TENM4 基因 rs4483616 位点多态性与江西省汉族人群免疫性血小板减少症的相关性研究

赵　翠　徐颜美　杨文涛　李　静　黄　波　刘　静　林　晋　杨伟明　张　静　王小中

摘　要　目的　探讨 Teneurin 跨膜蛋白 4(Teneurin transmembrane protein 4,TENM4)基因 rs4483616 位点单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNP)与江西省汉族人群免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia,ITP)的易感相关性。**方法**　收集笔者医院血液内科 2015 年 6 月 ~2018 年 10 月收治的 200 例 ITP 患者作为病例组,同期收集于笔者医院体检的 180 例健康受试者作为对照组。采用 TaqMan 探针法对所有受试者 TENM4 基因 rs4483616 位点进行基因型检测,比较两组基因型及等位基因频率分布差异。**结果**　病例组 TENM4 基因 rs4483 616 位点 CC、CT 基因型频率分别是 98% 和 2% ,C、T 等位基因频率分别为 99% 和 1% ,与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　TENM4 基因 rs4483616 位点可能是江西省汉族人群 ITP 的易感基因位点。

关键词　免疫性血小板减少症　TENM4　单核苷酸多态性

中图分类号　R714.254　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2021.05.010

Correlation between the Polymorphism of rs4483616 in TENM4 Gene and Susceptibility to Immune Thrombocytopenia in Han Population in Jiangxi Province.

Zhao Cui, Xu Yanmei, Yang Wentao, et al. Jiangxi Province Key Laboratory of Laboratory Medicine, Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi 330006, China

Abstract　Objective　To investigate the relationship between the single nucleotide polymorphisms (SNP) of Teneurin transmembrane protein 4 (TENM4) gene rs4483616 and the susceptibility of immune thrombocytopenia (ITP) inHan populationin Jiangxi Province. **Methods**　A total of 200 ITP patients admitted in our hospital's Department of Hematology from June 2015 to October 2018 were collected as the case group, and 180 healthy medical examiners were collected as the control group during the same period. The TaqMan probe method was used to detect the genotype of the rs4483616 in TENM4 gene in all subjects, and to compare the differences in genotype and allele frequency distribution between the two groups. **Results**　The CC and CT genotype frequencies of the rs4483616 locus of the TENM4 gene in the case group were 98% and 2% , and the C and T allele frequencies were 99% and 1% , respectively. Compared with the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion**　The rs4483616 locus of the TENM4 gene may be a susceptible gene locus of ITP in Han population in Jiangxi Province.

Key words　Immune thrombocytopenia;TENM4;Single nucleotide polymorphism

免疫性血小板减少症(immunethrombocytopenia,ITP)是一种获得性自身免疫性疾病,其特点为体内血小板产生减少和破坏过多,循环血小板数量显著减少,出血风险增加[1,2]。目前认为 ITP 主要由细胞和体液免疫因素导致[3]。近年来,研究者认为遗传因素在 ITP 发生、发展过程中起重要作用,且通过多种遗传学分析手段发现多种基因多态性可能是 ITP 发生的易感因素[3~5]。笔者团队前期通过全基因组关联研究(genome - wideassociationstudy,GWAS)发现 TENM4 rs4483616($P=0.000$)与中国江西省汉族人群显著相关,因当时技术问题无法合成探针引物,故未对其进行基因分型[6]。本研究将完善前期实验,采用 TaqMan 法检测 TENM4 基因 rs4483616 位点基因型,探讨其基因型及等位基因频率分布与 ITP 的易感相关性。

材料与方法

1. 研究对象:于 2015 年 6 月 ~2018 年 10 月,纳入于笔者医院血液内科就诊并符合《成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版)》诊

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81860034);江西省科技厅自然科学基金青年基金资助项目(20161BAB215248)

作者单位:330006　江西省检验医学重点实验室、南昌大学第二附属医院检验科(赵翠、徐颜美、黄波、刘静、林晋、杨伟明、张静、王小中);330006　南昌大学第二附属医院器官移植科(杨文涛);330006　南昌大学第一附属医院检验科(李静)

通讯作者:王小中,电子信箱:wangxiaozhong@ ncu. edu. cn

断标准的成人 ITP 患者 200 例为病例组[7]。本研究排除了招募家族性 ITP 病例。另外,排除其他类型的血小板减少,如肝素诱导的血小板计数减少或药物诱导的血小板计数减少。同期收集于笔者医院体检的 180 例性别、种族等相匹配的健康受试者为对照组。同时,收集所有受试者的临床基本资料。所有受试者均签署知情同意书,本研究经南昌大学第二附属医院医学伦理学委员会审批。

2. 仪器与试剂:LineGene 9600 实时荧光定量 PCR 仪(杭州博日科技有限公司),K960 PCR 仪(力新仪器有限公司),MINIP - 2500 微孔板离心机(杭州米欧仪器有限公司),Theromo NanoDrop 2000C 紫外/可见分光光度定量仪(中国赛默飞世尔科技有限公司),PCR 引物、血液基因组柱式提取试剂盒、探针(北京 Tsingke 公司),灭菌水(实验室自备)。

3. 基因组 DNA 提取及检测:收集 ITP 患者及健康对照者 EDTA - K2 抗凝全血 3 ~ 4ml。根据 Tsingke 公司的基因组提取试剂盒说明书,从 200 例病例和 180 例对照中提取外周血白细胞的基因组 DNA。使用 Theromo NanoDrop 2000C 紫外/可见分光光度定量仪器计算 DNA 浓度和纯度,选择浓度和纯度合格的基因组 DNA 样品,以进一步进行基因分型检测。

4. 探针及引物序列:rs4483616 的引物及探针由 Tsingke 公司设计合成,具体序列如下:上游引物:5′ - TCATGCTTTCCCTCCGTGG - 3′,下游引物:5′ - TCAGCTGAGGGTCAGGGAT - 3′;探针 1:5′ - TGGATCCACTCTAAG - 3′,探针 2:5′ - ATCCACTCCAAGAC - 3′。PCR 总反应体系为 20μl,反应条件为 95℃ 2min,95℃ 10s,60℃ 35s,共 40 个循环。反应在 LineGene9600 实时荧光定量 PCR 仪(杭州博日科技有限公司)进行,利用 Genotyper 软件进行基因分型检测。

5. 统计学方法:运用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析。连续数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,在适当情况下使用 Student t 检验或 χ^2 检验评估病例与对照组之间的差异。采用基因计数法计算 SNP 多态位点的等位基因频率和基因型频率,χ^2 检验用于检测所研究 SNP 的基因型分布是否符合 *Hardy - Weinberg* 平衡(HWE)定律和 $P > 0.05$ 被认为与 HWE 平衡相符。使用基因型分布的比值比(odds ratio, OR)及其 95% 可信区间(95% confidenceinterval, 95% CI)评价不同基因型和等位基因与 ITP 易感性之间的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 一般临床特点:本研究招募的所有 ITP 患者均表现出相似的典型症状和体征。各受试者之间无血缘关系,无其他遗传性疾病,均为江西省汉族人群。病例组与对照组受试者的年龄、性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),所有受试者的一般临床特征详见表 1。

表 1　病例组与对照组的一般临床资料($\bar{x} \pm s$)

项目	病例组	对照组	P
性别(n)			
男性	65	54	0.601
女性	135	126	
年龄(岁)	40.81 ± 16.32	41.01 ± 16.28	0.907

2. *Hardy - Weinberg* 平衡检验结果结果:患者和对照组人群 rs4483616 位点的基因型频率处于 *Hardy - Weinberg* 平衡状态($P > 0.05$)。本研究招募的人群来自遗传平衡群体,详见表 2。

表 2　基因型频数分布的 *Hardy - Weinberg* 平衡检验

SNP	基因型	病例组		χ^2	P	对照组		χ^2	P
		观察值	预计值			观察值	预计值		
rs4483616	CC	196	196	0.02	0.89	166	166.3	0.29	0.59
	CT	4	4			14	13.5		
	TT	0	0			0	0.3		

3. rs4483616 位点等位基因的探针分型结果:rs4483616 位点具有两种等位基因分别是 C 和 T,共 3 种基因型分别是 CC、CT 和 TT。本实验分型结果显示病例组 CC 型 196 例,CT 型 4 例,TT 型 0 例;对照组 CC 型 166 例,CT 型 14 例,TT 型 0 例。实验结果与人类基因组计划(HapMap)公布的中国北京人的 SNP 分型数据一致。

4. rs4483616 位点基因型频率和等位基因频率与 ITP 的关系:ITP 病例组 rs4483616 位点 CC、CT 和 TT 基因型频率分别为 98.0%、2.0% 和 0,对照组的基因

型频率分别为 92.2%、7.8% 和 0。rs4483616 位点与 ITP 疾病的发生存在一定的风险(OR = 4.133,95% CI:1.335 ~ 12.796),该位点的基因型频率在两组间比较,差异有统计学意义(χ^2 = 7.009,P = 0.008),其中 CC 基因在病例组分布频率高于对照组(P < 0.05)(表 3)。在 ITP 病例组和对照组中等位基因 C 的频率分别为 99.0% 和 96.1%,等位基因 T 在 ITP 病例组和对照组中的频率分别为 1.0% 和 3.9%。两组人群间等位基因频率差异有统计学意义(χ^2 = 6.839,P = 0.009)。ITP 疾病组中 C 等位基因频率与对照组比较,OR = 4.006(95% CI:1.799 ~ 8.918);T 等位基因频率与对照组比较,OR = 0.292(95% CI:0.131 ~ 0.649,表 4)。

表 3 rs4483616 位点基因型频率分布及其与 ITP 的关系基因型[n(%)]

组别	基因型		
	CC	CT	TT
病例组	196(98.0)	4(2.0)	0(0)
对照组	166(92.2)	14(7.8)	0(0)

表 4 rs4483616 位点等位基因频率分布及其与 ITP 的关系

碱基	等位基因(n)		平均等位基因频率(MAF)	
	病例组	对照组	病例组	对照组
C	396	346	0.99	0.961
T	4	14	0.01	0.039

讨 论

SNP 是人类遗传变异中最常见的类型,在人类基因组中广泛存在。已有多项研究报道了基因的 SNP 与 ITP 的发生相关[4,8~10]。TENM4 基因位于 11 号染色体上,含有 34 个外显子,编码一个由 2769 个氨基酸残基组成的蛋白质。到目前为止,该基因的分子功能尚未明确。它可能是一种Ⅱ型跨膜蛋白,具有细胞信号转换器的功能[11]。Park 等[12]研究了 TENM4 基因多态性在高血压患者中的易感性,发现 TENM4 rs10466739 与高血压呈正相关。近年来有报道 TENM4 基因变异与常染色体显性遗传的原发性震颤、双相情感障碍有关[13,14]。精神分裂症具有高度的遗传异质性,TENM4 基因是精神分裂症的候选基因[11]。众所周知,许多遗传性疾病有相似的潜在病因,并有共同的易感基因。笔者团队前期通过 GWAS 筛选出 TENM4 基因 rs4483616 位点与中国江西省汉族人群显著相关,可能是 ITP 的易感基因位点[6]。因此本研究进一步探究 TENM4 基因 rs4483616 位点基因型及等位基因频率分布与 ITP 的易感相关性。

目前国内外尚无 TENM4 基因多态性与 ITP 的关联性研究。本研究结果显示 TENM4 基因 rs4483616 位点单核苷酸多态性的基因型频率都达到遗传平衡,具有群体代表性。ITP 病例组 rs4483616 位点 CC 基因型频率(98.0%)高于对照组(92.2%),而且两组间 rs4483616 位点的等位基因频率及基因型频率的差异有统计学意义(P < 0.05)。ITP 病例组中 C 等位基因频率与对照组比较,OR = 4.006(95% CI:1.799 ~ 8.918);T 等位基因频率与对照相比较,OR = 0.292(95% CI:0.131 ~ 0.649),提示 C 等位基因可能是 ITP 发病的危险等位基因,T 等位基因可能是 ITP 发病的保护等位基因。研究表明,TENM4 基因 rs4483616 位点可能是江西省汉族人群 ITP 的易感基因位点。

本研究尚有不足之处,由于研究样本量有限,研究对象种族、地域局限,因此研究中观察到的结果有待于扩大样本量予以进一步证实。需要从不同地域、不同种族及人种分析研究 TENM4 基因多态性与 ITP 易感性之间的关联,同时联合其他 ITP 易感基因,以提高个体 ITP 病易感性的预测水平,筛选出高危人群,从而加强 ITP 的早期预防、诊断及治疗。

参考文献

1 Marini I, Bakchoul T. Pathophysiology of Autoimmune thrombocytopenia: current insight with a focus on thrombopoiesis[J]. Hamostaseologie, 2019, 39(3): 227 - 237

2 Tolba FM, Diab SM, Abdelrahman A, *et al*. Assessment of IL - 17F rs763780 gene polymorphism in immune thrombocytopenia[J]. Blood Cells Mol Dis, 2019, 75: 20 - 25

3 Li J, Ma S, Shao L, *et al*. Inflammation - related gene polymorphisms associated with primary immune thrombocytopenia[J]. Front Immunol, 2017, 8: 744

4 Sheng Z, Li J, Wang Y, *et al*. A CARD9 single - nucleotide polymorphism rs4077515 is associated with reduced susceptibility to and severity of primary immune thrombocytopenia[J]. Ann Hematol, 2019, 98(11): 2497 - 2506

5 Wang D, Hu SL, Cheng XL, *et al*. FCGR2A rs1801274 polymorphism is associatedwith risk of childhood - onset idiopathic (immune) thrombocytopenic purpura: evidence from a Meta - analysis[J]. Thromb Res, 2014, 134(6): 1323 - 1327

6 Xu Y, Li J, Yang W, *et al*. A pooling genome - wide association study identifies susceptibility loci and signaling pathways of immune thrombocytopenia in Chinese Han population[J]. Int J Genomics, 2020, 2020: 7531876

7 侯明, 秦平. 成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(2016 版)解读[J]. 临床血液学杂志, 2016, 29(4): 523 - 527

(下转第 75 页)

于 ANGPTL8 诊断 Hp 阳性肥胖患儿并发 NAFLD 敏感度低的不足,本研究构建了由 FBG、TC、LDL－C、ALT、AST 和 ANGPTL8 组成的列线图回归模型,删除了对预测结果效能低的指标 BMI 和 TG,结果显示该模型的拟合曲线与理想曲线重合度高,C－index 为 0.971,上述结果表明该列线图模型具有较高的精准度和区分度,可有效预判 Hp 阳性肥胖患儿并发 NAFLD。

综上所述,本研究尚存在以下不足:①单中心研究,纳入研究样本量有限;②在样本选取上存在一定偏倚,下一步将开展多中心、大样本量研究验证本研究结论。高水平 ANGPTL8 的 Hp 阳性肥胖患儿并发 NAFLD 风险高。基于 ANGPTL8 构建的列线图回归模型有较高的区分度和精准度,可有效预判 Hp 阳性肥胖患儿并发 NAFLD。

参考文献

1 Canbay A, Kachru N, Haas JS, *et al*. Patterns and predictors of mortality and disease progression among patients with non－alcoholic fatty liver disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2020, 52(7): 1185－1194

2 李婕, 任万华. 儿童非酒精性脂肪性肝病的诊治对策[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(3): 208－212

3 Zhang J, Chen Y, Chen W, *et al*. Persistent infection of Helicobacter pylori affects weight loss in obese population compared with persistent negative: a case－control study based on healthy Chinese[J]. Helicobacter, 2020, 25(4): e12697

4 Maharshi V, Gupta P, Kumar VL, *et al*. Effect of Helicobacter pylori－eradication therapy on hepatic steatosis in patients with non－alcoholic fatty liver disease: a randomized－controlled pilot study[J]. Gastroenterol Rep: Oxf, 2020, 8(2): 104－110

5 Alenad A, Alenezi MM, Alokail MS, *et al*. Association of ANGPTL8 (Betatrophin) gene variants with components of metabolic syndrome in arab adults[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6764

6 Huang JW, Chen CJ, Yen CH, *et al*. Loss of Glycine N－methyltransferase associates with angiopoietin－like protein 8 expression in high fat－diet－fed mice[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17): 4223

7 中国肥胖问题工作组. 中国学龄儿童青少年超重、肥胖筛查体重指数值分类标准[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(2): 97－102

8 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组, 中华医学会儿科学分会消化学组, 中华医学会儿科学分会青春期医学专业委员会, 等. 儿童非酒精性脂肪肝病诊断与治疗专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(7): 487－492

9 Guo C, Zhao Z, Deng X, *et al*. Regulation of angiopoietin－like protein 8 expression under different nutritional and metabolic status[J]. Endocr J, 2019, 66(12): 1039－1046

10 Zhang Z, Wu H, Dai L, *et al*. ANGPTL8 enhances insulin sensitivity by directly activating insulin－mediated AKT phosphorylation[J]. Gene, 2020, 749: 144707

11 Abu－Farha M, Ghosh A, Al－Khairi I, *et al*. The multi－faces of Angptl8 in health and disease: novel functions beyond lipoprotein lipase modulation[J]. Prog Lipid Res, 2020, 80: 101067

12 Zheng T, Ge B, Liu H, *et al*. Triglyceride－mediated influence of serum angiopoietin－like protein 8 on subclinical atherosclerosis in type 2 diabetic patients: results from the GDMD study in China[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 84

13 Hu H, Yuan G, Wang X, *et al*. Effects of a diet with or without physical activity on angiopoietin－like protein 8 concentrations in overweight/obese patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized controlled trial[J]. Endocr J, 2019, 66(1): 89－105

14 Luo M, Zhang Z, Peng Y, *et al*. The negative effect of ANGPTL8 on HDL－mediated cholesterol efflux capacity[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 142

15 Ahn Y, Yun SC, Lee SS, *et al*. Development and validation of a simple index based on non－enhanced CT and clinical factors for prediction of non－alcoholic fatty liver disease[J]. Korean J Radiol, 2020, 21(4): 413－421

16 Mohamed RZ, Jalaludin MY, Anuar Zaini A. Predictors of non－alcoholic fatty liver disease (NAFLD) among children with obesity[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2020, 33(2): 247－253

17 Prokopowicz Z, Malecka－Tendera E, Matusik P. Predictive value of adiposity level, metabolic syndrome, and insulin resistance for the risk of nonalcoholic fatty liver disease diagnosis in obese children[J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2018, 2018: 9465784

18 Qian LL, Wu L, Zhang L, *et al*. Serum biomarkers combined with ultrasonography for early diagnosis of non－alcoholic fatty liver disease confirmed by magnetic resonance spectroscopy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(4): 554－560

19 Seth A, Orkin S, Yodoshi T, *et al*. Severe obesity is associated with liver disease severity in pediatric non－alcoholic fatty liver disease[J]. Pediatr Obes, 2020, 15(2): e12581

(收稿日期: 2020－09－23)
(修回日期: 2021－01－03)

(上接第 41 页)

8 Salvatore P, Karlsen KK, Hansen AG, *et al*. Polycation induced potential dependent structural transitions of oligonucleotide monolayers on Au(111)－surfaces[J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(46): 19092－19098

9 Gouda HM, Kamel NM, Meshaal SS. Association of DNA methyltransferase 3B promotor polymorphism with childhood chronic immune thrombocytopenia[J]. Lab Med, 2016, 47(4): 312－317

10 Abdelghafar MT, El－Kholy RA, Elbedewy TA, *et al*. Impact of CD40 gene polymorphisms on the risk of immune thrombocytopenic purpura[J]. Gene, 2020, 736: 144419

11 Xue CB, Xu ZH, Zhu J, *et al*. Exome sequencing identifies TENM4 as a novel candidate gene for schizophrenia in the SCZD2 locus at 11q14－21[J]. Front Genet, 2018, 9: 725

12 Park YM, Kwock CK, Kim K, *et al*. Interaction between single nucleotide polymorphism and urinary sodium, potassium, and sodium－potassium ratio on the risk of hypertension in Korean adults[J]. Nutrients, 2017, 9(3): 235

13 Hor H, Francescatto L, Bartesaghi L, *et al*. Missense mutations in TENM4, a regulator of axon guidance and central myelination, cause essential tremor[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(20): 5677－5686

14 Ament SA, Szelinger S, GlusmanG, *et al*. Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(11): 3576－3581

(收稿日期:2020－10－19)
(修回日期:2021－01－07)