论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0456-04

STAT3基因多态性与重庆地区汉族儿童川崎病易感性的关系

钟芳芳，蒋利萍，沈文婷，李永钦 （400014 重庆，重庆医科大学附属儿童医院临床免疫研究室，儿童发育疾病研究教育部重点实验室，儿科学重庆市重点实验室，重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地）

［**摘要**］ **目的** 探讨信号转导和转录激活因子-3（signal transducer and activator of transcription-3，STAT3）基因单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）与重庆地区汉族儿童川崎病（kawasaki disease，KD）易感性的关系。**方法** 用序列特异性引物聚合酶链反应（sequence specific primers-polymerase chain reaction，SSP-PCR）分析130例重庆地区汉族川崎病患儿及147名健康儿童STAT3基因内含子11（rs2293152C/G和rs957970C/T）的SNP，统计学分析病例组与对照组之间的差异。**结果** 川崎病组STAT3基因rs2293152C/G位点CC基因型频率（23.8%）显著高于对照组（10.2%），川崎病组rs2293152C等位基因分布频率（45.4%）显著高于对照组（34.0%，$P=0.006$，$OR=1.612$，95% CI：1.144～2.272）；而STAT3 rs957970C/T位点基因型及等位基因频率分布在川崎病组和对照组间无统计学差异（$P>0.05$）。**结论** 重庆地区汉族儿童的STAT3基因内含子11中rs2293152位点多态性与川崎病易感性相关，携带rs2293152C等位基因者比G等位基因携带者易罹患川崎病，而STAT3 rs957970C/T位点多态性与该地区儿童川崎病的易感性无显著相关性。

［**关键词**］ 信号转导和转率激活因子-3；单核苷酸多态性；川崎病；易感性

［**中图法分类号**］ R181.23；R394.1；R725.512 ［**文献标志码**］ A

Association of polymorphism of STAT3 gene with susceptibility Kawasaki disease in Chongqing, China

Zhong Fangfang, Jiang Liping, Shen Wenting, Li Yongqin (Laboratory of Clinical Immunology, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

［**Abstract**］ **Objective** To explore the association of polymorphism of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) gene with the susceptibility of Kawasaki disease (KD) in Han children in Chongqing, China. **Methods** The single nucleotide polymorphisms (SNPs) of STAT3 intron 11 (rs2293152C/G and rs957970C/T) in 130 patients with KD and 147 healthy controls were detected by sequence specific primers-polymerase chain reaction (SSP-PCR), and their statistical differences were analyzed. **Results** The frequency of homozygous CC genotype at rs2293152C/G in STAT3 of the KD patients were significantly higher than that of the controls (23.8% *vs* 10.2%, $P=0.02$). The frequency of C allele at rs2293152C/C was higher in the KD patients than in the controls (45.4% *vs* 34.0%, $P=0.006$, $OR=1.612$, 95% CI: 1.144 to 2.272). Meanwhile, there was no statistical difference in the frequencies of allele and genotypes at rs957970C/T in STAT3 between the KD patients and controls ($P>0.05$). **Conclusion** This study confirms the association between the STAT3 gene polymorphism at rs2293152 and the susceptibility of KD in Han children in Chongqing, China. The children with rs2293152C allele are more vulnerable to KD, and there is no significant association between polymorphism of rs957970 in STAT3 gene and the susceptibility of KD.

［**Key words**］ signal transducer and activator of transcription-3; single nucleotide polymorphism; Kawasaki disease; susceptibility

Supported by the Project of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-206). Corresponding author: Jiang Liping, E-mail: jianglp2005@126.com

［**基金项目**］ 重庆卫生局科研基金（2010-2-206）

［**通信作者**］ 蒋利萍，E-mail：jianglp2005@126.com

［**优先出版**］ http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1739.010.html（2012-12-19）

川崎病(kawasaki disease, KD)又称为皮肤黏膜淋巴结综合征，是1964年由日本川崎富作医师首次报道的一种全身血管炎综合征，临床上以不明原因发热5d以上，皮肤黏膜损害，双侧非化脓性结膜炎，肢端硬肿，多形性红斑以及颈淋巴结非化脓性肿大为主要表现。虽然经过医学家和免疫学家40余年的研究，但是其病因至今未明。近年来，在国内外相继有IL-4、IL-18、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、IL-10、CD40L、CD40等基因的多态性与KD的易感性和(或)冠状动脉损伤(coronary artery lesions, CAL)相关的报道[1-7]，提示基因因素在川崎病的发生、发展中起到重要作用。现已知STAT3基因内含子11中rs2293152和内含子23中rs957970存在SNP。已有STAT3(rs2293152)基因多态性与炎症性肠病[8]、白塞病[9]、强直性脊柱炎[10]等免疫相关性疾病易感性相关的报道。过往的研究[11]也表明同一个基因多态性可引起共同的致病通路从而影响不同自身免疫性疾病的发生。而目前国内有关STAT3基因多态性与川崎病易感性的相关研究很少。本研究应用SSP-PCR检测STAT3 rs2293152和rs957970两个位点的基因型，拟揭示STAT3基因多态性与川崎病易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

依据日本KD诊断标准2002修订版(http://www.kawasaki-disease.org/diagnostic/index.html)选取2011年2月至2012年2月重庆医科大学附属儿童医院门诊随访及住院川崎病患儿130例，男女比例为1.2∶1，年龄(2.1±1.2)岁。同时选取我院门诊体检健康儿童147例，并除外自身免疫性疾病、过敏性疾病、肿瘤病史及近期有发热感染病史，男女比例为1.1∶1，年龄(4.6±2.7)岁。本研究经重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准，患儿及其家属知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 人基因组DNA提取 每例研究对象抽取200 μL外周静脉血(EDTA抗凝)，提取DNA(天根公司,中国)并置-20 ℃保存备用。

1.2.2 SSP-PCR引物设计及合成 依据STAT3在人基因库中已知DNA序列及rs2293152和rs957970位点的SNP设计序列特异性引物，由上海英潍捷基公司合成(表1)。

1.2.3 SSP-PCR反应体系及条件 PCR体系总体积为25 μL，包括12.5 μL 2×Power *Taq* Master Mix (BioTeke, China)，2 μL DNA，特异正向引物F1(或F2) 0.5 μL，内参正向引物0.5 μL，通用反向引物1 μL，灭菌双蒸馏水8.5 μL。在Mycycler热循环仪(Bio-Rad, USA)上完成以下反应：①STAT3 rs2293152C/G位点：94 ℃预变性4 min，94 ℃变性30 s，60 ℃退火40 s，72 ℃延伸40 s，8个循环，94 ℃变性30 s，50 ℃退火30 s，72 ℃延伸40 s，25个循环，72 ℃延伸5 min。②STAT3 rs957970C/T位点：94 ℃预变性4 min，94 ℃变性30 s，51 ℃退火40 s，72 ℃延伸40 s，35个循环，72 ℃延伸5 min。

表1 STAT3基因rs2293152和rs957970位点序列特异性引物

位点	引物序列(5′→3′)	PCR产物长度(bp)
rs2293152	特异正向引物1(F1) TTCACAAAGGGCCTCTGGCTGCC	234
	特异正向引物2(F2) TTCACAAAGGGCCTCTGGCTGCG	234
	内参正向引物 TGATTCAGATCCCGGAAATTTAAC	356
	通用反向引物 AGCTGAAAGAACAGGTTGATGTTTC	
rs957970	特异正向引物1(F1) GTTTTCTCTATGCTAAAAGTGTGTTCC	206
	特异正向引物2(F2) GTTTTCTCTATGCTAAAAGTGTGTTCT	206
	内参正向引物 TATTGTCTCCTACTTAAGGAAGGGC	277
	通用反向引物 CGCCCTCCATTGTTCATATATTTC	

1.2.4 SSP-PCR反应产物电泳分析 PCR产物5 μL经1.5%琼脂糖凝胶，0.5×TAE缓冲液、稳压110 V，35 min电泳，在自动凝胶成像仪(Gene Company, UK)观察记录电泳结果。

1.2.5 SSP-PCR反应产物测序分析 已初步确定为杂合子的DNA样本2个位点分别选取3份，只用内参引物(C, R)PCR扩增后，产物送至上海生工生物公司进行DNA测序，以验证SSP-PCR方法的可靠性。

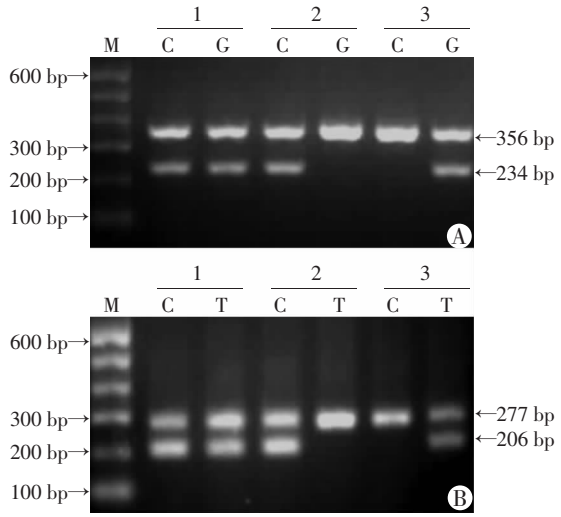
1.3 统计分析方法

所有SNPs的遗传平衡应用Hardy-Weinbergy遗传平衡定律检测；两组人群各位点基因型及等位基因的频率应用直接计数法，组间分布差异比较应用卡方检验，优势比(odds ratio, *OR*)评估相对危险度，计算95%可信区间(confidence interval, CI)；Haploview 4.2进行单体型分析。以上统计应用SPSS 18.0统计软件，检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 基因型分析及产物测序结果分析

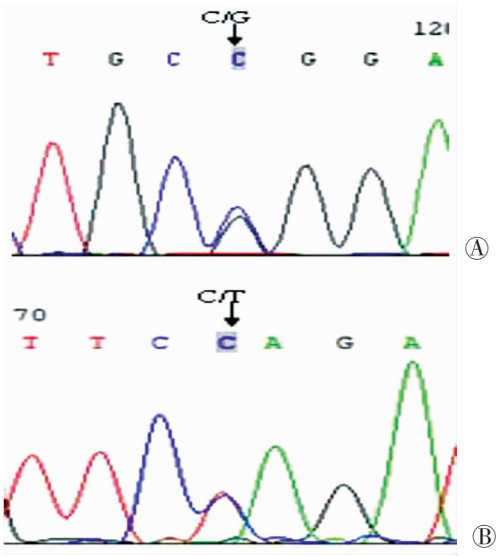
2.1.1 基因型分析 各多态性位点同时做两管PCR，每管含一序列特异性引物(F1或F2)及质控内参引物(C)。每一管反应体系中质控引物均应扩增出产物，检验反应体系及条件的正确性。若一样本同一位点F1和F2两种引物均能扩增出产物，则表明其含有与两种序列特异引物相配对的碱基，为杂合子；若只能扩增出1种，则样本视为其中1种纯合子(图1)。



A：rs2293152 位点产物电泳结果　1：rs2293152CG 基因型；2：rs2293152CC 基因型；3：rs2293152GG 基因型；M：标准；B：rs957970 位点产物电泳结果　1：rs957970CT 基因型；2：rs957970CC 基因型；3：rs957970TT 基因型；M：标准

图1　STAT3 基因 SSP-PCR 产物电泳结果

2.1.2　产物测序结果分析　　测序结果与 STAT3 基因 GeneBank 已知序列完全一致，显示的基因型与 SSP-PCR 结果一致，说明本研究采用 SSP-PCR 法检测 STAT3 基因 SNP 的结果可靠（图2）。



A：rs2293152 位点 CG 杂合；B：rs957970CT 杂合　↑：杂合位点

图2　STAT3 基因 SSP-PCR 产物测序结果

2.2　遗传平衡检验

应用 Hardy-Weinbergy 遗传平衡定律检测川崎病组和对照组 STAT3 rs2293152C/G 和 rs957970C/T 位点的基因型频率，提示达到遗传平衡（$P>0.05$），说明入选对象具有群体代表性。

2.3　基因型及等位基因频率分布分析

rs2293152C/G 位点的基因型及等位基因频率在川崎病组和对照组之间分布差异有统计学意义，川崎病组 CC 基因型分布频率（23.8%）显著高于对照组（10.2%，$P=0.002$，$OR=2.756$，95% CI 为 1.411～5.381）；川崎病组 rs2293152 C 等位基因分布频率（45.4%）显著高于对照组（34.0%，$P=0.006$，$OR=1.612$，95% CI 为 1.144～2.272，表2）。rs957970C/T 位点基因型和等位基因频率组间分布无统计学差异（$P>0.05$，表3）。

表2　川崎病组和对照组 rs2293152C/G 基因型和等位基因频数分布［例（%）］

组别	n	基因型		等位基因	
		CC	CG+GG	C	G
川崎病组	130	31(23.8)	99(76.2)	118(45.4)	142(54.6)
对照组	147	15(10.2)	132(89.8)	100(34.0)	194(66.0)

表3　川崎病组和对照组 rs957970C/T 基因型和等位基因频数分布［例（%）］

组别	n	基因型		等位基因	
		CC	CG+GG	C	G
川崎病组	130	30(23.1)	100(76.9)	132(50.8)	128(49.2)
对照组	147	40(27.2)	107(72.8)	160(54.4)	134(45.6)

2.4　单体型分析

在 STAT3 中 rs2293152C/rs957970T 单体型在川崎病组（21.6%）和对照组（14.0%）间差异有统计学意义（$P=0.020$），在川崎病组中分布明显高于对照组（表4）。

表4　STAT3（rs2293152C/G、rs957970C/T）基因单体型频率分布［例（%）］

组别	n	单体型（rs2293152/ rs957970）			
		G/C	G/T	C/C	C/T
川崎病组	130	36(27.0)	36(27.6)	31(23.8)	28(21.6)
对照组	147	51(34.5)	46(31.5)	29(20.0)	21(14.0)
χ^2		3.595	1.010	1.176	5.441
P		0.058	0.315	0.278	0.020

3　讨论

STAT3 由 750～795 个氨基酸组成，基因定位在 12 号染色体，是一类 DNA 结合蛋白，在不同细胞和组织中广泛表达[12]。在细胞因子的刺激下，STAT3 发生磷酸化，其中高度保守的 SRC 同源区 2（SH2）与受体上活化的酪氨酸结合形成同源或者异源二聚体，从而进入细胞核识别并结合特异 DNA 片段调控基因的转录，参与细胞生长分化、增殖凋亡等生理功能调节[13]。

至今川崎病的发病机制仍是一个谜，但感染因素所触发的急性炎症和免疫调节紊乱被认为是 KD 发生的关键。有研究[14]表明：IL-6 通过与 IL-6 受体复合物（IL-6Rα/gp130）结合激活 STAT3，从而诱导初始 T 淋巴细胞转化成 Th17 细胞，产生 IL-17 等细胞因子，参与各种急、慢性炎症反应。而本课题组前期[15-16]发现在急性期 KD 患儿血清中 Th17 和 IL-6 呈正相关升高，同时 PBMC 中 STAT3 和 pSTAT3 较正常儿童升高。在 KD 患者中，同卵双胞胎同时患病的机会明显大于异卵双胞胎，不同种族之间患病率不同；KD 的父母其后代 KD 发病率明显高于一般人群，并且 KD 的

发生具有家族聚集性[17-18]。以上均提示宿主遗传背景与其对KD的易感性相关。而近年来也有大量的免疫应答相关性基因被证实与KD的易感性相关[1-7]。这些研究发现都说明基因遗传因素在KD的发病机制中扮演重要角色。本研究结果也在重庆地区汉族儿童人群中证实了STAT3基因多态性与川崎病易感性的关系。

本研究的STAT3基因rs2293152G/C位点的GG、GC、CC基因型在重庆地区汉族儿童中分布频率分别是42.2%、47.6%、10.2%，这与Sato等[6]报道的日本人群rs2293152G/C基因型(GG 42.0%、GC49.5%、CC8.5%)结果相近。rs2293152CC基因型在川崎病组分布显著高于对照组($P<0.05$)，rs2293152CC基因型携带者罹患川崎病的概率为非CC基因型携带者的2.756倍。同时，在对STAT3 rs2293152C/G、rs957970C/T进行单体型频率分析发现，川崎病组患儿rs2293152C/rs957970T单体型频率显著高于对照组($P<0.05$)。分析表明，STAT3 rs2293152G/C位点基因多态性可能与川崎病的易感性相关，rs2293152C可能是罹患川崎病的危险因素。而本研究对STAT3基因rs957970C/T位点的基因型及等位基因在川崎病组和对照组的分布频率分析中未发现统计学上显著差异，提示STAT3基因rs957970C/T位点多态性可能与川崎病的易感性无关。对STAT3基因rs2293152位点多态性的检测，可有效预测KD的高危人群，为采取新型干预措施保护KD易感人群奠定基础。

综上所述，本研究在基因水平提示STAT3与川崎病的相关性。研究结果提示在重庆地区汉族儿童人群中STAT3基因内含子11中rs2293152位点多态性与川崎病易感性相关，STAT3 rs2293152 CC基因型携带者比其他基因型患川崎病的可能性高；但STAT3基因rs2293152多态性对STAT3蛋白表达及功能的影响仍需进一步的功能学试验检验，同时还需要检测STAT3基因其他位点多态性的作用，亦需要多中心大样本的研究资料，才能进一步揭示STAT3基因多态性与川崎病易感性的关系。

参考文献：

[1] Burns J C, Shimizu C, Shike H, *et al*. Family-based association analysis implicates IL-4 in susceptibility to Kawasaki disease[J]. Genes Immun, 2005, 6(5): 438-444.

[2] Hsueh K C, Lin Y J, Chang J S, *et al*. Influence of interleukin 18 promoter polymorphisms in susceptibility to Kawasaki disease in Taiwan[J]. J Rheumatol, 2008, 35(7): 1408-1413.

[3] Kariyazono H, Ohno T, Khajoee V, *et al*. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor gene polymorphisms with coronary artery lesions of Kawasaki disease[J]. Pediatr Res, 2004, 56(6): 953-959.

[4] Hsueh K C, Lin Y J, Chang J S, *et al*. Association of vascular endothelial growth factor C-634 g polymorphism in Taiwanese children with Kawasaki disease[J]. Pediatr Cardiol, 2008, 29(2): 292-296.

[5] Huang F Y, Chang T Y, Chen M R, *et al*. Genetic polymorphisms in the CD40 liganol gene and kawasaki disease[J]. J Chin Immunol, 2008, 28(5): 405-410.

[6] Kuo H C, Chao M C, Hsu Y W, *et al*. CD40 gene polymorphisms associated with susceptibility and coronany antery lesions of kawasaki disease in the Tainaness population[J]. Scientific World Journal, 2013, 2012:520865.

[7] Hsueh K C, Lin Y J, Chang J S, *et al*. Association of interleukin-10 A-592C polymorphism in Taiwanese children with Kawasaki disease[J]. J Korean Med Sci, 2009, 24(3): 438-442.

[8] Sato K, Shiota M, Fukuda S, *et al*. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population[J]. J Clin Immunol, 2009, 29(6): 815-825.

[9] Hu K, Hou S, Jiang Z, *et al*. JAK2 and STAT3 polymorphisms in a Han Chinese population with Behcet's disease[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(1): 538-541.

[10] Davidson S I, Liu Y, Danoy P A, *et al*. Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(2): 289-292.

[11] Kobayashi S, Ikari K, Kaneko H, *et al*. Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in he Japanese population[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(7): 1940-1946.

[12] Cheon H, Yang J, Stark G K. The functions of signal transducers and activators of transcr tials 1 and 3 as cytokine-inducible proteins[J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(1): 33-40.

[13] Gao L, Li F, Dong B, *et al*. Inhibition of STAT3 and ErbB2 suppresses tumor growth, enhances radiosensitivity, and induces mitochondria-dependent apoptosis in glioma cells[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 77(4): 1223-1231.

[14] Fischer A. Human immunodeficiency: connecting STAT3, Th17 and human mucosal immunity[J]. Immunol Cell Biol, 2008, 86(7): 549-551.

[15] 沈文婷，蒋利萍，李淑娟，等. 川崎病急性期患者Th17细胞检测及意义[J]. 中国免疫学杂志，2010，26(5)：458-461.

[16] 李永钦，蒋利萍，张璐颖，等. 急性期川崎病信号转导和转录激活因子3的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志，2011，27(8)：743-747.

[17] Uehara R, Yashiro M, Nakamura Y, *et al*. Parents with a history of Kawasaki disease whose child also had the same disease[J]. Pediatr Int, 2011, 53(4): 511-514.

[18] Dergun M, Kao A, Hauger S B, *et al*. Familial occurrence of Kawasaki syndrome in North America[J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2005, 159(9): 876-881.

(**收稿**:2012-10-08;**修回**:2012-12-10)

(编辑 王 红)