

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.07.011

论著·临床研究

Cosmc 基因突变与儿童过敏性紫癜 易感性的相关性分析

谢秋玲 莫茜 刘少玲 朱明昂 陶悦 张小秦 王剑 金燕樑

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心风湿免疫科, 上海 200127)

[摘要] **目的** 探索过敏性紫癜(HSP)患儿中是否存在 Cosmc 基因突变以及该突变与 HSP 发病的关联性。**方法** 选取 2014 年 3 月至 2015 年 12 月确诊为 HSP 患儿 84 例为 HSP 组, 另选取性别和年龄匹配的健康体检者 58 例为健康对照组。采集两组儿童空腹静脉血 5 mL, EDTA 抗凝, 根据密度梯度离心法分离得到外周血单个核细胞(PBMC), 提取 PBMC 中的基因组 DNA, 应用降落聚合酶链反应(Touch-down PCR)扩增 Cosmc 基因全外显子片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后行测序分析, 并进一步分析突变与 HSP 易感性的关系。**结果** 测序结果显示 HSP 患儿 Cosmc 基因存在两个位点的突变, 分别为 c.393T>A 和 c.72A>G。c.393T>A 和 c.72A>G 突变位点中各基因型、等位基因在两组间比较差异均无统计学意义, 且不受性别影响(均 $P>0.05$)。**结论** HSP 患儿 Cosmc 基因外显子中存在两个突变位点, 且与 HSP 的发病并无关联。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(7): 625-629]

[关键词] 过敏性紫癜; Cosmc 基因; 基因突变; 儿童

Association of Cosmc gene mutation with susceptibility to Henoch-Schönlein purpura in children

XIE Qiu-Ling, MO Xi, LIU Shao-Ling, ZHU Ming-Ang, TAO Yue, ZHANG Xiao-Qin, WANG Jian, JIN Yan-Liang. Department of Rheumatology, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Jin Y-L, Email: jinyanliang2000@163.com)

Abstract: Objective To investigate the presence of Cosmc gene mutation in children with Henoch-Schönlein purpura (HSP) and the association between Cosmc gene mutation and the susceptibility to HSP. **Methods** Eighty-four children who were diagnosed with HSP between March 2014 and December 2015 were selected as the HSP group. Fifty-eight healthy volunteers matched for age and sex were enrolled as the control group. Fasting venous blood (5 mL) from the two groups was collected in EDTA anticoagulated tubes, followed by the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) through density gradient centrifugation. Genomic DNA was extracted from PBMCs according to the manufacturer's protocol, and the whole exon region of Cosmc gene was amplified by touch-down polymerase chain reaction (touch-down PCR). The PCR products were identified by 1% agarose gel and sequenced in order to further examine the association between Cosmc gene mutation and the susceptibility to HSP. **Results** Sequencing results showed two mutations (c.393T>A and c.72A>G) of Cosmc gene in children with HSP. There were no significant differences in the genotype and allele frequencies at the two loci between the HSP and control groups, and this distribution was not associated with sex. **Conclusions** The mutations c.393T>A and c.72A>G in the exon region of Cosmc gene in children with HSP are not associated with the onset of HSP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(7): 625-629]

Key words: Henoch-Schönlein purpura; Cosmc gene; Gene mutation; Child

[收稿日期] 2016-03-15; [接受日期] 2016-05-04

[基金项目] 上海市浦东新区科技发展基金创新资金(PKJ2012-Y51)。

[作者简介] 谢秋玲, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 金燕樑, 男, 主任医师。

过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura, HSP) 为儿童时期常见的小血管炎^[1]。然而, 目前关于 HSP 的发病机理仍不清楚。最近几年的研究表明 IgA1 分子铰链区 $\beta 1, 3$ 半乳糖基的缺失才是 HSP 发病的关键^[2-3]。

IgA1 铰链区的 O-糖基化是在高尔基体中完成的。 $\beta 1, 3$ 半乳糖基转移酶 ($\beta 1, 3$ -galactosyltransferase, C1GALT1) 作为 O-糖基化的关键酶, 可催化半乳糖 Gal 从 UDP-Gal 转移到 Tn 抗原上从而形成 T 抗原^[4]。在哺乳动物细胞中, 有活性的 C1GALT1 的形成需要其特异性分子伴侣 Cosmc (亦称为 C1GALT1C1) 的共表达^[5]。Cosmc 通过直接识别并结合 C1GALT1 N 端的一个疏水性多肽从而促进 C1GALT1 的折叠并形成有活性的 C1GALT1^[6]。Cosmc 基因的功能性突变可导致 C1GALT1 的失活, 继而引起糖蛋白的糖基化降低^[4]。

IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 与过敏性紫癜性肾炎 (Henoch-Schönlein purpura nephritis, HSPN) 被认为是一种疾病的两种不同表现形式, 可能拥有相同的发病机理^[7]。然而, 关于 IgAN 的研究显示 IgAN 患者中存在 Cosmc 表达降低, 而 C1GALT1 的表达则正常^[8]。此外, 同样涉及 $\beta 1, 3$ 半乳糖基化缺失的 Tn 综合征, 是由 Cosmc 基因突变所致, 而非 C1GALT1 表达降低所致^[9]。这些结果均表明 Cosmc 才是导致 IgA1 分子铰链区半乳糖基化异常的关键。因此, 我们推测 Cosmc 可能通过其基因突变影响 IgA1 分子铰链区 GalNAc $\alpha 1$ -R 的半乳糖基化而导致疾病的易感。目前为止, 关于 HSP 患儿中是否存在 Cosmc 基因的突变还未有研究报道。

为了解 HSP 患儿中 Cosmc 基因突变可能产生的影响, 我们应用降落聚合酶链反应 (touch down polymerase chain reaction, Touch-down PCR) 技术, 对 2014 年 3 月至 2015 年 12 月就诊于我院风湿科门诊的 HSP 患儿的 DNA 标本进行 Cosmc 基因全外显子的检测, 并分析基因突变与 HSP 发病的关联性, 从而从基因角度探讨 HSP 患儿血清中 IgA1 铰链区 O-糖基化异常的原因, 并为 HSP 的发病机理研究提供可能。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 3 月至 2015 年 12 月在上海儿童医学中心风湿科专科门诊就诊的 84 例 HSP 患儿为研究对象, 其中男 45 例, 女 39 例; 年龄 2~15 岁, 平均年龄 8.0 ± 2.9 岁。研究对象入选标准: (1) 年龄 <18 岁。(2) 符合中华医学会儿科学分会免疫学组儿童过敏性紫癜循证诊治建议 (2013)^[10] 中的 HSP 诊断标准, 即可触性皮炎 (必要条件) 伴如下任何 1 条: ①弥漫性腹痛; ②任何部位活检显示 IgA 沉积; ③关节炎/关节痛; ④肾脏受损表现 (血尿和/或蛋白尿)。(3) 排除合并其他血管炎的患儿。依据 HSPN 的诊断标准, 将 84 例 HSP 患儿分为 HSPN 组 ($n=14$), 男 8 例, 女 6 例, 平均年龄 10.1 ± 2.0 岁; 非 HSPN 组 ($n=70$), 男 37 例, 女 33 例, 平均年龄 7.6 ± 2.9 岁。HSPN 的诊断依据参照中华医学会儿科学分会肾脏病学组儿童常见肾脏疾病诊治指南中紫癜性肾炎诊断标准^[11]。

另选取同期在我院接受体检的健康儿童 58 例作为对照组, 其中男 38 例, 女 20 例, 平均年龄 7.6 ± 4.5 岁。对照组儿童的入选标准: (1) 年龄 2~17 岁; (2) 在我院接受健康体检, 且无异常发现; (3) 排除曾有严重疾病或免疫性疾病史者。HSP 组与对照组儿童年龄、性别差异均无统计学意义, 具有可比性。

本研究通过上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心医学伦理委员会批准并获得入组儿童家长的知情同意。

1.2 试剂

TRIzol 试剂、Pfx DNA polymerase、 $10 \times$ Pfx Amplification Buffer、 $10 \times$ Enhancer Buffer、 $MgSO_4$ 购自美国 Invitrogen 公司, dNTP、ddH₂O 购自日本 Takara 公司, 无水乙醇、柠檬酸钠、异丙醇、氯仿、乙醇等均购自上海生工生物有限公司, LymphoprepTM (人淋巴细胞分离液) 购自加拿大 Stem Cell Technologies 公司。

1.3 引物设计与合成

Cosmc 基因位于 X 染色体上, 其参考序列

见于国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI)。使用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对引物, 由上海生工生物工程公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 Touch-down PCR 引物序列

扩增片段	引物序列
Cosmc-816 bp	正义: 5'-CTTGATTTCAAGCTTGGGAACCTT-3' 反义: 5'-GCAAACCTGCTAGCTGTTTATCTTCAG-3'
Cosmc-680 bp	正义: 5'-CAACTGGTTCCTCCTGCACG-3' 反义: 5'-TGTGGTTATACCAGTGCCACC-3'

1.4 标本采集及处理

采集两组儿童清晨空腹静脉血 5 mL, 置于含有 EDTA 的抗凝管中摇匀、编号并登记, 然后将 5 mL EDTA 抗凝的血标本, 经 900 转 /min 离心 15 min, 最上层为富含血小板的血浆 (platelet rich plasma, PRP)。将 PRP 溶液在室温下经 4000 转 /min 离心 5 min 去血小板, 得上清, 分装至冻存管内, 于 -80℃ 冻存直至使用。下层的细胞加淋巴细胞分离液分离得外周血单个核细胞 (PBMC), 加 1 mL 冻存液冻存于 -80℃ 直至使用。

1.5 基因组 DNA 的提取

TRIzol 法提取 PBMC 中的基因组 DNA。取一管上述冻存的 PBMC 细胞, 于 37℃ 水浴锅快速融化, 经 900 转 /min 离心去上清。每 5~10 × 10⁶ 个细胞加 1 mL TRIzol 试剂, 反复吸打, 按照 TRIzol 试剂的说明书进行操作。提取的 DNA 用 NanoDrop 2000C 测其浓度和纯度 (A260/280 和 A260/230)。DNA 产物置于 -20℃ 冰箱保存。

1.6 Touch-down PCR 扩增反应

PCR 扩增反应的总体系为 25 μL, 含模板 2 μL、10 × amplification buffer 5 μL、10 × enhancer buffer 2.5 μL、dNTP 3 μL、ddH₂O 10 μL、上下游引物各 0.75 μL、Pfx DNA polymerase 0.5 μL、MgSO₄ 0.5 μL。

Cosmc 外显子区域分两段进行 PCR。第一段 PCR 产物大小为 816 bp, 第二段 PCR 产物大小为 680 bp。第一片段的 PCR 反应条件为: 94℃ 预变

性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s (每个循环降 1℃), 72℃ 延伸 1 min, 共 16 个循环; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 20 个循环; 最后 72℃ 再延伸 10 min。第 2 片段的 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s (每个循环降 1℃), 72℃ 延伸 45 s, 共 13 个循环; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 20 个循环; 最后 72℃ 再延伸 10 min。

将 PCR 扩增产物 5 μL 加入预先加有 GelRed 染料的 1% 琼脂糖凝胶中电泳 30 min (电压 120 V), 在紫外投射自动成像分析仪上成像。将有条带的 PCR 电泳产物送华大基因有限公司进行测序分析, 并使用 Chromas 软件对测序结果进行分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据做统计学分析, 计数资料采用百分率 (%) 表示, 两组间比较用 χ^2 检验; 并对女性基因型进行群体遗传学 Hardy-Weinberg 平衡检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cosmc 基因外显子突变位点检测结果

测序结果显示 HSP 患儿 Cosmc 基因存在两个位点的突变, 分别为 c.393T>A 和 c.72A>G。

2.2 Cosmc 基因突变位点测序分型 Hardy-Weinberg 平衡检验

Cosmc 基因 c.393T>A 位点具有 T、A 双态性, 测序分型显示该位点有 2 种基因型, 即 TT 型、TA 型 (图 1)。c.72G>A 位点具有 G、A 双态性, 测序分型显示该位点也有 2 种基因型, 即为 GG 型、GA 型 (图 2)。Hardy-Weinberg 平衡检验显示, 实验组和对照组 TT、TA 基因型和 GG、GA 基因型分布均符合遗传平衡 (P > 0.05), 表示所测位点的基因频率、基因型频率达到传递平衡, 样本具有群体代表性。

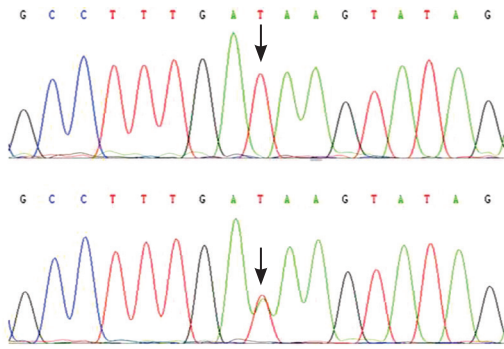


图1 Cosmc 基因 c.393T>A 位点测序 上图为 TT 基因型(野生型); 下图为 TA 基因型(杂合型)。箭头表示检测到的突变位点。

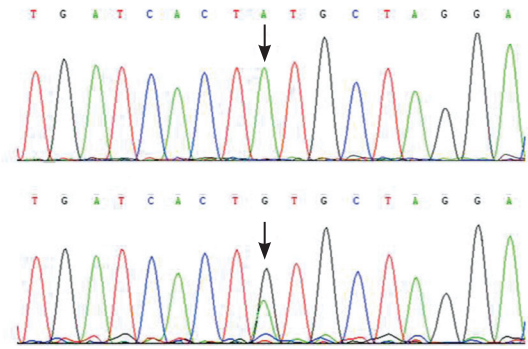


图2 Cosmc 基因 c.72A>G 位点测序 上图为 AA 基因型(野生型); 下图为 AG 基因型(杂合型)。箭头表示检测到的突变位点。

2.3 Cosmc 基因 c.393T>A 突变位点的等位基因频率与 HSP 的易感关联性分析

该位点等位基因频率在健康对照组和 HSP 组间差异无统计学意义, 且不受性别影响 ($P>0.05$) (表 2)。HSP 患儿存在 c.393T>A 位点突变, 男性患儿均为纯合突变; 女性患儿均为杂合突变, 无纯合突变, 且该位点不同基因型 (TT/TA) 在 HPS 组 (28/11) 及健康对照组 (16/4) 之间比较差异亦无统计学意义 ($\chi^2=0.469, P=0.493$)。

2.4 Cosmc 基因 c.72A>G 突变位点的等位基因频率与 HSP 的易感关联性分析

由表 3 可知, 健康对照组无 c.72A>G 的突变, HSP 组则存在 2 例突变, 且均为女性患者, 为杂合突变。表 3 显示该位点等位基因频率在健康对照组与 HSP 组间差异无统计学意义, 且不受性别影响 ($P>0.05$)。女性患儿不同基因型 (AA/AG) 在非 HSPN 组 (32/1) 与 HSPN 组 (5/1) 之间比较差异无统计学意义 ($\chi^2=1.94, P=0.164$)。

表 2 c. 393T>A 等位基因频率的分布 [例 (%)]

组别	等位基因			男			女		
	n	T	A	n	T	A	n	T	A
健康对照组	58	72(92.3)	6(7.7)	38	36(94.7)	2(5.3)	20	36(90.0)	4(10.0)
HSP 组	84	106(86.2)	17(13.8)	45	39(86.7)	6(13.3)	39	67(85.9)	11(14.1)
χ^2 值		1.769			1.541			0.401	
P 值		0.184			0.215			0.527	

表 3 c.72 A>G 等位基因频率的分布 [例 (%)]

组别	等位基因			男			女		
	n	A	G	n	A	G	n	A	G
健康对照组	58	78(100)	0(0)	38	38(100)	0(0)	20	40(100)	0(0)
HSP 组	84	121(98.4)	2(1.6)	45	45(100)	0(0)	39	76(97.4)	2(2.6)
χ^2 值		1.281			-			1.043	
P 值		0.258			-			0.307	

注: “-”表示无此项。

3 讨论

HSP 是儿童时期常见的小血管炎, 其发病机制目前尚未完全阐明。C1GALT1 为 O-糖基化的

关键酶, 而 Cosmc 作为 C1GALT1 的特异性分子伴侣, 为 IgA1 铰链区 $\beta 1, 3$ 半乳糖基化所必不可少。当 Cosmc 发生异常时, 可导致 IgA1 糖基化异常, 从而可能导致 HSP 的发生。因此, 我们进

行该项病例对照研究验证上述假设是否成立。本研究中,我们对84例HSP患儿和58例健康儿童进行Cosmc基因的全外显子测序。结果显示,其中的一个突变位点为c.393T>A。对该突变位点与HSP的关联性进行分析显示不同等位基因在健康对照组与HSP组之间的差异无统计学意义。考虑到Cosmc基因位于X染色体上,性别可能会导致结果的不同,我们比较了女性患者不同基因型在健康对照组与非HSPN组、HSPN组之间的差异,但结果显示差异无统计学意义。而之前的一个研究显示IgAN患者Cosmc基因的整个编码区仅存在一个位点的突变,即c.393T>A,c.393T>A的最小等位基因频率(MAF)仅为0.069,且该基因突变与IgAN的易感性无关^[12]。这一结果与本研究结果相一致。可能的原因是Cosmc基因位于X染色体上,因此基因多态性对疾病的影响可能会受到非活化的性染色体的限制。即使是阳性的关联结果,也不能代表HSP组和对照组之间真正的关联性。此外,在关于Tn综合征^[9]的研究中显示c.393T>A的突变并未引起C1GALT1活性的改变,也就是说该位点可能并非是引起疾病发生的关键位点。

本研究中检测到的另一个突变位点为c.72A>G,而且仅存在于2名女性HSP患者中,关联性分析显示不同等位基因在HSP组与健康对照组之间的差异无统计学意义,且女性患者中不同基因型在非HSPN组和HSPN组中分布的差异亦无统计学意义。由于该位点在之前的研究中并未发现过,而我们的实验数据呈阴性结果,可能与实验样本数量较少有关,也可能是非活性的性染色体抑制其对疾病的影响所致。因此,以上结果均表明Cosmc外显子区域内基因多态性可能与HSP的易感性并无关联。如果Cosmc基因可影响自身免疫性疾病的发生,则必然是通过除外显子区域突变外的其他途径而实现的。最新的一项研究认为Cosmc基因启动子区域的DNA高甲基化才是IgAN中Cosmc mRNA表达降低的关键^[13]。我们推测Cosmc基因启动子区域或非编码区的基因突变可能与疾病的发生有关。

因此,在扩大样本量的同时,检测HSP患者Cosmc基因启动子区域或非编码区内是否存在突变

将成为我们下一步的工作重点,从而为HSP及涉及到O-糖基化的其他疾病的发病机制研究提供基础。

[参 考 文 献]

- [1] Chen JY, Mao JH. Henoch-Schönlein purpura nephritis in children: incidence, pathogenesis and management[J]. World J Pediatr, 2015, 11(1): 29-34.
- [2] Lau KK, Wyatt RJ, Moldoveanu Z, et al. Serum levels of galactose-deficient IgA in children with IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura[J]. Pediatr Nephrol, 2007, 22(12): 2067-2072.
- [3] Trnka P. Henoch-Schönlein purpura in children[J]. J Paediatr Child Health, 2013, 49(12): 995-1003.
- [4] Ju T, Wang Y, Aryal RP, et al. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers[J]. Proteomics Clin Appl, 2013, 7(9-10): 618-631.
- [5] Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(26): 16613-16618.
- [6] Aryal RP, Ju T, Cummings RD. Identification of a novel protein binding motif within the T-synthase for the molecular chaperone Cosmc[J]. J Biol Chem, 2014, 289(17): 11630-11641.
- [7] Kamei K, Ogura M, Sato M, et al. Evolution of IgA nephropathy into anaphylactoid purpura in six cases-further evidence that IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis share common pathogenesis[J]. Pediatr Nephrol, 2016, 31(5): 779-785.
- [8] Qin W, Zhou Q, Yang LC, et al. Peripheral B lymphocyte beta1,3-galactosyltransferase and chaperone expression in immunoglobulin A nephropathy[J]. J Intern Med, 2005, 258(5): 467-477.
- [9] Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome[J]. Nature, 2005, 437(7063): 1252.
- [10] 中华医学会儿科学分会免疫学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童过敏性紫癜循证诊治建议[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(7): 502-506.
- [11] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(二): 紫癜性肾炎的诊治循证指南(试行)[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(12): 911-913.
- [12] Li GS, Zhang H, Lv JC, et al. Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 2007, 71(5): 448-453.
- [13] Sun Q, Zhang J, Zhou N, et al. DNA methylation in Cosmc promoter region and aberrantly glycosylated IgA1 associated with pediatric IgA nephropathy[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0112305.

(本文编辑: 万静)