文章编号:1000-5404(2006)15-1563-03

论著

重庆地区汉族人群CD14基因启动子区-159 T→C多态性及其与LPS反应分析

董 蕨,蒋建新,段朝霞,顾 玮 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 观察重庆地区汉族人群CD14基因启动子区-159单核甘酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分布特征,及其与CD14表达和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)反应的关系。**方法** 选择298例重庆地区汉族健康个体,采用限制性片段长度多态性法(restrictionfragment lengthpoly-morphism, RFLP)进行基因分型,检测LPS刺激前后外周血单核-巨噬细胞mCD14荧光强度和血浆sCD14浓度。**结果** 重庆地区汉族人群CD14-159 T/T、T/C、C/C基因型频率分别为32.21%、50.67%和17.11%,样本符合Hardy-Weinberg平衡,正常情况下,不同基因型mCD14水平差异不明显,而sCD14浓度有显著性差异($P<0.05$),LPS刺激能增强mCD14和sCD14的表达,但各基因型的增强幅度没有明显差异。**结论** 重庆地区汉族人群CD14-159 SNP等位碱基以T为主,T→C变异可抑制sCD14的表达,但对mCD14表达和LPS刺激反应的影响可能不明显。

关键词: CD14;SNP; RFLP; Hardy-Weinberg平衡; LPS
中图法分类号: R181.34; R394.5 **文献标识码**: A

Analysis of CD14 -159 T→C polymorphism in Chongqing Han population and their relationship with LPS response

DONG Hong, JIANG Jian-xin, DUAN Zhao-xia, GU Wei (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the distribution of CD14 T(-159)C polymorphism in Chongqing Han population, and their relationship with the expression of CD14 and LPS response. **Methods** PCR-RFLP were used for genotyping in 298 volunteers from Chongqing Han population, and the levels of mCD14 and sCD14 in peripheral blood were detected before and after LPS stimulation. **Results** Frequency of T/T, T/C and C/C was 37.93%, 45.81% and 16.26%, respectively. Sample used met Hardy-Weinberg equilibrium. There were no difference in mCD14 between genotypes with or without LPS, but there were marked difference in sCD14. **Conclusion** T is the predominant allele in CD14-159 SNP in Chongqing Han population. -159 T→C mutation could inhibit the expression of sCD14, but may not play an important role in the expression of mCD14 and LPS response.

Key words: CD14; SNP; PCR-RFLP; Hardy-Weinberg equilibrium; LPS

CD14是针对微生物和其他内、外源性应激因子的先天性免疫应答过程中的一种模式识别分子,对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等病原微生物成份具有较高的亲和性,位于单核/巨噬细胞、枯否细胞等细胞膜上的mCD14和位于血清中的sCD14能特异性识别、结合LPS或LPS/LBP复合物,递呈给跨膜蛋白TLR,TLR通过IL-1信号转导过程中信号分子(MyD88、IRAK、IRAK2、TRF6等)间的相互作用,最终导致NF-κB的活化及多种细胞因子的过度表达和失衡,从而引起炎症反应,因此CD14是启动炎性反应的重要因子,其基因多态性可能是导致炎性疾病临床过程多样性的重要因素。近年在许多国家和地区发现CD14基因启动子区存在-159 T/C多态性,其与CD14表达和多种炎性疾病的相关性得到了广泛的研究[1],但在我国至今仍缺乏对核甘酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)系统和全面的分析。本室前期通过直接测序证明中国人群也存在CD14基因-159 SNP,其等位碱基以T为主。本研

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G199905-4203)和国家杰出青年科学基金资助项目(30325040)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054203) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30325040)
作者简介:董 蕨(1971-),男,湖北省宜城市人,博士,助理研究员,主要从事创伤基础方面的研究。电话:(023)68757460
通讯作者:蒋建新,电话:(023)68757460
收稿日期:2005-06-27;**修回日期**:2005-10-11

究以重庆地区汉族人群为检测对象，扩大样本观察了我国人群 CD14 基因 -159 SNP 的分布频率，并在对该样本进行 H-W 平衡检验的基础上，探讨了此 SNP 在正常情况下 CD14 表达及 LPS 反应中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

样本来自重庆地区 298 例健康汉族献血员，男性 190 例，女性 108 例；年龄 18～58（37±11）岁。献血员之间无血缘关系。取外周静脉全血，部分经枸橼酸钠（1∶6）抗凝，-70 ℃保存，用于提取基因组 DNA，剩余部分分为正常组和 LPS 刺激组（LPS 刺激组加入 LPS，100 mg/ml），37 ℃，旋转 4 h，取部分样本检测 mCD14 强度，剩余样本离心，取上清，分装后，-70 ℃保存，用于检测 sCD14 浓度。

1.2 基因组 DNA 提取

酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.3 CD14 基因启动子区 -159 T→C 多态性检测

1.3.1 PCR 扩增含 CD14 基因启动子区 -159 位点的 DNA 片段 上游引物为 5′-GTGCCAACAGATGAGGTTCA-3′，下游引物为 5′-GCTTCCAGGCTTCACACTTG-3′（中科院上海生物工程公司合成）。PCR 反应条件：先预变性 94 ℃ 5 min，然后 94 ℃ 30 s、56 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s，30 个循环，最后 72 ℃延伸反应 10 min。PCR 反应产物长度为 592 bp。

1.3.2 限制性内切酶酶切及电泳 取 10 μl PCR 产物，加入适当体积缓冲液、水和 1.5 U 限制性内切酶 AvaⅡ（NEB，英国）进行酶切反应。取 10 μl 酶切产物，2% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，凝胶紫外扫描成像仪观察并扫描。

1.3.3 结果判读 AvaⅡ识别位点为 5′-G↓GTCC-3′，因此 C/C 基因型产生 1 个片段，T/T 基因型产生 3 个片段，T/C 基因型产生 2 个片段。

根据电泳片段大小和数量，结合凝胶扫描系统自带的 Quantity One 软件判读基因型如下：

SNP	基因型	片段		
	C/C	592 bp		
-159 T→C	T/T		355 bp	237 bp
	T/C	592 bp	355 bp	237 bp

1.4 Hardy-Weinberg 平衡分析

根据 H-W 法则计算各种基因型的预期值，计算 χ^2，df = 1，查表得 P 值，$P \leqslant 0.05$，群体不符合 H-W 平衡，$P > 0.05$，群体符合 H-W 平衡。

1.5 外周血单核-巨噬细胞 mCD14 检测

应用流式细胞仪检测 LPS 刺激前后外周血单核-巨噬细胞表面 mCD14 荧光强度。

1.6 外周血血浆 sCD14 检测

根据基因分型结果分组，应用 ELISA 法检测 LPS 刺激前后外周血浆 sCD14 浓度。

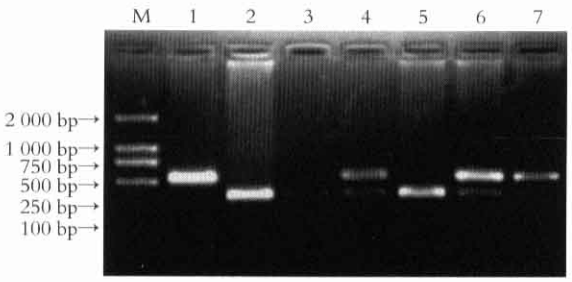
1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件行非参数分析和秩和检验。

2 结果

2.1 基因分型

重庆地区汉族人群 CD14 基因启动子区 -159 T→C 基因分型结果见图 1。2、3、5 泳道为 T/T 纯合子基因型，表现为 355 bp和 237 bp 2 条电泳带，1 泳道为 C/C 纯合子基因型，仅出现 592 bp 1 条电泳带，4、6、7 泳道为 T/C 杂合子基因型，表现为 592、355、237 bp 3 条电泳带。



M：DL2000；1：C/C 纯合子基因型；2、3、5：T/T 纯合子基因型；4、6、7：T/C 杂合子基因型

图 1 重庆地区汉族人群 CD14 基因启动子区 -159 SNP 基因分型

2.2 基因频率分析

在重庆地区汉族人群 CD14 基因启动子区 -159 位点发生的碱基变异为 T→C，频率为 42.45%。-159 T/T、T/C、C/C 3 种基因型的频率分别为 32.21%、50.67% 和 17.11%（表 1）。

表 1 重庆汉族人群 CD14 基因启动子区 -159 SNP 分布特点

位点	总数	基因型	数量（频率，%）	等位碱基（频率，%）
-159	298	T/T	96（32.21）	T：57.55
		T/C	151（50.67）	C：42.45
		C/C	51（17.11）	

2.3 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验

CD14 基因启动子区 SNP 位点基因型实际检出率与计算理论值十分接近（$\chi^2 = 0.410$，$P > 0.05$），见表 2，说明我们所选的观察样本符合 H-W 平衡，具有较好的代表性，可用于遗传学研究。

表 2 Hardy-Weinberg 平衡检验

位点	基因型	检测频率（数量）	理论频率（数量）
-159	T/T	0.322（96）	0.331（98.70）
	T/C	0.507（151）	0.489（145.60）
	C/C	0.171（51）	0.180（53.70）

2.4 外周血单核-巨噬细胞 mCD14 检测

结果显示，正常情况下，-159 T/T、T/C、C/C 基因型间 mCD14 水平没有显著性差异，LPS 刺激后 mCD14 水平均显著增高，但各基因型间增高水平没有显著性差异（$P > 0.05$）（表 3）。

表 3　LPS 刺激后不同基因型外周血单核-巨噬细胞 mCD14 水平 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	LPS 刺激前	LPS 刺激后
T/T	100.68 ±8.66	118.87 ±12.63
T/C	100.54 ±11.59	118.54 ±13.72
C/C	98.29 ±10.55	120.36 ±4.63

2.5　外周血浆 sCD14 检测

LPS 刺激前,发生碱基变异的 C/C 组的外周血浆 sCD14 水平均比 T/T 组的低,差异显著($P < 0.05$)。LPS 刺激后 sCD14 水平均增高,但各基因型间增高幅度没有显著性差异($P > 0.05$)(表 4)。

表 4　LPS 刺激后不同基因型外周血 sCD14 水平 (ρ_B/μg · ml^{-1}, $\bar{x} \pm s$)

基因型	LPS 刺激前	LPS 刺激后
T/T	4.05 ±2.12	4.35 ±2.23
T/C	3.11 ±1.97	4.01 ±2.69
C/C	2.45 ±0.83[a]	2.77 ±0.98[a]

a: $P < 0.05$, 与 T/T 比较

3　讨论

随着人类基因组计划的逐步完成,人们发现基因具有多态性,这种多态性可能是疾病发生、发展、转归及表型出现个体和群体差异的遗传基础,深入研究基因多态性与疾病的关系,将有助于阐明不同人群和个体中疾病发生、发展和转归的机制,从而制订针对性强的诊治措施,提高疾病诊断和治疗的成功率[2]。SNP 是最重要和最常见的基因多态性,指基因组内特定核苷酸位置上存在 2 种不同的碱基,其中最少 1 种在群体中的频率不小于 1%。

近年来在人 CD14 基因上陆续发现了数百个 SNP,其中 -159 SNP 的分布特点及其与临床疾病的关系是近年来研究的重点和热点。资料显示,不同人群 CD14 基因启动子区 -159 SNP 的分布频率不同,与 CD14 表达和疾病的相关性也不同:在德国、美国和澳大利亚等欧美和大洋洲地区,CD14 基因启动子区 -159 T/C 等位碱基均以 C 为主,而日本、韩国和中国台湾等亚洲国家和地区相反,其等位碱基以 T 为主;德国人群 CD14 基因启动子区 -159 T/C 多态性与 mCD14 和 sCD14 表达水平不相关,而在美国,TT 型的外周血 sCD14 水平明显高于其他基因型[3-8]。此外,虽然在部分人群中发现 CD14 基因 -159 SNP 与脓毒症等多种炎性疾病或并发症相关,但对其是否影响 LPS 反应及机制尚少见文献报道。

本研究选择的样本人群符合 H-W 平衡,可用于遗传学研究,所得结论具有较好的代表性。实验结果显示,重庆地区汉族人群 CD14 基因启动子区 -159 SNP 等位碱基以 T 为主,与我室前期对有代表性的小样本中国人群直接测序得到的结果相符,频率与东亚其他国家和地区相近。正常情况下和 LPS 刺激后不同基因型间 mCD14 水平没有显著性差异,提示 -159 T→C 碱基变异对外周血单核-巨噬细胞上 mCD14 数量的影响不大。正常情况下,C/C 组的外周血浆 sCD14 水平明显低于 T/T 组的,提示 -159 T→C 可抑制 sCD14 的表达,由于 sCD14 是由髓样细胞直接分泌或 mCD14 脱落产生的,因此除了直接抑制髓样细胞分泌外,-159 T→C 还可能通过调节 mCD14 的产生和从膜上的脱落实现对 sCD14 表达的抑制作用。另外,虽然 LPS 刺激后不同基因型 mCD14 和 sCD14 水平均明显增高,但各组间增高幅度并没有显著差异,提示 LPS 在促进 CD14 表达过程中 -159 SNP 的影响不大。

参考文献:

[1] SEBASTIEN G, ALAIN C, LUDOVIC D, *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.

[2] BLOMHOFF A, LIE B A, MYHRE A G, *et al*. Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(7): 3474 -3476.

[3] KOCH W, KASTRATI A, MEHILLI J, *et al*. CD14 gene -159C/T polymorphism is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction[J]. Am Heart J, 2002, 143(6): 971 -976.

[4] ZEE R Y, LINDPAINTNER K, STRUK B, *et al*. A prospective evaluation of the CD14 C(-260)T gene polymorphism and the risk of myocardial infarction[J]. Atherosclerosis, 2001, 154(3): 699 -702.

[5] HUNG J, MCQUILLAN B M, CHAPMAN C M, *et al*. Promoter polymorphism of the gene for CD14 receptor is not associated with sub-clinical carotid atherosclerosis in a community population[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2004, 11(4): 344 -349.

[6] HOHDA S, KIMURA A, SASAOKA T, *et al*. Association study of CD14 polymorphism with myocardial infarction in a Japanese population [J]. Jpn Heart J, 2003, 44(5): 613 -622.

[7] YOON H J, SHIN J H, YANG S H, *et al*. Association of the CD14 gene -159C polymorphism with progression of IgA nephropathy[J]. J Med Genet, 2003, 40(2): 104 -108.

[8] ENG H L, CHEN C H, KUO C C, *et al*. Association of CD14 promoter gene polymorphism and Chlamydia pneumoniae infection[J]. J Infect Dis, 2003, 188(1): 90 -97.

(编辑　汪勤俭)