

## RAGE 基因多态性与脓毒症易感性研究<sup>①</sup>

彭丁伟<sup>1,5</sup>, 覃月秋<sup>2</sup>, 黄冰<sup>1</sup>, 黄雨晴<sup>3</sup>, 梁燕冰<sup>3</sup>, 李军<sup>4</sup>, 韦叶生<sup>5</sup>, 黄莹<sup>3</sup>, 廖品琥<sup>3,4</sup>②

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院麻醉科, 广西 南宁 530021 E-mail: pengdw2009@163.com;

2. 右江民族医学院附属医院消化科, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院附属医院呼吸内科, 广西 百色 533000;

4. 右江民族医学院附属医院重症医学科, 广西 百色 533000;

5. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西 百色 533000)

**摘要:** **目的** 研究脓毒症患者与健康人晚期糖基化终末产物受体(RAGE)多态性分布规律,并探讨与脓毒症的关系。**方法** 选择 152 例脓毒症患者(脓毒症组)及 189 例健康体检者(对照组)作为研究对象。应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术对 RAGE 基因 rs9469089、rs2070600、rs184003、rs2071288 多态位点进行检测,并应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测两组受试者血浆内皮素 1(ET-1)水平,比较两组 RAGE 基因位点多态性分布规律,探讨其与脓毒症之间的关系。**结果** 脓毒症组患者血浆 ET-1 水平显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。脓毒症组与对照组 RAGE rs9469089、rs2070600、rs184003、rs2071288 多态性位点的等位基因及基因型分布频率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 脓毒症患者血浆 ET-1 表达水平显著升高,所检测的 RAGE 基因多态性与脓毒症的易感性无相关。

**关键词:** 脓毒症;RAGE;基因多态性;ET-1

**中图分类号:** R394.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-5817(2017)01-0001-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.01.001

## RAGE gene polymorphism and the susceptibility to sepsis

Peng Dingwei<sup>1,5</sup>, Qin Yueqiu<sup>2</sup>, Huang Bing<sup>1</sup>, Huang Yuqing<sup>3</sup>, Liang Yanbing<sup>3</sup>,  
Li Jun<sup>4</sup>, Wei Yesheng<sup>5</sup>, Huang Ying<sup>3</sup>, Liao Pinhu<sup>3,4</sup>

(1. Department of Anesthesia, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China E-mail: pengdw2009@163.com; 2. Gastroenterology Department, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 3. Respiratory Department, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000 Guangxi, China; 4. Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000 Guangxi, China; 5. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To study the polymorphism distribution of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in patients with sepsis and in healthy people, and to explore the possible relationship between the polymorphism of the receptor and the sepsis. **Methods** A total of 152 cases of sepsis (sepsis group) and 189 cases of healthy subjects (control group) were selected in this study. The RAGE gene polymor-

① **基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81560321);2014 年广西医学高层次骨干人才培养“139”计划培养人选项目;广西高校急重症分子免疫研究重点实验室项目(kfkt20160061)

② **通信作者,**E-mail:liao pinhu@163.com

phisms of loci rs9469089, rs2070600, rs184003 and rs2071288 were detected by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The levels of plasma endothelin-1 (ET-1) in the two groups were measured by ELISA. The distribution of RAGE gene polymorphism was compared between the two groups and the relationship between the RAGE gene polymorphism and sepsis was analyzed.

**Results** Plasma ET-1 levels in sepsis group were significantly higher than those in control group, and there was statistical difference ( $P < 0.05$ ). The allele frequency and genotype frequency of RAGE rs9469089, rs2070600, rs184003, and rs2071288 polymorphism were not significantly different between the sepsis group and the control group, and there was no statistical difference ( $P > 0.05$ ). Conclusion Serum ET-1 levels are higher in patients with sepsis. RAGE gene polymorphism may not be associated with the susceptibility to sepsis.

**Key words:** sepsis; RAGE; ET-1; gene polymorphism

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),易进展为严重脓毒症、脓毒性休克及多器官功能障碍综合征,临床发病率和病死率高<sup>[1]</sup>。研究表明糖基化终末产物受体(the receptor of advanced glycation endproducts, RAGE)及其下游表达产物内皮素1(endothelin-1, ET-1)参与了炎症疾病及脓毒症的病理生理过程<sup>[2-4]</sup>。RAGE基因多态性广泛参与炎症、免疫和凝血过程,和人群脓毒症的易感性及预后相关<sup>[5]</sup>。本文研究脓症患者与健康体检者RAGE基因外显子多态性分布规律和ET-1表达水平,并探讨其与脓毒症之间的关系。

## 1 对象与方法

1.1 实验对象 按照脓毒症诊断标准<sup>[6]</sup>,选取2014年7月—2016年7月右江民族医学院附属医院收治的脓症患者共152例作为脓毒症组,男性100例,女性52例,平均年龄(55.92±16.27)岁,排除标准为:①年龄<18岁或>80岁;②心脏停搏者;③有急诊手术者;④无或不愿接受中心静脉置管者,或有置管禁忌者。另随机选取同期无亲缘关系的体检健康(临床和实验室检查指标均在正常范围内)人群189例作为对照组(男性127例,女性62例;平均年龄(54.12±5.87)岁。研究严格按照医学伦理学要求,征得患者及

其家属同意,并签署知情同意书。

## 1.2 实验方法

1.2.1 ET-1检测 分别收集正常体检人群和入住ICU 24 h内的脓毒症患者的6 ml静脉血,离心取上层血浆,根据试剂盒使用说明书(E-EL-H0064c,伊莱瑞特生物科技有限公司),检测对照组及脓毒症组所有人群血浆ET-1水平。

## 1.2.2 多态性分析

1.2.2.1 人外周血DNA提取 用EDTA-K2抗凝采血管分别收集正常体检人群和入住ICU 24 h内的脓毒症患者的2 ml静脉血,使用离心柱法(血液基因组柱式提取试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司)提取DNA, DNA质检合格后,置于-80℃冰箱保存备用。

1.2.2.2 PCR扩增反应 根据SNP位点序列信息,使用美国Sequenom公司的引物设计软件Assay design 3.1设计PCR反应和单碱基扩展引物(见表1)。由北京六合华大基因科技有限公司用美国Sequenom公司基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术的Mass-ARRAY系统完成分析。产物保存在4℃。

表1 RAGE基因基因位点引物序列

SNP	反向PCR引物序列	正向PCR引物序列
rs9469089G/C	ACGTTGGATGCTCACATTGTCTGCCACTC	ACGTTGGATGAAGGTCTTAGGAACCCAGGAG
rs2070600T/C	ACGTTGGATGACAGTGTGGCTCGTGTCTCTT	ACGTTGGATGCACCCGAAAATCCCTCATC
rs184003C/A	ACGTTGGATGTGAAGGATGTGAGTGACCTG	ACGTTGGATGTTTCCCTCGTTAGCCCTCTG
rs2071288C/T	ACGTTGGATGCTAGAGTTCCAGCCCTGAT	ACGTTGGATGAAAGGAATGGTGAGTGGTGG

1.2.2.3 碱性磷酸酶去磷酸化 在PCR反应结束后,将PCR产物用虾碱性磷酸酶(SAP)处理后,4℃保

存。

1.2.2.4 单碱基延伸反应 在碱性磷酸酶处理结束后,进行单碱基延伸反应,反应体系总体积 9 μL,其中 SAP+PCR 反应物 7 μL,Extend Mix 反应组分 2 μL。

1.2.2.5 MALDI-TOF-MS 质谱检测 使用 Mas-sARRAY Nanodispenser RS 1000 点样仪将树脂纯化后的延伸产物移至 384-well SpectroCHIP bioarray 上,然后使用 MALDI-TOF 质谱仪分析。最终结果用 TYPER 4.0 软件获取原始数据及基因分型结果。

1.3 统计学方法 数据分析应用 SPSS 21.0 统计软件包进行,Hardy-Weinberg 平衡检验用 HaploView 4.0 软件完成。组间的基因型及等位基因型频率比较采用 R×C 表的  $\chi^2$  检验或按 Fisher's 确切概率法。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析检验计量资料的显著性,方差不齐时采用非参数的秩和检验。相对风险度用比值比(OR)和 95%的可信区间(95% CI)表示。所有统计检验均为双侧概率, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料 两组性别构成及年龄差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。脓毒症组疾病感染部位常见有肺部、腹部、泌尿、血液、四肢等,其中脓毒症有 11 例,严重脓毒症有 38 例、脓毒症休克有 103 例,见表 2。

表 2 病人基本资料

项目	病例组	对照组	P
	(n = 152)	(n = 189)	
年龄(岁)	55.92 ± 16.27	54.13 ± 5.87	0.176
男	100	127	0.784
女	52	62	
感染部位			
肺部	88	0	
腹部	36	0	
泌尿	9	0	
血液	4	0	
四肢	6	0	
未知	17	0	
脓毒症	11		
严重脓毒症	38		
脓毒症休克	103		

2.2 血浆 ET-1 水平 脓症患者组血浆 ET-1 水平[中位数 7.69 pg/ml,四分位间距(3.40~24.12) pg/ml]显著高于对照组[(中位数 3.69 pg/ml,四分位间距(2.41~5.38) pg/ml)],差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

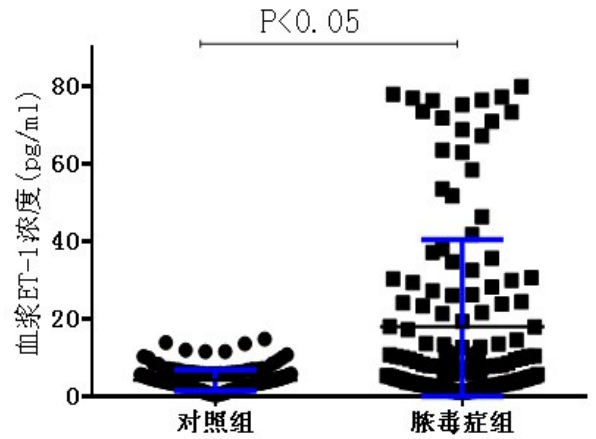


图 1 对照组与脓毒症组血浆 ET-1 浓度对比

2.3 RAGE 基因位点扩增产物测序结果分析 根据测序结果证实,RAGE 基因 rs9469089 存在 GG、GC 及 CC 三种基因型,其三种基因型 GG、GC、CC 及两种等位基因 G、C 在 152 例脓症患者中分布频率分别为 88.16% (男 65.67%、女 34.33%)、10.53% (男 56.25%、女 43.75%)、1.32% (男 0、女 100%)、93.42% (男 65.14%、女 34.86%)、6.58% (男 45.00%、女 55.00%);其在 189 例健康对照组中分布频率分别为 87.83% (男 66.87%、女 33.13%)、12.17% (男 73.91%、女 26.09%)、0、93.92% (男 67.32%、女 32.68%)、6.08% (男 73.91%、女 26.08%)。RAGE rs2070600 存在 TT、TC 和 CC 基因型,rs184003 存在 CC、CA 及 AA 基因型,rs2071288 则有 CC、CT 和 TT 三种基因型。两组实验对象基因型分布符合哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg)遗传平衡定律(见表 3),实验样本具有群体代表性。

表 3 广西人群 RAGE 相关基因位点基因型

组别	Hardy-Weinberg 平衡检验						$\chi^2$	P
	实际例数 基因型			H-W 平衡例数 基因型				
rs9469089G/C	CC	CG	GG	CC	CG	GG	0.793	0.373
	对照组	0	23	166	0.7	21.6		
脓毒症组	2	16	134	0.7	18.7	132.7	3.137	0.0765
rs2070600C/T	TT	TC	CC	TT	TC	CC	0.054	0.816
	对照组	7	56	125	6.5	57.0		
脓毒症组	9	51	91	7.7	53.5	92.7	0.347	0.556
rs184003C/A	AA	AC	CC	AA	AC	CC	0.840	0.359
	对照组	7	49	133	5.3	52.5		
脓毒症组	4	39	109	3.6	39.7	108.6	0.0518	0.820
rs2071288C/T	TT	TC	CC	TT	TC	CC	0.288	0.591
	对照组	1	33	155	1.6	31.8		
脓毒症组	1	17	134	0.6	17.8	133.6	0.316	0.574

2.4 RAGE 基因多态性与脓毒症易感性分析 脓毒

症患者与对照者的 RAGE 在 rs9469089 (G/C)、rs2070600(C/T)、rs184003(C/A)、rs2071288(C/T)位点基因型和等位基因分布频率比较差异无统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ ), 见表 4。

表 4 脓毒症组和对照组 RAGE 四个位点基因型与等位基因的比较 ( $n$ )

SNPs	对 照组	脓毒 症组	$\chi^2$	$P$	OR (95% CI)
rs9469089(G/C)基因型					
CC	0	2			
CG	23	16	0.009	0.926	
GG	166	134			
等位基因					
C	23	20	0.697	0.792	1.087(0.585~2.019)
G	355	284			1
rs2070600(C/T)基因型					
TT	7	9			
TC	56	51	1.819	0.403	
CC	125	91			
等位基因					
T	70	69	1.839	0.176	1.295(0.891~1.881)
C	306	233			1
rs184003(C/A)基因型					
AA	7	4			
AC	49	39	0.324	0.951	
CC	133	109			
等位基因					
A	63	47	0.181	0.670	0.914(0.606~1.381)
C	315	257			1
Rs2071288(C/T)基因型					
TT	1	1			
TC	33	17	2.663	0.264	
CC	155	134			
等位基因					
A	35	19	2.093	0.148	0.653(0.366~1.167)
C	343	285			1

2.5 脓毒症组 RAGE 各位点与血浆 ET-1 的相关性  
脓毒症组血浆 ET-1 水平较对照组高, 但 RAGE 各位点的基因型及等位基因型的 ET-1 表达水平无差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

RAGE 是免疫球蛋白超家族多配体受体, 广泛分布于单核-巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞、平滑肌细胞、肾小球系膜细胞、肿瘤细胞、星形胶质细胞等细胞表面<sup>[7]</sup>, 通过与高迁移率蛋白超家族球蛋白 1、 $\beta$  淀粉样肽、钙结合蛋白 S100 及晚期糖基化终末产物等配体结合<sup>[8]</sup>, 激活 MAPK 等细胞信号转导通路<sup>[9-10]</sup>, 影响炎症性基因的表达而促进炎症的发生发展<sup>[11-13]</sup>。RAGE 编码基因位于 6 号染色体上, 包含 11 个外显子和 10 个较短的内含子。其外显子序列存在单核苷酸多态性

(SNP), 且可能影响血清中 RAGE、IL-6、ET-1 等炎症因子水平<sup>[14]</sup>, 影响疾病的发展过程, 研究发现 RAGE 基因多态性变化与乳腺癌<sup>[15]</sup>、缺血性脑卒中<sup>[16]</sup>、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)<sup>[17]</sup>、糖尿病<sup>[18]</sup>、溃疡性结肠炎<sup>[19]</sup>、脓毒症<sup>[14]</sup> 等疾病易感性相关。

RAGE 作为脓毒症的生物学标志物, 其血清可溶性 RAGE (sRAGE) 浓度与脓毒症的发展及 DIC 的进展有关, 可能通过 RAGE/HMGB1 轴介导中性粒细胞坏死等, 参与脓毒症的炎症紊乱、凝血障碍及内皮细胞损伤等过程而发挥作用<sup>[20-22]</sup>。ET-1 作为一个 21 个氨基酸肽, 主要由血管内皮细胞分泌, 其具有强大的血管收缩活性, 参与了脓毒症的病理生理过程<sup>[23]</sup>。研究证实 RAGE 可通过 ERK1/2 - NF- $\kappa$ B 和 JNK - AP-1 通路促进人主动脉内皮细胞 ET-1 表达<sup>[12, 24]</sup>。

本研究发现, RAGE 基因的 rs9469089 (G/C)、rs2070600(C/T)、rs184003(C/A)、rs2071288(C/T) 四个位点都存在三种基因型及两个等位基因, 但两组之间的等位基因及基因型分布无差异, 提示 RAGE 基因多态性与脓毒症易感性可能无相关性, 研究结果与其他作者对 rs2070600 基因多态性改变与脓毒症发生发展无关的结论相似<sup>[14]</sup>。脓毒症患者的血浆 ET-1 浓度高于健康对照组, 可能与脓毒症患者的血管内皮细胞受损有关, 将 ET-1 血浆浓度与相应的基因型对比分析, 结果表明 RAGE 各位点的基因型及等位基因型的 ET-1 表达水平无差异。

研究发现脓症患者血浆 ET-1 表达水平显著升高, 所检测的 RAGE 基因多态性与脓毒症的易感性无相关。

### 参考文献:

- [1] Cheng B, Xie G, Yao S, et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospitals in China [J]. Crit Care Med, 2007, 35 (11): 2538-2546.
- [2] Ioannidou A, Goulielmaki E, Garinis GA. DNA Damage: From Chronic Inflammation to Age-Related Deterioration [J]. Front Genet, 2016, 7:187.
- [3] Chuah YK, Basir R, Talib H, et al. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases [J]. Int J Inflam, 2013, 2013:403460.
- [4] Hofer S, Uhle F, Fleming T, et al. RAGE-mediated inflammation in patients with septic shock [J]. J Surg Res, 2016, 202(2):315-327.
- [5] Wong HR. Genetics and genomics in pediatric septic shock [J]. Crit Care Med, 2012, 40(5):1618-1626.

- [6] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012[J]. Intensive Care Medicine, 2013, 39(2): 165-228.
- [7] van Zoelen MA, Achouiti A, van der Poll T. RAGE during infectious diseases[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2011, 3: 1119-1132.
- [8] Kwak T, Drews-Elger K, Ergonul A, et al. Targeting of RAGE-ligand signaling impairs breast cancer cell invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2016 Sep 26. Doi: 10. 1038/ onc.
- [9] Shekhtman A, Ramasamy R, Schmidt AM. Glycation & the RAGE axis: targeting signal transduction through DI-APH1[J]. Expert Rev Proteomics, 2017, 14(2): 147-156.
- [10] Chen J, Jing J, Yu S, et al. Advanced glycation end-products induce apoptosis of endothelial progenitor cells by activating receptor RAGE and NADPH oxidase/JNK signaling axis[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(5): 2169-2178.
- [11] Fuentes E, Rojas A, Palomo I. NF-kappaB signaling pathway as target for antiplatelet activity[J]. Blood Rev, 2016, 30(4): 309-315.
- [12] Adamopoulos C, Piperi C, Gargalionis AN, et al. Advanced glycation end products upregulate lysyl oxidase and endothelin-1 in human aortic endothelial cells via parallel activation of ERK1/2-NF-kB and JNK-AP-1 signaling pathways[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(8): 1685-1698.
- [13] Bierhaus A, Schiekofler S, Schwaninger M, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB[J]. Diabetes, 2001, 50(12): 2792-2808.
- [14] Shao Y, Shao X, He J, et al. The promoter polymorphisms of receptor for advanced glycation end products were associated with the susceptibility and progression of sepsis[J]. Clin Genet, 2016 May 12. doi: 10. 1111/cge. 12800.
- [15] Yue L, Zhang Q, He L, et al. Genetic predisposition of six well-defined polymorphisms in HMGB1/RAGE pathway to breast cancer in a large Han Chinese population [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(10): 1966-1973.
- [16] Liu W, Ge S, Liu Y, et al. Polymorphisms in three genes are associated with hemorrhagic stroke[J]. Brain and Behavior, 2015, 5(11): e00395.
- [17] Kerkhof M, Boezen HM, Granell R, et al. Transient early wheeze and lung function in early childhood associated with chronic obstructive pulmonary disease genes [J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(1): 68-76.
- [18] Franko B, Benhamou PY, Genty C, et al. RAGE and CYBA polymorphisms are associated with microalbuminuria and end-stage renal disease onset in a cohort of type 1 diabetes mellitus patients over a 20-year follow-up[J]. Acta Diabetol, 2016, 53(3): 469-475.
- [19] Wang J, Zeng J, Wang H, et al. Genetic polymorphisms of RAGE and risk of ulcerative colitis in a Chinese population[J]. Immunol Lett, 2016, 170: 88-94.
- [20] Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis[J]. J Clin Invest, 2015, 125(2): 539-550.
- [21] Matsumoto H, Matsumoto N, Ogura H, et al. The clinical significance of circulating soluble RAGE in patients with severe sepsis [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2015, 78(6): 1086-1093.
- [22] Narvaez-Rivera RM, Rendon A, Salinas-Carmona MC, et al. Soluble RAGE as a severity marker in community acquired pneumonia associated sepsis [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 15.
- [23] Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, et al. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity[J]. Nature, 2004, 432(7016): 512-516.
- [24] Chen D, Shan YX, Dai YT. Advanced glycation end products and their receptors elevate the activity of endothelin-1 in rat cavernosum[J]. Zhonghua Nan Ke Xue, 2008, 14(2): 110-115.

收稿日期: 2017-02-25