症、水钠潴留为中心的代谢紊乱^[3-4]。原发性肾病综合征治疗复杂,临床上感染等并发症多发,目前认为感染是肾病综合征的主要并发症,同时也可能成为激素依赖产生的主要原因,诱使肾病综合征复发^[5]。频繁复发是指短期内多次复发,即患者对皮质激素治疗有完全效应,但在 6 个月内有 2 次或 1 年内有 3 次以上复发,属难治性肾病综合征。临床上为减少复发、延长缓解时间常采用激素联合细胞毒药物或免疫抑制剂等治疗,但激素和免疫抑制剂的应用更易并发感染。

作为天然免疫的关键分子之一,MBL 的天然免疫功能已得到证实^[6-8]。选择 MBL 这一天然免疫关键分子为研究对象,结合临床样本及基础研究,运用现代免疫学及分子生物学技术,以细胞和分子水平,探讨 MBL 的基因多态性与常复发性肾病综合征的关系,可以从基因分子水平进一步认识原发性肾病综合征的复发及其相关性,探索新的治疗方法和突破口。人类 MBL 的基因位于染色体 10q11. 2-q21,MBL 的基因启动子区及第 1 外显子基因多态性情况复杂。MBL 的基因型在不同种族人群中的分布存在明显差异^[9]。欧洲人群及华人最常见的点突变是第 54 号密码子,启动子区的基因突变也有相关性,二态性 H/L 和 X/Y 位点可以在转录水平调节 MBL 产量。本次研究 MBL 的基因多态性位点选择为启动子区:-550 bpH/L(G/C)、-220 bpX/Y(G/C);外显子 1 第 54 号密码子 A/B(G/A)。研究结果显示,复发的肾病综合征组外显子 1 第 54 号密码子变异型等位基因 B 型发生频率明显高于健康对照组,两组比较差异有统计学意义,但 MBL 启动子各基因型及等位基因的发生频率两组比较差异无统计学意义。本文据此推测肾病综合征的复发与 MBL 的基因多态性存在一定相关性,且与外显子 1 第 54 号密码子关系可能更为密切。

血清 MBL 的降低或缺乏是感染的显著危险因素,特别在应用激素及免疫抑制剂时。本研究结果显示,对于复发性肾病综合征患者,低表达 MBL 的基因型患者复发时有前驱感染者显著多于高表达 MBL 的基因型患者,据此推测 MBL 的基因变

异引起的血清浓度降低诱发感染可能是原发性肾病综合征复发的原因之一。

综上所述,本研究结果显示,MBL 的基因多态性与复发性肾病综合征存在一定相关性,是临床上从基因水平认识原发性肾病综合征的复发及相关因素,并有针对性地为采取干预治疗提供依据,同时提示大家在临床及科研工作中可以基于不同基因型采取相关的干预措施,从而预防原发性肾病综合征复发。当然,由于临床资料有限,MBL 的基因多态性与复发性肾病综合征相关性还需要进一步的临床和实验研究。

参考文献

[1] Olivo-Marston SE, Yang P, Mechanic LE, et al. Childhood exposure to secondhand smoke and functional mannose binding lectin polymorphisms are associated with increased lung Cancer risk[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(12): 3375-3383.

[2] Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2010, 19(3):280-287.

[3] 夏正坤, 顾圆圆, 刘光陵, 等. 甘露糖结合凝集素基因多态性与复发的儿童肾病综合征的相关性研究[J]. 中国全科医学, 2007, 10(19): 1595-1598.

[4] 王海燕. 肾脏病临床概览[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010: 130.

[5] 周慧. 难治性肾病综合征的原因分析及治疗对策[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(4): 968-969.

[6] Neth O, Jack DL, Dodds AW, et al. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition[J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 688-693.

[7] Walport MJ. Complement. First of two parts[J]. N Engl J Med, 2001, 344(14): 1058-1066.

[8] Walport MJ. Complement. Second of two parts[J]. N Engl J Med, 2001, 344(15): 1140-1144.

[9] Steffensen R, Thiel S, Varming K, et al. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers[J]. J Immunol Methods, 2000, 241(1-2): 33-42.

(收稿日期: 2013-04-21 修回日期: 2013-07-25)

(上接第 3254 页)

功能障碍危险因素分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(1): 16-19.

[8] Bai LT, Zhong P. Analysis of risk factors of progressive ischemic stroke[J]. Chines J General Practice, 2013, (11) 2: 208-209.

[9] 涂秋云, 杨霞, 丁斌蓉, 等. 缺血性脑卒中后血管性认知障碍的流行病学调查[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(9): 3576-3577.

[10] 刘瑞华, 王莉, 陈长香, 等. 日常生活习惯对老人院老年人认知障碍的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(8): 1665-1666.

[11] 王艳秀, 吴寿岭, 高竞生, 等. 理想心血管健康行为和因素对新发缺血性脑卒中的影响[J]. 中华高血压杂志, 2012, 20(4): 342-346.

(收稿日期: 2013-05-30 修回日期: 2013-09-05)