

血栓调节蛋白单核苷酸多态性与脓毒症的相关性研究^①

李进^{1,5},熊滨²,黄冰¹,覃纲³,韦叶生⁴,李军⁵,黄霞⁵,
蒋玉洁⁵,梁燕冰⁵,彭丁生^{1,5},黄雨晴⁵,廖品琥^{5②}

- (1. 广西医科大学附属肿瘤医院,广西 南宁 530021 E-mail:lijin6_9@163.com;
2. 广西壮族自治区人民医院重症医学科,广西 南宁 530021;
3. 广西壮族自治区民族医院重症医学科,广西 南宁 530021;
4. 右江民族医学院附属医院检验科,广西 百色 533000;
5. 右江民族医学院附属医院重症医学科、呼吸内科,广西 百色 533000)

摘要:目的 研究血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)的基因型及其等位基因的分布频率,分析可能与脓毒症相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。方法 采用单碱基延伸 PCR 技术和 DNA 测序方法,检测 132 例无血缘关系的体检健康人群和 172 例脓毒症患者的 TM 的 SNPs,比较分析各组间基因型及等位基因的分布频率,以及这些 SNPs 位点是否与脓毒症的易感性有关。结果 健康广西人群 rs1962C/T 的多态性分布与非洲人相比差异有统计学意义,rs3176123G/T、rs6082986G/A 以及 rs1042580C/T 的基因多态性与欧洲人、北京人、日本人和非洲人相比差异有统计学意义。脓毒症组 rs1042580C/T 位点的基因型频率分布 CT 和 TT 均高于对照组,基因型频率之间差异有统计学意义,但等位基因频率差异无统计学意义。其余六个位点 rs13306848C/T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A 以及 rs1042579G/A 的基因型频率和等位基因分布,在两组间差异无统计学意义。结论 TM 的单核苷酸多态性在不同地区、种族人群之间的基因型及等位基因分布存在差异;TM 的 rs1042580C/T 基因位点的基因型频率与脓毒症易感性有关。

关键词: 血栓调节蛋白;单核苷酸多态性;广西人群;脓毒症

中图分类号: R394 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)02-0127-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.02.001

The association of single nucleotide polymorphism of thrombomodulin and sepsis

Li Jin^{1,5}, Xiong Bin², Huang Bing¹, Qin Gang³, Wei Yesheng⁴, Li Jun⁵, Huang Xia⁵, Jiang Yujie⁵,
Liang Yanbing⁵, Peng Dingsheng^{1,5}, Huang Yuqing⁵, Liao Pinhu⁵

- (1. *Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China* E-mail: lijin6_9@163.com; 2. *Department of Critical Care Medicine, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi, China*; 3. *Department of Critical Care Medicine, Guangxi Zhuang Autonomous Region Nationality Hospital, Nanning 530021, Guangxi, China*; 4. *Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*
5. *Department of Critical Care Medicine and Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*)

① 基金项目:国家自然科学基金项目(81560321);广西自然科学基金重点项目(2011GXNSFD018039);广西科技攻关项目(1140003B-93);2014年广西医学高层次骨干人才139计划培养人选项目

② 通讯作者,E-mail: liaopinhu@163.com

Abstract: **Objective** To study the allele and genotype distribution of thrombomodulin (TM) and to explore the single nucleotide polymorphism (SNP) which may be associated with sepsis. **Methods** Single base extension PCR and DNA sequencing were used to measure the single nucleotide polymorphism of TM in 172 patients with sepsis and 132 health controls without consanguinity relationship. The distribution frequencies of the genotype and allele were compared among different groups in order to evaluate whether these gene loci of TM were associated with sepsis susceptibility. **Results** Comparison of rs1962C/T polymorphism distribution between Guangxi health population and Africans yielded that there was statistically significant difference, and there were statistically significant differences in comparison of rs3176123G/T, rs6082986G/A and rs1042580C/T polymorphisms among Guangxi population and Europeans, Beijing population, Japanese and Africans. The frequency distribution of CT genotype and TT genotype of rs1042580C/T polymorphism in sepsis group were higher than those of the control group, comparison of genotype frequencies of sepsis group with those of control group, there were statistically significant differences, but there was no statistically significant difference in comparison of allele frequency. There were no statistically significant differences in genotype frequencies and allele distribution at other six loci rs13306848C/T, rs1962C/T, rs3176123G/T, rs6082986G/A, rs6113909G/A and rs1042579G/A between the sepsis group and the control group. **Conclusion** There were significant differences in genotypes and allelic distribution of TM SNPs among ethnic groups in different regions; the genotype frequencies of TM rs1042580C/T was associated with susceptibility of sepsis.

Key words: thrombomodulin; single nucleotide polymorphism; Guangxi population; sepsis

脓毒症患者的炎症反应和凝血系统都发生异常,两者相互影响^[1]。血栓调节蛋白(TM)是一种主要表达于内皮细胞表面的糖蛋白,在血小板、单核细胞、平滑肌细胞、癌细胞和心肌细胞等也有表达,有抗炎和抗凝作用^[2-3],脓毒症时其结构和功能发生改变能导致凝血、抗凝系统失衡和抗炎作用的改变,基因遗传因素也是导致结构和功能异常的原因。本研究从遗传学角度探讨血栓调节蛋白基因多态性与脓毒症易感性之间的关系。

1 对象与方法

1.1 对象 选取2012年4月~2015年8月右江民族医学院附属医院、广西壮族自治区人民医院和广西壮族自治区民族医院的脓毒症患者共172例作为脓毒症组,脓毒症诊断依据“2001年危重病医学会/欧洲危重病医学会/美国胸科医师协会/美国胸科学会/外科感染学会关于全身性感染的定义会议”的成年病人的诊断标准进行诊断。随机选取无亲缘关系的体检正常人群132例作为对照组。试验将严格按照医学伦理学准则和要求,告知实验内容及目的,征得患者及其家属同意,并签署知情同意书。

1.2 方法 ①采用EDTA-K2抗凝采血管收集所有参与对象外周静脉血2 ml,使用离心柱法提取DNA,-70℃保存备用。②TM基因的rs13306848C/

T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A、rs1042580C/T以及rs1042579G/A序列来自NCBI的核苷酸序列 Gene ID:7056,利用SNaP-shot SNP分型技术对所有样本进行SNP位点分型。引物采用Primer 3.0软件设计,全部引物由上海天昊生物公司合成。③采用20 μl PCR扩增反应体系,含1×GC-I buffer(Takara),3.0 mmol/L Mg²⁺,0.3 mmol/L dNTP,1 U HotStarTaq polymerase(Qiagen Inc),1 μl的DNA样本和1 μl多重PCR引物。④PCR产物纯化后进行延伸反应(SNaPshot Multiplex Kit,ABI),延伸产物经纯化后用ABI3730XL自动测序仪进行测序(委托上海天昊生物科技有限公司),测序结果用Gene Mapper 4.1(Applied Biosystems Co, Ltd,USA)进行分型分析。

1.3 统计学方法 采用HaploView 4.0软件进行Hardy-Weinberg平衡检验,应用SPSS 16.0统计软件进行数据分析,两组间的基因型及等位基因型频率比较采用R×C表的 χ^2 检验或按Fisher's确切概率法计算确切P值,以P<0.05为差异具有统计学意义,95%的可信区间(95%CI)和比值比(Odds Ratio, OR)表示相对风险度。

2 结果

2.1 TM基因测序结果 本研究选择TM基因的7

个 SNPs 位点,rs1042580C/T、rs1042579G/A、rs13306848C/T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A 分型结果显示,每个位点均存在 3 种基因型,基因分型成功率在 96.5%~100%之间。

2.2 TM 基因分布特点 本研究选择的 TM 基因的 7 个位点,其中位于 5'-侧翼 1 个(rs13306848C/T);3'-非编码区 3 个(rs1962C/T、rs3176123G/T、rs1042580C/T);3'-侧翼 2 个(rs6082986G/A、rs6113909G/A);外显子区 1 个(rs1042579G/A)。基因型及等位基因频率的分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,样本具有群体代表性。

2.3 不同种族人群 TM 基因多态性分布的比较 将广西人群的 TM 基因型及等位基因分布频率,与人类

基因组计划公布的欧洲人、非洲人、日本东京人和中国北京人的多态性分型频率数据(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>)进行比较,发现 rs1962C/T 的多态性分布与非洲人相比差异有统计学意义(P 均 <0.05),而与中国北京人、日本人及欧洲人相比差异无统计学意义(P 均 >0.05),见表 1;rs3176123 G/T、rs6082986 G/A 以及 rs1042580C/T 的基因多态性与欧洲人、北京人、日本人和非洲人相比差异有统计学意义(P 均 <0.05),见表 1。目前,NCBI 上暂未提供人类基因组 rs13306848C/T、rs1042579G/A、rs6113909G/A 位点基因型及基因型频率分布的官方数据,因此未做对比。

表 1 不同种族及地区人群 TM 基因 rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A 以及 rs1042580C/T 多态性分布频率的比较

SNP	n	基因型频率			χ^2	P	等位基因频率		χ^2	P
		CC	CT	TT			C	T		
rs1962		CC	CT	TT			C	T		
欧洲人	226	16	80	130	3.512	0.170	112	340	2.826	0.093
北京人	86	10	26	50	2.916	0.233	46	126	3.320	0.068
日本人	172	6	40	126	1.754	0.409	52	292	1.874	0.171
非洲人	226	28	116	82	32.400	<0.001	172	280	27.278	<0.001
广西人	132	8	35	89	—	—	51	213	—	—
rs3176123		GG	GT	TT			G	T		
欧洲人	226	154	64	8	132.608	<0.001	372	80	169.221	<0.001
北京人	86	46	40	0	67.640	<0.001	132	40	75.815	<0.001
日本人	172	94	68	10	85.102	<0.001	256	88	99.059	<0.001
非洲人	120	120	0	0	232.141	<0.001	240	0	241.587	<0.001
广西人	132	18	54	60	—	—	90	174	—	—
rs6082986		GG	GA	AA			G	A		
欧洲人	226	88	88	50	73.130	<0.001	264	188	91.334	<0.001
北京人	86	44	38	4	93.688	<0.001	126	46	114.120	<0.001
日本人	172	96	62	14	123.289	<0.001	254	90	163.177	<0.001
非洲人	226	28	116	82	32.400	<0.001	172	280	27.278	<0.001
广西人	132	6	45	81	—	—	57	207	—	—
rs1042580		CC	CT	TT			C	T		
欧洲人	224	94	92	38	108.252	<0.001	280	168	133.632	<0.001
北京人	86	52	28	6	106.794	<0.001	132	40	149.510	<0.001
日本人	170	110	46	14	148.776	<0.001	266	74	217.380	<0.001
非洲人	226	148	68	10	195.248	<0.001	364	88	268.186	<0.001
广西人	132	6	35	91	—	—	47	217	—	—

注:广西人 TM 基因 rs1962C/T 与非洲人相比, $P<0.05$;广西人 TM 基因 rs3176123G/T、rs6082986G/A 以及 rs1042580C/T 与欧洲人、北京人、日本人以及非洲人相比, $P<0.05$

2.4 脓毒症患者血栓调节蛋白基因多态性的分布特点 脓毒症患者 TM 基因 rs13306848C/T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A、

rs1042580C/T 以及 rs1042579G/A 7 个位点基因型及等位基因频率的分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,样本具有群体代表性。

2.5 脓毒症组与对照组基因型分布的比较 比较分析 172 例脓毒症患者与 132 例对照组的 7 个 SNP 位点的基因型频率和等位基因频率分布,结果显示 rs1042580C/T 在两组间的基因型频率差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2,而两组间等位基因频率差异

无统计学意义($P > 0.05$),见表 2,其余的 rs13306848 C/T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A 以及 rs1042579G/A 位点的基因型频率和等位基因分布,在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 脓毒症组与对照组 TM 基因型的比较

SNP	例数	基因型			χ^2	P	等位基因频率(%)		RO(CI 95%)	P	
rs13306848		CC	CT	TT			C	T			
	对照组	132	111	19	2	2.292	0.318	91.3	8.7	0.879(0.32~2.379)	1.000
	病例组	172	145	27	0			92.2	7.8		
rs1962		CC	CT	TT			C	T			
	对照组	132	8	35	89	3.878	0.140	19.3	80.7	1.231(0.59~2.560)	0.710
	病例组	172	3	49	120			6.0	84.0		
rs3176123		GG	GT	TT			G	T			
	对照组	132	18	54	60	0.051	0.974	32.6	67.4	0.915(0.50~1.642)	0.881
	病例组	172	25	70	77			34.9	65.1		
rs6082986		GG	GA	AA			G	A			
	对照组	132	6	45	81	2.809	0.257	21.6	78.4	0.893(0.46~1.727)	0.867
	病例组	172	5	74	93			24.4	75.6		
rs6113909		GG	GA	AA			G	A			
	对照组	132	36	68	28	0.741	0.686	53.0	47.0	1.083(0.62~1.887)	0.887
	病例组	172	40	96	36			51.2	48.8		
rs1042580		CC	CT	TT			C	T			
	对照组	132	6	35	91	7.953	0.016	17.8	82.2	0.818(0.54~1.231)	0.355
	病例组	172	2	68	102			20.9	79.1		
rs1042579		GG	GA	AA			G	A			
	对照组	132	63	53	16	0.056	0.973	67.8	32.2	1.047(0.57~1.892)	1.000
	病例组	172	80	70	22			66.9	33.1		

注:TM 基因 rs1042580 脓毒症与对照组比较,基因型 $P < 0.05$;等位基因频率 $P > 0.05$;其余位点差异均无统计学意义

3 讨论

TM 是血管内皮细胞膜上的凝血酶受体之一,是内皮细胞损伤的标志物,通过与凝血酶结合和激活蛋白 C 系统发挥抗凝作用。TM 与凝血酶结合,使凝血酶失活,当内皮细胞损伤后,TM 大量释放到外周血中^[1]。研究表明,TM 的多态性与多种疾病有关:TM 的 rs1962、rs1042579 和 rs1042580 基因位点可预测激素耐药的移植物抗宿主病患者的非复发性死亡率^[4];rs1042580 与机械性心脏瓣膜置换术后华法林抗凝治疗出血的并发症有关^[5];TM 的 1418t 等位基因频率的高表达能减低深部静脉血栓的发生率^[6];rs13306848 和 rs1042579 与心肌梗死、冠心病等相关^[7-10];而 rs1042579 的基因型与脑卒中有联系等等^[11]。对于 TM 基因多态性与脓毒症的关系,目前研究不多,输注重组人血栓调节蛋白能有效减轻脓毒症

并发弥漫性血管内凝血引起的器官功能失调,降低死亡率^[3]。

本研究检测了 TM 基因 rs13306848C/T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A、rs1042580C/T 以及 rs1042579G/A 基因多态性的分布情况,研究设置的脓毒症组和对照组,其基因型及等位基因频率的分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,样本具有群体代表性。健康广西人群的 rs1962C/T 的多态性分布与非洲人相比差异有统计学意义;rs3176123G/T、rs6082986G/A 以及 rs1042580C/T 的基因多态性与欧洲人、北京人、日本人和非洲人相比差异有统计学意义(见表 1)。

在脓毒症组和对照组两组之间的比较分析显示,脓毒症组 rs1042580C/T 位点的基因型频率分布 CT 和 TT 均高于对照组,基因型频率之间差异有统计学

意义,但等位基因频率差异无统计学意义($OR = 0.818, 95\% CI = 0.54 \sim 1.231, P > 0.05$),见表 2。其余 6 个位点 rs13306848C/T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A 以及 rs1042579G/A 的基因型频率和等位基因分布,在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。结果提示,rs1042580C/T 基因位点的基因型频率与脓毒症易感性有关,其等位基因风险评估与脓毒症无关,而其它 6 个 rs13306848C/T、rs1962C/T、rs3176123G/T、rs6082986G/A、rs6113909G/A 以及 rs1042579G/A 位点的基因型频率和等位基因分布与脓毒症易感性无关。

综上所述, TM 基因在不同地区、种族人群之间的基因型及等位基因分布存在差异; TM 的 rs1042580C/T 基因位点的基因型频率与脓毒症易感性有关。

参考文献:

- [1] Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation [J]. *Critical care medicine*, 2010, 38(2 Suppl): S26-34.
- [2] Li YH, Chung HC, Luo CY, et al. Thrombomodulin is upregulated in cardiomyocytes during cardiac hypertrophy and prevents the progression of contractile dysfunction [J]. *Journal of cardiac failure*, 2010, 16(12): 980-990.
- [3] Ogawa Y, Yamakawa K, Ogura H, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin improves mortality and respiratory dysfunction in patients with severe sepsis [J]. *The journal of trauma and acute care surgery*, 2012, 72(5): 1150-1157.
- [4] Rachakonda SP, Penack O, Dietrich S, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms Within the Thrombomodulin Gene (TM) Predict Mortality in Patients With Graft-Versus-Host Disease [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2014, 32(30): 3421-3427.
- [5] An SH, Lee KE, Chang BC, et al. Association of gene polymorphisms with the risk of warfarin bleeding compli-

cations at therapeutic INR in patients with mechanical cardiac valves [J]. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 2014, 39(3): 314-318.

- [6] Navarro S, Medina P, Bonet E, et al. Association of the thrombomodulin gene c. 1418C>T polymorphism with thrombomodulin levels and with venous thrombosis risk [J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2013, 33(6): 1435-1440.
- [7] Wang H, Dong P. Thrombomodulin - 33G/A and Ala455Val polymorphisms are associated with the risk of coronary artery disease: a meta-analysis including 12 584 patients [J]. *Coronary artery disease*, 2015, 26(1): 72-77.
- [8] Guella I, Duga S, Ardissino D, et al. Common variants in the haemostatic gene pathway contribute to risk of early-onset myocardial infarction in the Italian population [J]. *Thrombosis and haemostasis*, 2011, 106(4): 655-664.
- [9] Dogra R, Das R, Ahluwalia J, et al. Association of thrombomodulin gene polymorphisms and plasma thrombomodulin levels with acute myocardial infarction in north Indian patients [J]. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2013, 19(6): 637-643.
- [10] Shah SA, Ashavaid TF, Mankeshwar R, et al. Role of thrombomodulin gene in Indian population with coronary artery disease [J]. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 2012, 17(7): 610-617.
- [11] Cole JW, Roberts SC, Gallagher M, et al. Thrombomodulin Ala455Val Polymorphism and the risk of cerebral infarction in a biracial population: the Stroke Prevention in Young Women Study [J]. *BMC neurology*, 2004, 4(1): 21.

收稿日期: 2016-02-26