

• 论 著 •

SAA 水平及其基因多态性分析在川崎病中的临床研究价值^{*}张 娟, 陈 颖, 易秀英, 刘 飞, 李 红, 姚永明, 纪 青[△]

(株洲市中心医院儿科, 湖南株洲 412000)

摘要: 目的 探讨血清淀粉样蛋白 A (SAA) 水平在川崎病 (KD) 患儿中的变化及临床意义, SAA1rs12218、SAA2rs2468844 基因多态性与 KD 易感性之间的关系。**方法** 选取 90 例 KD 患儿作为 KD 组, 选取同期 100 例健康儿童作为对照组, 利用散射免疫比浊法检测 SAA 水平; 采用基于聚合酶链式反应 (PCR) 的序列分型方法对两种单核苷酸多态性 SAA1rs12218 和 SAA2rs2468844 进行分析。**结果** KD 组 SAA 水平较对照组明显升高, 经治疗后 SAA 水平明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SAA1rs12218、SAA2rs2468844 位点 TT、TC、CC 基因型分布和 T、C 等位基因分布在 KD 组与对照组、KD-CAL 组与 KD-NCAL 组之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** SAA 水平可能有助于监测 KD 病程; 尚未发现 SAA1rs12218、SAA2rs2468844 位点多态性与 KD 及其冠脉损伤的发生存在关联性。

关键词: 血清淀粉样蛋白 A; 川崎病; 基因多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.24.009

中图法分类号: R446.6

文章编号: 1673-4130(2020)24-2978-04

文献标识码: A

The clinical value of SAA level and its polymorphism analysis in Kawasaki disease^{*}

ZHANG Juan, CHEN Ying, YI Xiuying, LIU Fei, LI Hong, YAO Yongming, JI Qing[△]

(Department of Pediatrics, Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou, Hunan 412000, China)

Abstract: Objective To investigate the changes and clinical significance of serum amyloid A (SAA) level in children with Kawasaki disease (KD), and to investigate the association between the polymorphisms of SAA1rs12218 and SAA2rs2468844 gene and KD susceptibility. **Methods** A total of 90 KD children were selected as KD group, and 100 healthy children were taken as control group, the level of SAA was measured by scatter immunoturbidimetry. Two single nucleotide polymorphisms SAA1rs12218 and SAA2rs2468844 were detected by polymerase chain reaction sequence-based typing (PCR). **Results** SAA level in KD group significantly increased compared with that in control group, and SAA level significantly decreased after treatment, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). There was no statistical difference in the distribution of the locus SAA1rs12218 and SAA2rs2468844 genotype TT, TC and CC and allele T and C between KD group and control group, and between KD-CAL group and KD-NCAL group ($P > 0.05$). **Conclusion** SAA level may help to monitor KD course. No association was found between loci SAA1rs12218 and SAA2rs2468844 polymorphism of SAA gene and the risk of KD or its complication of coronary artery lesion.

Key words: serum amyloid A; Kawasaki disease; gene polymorphism

川崎病 (KD) 也称黏膜皮肤淋巴结综合征, 其主要临床症状为持续性高热、口腔黏膜炎、结膜充血、手足硬性肿胀、多形性皮疹和非化脓性淋巴结肿大、手足蜕皮等^[1]。KD 是一种多系统血管炎, 可以导致冠状动脉病变^[2], KD 在低龄儿童中更为常见, 大多数的 KD 发生在 5 岁以下, 男性与女性的比例约为 1.5 : 1.0^[3]。KD 的病因尚不明确, 随着分子遗传学的发展, 许多研究集中于基因多态性与 KD 之间的关

系。血清淀粉样蛋白 A (SAA) 是一种急性期蛋白和炎症标志物, 在急性期早期, 免疫系统被激活, 由此异常活化的 T 淋巴细胞释放大量的炎性介质和细胞因子刺激肝脏合成 SAA。SAA 长期以来被认为是类风湿关节炎临床进展和预后的预测因子, 也是冠状动脉疾病、心血管疾病预后和急性冠脉综合征早期死亡的预测因子^[4]。在缺血性心脏病患者中, SAA 水平明显升高, 而扩张型心肌病患者中 SAA 水平升高程度不

* 基金项目: 湖南省自然科学基金省市联合基金项目(2019JJ60091)。

△ 通信作者, E-mail: 1356159350@qq.com。

本文引用格式: 张娟, 陈颖, 易秀英, 等. SAA 水平及其基因多态性分析在川崎病中的临床研究价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(24): 2978-2981.

及缺血性心肌病患者^[5]。近年来关于 SAA 在心血管疾病中的研究发现, SAA 也可能作为大动脉炎的生物标志物^[6-7]。本次研究旨在阐述 KD 中 SAA 水平变化, 以及对 SAA 基因多态性与 KD 易感性及 KD 冠状动脉损伤之间的关联进行研究, 了解 SAA 在 KD 发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016—2019 年在株洲市中心医院住院的 90 例汉族 KD 患儿作为 KD 组, 其中男 58 例, 女 32 例, 男女比例为 1.8:1.0, 年龄为 6 月至 5 岁, 平均年龄为 2.75 岁, 所有患儿在采血前没有经过人免疫球蛋白(IVIG)及阿司匹林治疗; 均符合 KD 诊断标准^[8]。为进一步探究 SAA 基因多态性与 KD 冠状动脉损伤之间的关系, 将 KD 组按照有无冠状动脉损伤分为 KD 合并冠状动脉损伤(KD-CAL 组)和 KD 无冠状动脉损伤(KD-NCAL 组)。冠状动脉损伤的诊断标准: 左冠状动脉或右冠状动脉的内腔直径 > 3 mm(5 岁以下儿童), > 4 mm(5 岁及以上儿童), 或一段冠状动脉内径至少是相邻冠状动脉的 1.5 倍或冠状腔明显不规则。选取 100 例健康儿童作为对照组, 无心血管疾病及既往无 KD 病史, 其中男 63 例, 女 37 例, 男女比例为 1.7:1.0, 年龄为 6 月至 5 岁, 平均年龄为 3.48 岁, 对照组及 KD 组性别比例比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.043, P = 0.836$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 SAA 检验方法 采用深圳市国赛生物技术有限公司提供的 SAA 定量试剂盒(散射免疫比浊法)测定 SAA 水平(>10 mg/L 为异常), 按试剂说明进行操作; KD 患儿入院后, 在使用 IVIG 及阿司匹林前后分别空腹采集静脉血 2 mL, 对照组儿童空腹采取静脉血 2 mL, 分次检验。

1.2.2 DNA 提取和基因多态性检测 应用 Promega DNA 提取试剂盒, 提取血液 DNA, 按照说明书进行操作。检测水平和纯度后置于 -20 °C 冰箱保存, 选择 SAA1 基因多态性位点 rs12218 和 SAA2 基因多态性位点 rs2468844 检测, 通过聚合酶链式反应(PCR)扩增基因, 使用引物的序列为 rs12218 上游引物: AGTGGATGGTAGGAGTGAGTGA, 下游引物: TACTTGTGGTATAGACTGCCTGT。rs2468844 上游引物: ATGCCATATCTCAGCTCTCTGGAC, 下游引物: GGAGGAGTGAAACACTGACCC(上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。PCR 的反应体系为 25 μL: T3 Super PCR 混合液 22 μL(北京擎科生物技术公司), 上游引物 1 μL(北京擎科生物技术公司), 下游引物 1 μL(北京擎科生物技术公司), DNA 1 μg。PCR 的反应条件如下, rs12218: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 61 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸

5 s, 35 个循环, 72 °C 终末延伸 2 min, 4 °C 保存。rs2468844: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 61 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 5 s, 35 个循环, 72 °C 终末延伸 2 min, 4 °C 保存。反应在 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司)上进行。扩增产物送到测序公司(上海铂尚生物技术有限公司)进行基因测序。测序结果在 Chromas 软件(澳大利亚 Technelysium 公司)中进行阅读分析。

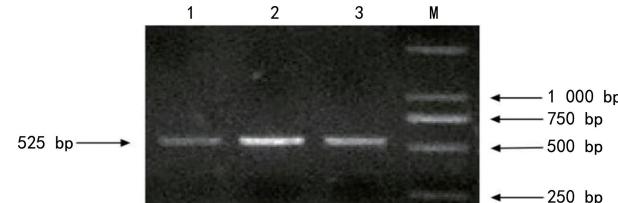
1.3 统计学处理 使用软件 SPSS18.0 进行数据处理及统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 计数资料以频数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 使用 1 个自由度的 χ^2 检验进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验各基因型频率的遗传平衡性, 双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KD 组临床资料 在 KD 组中, 发热 90 例(100.0%), 皮疹 68 例(75.6%), 球结膜充血 41 例(45.6%), 草莓舌 69 例(76.7%), 颈部非化脓性淋巴结肿大 70 例(77.8%), 手足硬肿 50 例(55.6%), 指端脱皮 61 例(67.8%), 肛周脱皮 50 例(55.6%), 冠脉损伤 25 例(27.8%)。

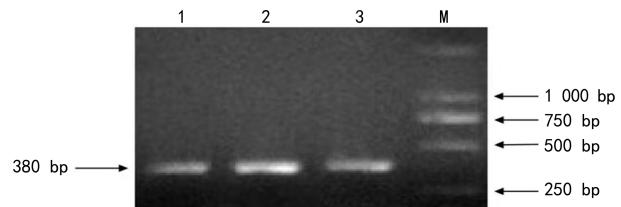
2.2 KD 组与对照组 SAA 水平比较 KD 患儿 SAA 水平治疗前为 (434.72 ± 168.50) mg/L, 治疗后为 (20.23 ± 7.11) mg/L, 差异有统计学意义($t = 9.548, P < 0.01$), 治疗前 KD 组与对照组 SAA 水平 $[(3.83 \pm 2.60)$ mg/L] 比较, 差异均有统计学意义($t = 9.619, P < 0.01$)。

2.3 SAA 基因 PCR 产物图 SAA1 基因 rs12218 位点的扩增产物片段为 525 bp, SAA2 基因 rs2468844 位点的扩增产物片段为 380 bp, 扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳分离, 见图 1、2。基因直接测序法测序结果见图 3、4。SAA1 基因 rs12218 位点的基因型和等位基因频率在对照组和 KD 组的分布经 Hardy-Weinberg 吻合度检测差异无统计学意义($\chi^2 = 1.66, 5.76, P > 0.05$)。SAA2 基因 rs2468844 位点的基因型和等位基因频率在对照组和 KD 组的分布经 Hardy-Weinberg 吻合度检测差异无统计学意义($\chi^2 = 0.15, 0.66, P > 0.05$)。结果与预期一致。



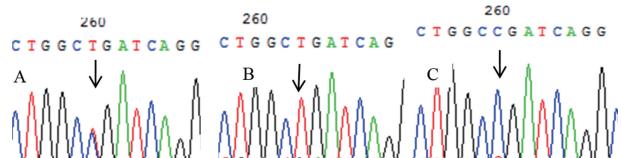
注: M 为 DNA Marker; 1、2、3 为 SAA1 基因位点 rs12218 PCR 产物。

图 1 SAA1 基因位点 rs12218 PCR 产物凝胶电泳



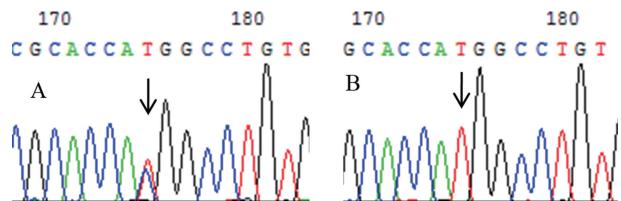
注:M 为 DNA Marker; 1、2、3 为 SAA2 基因位点 rs2468844 PCR 产物。

图 2 SAA2 基因位点 rs2468844 PCR 产物凝胶电泳



注:A 为 TC 基因型; B 为 TT 基因型; C 为 CC 基因型。

图 3 SAA1rs12218 位点基因测序图



注:A 为 TC 基因型; B 为 TT 基因型。

图 4 SAA2 rs2468844 位点基因测序图

2.4 SAA1rs12218 位点基因型及等位基因分布

SAA1rs12218 位点的 TT、TC、CC 基因型分布与 T、C 等位基因在 KD 组和对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。TT、TC、CC 基因型分布与 T、C 等位基因在 KD-CAL 组与 KD-NCAL 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 SAA1rs12218 基因型及等位基因分布与 KD 易感性的关系 (n)

组别	n	基因型			等位基因	
		TT	TC	CC	T	C
KD 组	90	43	42	5	128	52
对照组	100	47	50	3	144	56
χ^2		0.849			0.037	
P		0.654			0.848	
KD-CAL 组	20	9	8	3	26	14
KD-NCAL 组	70	34	34	2	102	38
χ^2		4.415			1.145	
P		0.110			0.285	

2.5 SAA2rs2468844 位点基因型及等位基因分布

SAA2rs2468844 位点的 TT、TC、CC 基因型分布与 T、C 等位基因在 KD 组和对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。TT、TC、CC 基因型分布与 T、C 等位基因在 KD-CAL 组与 KD-NCAL 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 SAA2rs2468844 基因型及等位基因分布与 KD 易感性的关系 (n)

组别	n	基因型			等位基因	
		TT	TC	CC	T	C
KD 组	90	83	7	0	173	7
对照组	100	85	15	0	185	15
χ^2			2.413		2.265	
P			0.120		0.132	
KD-CAL 组	12	8	4	0	20	4
KD-NCAL 组	78	67	11	0	145	11
χ^2			2.000		2.517	
P			0.096		0.113	

3 讨 论

KD 好发于 5 岁以内的幼儿, 是一种以全身性中、小血管炎为主要病变的急性发热出疹性疾病, 是儿童后天性心脏病最常见的病因之一^[9], 其发病机制及病因不明。

SAA 是一种急性时期蛋白, 在机体发生炎症时其水平快速上升, 是目前最敏感的炎症标志物之一, 近期研究发现 SAA 水平与冠心病、脑出血等心血管疾病的严重程度及其炎性反应呈正相关^[10-11]。高水平的 SAA 可能通过升高 C 反应蛋白(CRP)、纤维蛋白原、白细胞介素(IL)-6 水平或降低高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平在冠心病中发挥作用^[10]。许多炎性因子, 包括细胞因子、趋化因子、急性期反应物(如 CRP、SAA)在 KD 中明显升高, 提示 SAA 有可能参与了 KD 的发生机制^[12]。KD 患儿 SAA、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的改变与其出现血管炎性反应、冠状动脉损伤有关^[13]。本研究结果表明, SAA 水平在 KD 患儿急性期明显升高, 使用 IVIG 后水平迅速下降, KD 患儿 SAA 水平在使用 IVIG 前后均较对照组更高。由此可说明, SAA 可能参与了 KD 的发生过程, SAA 作为新的炎性因子, SAA 水平在 KD 治疗前后的变化, 提示炎症参与了 KD 病程, 与既往研究中 SAA 水平的监测有助于监测 KD 疾病评估疗效这一结论一致^[13-14], SAA 可能作为诊断 KD 的早期诊断指标。

KD 是一种可能与遗传易感有关的全身性血管炎综合征, 目前已有研究发现, 家族中既往亲属有 KD 病史的儿童 KD 患病率相应增加^[15]。SAA 可在单核/巨噬细胞、内皮细胞中诱导促炎和促血栓形成介质的表达, 并诱导内皮细胞功能障碍, 在动脉粥样硬化中 SAA 有促进炎症的作用^[16-17], 炎症早期 SAA 通过诱导基质金属蛋白酶导致斑块失稳, 促使血栓事件的发生; SAA 遗传基因多态性与心血管疾病相关, SAA 基因位点(SAA1rs12218)突变与冠心病及其预后结局相关^[18-19], SAA1rs12218 CC 基因型是脑梗死的独立

危险因素^[20]; SAA 基因多态性 (SAA1rs12218 及 SAA2rs2468844) 基因突变在心肌梗死、颈动脉内膜中层厚度 (IMT) 增厚等疾病中可能起到遗传学标志物的作用^[21], 而 SAA1rs12218 CC 基因使汉族冠心病的风险增加^[22]。本研究选择 SAA1rs12218 位点、SAA2rs2468844 位点, 探讨其多态性与 KD 及 KD 冠状动脉损伤的关系。

本研究结果显示, KD 患儿 SAA1rs12218 位点基因型分布与等位基因分布与健康儿童比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), SAA2rs2468844 位点基因型分布及等位基因分布与健康儿童相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), KD 无冠状动脉损伤患儿 SAA1rs12218、SAA2rs2468844 位点基因型分布及等位基因频率与 KD 合并冠状动脉损伤患儿比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此, 本研究尚未发现 SAA1rs12218、SAA2rs2468844 位点与 KD 及其冠状动脉损伤的发生存在相关性。

4 结 论

本研究通过监测 SAA 水平在 KD 病程的变化, 初步发现 SAA 水平可能有助于监测 KD 病程, 可能有助于 KD 的早期诊断。此外, 笔者发现 SAA 基因多态性 (SAA1rs12218 位点和 SAA2rs2468844 位点) 与 KD 遗传易感关联性不强, 也可能与本研究样本量不够大有关。因此, 仍然需要多个中心和大量样本研究, 以进一步揭示 SAA 基因多态性和 KD 之间的关系。

参考文献

- [1] KUO H C. Preventing coronary artery lesions in Kawasaki disease[J]. *Biomed J*, 2017, 40(3): 141-146.
- [2] NEWBURGER J W, TAKAHASHI M, BURNS J C. Kawasaki disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(14): 738-749.
- [3] AGARWAL S, AGRAWAL D K. Kawasaki disease: etiopathogenesis and novel treatment strategies[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(3): 247-258.
- [4] LAKOTA K, HROSOVAR D, OGRIC M, et al. Analysis of drug effects on primary human coronary artery endothelial cells activated by serum amyloid A[J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 8237209.
- [5] 吕亚辉, 李洁, 李莉, 等. 血清淀粉样蛋白 A 在缺血性及扩张型心肌病患者中的鉴别及临床意义[J]. 中国医药导刊, 2013, 15(6): 925-927.
- [6] NAIR M A, GOEL R, MINDHUMATI M, et al. Serum amyloid A as a marker of disease activity and treatment response in Takayasu arteritis[J]. *Rheumatol Int*, 2017, 37(10): 1643-1649.
- [7] LOPALCO G, LUCHERINI O M, VITALE A, et al. Putative role of serum amyloid-A and proinflammatory cytokines as biomarkers for behcet's disease[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(42): e1858.
- [8] BMCCRINDLE B W, ROWLEY A H, NEWBURGER J W, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the american heart association[J]. *Circulation*, 2017, 135(17): e927-e999.
- [9] XIE X, MA Y T, YANG Y N, et al. Genetic polymorphisms of serum amyloid A1 and coronary artery disease risk[J]. *Tissue Antigens*, 2015, 85(3): 168-176.
- [10] ZHOU J L, LU Y, WANG S F, et al. Association between serum amyloid A levels and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of 26 studies[J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(4): 331-345.
- [11] HUANGFU X Q, WANG L G, LE Z D, et al. Utility of serum amyloid A as a potential prognostic biomarker of acute primary basal ganglia hemorrhage[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 505(1): 43-48.
- [12] WHITIN J C, YU T T, BRUCE L X, et al. A novel truncated form of serum amyloid A in Kawasaki disease[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157024.
- [13] 杜佳, 周霖, 蒋瑾瑾. 川崎病患者治疗前后血清淀粉样蛋白和炎症因子变化及其相关性分析[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2019, 16(2): 11-14.
- [14] 陈灵红, 林红霞, 杨德华. 血清淀粉样蛋白 A 对川崎病诊断的临床应用价值[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(9): 770-773.
- [15] YOON K L. Update of genetic susceptibility in patients with Kawasaki disease[J]. *Korean J Pediatr*, 2015, 58(3): 84-88.
- [16] CHAMI B, NARRE N, CAI X, et al. Serum amyloid A receptor blockade and incorporation into high-density lipoprotein modulates its pro-inflammatory and pro-thrombotic activities on vascular endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 11101-11124.
- [17] 张璐璐, 刘芸, 段文冰, 等. 血清淀粉样蛋白 A 与冠心病的相关性研究[J]. 新医学, 2019, 50(1): 11-15.
- [18] 谢翔, 宋长来, 吴雪琴, 等. SAA 遗传多态性与冠心病临床预后的关联研究[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(1): 1-5.
- [19] ZHAO J, PIAO X, WU Y, et al. Association of SAA gene polymorphism with ischemic stroke in northern Chinese Han population[J]. *J Neurol Sci*, 2017, 380(4): 101-105.
- [20] ZHANG L J, YUAN B, LI H H, et al. Associations of genetic polymorphisms of SAA1 with cerebral infarction [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12(2): 130-134.
- [21] XIE X, MA Y T, YANG Y N, et al. Polymorphisms in the SAA1/2 gene are associated with carotid intima media thickness in healthy Han Chinese subjects: the cardiovascular risk survey[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13997.
- [22] XIE X, MA Y T, YANG Y N, et al. Association of genetic polymorphisms of SAA1 (rs12218) with myocardial infarction in a Chinese population [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 3693-3696.