DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.022
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1667-03

论著

重庆地区汉族 CD14 启动子区多态性分析

冯 凯,刘 兴,蒋建新 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 调查CD14(-260)多态性在重庆地区汉族中的分布特征,及检验该随机样本遗传学研究的可靠性。方法 对110名重庆汉族个体,采用降落式PCR和限制性片段长度多态性法(RFLP)进行基因型分析。结果 重庆地区汉族CD14(-260)多态性TT、TC、CC 3种基因型频率分别为43.6%、39.1%和17.3%;样本分布符合Hardy-Weinberg平衡。结论 重庆汉族CD14(-260)多态性基因型分布特征与白种人存在明显差异。样本为H-W平衡群体,可进一步用于重庆汉族全身性炎症反应的关联分析。

关键词:降落式PCR(TD-PCR);限制性片段长度多态性(RFLP);CD14
中图法分类号:R195.1;R394.2 文献标识码:A

Polymorphism in CD14 promoter region in Han population in Chongqing

FENG Kai, LIU Xing, JIANG Jian-xin (Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of CD14C(-260)T single nucleotide polymorphism (SNP) in the Han population in Chongqing and to test the reliability with this random sample in genetic research. **Methods** Single-round Touchdown PCR (TD-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) method were used for genotyping in 110 people from the Han population in Chongqing. Results Frequencies of TT, CT, and CC genotypes were 43.6%, 39.1%, and 17.3%, respectively. The sample distribution was accorded with Hardy-Weinberg principle. Conclusion CD14C(-260)T SNP was found in the Han population in Chongqing, and the distribution of alleles was significantly different from that in white population. The sample from an H-W equilibrium population can be used in the association study of the systematic inflammatory reaction in the Han population in Chongqing.

Key words: Touchdown PCR; restriction fragment length polymorphism; CD14

CD14是存在于单核-巨噬细胞及中性粒细胞细胞膜表面的LPS受体[1],在炎症反应中,CD14与LPB、TLR4和MD-2形成LPS-LPB-CD14-TLR4-MD2复合体,激活单核-巨噬细胞产生大量细胞因子如TNFα、IL-1、IL-6等,导致炎症反应发生。在介导初次免疫应答和炎症反应过程中具有多重作用[2~4]。

目前,人们在CD14的启动子区-260位点发现一个(C-T)单核苷酸多态性,已有报道表明CD14(-260)多态性影响CD14的转录和s CD14水平。尤其TT型多态常与较低的s CD14和IL-4有关,所以十分引人注目[5,6]。由于CD14在介导LPS诱导的炎症反应中具有重要的功能,研究此多态性在我国人群中的分布和与全身性炎症反应的关系有助于了解全身性炎症反应的发病机制,本研究以重庆汉族个体为代表,抽样调查了CD14(-260)多态在我国人群中的分布状况,与已报道的白种人的分布特征进行了比较,并对该样本进行了Hard-Weiberg平衡检验。

1 资料和方法

1.1 资料

样本来自重庆地区110名健康献血员,男性68名,女性42名。年龄30~50岁。献血员之间无血缘关系。全血ACD抗凝,于-70 ℃保存。

1.2 基因组DNA提取

按文献[7]方法进行。

1.3 基因分型

1.3.1 降落式PCR PCR(PE9700 PCR仪)反应体系25 μl,包括50 ng的基因组DNA,1 U *Taq*DNA HotStar聚合酶(Qiagen公司),50 pmol的引物,200 nmol的NTP,1.5 mmol Mg^{2+},引物-1,

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054200)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054200)
作者简介:冯 凯(1970-),男,北京市人,博士,助理研究员,主要从事基因多态性和炎症反应的分子机制等方面的研究。电话:(023)68757471
通信作者:蒋建新,电话:(023)68757454,E-mail:jiangjx@cta.cq.cn
收稿日期:2003-06-23;修回日期:2003-09-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5′-GTGCCAACAGATGAGGTTCA-3′，引物-2：5′-GCTTCCAGGCTTCACACTTG-3′。反应条件：预变性 95 ℃ 15 min，94 ℃ 40 s，65 ℃ 30 s，72 ℃ 50 s，16个循环，每个循环延伸温度递减0.5 ℃；94 ℃ 40 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 40 s，20个循环；最后 72 ℃延伸反应5 min。PCR产物 592 bp。

1.3.2 限制性片段长度多态性(RFLP) 取 12.5 μl PCR 产物，加入适当体积缓冲液、水和15 U *Ava* Ⅱ酶(上海生工)构成25 μl 的反应体系进行酶切反应。酶切产物进行 1.7%的琼脂糖凝胶电泳。

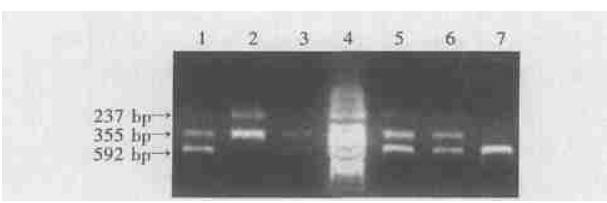
1.4 统计学分析

基因型分布比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 基因分型

采用 RFLP 法对 110 份样本进行基因分型，重庆汉族存在 CD14(-260)多态性。*Ava* Ⅱ酶识别的碱基序列为 GGTCC，因此对于TT型纯合子的个体，其PCR产物将完全切开，在电泳图上表现为 237 bp 和 355 bp 的两条带；如果该位点的 T 转变为 C，*Ava* Ⅱ酶将无法识别该位点，无法切开 PCR 产物，所以对于 CC 型纯合子电泳图上表现为一条带；杂合子 TC 型介于二者之间，PCR 产物一条链能切开，另一条不能，表现在电泳图上成 3 条带。重庆汉族 CD14(-260)多态性基因型频率分别是：TT 型 43.6%（48），TC 39.1%（43）型及 CC 型 17.3%（19），见图 1。



1，3，5，6：TC heterozygote；2：TT homozygote；4：Molecular weight standard (TaKaRa Ltd.)；7：CC homozygote

图1 CD14 基因分析

Fig 1 CD14 genetyping

2.2 基因频率分析

重庆汉族 CD14(-260)位点 T 等位基因频率为 63.2%，远远高于白种人的 35.2%，见表 1。

表1 重庆汉族 CD14C(-260) T SNP 等位基因频率及与白种人的比较

Tab 1 Frequencies of allelles of CD14C (－260) T SNP in the Han population in Chongqing and comparison with those of the white population

Allele	Han population in chongqing		White population		χ^2	P
	n	%	*n*	%		
T	139	63.2	95	35.2	—	—
C	81	36.8	175	64.8	38.08	＜0.01

2.3 Hard-Weiberg 平衡吻合度检验

按H-W定律作吻合度检验，结果见表2。

表2 Hard-Weiberg 平衡吻合度检验

Tab 2 Hard-Weiberg law fitting test

Genotype	Observed vale	Expected value	χ^2	P
TT	48	44	0.364	＞0.05
CT	43	51	1.25	＞0.05
CC	19	15	1.07	＞0.05
Total	110	110	2.684	＞0.05

由表 2 可见，各组平衡吻合度之间无显著性差异(P＞0.05)，表明样本符合 Hard-Weiberg 平衡，获得的数据是可靠的。

3 讨论

全身性炎症反应是临床上创伤后常见的并发症，但是它的发病机制尚未完全揭示。LPS 是存在于多种微生物细胞表面的多糖类物质，多年的研究表明它是引发炎症反应的主要成分。许多细胞尤其是免疫细胞都能识别 LPS。CD14 表达于多种细胞表面，能够识别并结合 LPS，与近来发现的信号传递分子 TLR4 一起在其它辅助因子如 LBP，MD-2 存在的情况下，通过 TOLL/IL1 途径激活 NF-κB，NF-κB 是多种炎症介质的反式作用因子，能够引起炎症介质的释放，最终引起炎症反应，而在 LPS 介导的炎症反应中关键在于免疫细胞识别，最近的研究表明，CD14 在识别复合体中居于中心位置。

临床上在全身性炎症反应的病人中存在个体差异，即便是伤情，医疗情况相似的情况下，可能预后很不一样。目前，认为原因在于个体的遗传差异。已经有文献[8～10]报道基因的多态性与全身性炎症反应相关，而且 CD14 多态性也被发现与该基因的表达差异有关，并且这种差异可增加心肌梗死的发病风险[11]。在我国人群中CD14的多态性对全身性炎症反应的影响尚少见报道。

进行遗传学研究样本一定要有可比性，随着基因组计划的进行，发现不同的种族之间存在着差异，因此研究疾病的遗传学背景一定要有相应样本对照。

本研究对 110 名重庆地区汉族健康献血员的 CD14(-260)多态性进行基因分型。实验结果表明此多态性在重庆汉族中的分布是相当广泛的。基因型频率分布与白种人有明显的差异。T 等位基因频率占 63.2%远远高于欧洲人群的 35.2%。目前的研究表明(-260)TT 型多态与 CD14 的低转录水平有关，而且实验证明 TT 型多态与低水平的血清 IL-4 和低水平的 sCD14 有关。因此有人认为 TT 型多态可能会增加全身性炎症反应的发病风险。本研究证明了我们收集的样本符合 Hardy-Weinberg 平衡，可用于进一步的遗传学分析，同时发现了重庆汉族 CD14(-260)多态性位点的基因型分布与白种人存在显著差异。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, *et al*. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein[J]. Science, 1990, 249(4975): 1431－1433.

[2] Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7 Suppl): S2－S7.

[3] da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, *et al*. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2[J]. J Biol Chem, 2001, 276(24): 21129－21135.

[4] Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, *et al*. Toll-like receptor family and signalling pathway[J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(5): 563－566.

[5] Pan Z, Hetherington C J, Zhang D E. CCAAT/enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor beta signaling in monocyte development[J]. J Biol Chem, 1999, 274(33): 23242－23248.

[6] Baldini M, Lohman I C, Halonen M. A polymorphism * in the 5′ flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20(5): 976－983.

[7] Gustafson S, Proper J A, Bowie E J, *et al*. Parameters affecting the yield of DNA from human blood[J]. Anal Biochem, 1987, 165(2): 294－299.

[8] Mira J P, Cariou A, Grall F, *et al*. Association of TNF2, a TNF-α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality[J]. JAMA, 1999, 282(6): 561－568.

[9] Majetschak M, Flohe S, Obertacke U, *et al*. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients[J]. Ann Surg, 1999, 230(2): 207－214.

[10] Fang X M, Schroder S, Hoeft A, *et al*. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis[J]. Crit Care Med, 1999, 27(7): 1330－1334.

[11] Hubacek J A, Pit'ha J, Skodova Z, *et al*. C(-260)-T Polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction[J]. Circulation, 1999, 99: 3218－3220.

（编辑　张　宁）

（上接 1666 页）

余分流，超声确定封堵器不影响心脏瓣膜的启闭后，则逆钟向旋转推送杆，释放出封堵器。

术后每日口服阿司匹林 300 mg，静脉应用抗生素 3～5 d。

2　结果

造影示缺损直径分别为 4、4、6、6 mm，置入 Amplatzer 偏心性封堵器分别为 6、6、10、10 mm。4 例患者封堵均获成功，术后即刻左心室造影、经胸心脏超声检查显示无残余分流，手术过程如图 1～2 所示。心电监护无心律失常发生。术中及术后未发生并发症，术后 5～7 d 出院。

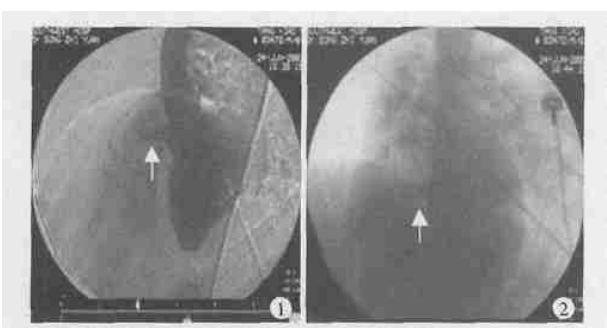


图 1　术前左室造影示有左向右分流（↑）

图 2　术后显示 **Amplatzer** 偏心性封堵器置放良好（↑）

3　讨论

经导管法关闭 VSD，可避免开胸手术或体外循环，且具有效、恢复快等优点。但由于左室腔处于高压状态，随着心室收缩室间隔变形，使堵塞装置移位或对心内结构产生损伤；绝大部分 VSD 发生在膜部，膜部 VSD 由于靠近主动脉瓣、房室瓣及传导束等重要解剖结构、缺损周围无足够的边缘可供封堵器附着，对其进行堵塞易引起严重的并发症。而我们现在采用的 Amplatzer 偏心性封堵器主要是双盘的左室面向主动脉侧突出 2 mm，而向室间隔肌部侧突出 5～7 mm，呈一不规则形状。此 VSD 封堵器明显地降低了膜部瘤、瓣膜关闭不全等并发症的发生，且 3 个月后表面可被平滑的内皮覆盖[2]。2002 年 FDA 已批准应用于临床[3]。

导管通过室间隔是关键的一步。Judkin 右冠状动脉导管经左心室侧寻找室间隔缺损口需以左心室造影时的投影体位和造影显示的缺损位置为路标，将导管从左心室经室间隔缺损处插入右心室则相对容易。如导管在撤向主动脉瓣下时从左心室弹出，则可将 Judkin 右冠状动脉导管塑形，即在距导管头端 5 cm 处作一 180° 弯曲，使导管进入左心室后不易跳出，也易于通过室间隔缺损口处进入右心室。

膜部 VSD 靠近主动脉瓣、三尖瓣和二尖瓣。封堵器置入后有可能影响到瓣膜的功能。因此，术前应行经胸或经食道超声检查，重点选择心尖五腔心切面和心底短轴切面，适合行封堵治疗的超声检查指标是在心尖五腔心切面上显示到室间隔缺损边缘与主动脉瓣的距离大于 3 mm，无右冠瓣脱垂；心底短轴切面上室间隔缺损应在 12 点以前的位置，并以 9～11 点钟的位置为佳。封堵器置入后有可能产生心律失常和传导阻滞，本组 4 例在术中和术后均未出现心律失常和传导阻滞，这可能与缺损的部位远离心室肌和传导系统有关。

关键词：室间隔缺损；介入治疗

中图法分类号：R541.105　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Janorkar S, Goh T, Wilkinson J. Transcatheter closure of ventricular septal defects using the Rashkind device: initial experience[J]. Cathete Cardiovasc Intervent, 1999, 46(1): 43－48.

[2] Gu X P, Han Y M, Titus J L, *et al*. Transcatheter closure of membranous ventricular septal defects with a new nitinol prosthesis in a natural swine model[J]. Cathete Cardiovasc Intervent, 2000, 50(4): 502－509.

[3] 穆瑞斌，秦永文. 室间隔缺损的介入治疗进展[J]. 国外医学心血管疾病分册，2002，29(6)：349－351.

（编辑　刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net