

·论 著·

NOD2/CARD15 基因突变与中国人克罗恩病相关性研究

张以洋¹ 韩树堂¹ 智发朝²

【摘要】背景 *NOD2/CARD15* 基因是人类克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 第一个易感基因, 既往研究发现 P268S 可能与中国人 CD 发病及临床特征相关。**目的** 本研究旨在证实 P268S 与中国人 CD 发病及其临床特征的相关性。**方法** 血样来自临床确诊的 50 例 CD 患者, 60 例溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者及 100 例健康体检者 (healthy controls, HC)。提取人血白细胞基因组 DNA, PCR 扩增目的片段, PCR-RFLP 发现突变位点, DNA 测序证实突变位点。**结果** 共有 8 例 CD 患者发现有 P268S 改变, 而在 UC 患者和 HC 中分别发现 2 例和 3 例 P268S 改变, CD 组明显高于 UC 和 HC 组 ($\chi^2 = 10.829, P = 0.004$), 而 UC 组和 HC 组无明显差异。8 例有 P268S 改变的 CD 患者临床特征包括病变多位于回肠, 发病年龄轻 (6 例 < 20 岁), 常并发肠腔狭窄而需手术治疗, 中-重度患者比例高。**结论** P268S 可能是 *NOD2/CARD15* 基因中与中国人 CD 相关的 SNP。P268S 与 CD 患者发病年龄、病变部位及并发症及病情严重程度可能相关。

【关键词】 P268S; 克罗恩病; *NOD2/CARD15*; 基因

NOD2/CARD15 gene mutation and Crohn's disease in the Chinese population ZHANG Yi-yang, HAN Shu-tang, ZHI Fa-chao. The Center of Gastrointestinal Endoscopy, Chinese Traditional Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, China. Corresponding author: ZHI Fa-chao, Institute of Digestive Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. Email: zfc@fimmu.com

【Abstract】Background Previous studies have shown *NOD2/CARD15* gene is the first susceptibility gene for Crohn's disease (CD), and P268S has been identified to be possibly associated with CD in the Chinese population. **Objective** Our aims are to verify P268S which is associated with Chinese patients with CD and their clinical features. **Methods** Blood samples were obtained from 50 patients with CD, 60 patients with ulcerative colitis (UC), and 100 healthy controls. We extracted DNA from patients' white blood cells. The target sequence of *NOD2/CARD15* was acquired by PCR amplification, the mutation was detected by PCR-RFLP and verified by direct DNA sequencing. **Results** Eight CD patients, 2 UC patients and 3 healthy controls were found to have P268S variant. The difference between CD patients and the other 2 groups was statistically significance ($\chi^2 = 10.829, P = 0.004$). The Clinical features of 8 CD patients were as follows: location of lesion of 7 patients were in the terminal ileum, 1 was in the colon ($\chi^2 = 8.936, P = 0.011$). Six of them were younger than 20 years old ($\chi^2 = 6.161, P = 0.013$) and 6 of them had intestinal stricture which needs surgery ($\chi^2 = 7.931, P = 0.005$). Six of them were severe, 2 were moderate ($\chi^2 = 7.150, P = 0.028$). Three of them were males, 5 were females ($\chi^2 = 1.296, P = 0.255$). **Conclusion** P268S variant in *NOD2/CARD15* is possibly associated with CD in Chinese population. P268S variant is related to the age of patients, the location of lesions, intestinal stricture and the state of illness, but not to gender.

【Key words】 P268S; Crohn's disease; *NOD2/CARD15*; Gene

作者单位: 1 210029 江苏省中医院消化内镜中心

2 510515 南方医科大学南方医院消化科

基金项目: 广东省自然科学基金 (05004770)

通讯作者: 智发朝, Email: zfc@fimmu.com

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是炎症性肠病(IBD)的一个主要类型,是以小肠为主的全胃肠道节段性全层炎症性病变。随着双气囊小肠镜的应用^[12],CD发现率逐年上升,但其病因与发病机制不明。近年来的观点认为,携带遗传易感基因的宿主在环境因素参与下,免疫功能紊乱,最终导致疾病发生^[3]。2001年以来,3个独立的实验室在16q12的位置发现了人类第1个CD易感基因 *NOD2*^[4-6],后更名为 *CARD15*,并证实该基因的3个单核苷酸多态性(SNP)(Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC)是白种人CD的易感基因,但与日本、我国香港及浙江人群无关^[7-9]。由于地域及种族差异,中国人CD有关的 *NOD2/CARD15* 基因突变位点可能与西方白种人不同。既往我们的初步研究^[10]也未发现上述3个SNP,但发现P268S可能是与中国人CD相关的SNP,现拟扩大标本量,通过PCR-RFLP及DNA测序法进一步验证P268S与中国人克罗恩病发病的相关性。

对象与方法

一、研究对象

南方医院及江苏省中医院2003年1月至2007年8月间临床资料完整并确诊的CD患者50例、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者60例及健康体检者(healthy controls, HC)100例。IBD的诊断按2001年中华医学会消化病学分会制定的标准^[11]。

二、实验方法

1. 基因组DNA提取

抽取外周血5ml,ACD抗凝,混匀后缓慢加入含3ml淋巴细胞分离液的灭菌离心管中,注意血不能和淋巴细胞相混,1500g离心20min,取中间淡黄色细胞层12000g离心1min,得到外周血白细胞,按DNA提取试剂盒(购自北京天为时代公司)说明书提取基因组DNA, -20℃保存。

2. 引物合成

根据P268S碱基突变所导致酶切位点的改变,用工具软件Primer6.0寻找相应的限制性内切酶BamH I,并设计相应的酶切引物,引物由上海博亚生物技术公司合成。

上游引物:5'-TGCCTCTTCTTCTGCCTTCC-3';下游引物:5'-AGTAGAGTCCGCACAGAGAG-3'。PCR产物大小为425bp,酶切产物大小为250bp、175bp。

3. PCR扩增目的片段

反应体系:DNA模板2μl,10μmol/L上下游引物各1μl,2×pfu PCR MasterMix(购自北京天为时代公司)10μl,灭菌去离子水6μl,共20μl。反应条件:预变性94℃,5min;变性94℃,45s,退火59℃,45s,延伸72℃,45s,共35个循环,终末延伸72℃,10min。PCR产物放4℃冰箱保存。PCR反应产物用2%琼脂糖电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像仪上成像,以确定目的片段扩增成功。阴性对照使用蒸馏水代替DNA。

4. 限制性内切酶酶切分析

酶切反应体系:PCR产物10μl, BamH I 2μl, 10×酶切缓冲液4μl, 灭菌ddH₂O 24μl,共40μl;反应条件:水浴箱30℃,90min,反应后加10×loadingbuffer 4μl终止反应。取酶切产物20μl,加样于含溴化乙锭的2%的琼脂糖凝胶中,在0.5×TBE缓冲液,80V电压条件下电泳50~60min,凝胶成像仪上成像,以鉴定酶切产物;有P268S纯合子突变者含250bp、175bp两条电泳带,杂合子突变者含425bp、250bp、175bp三条电泳带,无突变者只有425bp一条电泳带。

5. DNA测序进一步证实突变位点

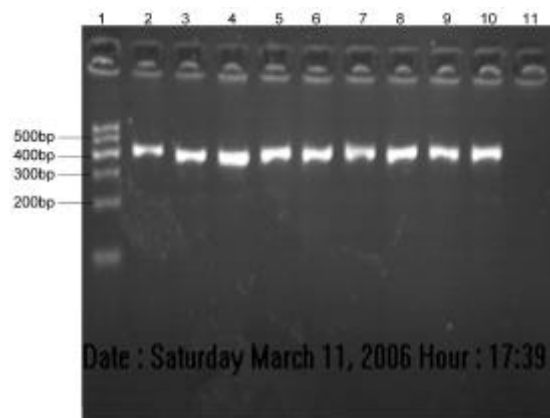
酶切分析发现突变者用PCR重新扩增目的片段,DNA凝胶纯化试剂盒纯化PCR产物,用双脱氧四色荧光法全自动测序仪(美国ABI377)测序;并与基因库数据对照(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),进一步证实突变位点。

6. 统计学分析

分别统计CD组、UC组及健康体检组中的突变分布频率, χ^2 检验比较各组间突变的分布差异。

结果

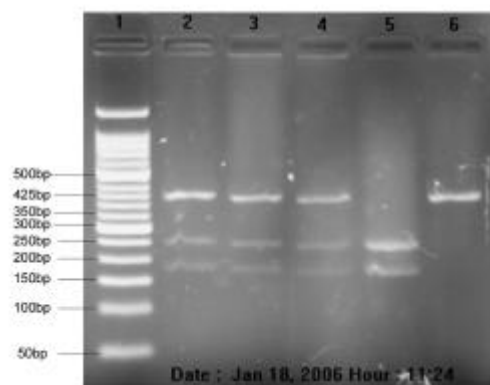
一、酶切片段的PCR扩增与电泳(见图1)



注:1为marker I;2-10为PCR产物,11为阴性对照。

图1 PCR产物电泳图

二、酶切分析与电泳(图 2)



注:1 为 marker (50bp ladder);2~4 为 P268S 杂合子酶切图;5 为 P268S 纯合子;6 为无突变者。

图 2 P268S 酶切产物电泳图

三、部分 DNA 测序图(图 3)

四、结果统计

50 例 CD 患者中,8 例发现有 P268S 改变;而在 60 例 UC 患者和 100 例 HC 中分别发现 2 例和 3 例 P268S 改变;其碱基 C 变成 T,密码子由 CCC 变成 UCC,编码的氨基酸由脯氨酸变为丝氨酸;CD 组显著高于其他两组($P < 0.01$),而 UC 组与 HC 组间

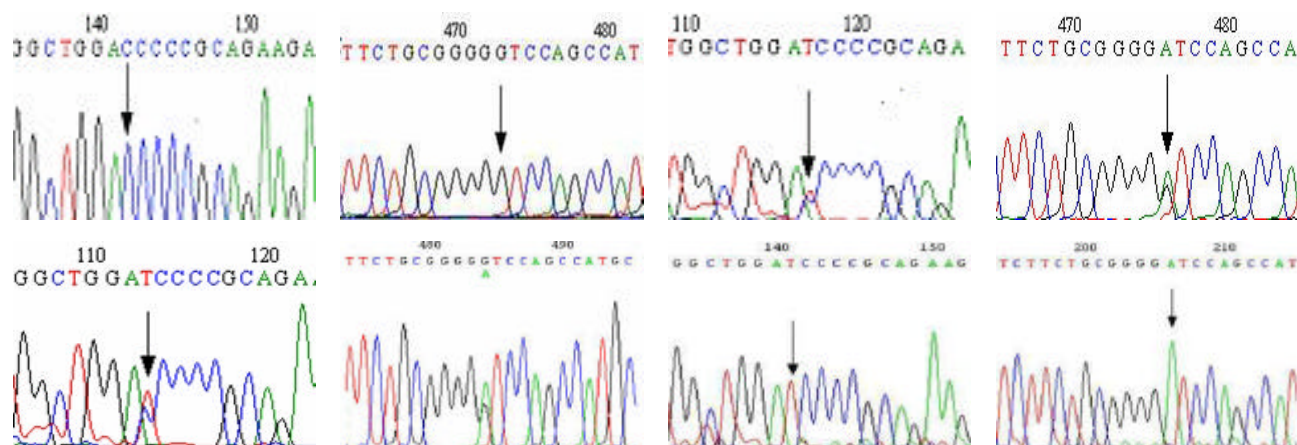
表 1 P268S 与 CD 患者临床特点之间的关系

临床特点	例数	P268S 突变例数	χ^2	P 值
发病年龄			6.161	0.013
≤20 岁	18	6		
>20 岁	32	2		
性别			1.296	0.255
男	28	3		
女	22	5		
病变部位			8.936	0.011
小肠	20	7		
回结肠	18	1		
结肠	12	0		
并发症			7.931	0.005
肠腔狭窄	16	6		
无肠腔狭窄	34	2		
病情			7.150	0.028
轻度	5	0		
中度	28	2		
重度	17	6		

无统计学差异。

五、P268S 与 CD 临床特征的关系

P268S 与 CD 患者发病年龄、病变部位及并发症肠腔狭窄相关,有 P268S 变化者发病年龄多小于 20



3-1	3-2	3-3	3-4
3-5	3-6	3-7	3-8

注:图 3-1、3-2 为野生型碱基序列,3-3、3-5 为 P268S 杂合子正向序列,3-4、3-6 为 P268S 杂合子反向序列,3-7、3-8 为 P268S 纯合子正反向序列。

图 3 部分 DNA 测序图

岁、病变部位易累及回肠及易出现肠腔狭窄而需手术,各组间差异有统计学意义,而与性别无关(表 1)。

讨 论

NOD2/CARD15 基因位于 16q12, 编码 *NOD2/CARD15* 蛋白,此蛋白仅在外周血单核细胞中表达,可诱导核因子(NF)- κ B 激活、介导细胞凋亡以及影响肠道先天性防御因子如小肠潘氏细胞防御素的表

达^[2]。当基因发生突变时,*NOD2/CARD15* 蛋白功能就可能改变。研究表明,*NOD2/CARD15* 基因的 3020insC 发生移码突变,使 LRR 区域发生 Leu1007 氨基酸互换,终止密码子提前,最后的 33 个氨基酸缺失,NF- κ B 活性减弱,宿主对肠道细菌产物先天性免疫反应减弱,继发性免疫过度激活,导致 CD 发生。在白种人的 CD 患者中其他 2 个 SNP 的突变携带率也显著增高。我们既往的初步研究未发现上述 3 个 SNP,提示在白种人中与 CD 易感相关的 3 个

SNP可能与国人无关,但发现 P268S 可能与中国人克罗恩病及其临床特征有关。为进一步证实 P268S 与中国人 CD 相关,我们扩大了标本量,通过 PCR-RFLP 及 DNA 测序法发现 50 例 CD 患者中有 8 例 P268S 改变,而 60 例 UC 及 100 例 HC 中分别发现 2 例及 3 例 P268S 改变,各组间差异有统计学意义,进一步说明 P268S 可能与中国人 CD 发病相关,这一结果与对爱尔兰及欧洲犹太人群的研究结果相似^[13,14]。其密码子由 CCC 变成 UCC,编码氨基酸由脯氨酸变成丝氨酸,但是否导致编码的 *NOD2* 蛋白功能发生改变有待进一步研究。

国外多项研究认为 *NOD2/CARD15* 基因突变型与疾病表型有相关性。Abreu 等^[15]对 2 组 CD 患者进行 *NOD2/CARD15* 的 3 个核苷酸变种 (R675W、G881R 与 3020insC) 研究发现,*NOD2* 变种与纤维狭窄性病变存在明显关联,46% 的纤维狭窄性病变患者至少携带上述一个等位基因,而非纤维狭窄性病变者中仅占 23.5%。另外,有基因突变的个体通常较早发病(≤ 21 岁)。Cuthbert 等^[16]进一步检测 4 个 *NOD2/CARD15* 多形性 P268S、R702W、G908R 与 3020insC,证明后三者突变与克罗恩病尤其是回肠病变易感性显著相关(比正常对照者高 200 倍),但与溃疡性结肠炎无关。Ahmad 等^[17]的资料表明,这三个 *NOD2/CARD15* 的 SNP 与人主要白细胞抗原 (HLA) 区突变在回肠病变中的群体可认定危险性 (population attributable risk, PAR) 的百分数分别为 32% 与 17%。本研究发现,P268S 与 CD 的临床特征有一定关联性,含有 P268S 的患者共同特征为发病年龄小于 20 岁、病情较重、病变部位在回肠且均因并发肠腔狭窄导致肠梗阻而需手术治疗,说明 P268S 与 CD 的发病年龄、病变严重程度、病变部位及并发症可能有关,而与患者的性别可能无关,提示基因突变可能决定 CD 的临床特征。

总之,CD 是涉及多种因素的复杂性疾病,*NOD2/CARD15* 基因是 CD 的一个重要易感基因,通过我们的研究进一步证实 P268S 可能与中国人 CD 发病相关的 SNP,为中国人 CD 发病机制的研究提供了一条重要线索。但由于样本量有限,其结果还有待于全国范围内更大样本的研究进一步证实。另外,为确定 *NOD2/CARD15* 基因在中国人 CD 发病中的关系,还有待于对 P268S 编码的 *NOD2/CARD15* 蛋白的功能进行进一步研究。

参考文献

- 1 智发朝,姜泊,潘德寿,等. 全小肠直视检查的双气囊电子小肠镜的初步临床应用. 中华医学杂志 2003;83:1832-1833.
- 2 Zhi fc, Xiao B, Jiang B, et al. Double-balloon enteroscopy detecting small intestinal bleeding. Chin Med J 2005;118:1834-1837.
- 3 Shanahan F. Crohn's disease. Lancet 2002;359:62-69.
- 4 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of *NOD2* leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:599-603.
- 5 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:603-606.
- 6 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in *NOD2* gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet 2001;357:1925-1928.
- 7 Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. Lack of common *NOD2* variants in Japanese patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2002;123:86-91.
- 8 Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, et al. *NOD2/CARD15* gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. Aliment Pharmacol Ther 2003;17:1465-1470.
- 9 高敏,曹倩,罗灵和,等. *NOD2/CARD15* 基因多态性与克罗恩病患者相关性研究. 中华内科杂志 2005;44:210-212.
- 10 张以洋,智发朝,周殿元,等. 克罗恩病 *CARD15/NOD2* 基因突变的研究. 中华消化杂志 2006;26:456-459.
- 11 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 胃肠病学 2001;6:56-59.
- 12 Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science 2005;307:731-734.
- 13 Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. *NOD2/CARD15*, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? Genes Immunity 2004;5:417-425.
- 14 Sugimura K, Taylor KD, Lin YC, et al. A novel *NOD2/CARD15* haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. Am J Hum Genet 2003;72:509-518.
- 15 Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in *NOD2* are associated with fibrostenosing disease in patient with Crohn's disease. Gastroenterology 2002;123:679-688.
- 16 Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of *NOD2* gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002;122:867-874.
- 17 Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, et al. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2001;15: 731-748.

(收稿日期:2008-01-05)

(本文编辑:姚永莉)