

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.07.003

CDKN2BAS 基因多态性与川崎病的关联性研究^{*}

张 驰, 申 琳, 易 璐, 胡 爽, 庄晓琪, 左袁博教, 黄利华, 李卓颖, 杨作成[△]
中南大学湘雅三医院儿科, 湖南长沙 410013

摘 要:目的 探讨 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点及 rs4977574 位点多态性与川崎病及并发冠状动脉损伤(CAL)的关联性。方法 选取 100 例川崎病患儿作为研究组, 100 例健康婴幼儿作为对照组, 提取外周血 DNA 并进行基因测序, 分析 CDKN2BAS 基因的 rs1333049 位点及 rs4977574 位点的多态性。结果 研究组与对照组的 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点 GG、CG、CC 基因型分布和 G、C 等位基因频率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。研究组与对照组的 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点 AA、AG、GG 基因型分布和 G、A 等位基因频率比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。川崎病合并 CAL 患儿与川崎病未合并 CAL 患儿 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点及 rs4977574 位点的基因型分布和等位基因频率比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点及 rs4977574 位点多态性与川崎病发病及合并 CAL 均无明显关联性。

关键词: 川崎病; CDKN2BAS 基因; 基因多态性

中图分类号: R725.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)07-0871-05

Association of CDKN2BAS gene polymorphism with Kawasaki disease^{*}

ZHANG Chi, SHEN Lin, YI Lu, HU Shuang, ZHUANG Xiaoqi, ZUO Yuanbojiao,
HUANG Lihua, LI Zhuoying, YANG Zuocheng[△]

Department of Pediatric, the Third Xiangya Hospital of Central South
University, Changsha, Hunan 410013, China

Abstract: Objective To explore the association between CDKN2BAS gene at loci rs1333049 and rs4977574 polymorphism with Kawasaki disease (KD) and its correlation with coronary artery lesion (CAL). **Methods** A total of 100 cases with KD were selected in study group, and 100 healthy children were selected in control group. The DNA was extracted from peripheral blood samples of two groups and detected the genotype of CDKN2BAS gene loci rs1333049 and rs4977574. **Results** There was no significant difference on GG, CG, CC genotype distribution and G, C allele frequency between study group and control group at rs1333049 site ($P>0.05$). There was no significant difference on AA, AG, GG genotype distribution and G, A allele frequency between study group and control group at rs4977574 site ($P>0.05$). There was no significant difference on genotype distribution and allele frequency of rs1333049 and rs4977574 of CDKN2BAS gene between children with KD complicated with CAL and children with KD without CAL ($P>0.05$). **Conclusion** The association of the loci rs1333049 and rs4977574 polymorphism of CDKN2BAS gene was not found with KD or KD complicated with CAL.

Key words: Kawasaki disease; CDKN2BAS gene; polymorphism

川崎病是一种急性、全身性的血管炎性疾病, 也称为皮肤黏膜淋巴结综合征, 病因不明, 易发人群多为 5 岁以下的婴幼儿^[1], 少数严重者可引起冠状动脉病变。目前, 川崎病的发病机制尚不明确, 多认为是人体受各种病原微生物侵袭造成的免疫损伤^[2]。川崎病是儿童发生后天性心脏病的重要原因之一^[3-5]。研究表明, 长链非编码 RNA(lncRNA)可以通过多种

方式参与基因调控来达到影响人体生长、发育、代谢及疾病的目的, 而定位于 INK4 位点上的 lncRNA 则称作 CDKN2BAS。CDKN2BAS 即编码细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2B 反义 RNA, 可以调控多种靶基因, 在炎症反应、免疫疾病和心血管疾病等方面发挥着重要作用。目前, 已有研究发现 CDKN2BAS 基因及其多态性与冠心病、动脉粥样硬化及 2 型糖尿病

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目(81800440)。

作者简介: 张驰, 男, 医师, 主要从事儿科疾病研究。 [△] 通信作者, E-mail: yang_zcr@126.com。

本文引用格式: 张驰, 申琳, 易璐, 等. CDKN2BAS 基因多态性与川崎病的关联性研究[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(7): 871-875.

等疾病有关,但目前缺乏 CDKN2BAS 基因与川崎病发病关系的相关报道。本研究采用病例对照的方法来探讨 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点及 rs4977574 位点基因多态性与川崎病发病及合并冠状动脉损伤(CAL)的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按照川崎病的诊断标准,选择 2016—2019 年本院收治的汉族川崎病患者 100 例纳入研究组,所有患儿入院前无阿司匹林和丙种球蛋白(IVIG)用药史。根据美国心脏协会定义的冠状动脉扩张 Z 值大小及心脏彩色多普勒超声检查结果,计算 Z 值^[1],将 Z 值<2 的患儿纳入川崎病无冠状动脉损伤组(KD-NCAL 组),Z 值≥2 的患儿纳入川崎病合并冠状动脉损伤组(KD-CAL 组)。KD-CAL 组 25 例,KD-NCAL 组 75 例。研究组中男 58 例,女 42 例,比例为 1.38:1.00;平均年龄(34.17±24.2)个月。另外选择同期本院体检健康婴幼儿 100 例纳入对照组,既往无川崎病病史,排除风湿性疾病、心血管疾病及感染性疾病等。对照组中男 49 例,女 51 例,男女比例为 0.96:1.00,平均年龄(42.38±28.3)个月。对照组与研究组性别比例比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 在征得研究对象监护人同意后,用含乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)的一次性采血管采集所有研究对象 2 mL 静脉血,置于一 80℃ 冰箱内保存。

1.2.2 基因组 DNA 提取 取静脉血标本,应用 Promega DNA 提取试剂盒,按说明书要求提取 DNA,用 NanoDrop ND-2000C 50 分光光度计进行纯度和浓度的检测,存于一 80℃ 的冰箱中备用。

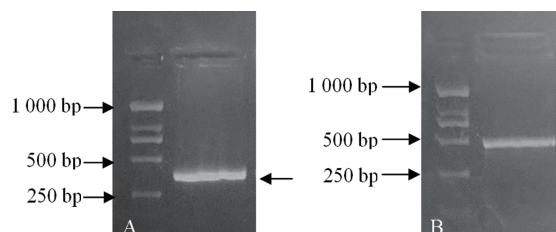
1.2.3 多态性检测 采用聚合酶链反应-直接测序法(PCR-SBT)检测 CDKN2BAS 基因多态性,通过 GenBank 检索到 CDKN2BAS 基因序列,引物由铂尚生物技术(上海)有限公司合成:rs1333049 上游引物为 5'-CTTGAGACTAGTATACCAATCATACTCCT-3',下游引物为 5'-TACATATGTGTTAATGACA-3';rs4977574 上游引物为 5'-CATGCTTTCTGAAACAACACG-3',下游引物为 5'-TAATGGAGGTGTGGTCAGCA-3'。PCR 反应体系为 15.0 μL,包括制好的模板 DNA 1.0 μL, Taq DNA 聚合酶(Mix II) 9.0 μL,引物各 0.5 μL,去离子水加至 15.0 μL。rs1333049 位点 PCR 扩增反应条件:(1)在 94℃ 下对样品进行 5 min 的预变性 1 次;(2)按以下步骤进行 35 次循环,94℃ 下变性 30 s,降至 60℃ 退火 30 s,温度提升至 72℃ 进行 40 s 延伸;(3)最后 5 min 延伸,4℃ 保存。rs4977574 位点 PCR 扩增反应条件:(1)在 94℃ 下对样品进行 5 min 的预变性 1 次;(2)按以下步骤进行 35 次循环,94℃ 下变性 40 s,降至 60℃ 退

火 40 s,温度提升至 72℃ 进行 40 s 延伸;(3)最后 5 min 延伸,4℃ 保存。对扩增产物染色后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,可在紫外灯下照相后观察结果并记录电泳图谱,初步判定扩增成功与否^[6]。PCR 扩增产物送至铂尚生物技术(上海)有限公司进行基因测序并用 Chromas 软件分析测序结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理及统计分析,基因型和等位基因频率以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。对研究组和对照组基因型及等位基因频率进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律验证,以确定两组是否符合遗传平衡。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点及 rs4977574 位点多态性检测 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点 PCR 扩增片段大小为 313 bp,rs4977574 位点 PCR 扩增片段大小为 411 bp,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离(图 1)。将 PCR 所得产物进行基因测序,显示 rs1333049 位点存在 CC、CG、GG 3 种基因型(图 2);rs4977574 位点存在 AA、AG、GG 3 种基因型(图 3)。对研究组和对照组进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律验证后,研究组与对照组 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点基因型频率分布符合遗传平衡定律($\chi^2=5.989, P>0.05; \chi^2=1.588, P>0.05$);研究组与对照组 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点基因型频率分布符合遗传平衡定律($\chi^2=0.430, P>0.05; \chi^2=0.745, P>0.05$)。



注:A 为 rs1333049 位点;B 为 rs4977574 位点。

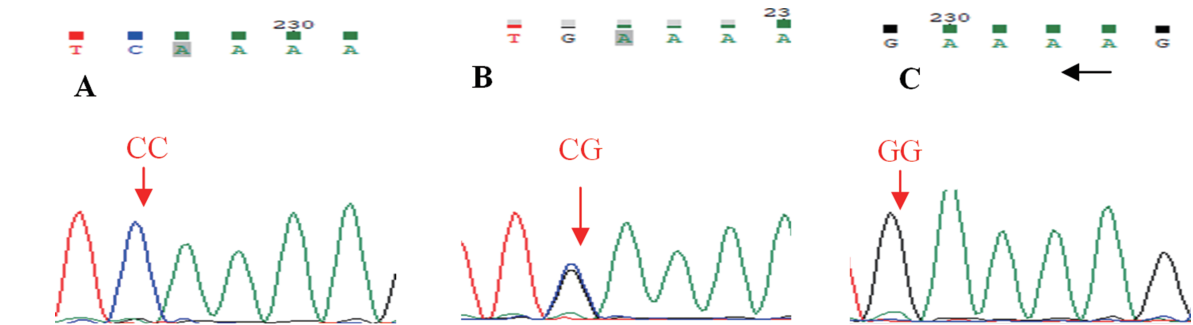
图 1 CDKN2BAS 基因 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 CDKN2BAS 基因位点多态性的变化

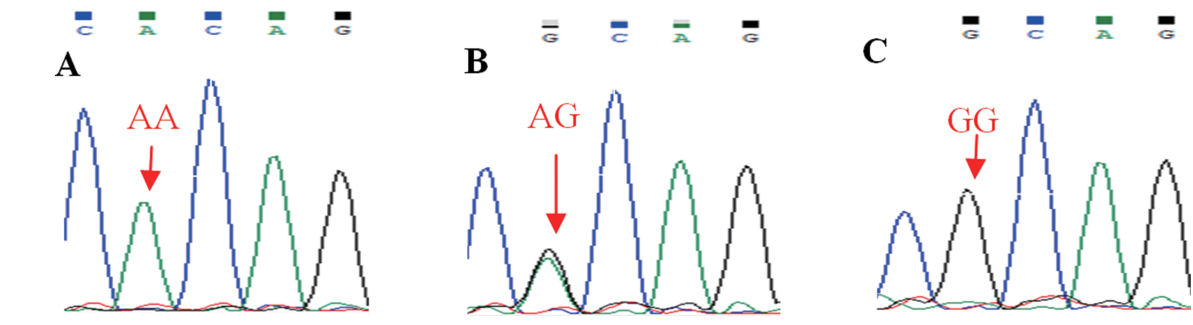
2.2.1 川崎病患者 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点多态性的变化 研究组与对照组 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点多态性 C、G 等位基因频率和 CC、CG、GG 基因型频率的分布比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。KD-CAL 组与 KD-NCAL 组 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点多态性的 C、G 等位基因频率和 CC、CG、GG 基因型频率的分布比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.2.2 川崎病患者 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点多态性的变化 研究组与对照组 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点多态性 A、G 等位基因频率和 AA、AG、GG 基因型频率的分布比较,差异均无统计学意

义($P>0.05$),见表 3。KD-CAL 组与 KD-NCAL 组 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点多态性的 A、G 等位基因频率和 AA、AG、GG 基因型频率的分布比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 4。



注:A 为 CC 纯合子;B 为 CG 杂合子;C 为 GG 纯合子。
图 2 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点 PCR 产物测序结果



注:A 为 AA 纯合子;B 为 AG 杂合子;C 为 GG 纯合子。
图 3 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点 PCR 产物测序结果

表 1 研究组和对照组 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点多态性的等位基因频率与基因型分布比较[n(%)]

组别	n	等位基因频率		基因型频率		
		C	G	CC	CG	GG
对照组	100	112(56.0)	88(44.0)	27(27.0)	58(58.0)	15(15.0)
研究组	100	103(51.5)	97(48.5)	18(18.0)	67(67.0)	15(15.0)
χ^2		0.814 5			2.448 0	
P		0.366 8			0.294 1	

表 2 KD-CAL 组与 KD-NCAL 组 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点多态性的等位基因频率与基因型分布比较[n(%)]

组别	n	等位基因频率		基因型频率		
		C	G	CC	CG	GG
KD-NCAL 组	75	78(52.0)	72(48.0)	13(17.3)	52(69.3)	10(13.3)
KD-CAL 组	25	25(50.0)	25(50.0)	5(20.0)	15(60.0)	5(20.0)
χ^2		0.060 0			0.873 4	
P		0.806 4			0.646 2	

表 3 研究组与对照组 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点多态性的等位基因频率与基因型分布比较[n(%)]

组别	n	等位基因频率		基因型频率		
		A	G	AA	AG	GG
对照组	100	96(48.0)	104(52.0)	20(20.0)	56(56.0)	24(24.0)
研究组	100	109(54.5)	91(45.5)	32(32.0)	45(45.0)	23(23.0)
χ^2		1.691 1			3.988 5	
P		0.193 5			0.136 1	

表 4 KD-CAL 组与 KD-NCAL 组 CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点多态性的等位基因频率与基因型分布比较[n(%)]

组别	n	等位基因频率		基因型频率		
		A	G	AA	AG	GG
KD-NCAL 组	75	81(54.0)	69(46.0)	22(29.3)	37(49.3)	16(21.3)
KD-CAL 组	25	28(56.0)	22(44.0)	10(40.0)	8(32.0)	7(28.0)
χ^2		0.060 5		2.280 8		
P		0.805 7		0.319 7		

3 讨 论

川崎病好发于亚裔婴幼儿,发病年龄主要集中在 6 月龄至 5 岁^[5],可导致全身性中小血管炎症。川崎病的并发症主要是 CAL,严重时甚至可导致冠状动脉瘤发生。在早期未使用大剂量 IVIG 的情况下,每 4 例患儿中就有 1 例会发展为冠状动脉瘤;而使用 IVIG 后,发病风险则降至 4% 左右^[7],但有 10%~20% 的患儿对 IVIG 不敏感^[8]。川崎病的发病机制尚未完全明了,有研究发现,某些基因的 SNP 位点及其多态性与川崎病发病有关联性,如白细胞介素(IL)-1 β 基因-31 T/C 位点及 PPIA 基因 rs17860041 A/C 位点等基因的多态性与川崎病的发病存在相关^[6,9]。

CDKN2BAS 基因是位于人类染色体 9p21 区段上的 CDKN2A/B 基因丛转录的 lncRNA,该基因定位于 p15/CDKN2B-p16/CDKN2A-p14/ARF 基因簇的 INK4 位点,全长 126.3 kb,可沿蛋白质编码反义转录,形成长 3 834 bp 的 mRNA。该基因通过不同转录剪接方式剪接形成约 20 种线性转录子及环形转录子,调控细胞增殖和凋亡^[10-13],从而参与多种疾病的发病,包括黑色素瘤、肝癌、鼻咽癌、胶质瘤等多种恶性肿瘤,以及动脉粥样硬化、2 型糖尿病等。在亚洲人群中,CDKN2BAS 基因 rs4977574 位点携带 G 等位基因可能增加患冠心病、心肌梗死的风险^[14];rs1333040、rs1333049 和 rs2383207 位点多态性与东亚人群冠心病的患病风险显著相关^[15]。CDKN2BAS 基因 rs1333049 C>G 与急性心肌梗死患病风险显著相关。同时 CDKN2BAS 基因 rs2383207 位点也与冠心病患病风险显著相关^[16]。另有研究发现,CDKN2BAS 基因 rs2184061 位点 AA 基因型增加了 45 岁以上人群动脉粥样硬化性脑梗死的发病风险,携带 C 等位基因则会明显降低发病风险;同时,rs7044859 位点的 AA 基因型同样会增加 45 岁以上人群动脉粥样硬化性脑梗死的发病风险^[17]。一项胶质瘤的研究发现,CDKN2BAS rs2151280 A>G 与胶质瘤发生风险升高有关,而 rs1136410 的 GG 基因型有利于无进展生存和整体生存,rs1136410 A>G 和 rs7763881 A>C 更有利于胶质瘤患者的整体生存^[18]。一项关于胰腺癌的研究发现,携带 rs1537373 TG/GG 基因

型的个体比携带 TT 基因型的个体表达更高水平的 CDKN2BAS,从而赋予其胰腺癌的易感性^[19]。研究发现 CDKN2BAS 在多种炎症及免疫疾病发病过程中起到了重要的作用,如 SONG 等^[20]对大鼠冠状动脉粥样硬化模型进行研究,发现环状 CDKN2BAS 在加重血管内皮细胞炎症反应方面起着重要作用,提示降低 CDKN2BAS 表达可能对动脉粥样硬化患者的治疗有保护作用。JARINOVA 等^[21]发现,CDKN2BAS 基因可以调控下游内皮细胞的炎症反应。这些研究提示 CDKN2BAS 基因可能在川崎病的发病过程中参与免疫炎症反应,导致川崎病血管炎的发生。但较少见 CDKN2BAS 基因多态性与川崎病关联性的报道。

本研究对研究组与对照组,KD-CAL 组与 KD-NCAL 组的 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点、rs4977574 位点的等位基因频率和基因型频率进行比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),提示川崎病发病及合并 CAL 不受 CDKN2BAS 基因 rs1333049 位点、rs4977574 位点的多态性影响。

参考文献

- [1] MCCRINDLE B W, ROWLEY A H, NEWBURGER J W, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of kawasaki disease; a scientific statement for health professionals from the American Heart Association[J]. Circulation, 2017, 135(17): e927-e999.
- [2] ASSARI R, AGHIGHI Y, ZIAEE V, et al. Pro-inflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in Kawasaki disease[J]. Int J Rheum Dis, 2018, 21(5): 1120-1126.
- [3] SON M B F, NEWBURGER J W. Kawasaki disease[J]. Pediatr Rev, 2018, 39(2): 78-90.
- [4] ZHANG H, XU M G, XIE L J, et al. Meta-analysis of risk factors associated with atherosclerosis in patients with Kawasaki disease[J]. World J Pediatr, 2016, 12(3): 308-313.
- [5] SINGH S, VIGNESH P, BURGNER D. The epidemiology of Kawasaki disease; a global update[J]. Arch Dis Child, 2015, 100(11): 1084-1088.
- [6] 邹登, 阿莫, 江杰, 等. IL-1 β 基因-31T/C 多态性与川崎病

- 的关联性[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(1): 8-12.
- [7] MAKINO N, NAKAMURA Y, YASHIRO M, et al. Descriptive epidemiology of Kawasaki disease in Japan, 2011—2012: from the results of the 22nd nationwide survey[J]. J Epidemiol, 2015, 25(3): 239-245.
- [8] GALEOTTI C, KAVERI S V, CIMA Z R, et al. Predisposing factors, pathogenesis and therapeutic intervention of Kawasaki disease[J]. Drug Discov Today, 2016, 21(11): 1850-1857.
- [9] SHI R, LUO Y, LI S, et al. Single-nucleotide polymorphism rs17860041 A/C in the promoter of the PPIA gene is associated with susceptibility to kawasaki disease in Chinese children[J]. Immunol Invest, 2021, 50(2/3): 230-242.
- [10] GHIRLANDO R, FELSENFELD G. CTCF: making the right connections[J]. Genes Dev, 2016, 30(8): 881-891.
- [11] TANWAR V S, JOSE C C, CUDDAPAH S. Role of CTCF in DNA damage response[J]. Mutat Res, 2019, 780: 61-68.
- [12] NORA E P, GOLOBORODKO A, VALTON A L, et al. Targeted degradation of ctf decouples local insulation of chromosome domains from genomic compartmentalization[J]. Cell, 2017, 169(5): 930-944.
- [13] LAVARONE E, BARBIERI C M, PASINI D. Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity [J]. Nature Commun, 2019, 10(1): 1679.
- [14] XU B, FANG Z, HE S, et al. ANRIL polymorphism rs4977574 is associated with increased risk of coronary artery disease in Asian populations: a Meta-analysis of 12 005 subjects[J]. Medicine, 2018, 97(39): e12641.
- [15] HU L, SU G, WANG X. The roles of ANRIL polymorphisms in coronary artery disease: a Meta-analysis[J]. Biosci Rep, 2019, 39(12): BSR20181559.
- [16] WANG P, DONG P, YANG X. ANRIL rs2383207 polymorphism and coronary artery disease (CAD) risk: a Meta-analysis with observational studies[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016, 62(12): 6-10.
- [17] YANG J, GU L, GUO X, et al. LncRNA ANRIL expression and ANRIL gene polymorphisms contribute to the risk of ischemic stroke in the Chinese Han population [J]. Cel Mol Neurobio, 2018, 38(6): 1253-1269.
- [18] DENG Y, ZHOU L, LI N, et al. Impact of four lncRNA polymorphisms (rs2151280, rs7763881, rs1136410, and rs3787016) on glioma risk and prognosis: a case-control study[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(12): 2218-2229.
- [19] ZHU B, ZHU Y, TIAN J, et al. A functional variant rs1537373 in 9p21. 3 region is associated with pancreatic cancer risk[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(5): 760-766.
- [20] SONG C L, WANG J P, XUE X, et al. Effect of circular ANRIL on the inflammatory response of vascular endothelial cells in a rat model of coronary atherosclerosis[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(3): 1202-1212.
- [21] JARINOVA O, STEWART A F, ROBERTS R, et al. Functional analysis of the chromosome 9p21. 3 coronary artery disease risk locus [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(10): 1671-1677.

(收稿日期: 2021-08-10 修回日期: 2022-01-05)

(上接第 870 页)

参考文献

- [1] 张春丽, 张彩彩. 不同浓度七氟醚对人脑胶质瘤细胞 U251 替莫唑胺抵抗的影响及机制初探[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 659-663.
- [2] 高远, 龙妮娅, 出良钊, 等. 人脑胶质瘤细胞来源外泌体的提取鉴定及微环境中的摄取[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2021, 24(9): 737-742.
- [3] WANG H X. The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas[J]. Neoplasia, 2015, 17(3): 239-255.
- [4] 罗冬冬, 彭彪, 罗爱萍, 等. 干扰 MGMT 的人胶质瘤 U251 细胞对替莫唑胺的敏感性变化[J]. 海南医学, 2018, 29(13): 1777-1779.
- [5] STOLL S J, PITT S C, CHEN H. Follicular thyroid cancer cell growth inhibition by proteasome inhibitor MG132 [J]. J Surg Res, 2009, 156(1): 39-44.
- [6] 王宇, 杨欣, 李晓冬, 等. 雌激素抑制内质网应激引起的血管内皮细胞凋亡及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(3): 217-223.
- [7] MILACIC V, CHEN D, RONCONI L, et al. A novel anti-cancer gold (Ⅲ) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts[J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10478-10486.
- [8] 王宇暄, 王燕, 苏文洲, 等. BMS-345541 对人骨肉瘤细胞 MG63 凋亡及其作用机制[J]. 解剖学研究, 2018, 40(2): 132-136.
- [9] 张新民, 李岳春, 陈鹏, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 对 VMC 小鼠氧化应激和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(9): 984-988.

(收稿日期: 2021-08-08 修回日期: 2021-12-15)