

信号传导和转录激活子 4 基因多态性与中国汉族 人群扩张型心肌病的相关研究*

付 锴¹, 彭 瑛¹, 李娅姣¹, 谢 秋¹, 杨 浩¹, 周 斌², 饶 莉^{1△}

1. 四川大学华西医院 心内科 (成都 610041); 2. 四川大学 分子与转化医学实验室 (成都 610041)

【摘要】 目的 研究信号传导和转录激活子 4 基因(STAT4)单核苷酸多态性与中国汉族人群扩张型心肌病(DCM)的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法,对 294 例 DCM 患者和 334 例正常对照者中 STAT4 基因 rs7574865、rs11889341 位点进行群体遗传学研究,分析 STAT4 基因两 SNP 位点在两组样本间基因型频率、等位基因频率分布,探讨 STAT4 基因多态性是否与 DCM 发病相关。**结果** STAT4 基因 rs11889341 位点 GG 基因型频率和 G 等位基因频率在 DCM 组患者中较高,与正常对照组相比差异有统计学意义(分别为 55.8% vs. 47.9%, $P=0.039$ 和 76.4% vs. 70.7%, $P=0.023$, $OR=1.341$, 95% CI 为 1.042~1.727)。rs7574865 位点 CC+AC 基因型频率在 DCM 组患者中较高,与正常对照组相比差异有统计学意义(94.2% vs. 89.2%, $P=0.025$, $OR=1.968$, 95% CI 为 1.081~3.585),该位点的等位基因频率分布在 DCM 组与对照组之间差异无统计学意义。**结论** 本研究首次证明 STAT4 基因单核苷酸多态性与 DCM 相关,STAT4 基因 rs11889341 位点 GG 基因型和 G 等位基因及 rs7574865 位点 CC+AC 基因型可能会增加 DCM 发生的危险性。

【关键词】 扩张型心肌病 信号传导和转录激活子 4 单核苷酸多态性

Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Gene Polymorphisms Associated with Dilated Cardiomyopathy in Chinese Han Population FU Kai¹, PENG Ying¹, LI Ya-jiao¹, XIE Qiu¹, YANG Hao¹, ZHOU Bin², RAO Li^{1△}. 1. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Molecular Translational Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lrlz1989@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the association between signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) gene polymorphism and dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods** Two single nucleotide polymorphisms (SNP) (rs7574865 and rs11889341) in STAT4 gene were determined using PCR-RFLP method. The genotype and allele frequencies of these two SNPs were compared between 294 DCM patients and 334 normal controls to test whether SNPs in STAT4 was associated with DCM. **Results** Compared to healthy controls, the frequency of GG genotype (55.8% in patients vs. 47.9% in controls, $P=0.039$) and the G allele in rs11889341 (76.4% in patients vs. 70.7% in controls, $P=0.023$) were significantly increased in DCM patients. We found that increased DCM risk is associated with CC+AC genotypes of rs7574865 (94.2% in patients vs. 89.2% in controls, $P=0.025$). No significant difference was observed in the distribution of allele frequency in rs7874865 between DCM patients and the controls. **Conclusion** SNPs in STAT4 gene is associated with DCM. G allele and GG genotype in rs11889341, and CC+AC genotypes in rs7574865, may be associated with significantly increased risk of DCM.

【Key words】 Dilated cardiomyopathy Signal transducer and activator of transcription 4 Polymorphis

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一组以左心室和(或)右心室扩大,伴收缩功能障碍为特征的原因不明性心肌疾病,是心血管疾病中导致心力衰竭、猝死和心脏移植的第三大基础疾病。

目前仍缺乏特异性治疗,DCM 患者一经确诊后的 5 年生存率仅 50%^[1]。因此,DCM 的早期诊断对改善其预后具有重要意义。DCM 的发病机制尚未完全阐明,目前认为遗传因素、病毒感染、自身免疫等可能与 DCM 的发病相关^[2]。近年来的研究发现,自身免疫机制异常导致的心肌组织损伤,尤其是 T 淋巴细胞活化为中心的过度细胞免疫导致的弥漫性心肌细胞受损在 DCM 的发生中起重要作用^[3]。

信号转导和转录激活子 4 (signal transducer

* 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20110181110011)和四川省国际合作与交流项目(No. 2012HH0032)资助

△ 通讯作者, E-mail: lrlz1989@163.com

and activator of transcription 4, STAT4)是 STAT 家族成员之一,主要参与了致炎因子如白介素(IL)-12,-15,-23 和干扰素(IFN- I)等的胞内信号传导,介导辅助性 T 细胞(T helper cell, Th)的活化增殖,并诱导其向参与慢性炎症的 Th1 细胞和 Th17 细胞方向分化^[4]。研究显示,STAT4 基因的突变或多态性位点与 T 细胞介导的多种自身免疫性疾病的发生密切相关^[4-7]。

迄今为止,尚未见 STAT 4 基因多态性和 DCM 的相关研究报道。本研究旨在通过对中国 DCM 患者与正常对照者中 STAT 4 基因上两个 SNP 位点(rs7574865,rs11889341)的群体遗传学研究,探讨 STAT 4 基因与 DCM 发生发展的相关性,为 DCM 病因以及发病机制的深入研究提供理论与实验依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2002 年 10 月至 2012 年 8 月期间经四川大学华西医院诊断的汉族人群 DCM 患者 294 例,诊断依据为 2002 年 10 月至 2007 年 1 月采用 1995 年世界卫生组织及国际心脏病学联合会(WHO/ISFC)制定的 DCM 诊断标准,2007 年 1 月后采用 2006 年美国心脏协会(AHA)制定的 DCM 诊断标准。男性 178 例,女性 116 例,年龄 6~80(48.3±14.3)岁。排除高血压、冠心病、心脏瓣膜病、糖尿病、结节病、自身免疫疾病、骨骼肌病、急性和慢性炎症以及长期大量饮酒史、肿瘤药物使用史等患者。随机选择来四川大学华西医院门诊体检的汉族健康人 334 例为对照,男性 212 例,女性 122 例,年龄为 24~80(44.5±7.8)岁。

1.2 方法

1.2.1 基因 DNA 的提取 所有受研者均抽取静脉血 3 mL,0.5 mmol/L EDTA 抗凝。取 300 μL 全血,采用北京百泰克生物技术有限公司的全血基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。DNA 提取后置于-20 ℃冰箱备用。

1.2.2 引物设计 STAT4 基因序列查询于 NCBI 人类基因组数据库,引物设计使用在线引物设计软

件 http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer2.html 设计,限制性内切酶购自 NEB。引物及限制性内切酶见表 1。

1.2.3 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法 采用 Eppendorf 公司的 PCR 仪及 bioLabs 公司及 NEB 公司生产的有关试剂。PCR 扩增在 25 μL 反应体系中进行。反应体系为:DNA 2 μL,dNTP 4 μL,buffer 2.5 μL,上游引物 0.25 μL,下游引物 0.25 μL,Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,加双蒸水 15.8 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min,然后 94 ℃ 变性 30 s,rs7574865 位点 58.8 ℃ 退火 30 s,rs11889341 位点 51.1 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,34 个循环,末次延伸 72 ℃ 10 min。采用限制性内切酶 *Ssp* I (rs7574865)和 *Mlu*CI(rs11889341)对相应位点的 PCR 产物酶切,酶切体系 10 μL:PCR 扩增产物 2 μL,10×Buffer 1 μL,内切酶 0.1 μL,加灭菌双蒸水 6.9 μL,37 ℃ 水浴过夜消化。取酶切产物 4.5 μL 与 0.5 μL loadingbuffer(溴酚蓝、二甲苯青凝胶上样缓冲液)混匀,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及硝酸银染色后观察基因型,拍照并记录结果。

1.2.4 DNA 序列分析 分别选取 rs7574865 和 rs11889341 位点的野生型纯合子、突变型纯合子以及杂合子标本,PCR 产物经纯化后进行正反方向测序分析,验证 PCR-RFLP 实验结果的准确性。

1.3 统计学方法

采用直接计数法计算病例组 and 对照组样本基因型频率及等位基因频率,进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。计量资料两组间比较采用不配对 *t* 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

DCM 组和对照组 rs11889341 和 rs7574865 位点等位基因频率分布比较见表 2,基因型分布比较见表 3。STAT4 基因 rs11889341 位点 GG 基因型频率和 G 等位基因频率在 DCM 组患者中升高,与正常对照组相比差异有统计学意义($\chi^2=6.500$,

表 1 STAT4 基因 SNPs 检测的引物、限制性内切酶
Table 1 Characteristics of genotyping SNPs in STAT4 gene by PCR-RFLP

SNP	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme	Product (bp)	Aellel (bp)
rs11889341	ATCTATTGATGAAGCAGAGAGA	<i>Mlu</i> CI	142	G (142)
	CAATAACATTTACTGAACATCTTAAT			A (115,27)
rs7574865	TTTCTGATTGCTTAAATAATGCAA	<i>Ssp</i> I	141	C (141)
	GTATGAAAAGTTGGTGACCAAAATAT			A (117,24)

$P=0.039$ 和 $\chi^2=5.198$, $P=0.023$, $OR=1.341$, 95% CI 为 $1.042\sim1.727$). rs7574865 位点 CC+AC 基因型频率在 DCM 组患者中升高,与正常对照组相比差异有统计学意义($\chi^2=5.051$, $P=0.025$, $OR=1.968$, 95% CI 为 $1.081\sim3.585$),该位点的等位基因频率分布在 DCM 组与对照组之间差异无统计学意义。正常对照组基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

表 2 DCM 组和对照组中 *STAT4* 基因 SNPs 位点的等位基因频率分布

Table 2 Allele frequencies of two SNPs in *STAT4* gene in DCM patients and controls

Genotype	DCM (<i>n</i> =294)	Control (<i>n</i> =334)
rs11889341		
G (%)	449 (76.4)	472 (70.7)
A (%)	139 (23.6)	196 (29.3)
<i>P</i>	0.023	
rs7574865		
C (%)	402 (68.4)	442 (66.2)
A (%)	186 (31.6)	226 (33.8)
<i>P</i>	0.407	

表 3 DCM 组和对照组中 *STAT4* 基因 SNPs 位点基因型频率分布

Table 3 Genotype of two SNPs in *STAT4* gene among DCM patients and controls

Genotype	DCM (<i>n</i> =294)	Controls (<i>n</i> =334)
rs11889341G/A		
GG (%)	164 (55.8)	160 (47.9)
AG (%)	121 (41.1)	152 (45.5)
AA (%)	9 (3.1)	22 (6.6)
<i>P</i>	0.039	
rs7574865C/A		
CC+AC (%)	277 (94.2)	298 (89.2)
AA (%)	17 (5.8)	36 (10.8)
<i>P</i>	0.025	

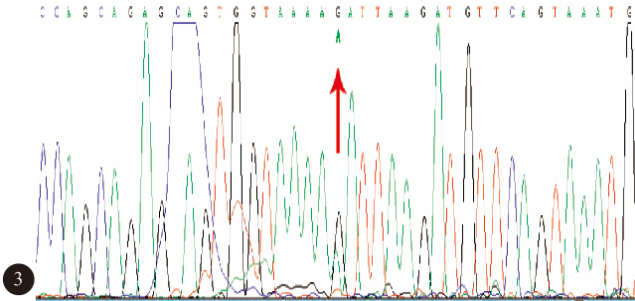


图 3 1 例 DCM 患者 *STAT4* 基因 rs11889341 位点检出突变为 GG→AG

Fig 3 rs11889341 locus mutation of *STAT4* gene as a GG→AG was detected in a DCM patient

对照组 rs7574865 位点电泳图谱见图 1。病例组 rs11889341 位点电泳图谱见图 2。

病例组 rs11889341 位点 AG 基因型测序结果见图 3,rs7574865 位点 AC 基因型测序结果见图 4。

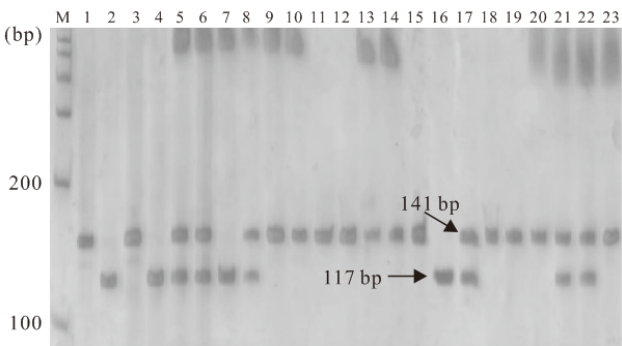


图 1 对照组 *STAT4* 基因 rs7574865 位点基因型检测结果

Fig 1 rs7574865 gene polymorphism of *STAT4* gene in controls

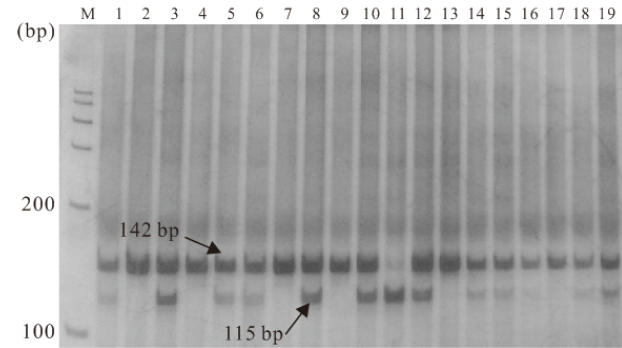


图 2 DCM 组 *STAT4* 基因 rs11889341 位点基因型检测结果

Fig 2 rs11889341 gene polymorphism of *STAT4* gene in DCM

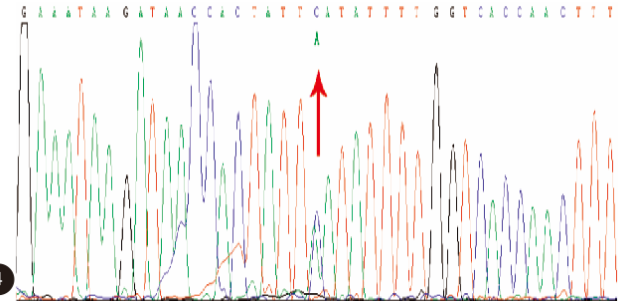


图 4 1 例 DCM 患者 *STAT4* 基因 rs7574865 位点检出突变为

Fig 4 rs7574865 locus mutation of *STAT4*

3 讨论

近二十年来,很多研究发现,在 DCM 患者外周血里存在自身免疫抗体和抗原以及一些免疫因子^[8,9]。免疫抑制治疗和免疫吸附治疗也被证明是一种可以改善非病毒感染心肌炎引起的心脏功能下降的有效方法^[10,11]。这些研究表明自身免疫机制与 DCM 的发生密切相关。自身免疫机制中 T 细胞介导的细胞免疫在小鼠模型中已被证明,其作用于各种心脏抗原及心肌肌球蛋白,T 细胞为中心的过度细胞免疫可导致弥漫性心肌受损^[3,12]。

T 淋巴细胞根据发育过程中出现的分化抗原的不同,分为 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞。其中 CD4⁺T 细胞在不同的细胞因子及环境作用下,经过增殖、分化会产生各种不同功能的效应 T 细胞,如 Th1、Th2、Th17 和 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞等。总体上,Th1 细胞有促炎的作用而 Th2 细胞有抑制炎症的作用^[13]。大量研究已证明,在 DCM 动物模型和 DCM 患者中存在 Th1/Th2 细胞的分化失衡^[12,14,15]。Th17 细胞是近年来新发现的促炎效应 T 细胞,在炎症的发生和自身免疫反应中起着重要的调节作用。一些研究指出,Th17 细胞分泌的白介素 17 在体内和体外都能诱导心肌的纤维化^[16]。在 DCM 患者的外周血内也被发现 Th17 细胞及其相关的细胞因子和转录因子水平明显高于健康人群^[17]。另外,现在大多数学者观点认为,心肌炎可能是遗传、病毒感染以及自身免疫反应等多种因素共同作用的结果,可能最终发展成为 DCM。有研究发现,在一部分的患者中,心肌炎和 DCM 是机体特异性心肌自身免疫疾病的急性 and 慢性的两个过程^[18]。在 T 细胞受体转基因小鼠模型中发现,Th1 细胞和 Th17 细胞的共同作用可以导致急性心肌炎向致死性的 DCM 发展^[19]。以上的研究证明,Th1 和 Th17 细胞在 DCM 的发生发展中起着重要的作用。

STAT4 蛋白主要负责致炎因子(IL-12,IL-15,IL-23,IFN- γ 等)的胞内信号传导,介导 Th 细胞的活化增殖并诱导其向参与慢性炎症的 Th1 细胞和 Th17 细胞方向分化。在大量敲除 STAT4 基因动物模型的实验中发现,该基因对 Th1 细胞和 Th17 细胞的活性和功能有重要的影响^[4,20]。STAT4 基因的突变或多态性位点也已被证明与 T 细胞介导的多种自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肠白塞病等的发生相关^[7-11]。本实验选

取的两个 STAT4 基因的 SNP 位点有报道与我国汉族人群中的自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮的遗传易感性相关^[7,8]。但 STAT4 基因多态性与这些自身免疫性疾病的真正关系尚不清楚。本实验的两个位点均位于 STAT4 基因的第三内含子区,因此推测其可能通过突变等影响 STAT4 基因的转录和剪切异构体的表达,进而影响 STAT4 蛋白的稳定表达从而影响 Th1 细胞和 Th17 细胞的活性,在 DCM 的发生中发挥作用^[4]。

本实验结果表明:STAT4 基因 rs11889341 多态性与 DCM 相关,G 等位基因可能是 DCM 的易感基因,GG 基因型频率在 DCM 组患者中明显高于正常对照组,提示该位点的基因多态性可能与 DCM 的发病风险紧密相关,rs11889341 位点多态性由 A 到 G,提示 DCM 的发病风险可能会升高。rs7574865 位点 CC+AC 基因型频率在 DCM 组患者中升高,同理,CC 和 AC 基因型可能对 DCM 的发生有促进作用。实验结果与现有大多数研究及我们的推测一致。但亦有部分研究发现,外周单核细胞内 STAT4 的表达与其 rs7574865 位点的危险等位基因的表达呈正相关^[4]。而本实验 rs7574865 位点的等位基因频率在对照组和病例组中差异无统计学意义,其原因可能是因为 SNP 在不同人种、不同地区、不同遗传背景的分布存在显著的差异,在不同的研究中 SNP 对基因转录以及蛋白水平表达的影响也存在较大不同。因此,本实验仅能证明 STAT4 基因多态性可能与 DCM 的发生相关,但与其与 DCM 的具体作用机制还不清楚。该基因多态性是否影响 STAT4 基因的转录和蛋白水平的表达;STAT4 基因是否是 DCM 的一个致病基因,其与 DCM 的具体作用机制是什么;或者该基因并不参与 DCM 的发病,而是其基因多态性与 DCM 的某一真正的致病基因存在连锁不平衡现象。这些都还有待在未来进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, *et al.* Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 2006; 113 (14): 1807-1816.

- 2 Li H, Chen Y, Zhou B, *et al.* Polymorphisms of presenilin-1 gene associate with dilated cardiomyopathy susceptibility. *Mol Cell Biochem*, 2011; 358(1-2): 31-36.
- 3 Fu M. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy: from patients to molecules and back to patients. *Int J Cardiol*, 2006; 112(1): 1-2.
- 4 Liang YL, Wu H, Li PQ, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 4 gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis in Northwestern Chinese Han population. *Life Sci*, 2011; 89(5-6): 171-175.
- 5 Luan H, Li P, Cao C, *et al.* A single-nucleotide polymorphism of the STAT4 gene is associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in female Chinese population. *Rheumatol Int*, 2012; 32(5): 1251-1255.
- 6 Kim ES, Kim SW, Moon CM, *et al.* Interaction between IL-17A, IL-23R and STAT4 polymorphisms confer susceptibility to intestinal Behcet's disease in Korean population. *Life Sci*, 2012; 90(19-20): 740-746.
- 7 Moon CM, Cheon JH, Kim SW, *et al.* Association of signal transducer and activator of transcription 4 genetic variants with extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *Life Sci*, 2010; 86(17-18): 661-667.
- 8 Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, *et al.* Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation*, 1994; 89(6): 2760-2767.
- 9 Marriott JB, Goldman JH, Keeling PJ, *et al.* Abnormal cytokine profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives. *Heart*, 1996; 75(3): 287-290.
- 10 Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the timic study. *Eur Heart J*, 2009; 30(16): 1995-2002.
- 11 Staudt A, Hummel A, Ruppert J, *et al.* Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy: 6-month results from a randomized study. *Am Heart J*, 2006; 152(4): 712, e711-e716.
- 12 Efthimiadis I, Skendros P, Sarantopoulos A, *et al.* CD4⁺/CD25⁺ T-Lymphocytes and Th1/Th2 regulation in dilated cardiomyopathy. *Hippokratia*, 2011; 15(4): 335-342.
- 13 Jäger A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol*, 2010; 72(3): 173-184.
- 14 Watanabe K, Sukumaran V, Veeraveedu PT, *et al.* Regulation of inflammation and myocardial fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011; 10(3): 218-25.
- 15 Peng HM, Yang XP, Oscar A, *et al.* Angiotensin II-induced dilated cardiomyopathy in Balb/c but not C57BL/6J mice. *Exp Physiol*, 2011; 96(8): 756-764.
- 16 Liu YF, Zhu HT, Su ZL, *et al.* IL-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKC β /Erk1/2/NF- κ B-dependent signaling pathway. *Int Immunol*, 2012; 24(10): 605-612.
- 17 An Y, Li J, Hu XJ, *et al.* The prevalence of Th17 cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Invest Med*, 2009; 32(2): E144-E150.
- 18 Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, *et al.* Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*, 2002; 4(4): 411-417.
- 19 Nindl V, Maier R, Ratering D, *et al.* Cooperation of Th1 and Th17 cells determines transition from autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Eur J Immunol*, 2012; 42(9): 2311-2321.
- 20 Xu J, Yang Y, Qiu G, *et al.* Stat4 is critical for the balance between Th17 cells and regulatory T cells in Colitis. *J Immunol*, 2011; 186(11): 6597-6606.

(2013-01-09 收稿, 2013-03-11 修回)

编辑 沈 进