

信号转导与转录激活因子4基因多态性与子痫前期的相关性研究

李银广, 李珠玉, 李 婕, 侯文汇, 李小青, 林敏欢, 游泽山
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨信号转导与转录激活因子4(*STAT4*)基因 rs10181656 及 rs16833431 位点多态性与子痫前期相关性的关系。【方法】应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测 228 名子痫前期患者(病例组)和 179 名健康孕妇(对照组)的 *STAT4* 基因 rs10181656 C/G 及 rs16833431 C/T 位点的基因型频率。【结果】①rs10181656 位点在病例组中 C/C、C/G 及 G/G 基因型频率分别是 35.96%、47.81% 及 16.23%, 而对照组中的三种基因型的频率分别是 46.37%、44.69% 及 8.94%, C/C、C/G 及 G/G 基因型频率在病例组和对照组中分布具有统计学差异($P = 0.031$), C、G 等位基因频率在病例组和对照组中分布具有统计学差异($P = 0.009$); ②rs16833431 位点: 三种基因型和 C、T 等位基因频率在病例组和对照组的分布无统计学意义($P = 0.508, 0.461$)。【结论】*STAT4* 基因 rs10181656 位点多态性与子痫前期相关, 而 rs16833431 位点多态性与子痫前期发病无关。

关键词:子痫前期; 信号转导与转录激活因子4; 基因多态性

中图分类号: R714.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)05-0705-05

Association of Polymorphisms of Signal Transducer and Activator of Transcription 4 with the Susceptibility to Preeclampsia

LI Yin-guang, LI Zhu-yu, LI Jie, HOU Wen-hui, LI Xiao-qing, LIN Min-huan, YOU Ze-shan

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: YOU Ze-shan, E-mail: youzeshan888@21cn.com

Abstract: 【Objective】 To investigate associations between the functional polymorphisms of signal transducer and activator of transcription 4 (*STAT4*) gene and preeclampsia. 【Methods】 PCR-restriction fragment length polymorphism was used to genotype rs10181656 and rs16833431 local polymorphism in 228 preeclampsia cases and 179 normal controls. 【Results】 (1) The frequencies of rs10181656 C/G were 35.96%, 46.37% in genotype C/C, 47.81%, 44.69% in genotype C/G and 16.23%, 8.94% in genotype G/G between preeclampsia patients and normal controls. They reached statistical difference ($P = 0.031$). There was different distribution in two alleles (C and G) between preeclampsia patients and normal controls ($P = 0.009$). (2) There was no different distribution in 3 genotypes (C/C, C/T, T/T) and 2 alleles (C and T) of rs16833431 C/T between preeclampsia patients and normal controls ($P = 0.508, 0.461$). 【Conclusions】 Functional polymorphisms of the rs10181656 locus could associate with the preeclampsia. The polymorphisms of the rs16833431 locus could not associate with the preeclampsia.

Key words: preeclampsia; signal transducer and activator of transcription 4; polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(5): 705-709]

子痫前期是妊娠期特有疾病,对母婴健康造成严重危害。子痫前期的病因复杂,发病机制不明,可能与氧化应激、过度炎症反应、遗传及免疫

因素等有关,目前研究显示子痫前期的发病机理与自然流产存在许多相似之处:母-胎免疫耐受的异常导致母体对胎儿这种特殊半同种“天然移

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 广东省自然科学基金(S2011010003522)

作者简介: 李银广, 医学硕士, 研究方向: 生殖免疫及肿瘤免疫临床研究, E-mail: liyinguang2012@163.com; 游泽山, 通信作者, 硕士生导师, 主任医师, E-mail: youzeshan888@21cn.com

植物”的排斥而发病^[1]。确实自然流产与子痫前期拥有着共同的易感基因,如HLA-G^[2]、Foxp3^[3]等,前期我们研究发现STAT4基因多态性显著增加自然流产发病风险^[4],而范广来^[5]等研究表明STAT4在子痫前期患者胎盘及血清组织中都是高表达状态,由上可见STAT4与子痫前期关系密切,但STAT4基因多态性与子痫前期相关性的研究尚未见文献报道,本文从生殖免疫和分子遗传学角度来探讨子痫前期的发病机理,为子痫前期的防治提供可能的理论参考。

1 材料与方 法

1.1 实验对象

1.1.1 病例组 子痫前期228例,自2012年12月至2016年12月间,在中山一院妇产科就诊,年龄21~38岁,平均29.4岁;依照妊娠期高血压疾病诊治指南(2012年版)诊断为子痫前期,并排除染色体及生殖道感染性疾病,无免疫性及代谢内分泌疾病。

1.1.2 对照组 179例,来自同期就诊健康孕妇,年龄20~37岁,平均28.5岁,至少一次正常孕育史,无不良妊娠史,无免疫性及代谢内分泌疾病。

1.2 方 法

1.2.1 DNA提取 经实验对象知情同意,并经中山大学附属第一医院医学伦理委员会批复,对每例实验对象(病例组228例和对照组179例)取3 mL外周血,按照DNA试剂盒实验步骤提取基因组DNA,-20℃保存备用。

1.2.2 PCR-RFLP法检测基因型 利用Primer premier 5.0对rs10181656和rs16833431位点设计两对扩增引物(表1)。每管PCR配兑体系:样本DNA 5 μL、上下游特异扩增引物各2 μL、Takara Ex Tap Mix 15 μL、加入双蒸水配制到30 μL;反应条件:先95℃预变性5 min 1次,接着94℃变性30 s,退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环,72℃延伸7 min。取10 μL PCR产物加入1 μL限制性内切酶和2 μL缓冲液(Fermentas),加注射灭菌水配成30 μL的酶切反应液,在37℃恒温箱反应12 h。取10 μL酶切后的反应液行电泳,随机挑出10%的样本重复上述过程,所得基因分型电泳图和上次结果完全一致。

1.3 统计学分析

采用Excel计数基因型、等位基因频率及Hardy-Weinberg平衡吻合度,利用SPSS 13.0软件对基因型和等位基因频率等定性资料差异比较行 χ^2 检验、非条件Logistic回归分析,设定 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P\leq 0.05$ 时差异具有统计学意义。

表1 基因分型中所用的引物序列及相关产物

Table 1 Primer sequences used in genotyping and related products

Site allele	Upstream primer	Downstream primer	Annealing temperature	PCR product	Enzyme digestion product
rs10181656	5'-ACTGTGATAGATAA	5'-AAAGCAGGGAAC	56℃		DdeI
C/G	CTAGCTGGAAT-3'	AGGAAGAT-3'		400 bp	237 bp + 163 bp
s16833431	5'-TTAGCCTGCCTCC	5'-GCGCCTACCTAAC	60℃		MspI
C/T	CTCTTC-3'	CAGGAAAT-3'		170 bp	123 bp + 47 bp

2 结 果

2.1 基因型判定

rs10181656位点PCR扩增目的产物片段长度400 bp(图1),完全没有被内切酶DdeI内切的是CC基因型,只有部分被酶切为400、237及163 bp片段的是C/G,彻底被酶切为237和163 bp片段是G/G;rs16833431:T/T(170 bp),T/C(170、123及47 bp)和C/C(123及47 bp),47 bp条带弥散到胶外不能显示。

2.2 STAT4基因两位点的H-W平衡检验

经 χ^2 检验rs10181656及rs16833431位点的基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡(病例组和对照组 P 均 > 0.05),具有群体代表意义。

2.3 频率分布

经 χ^2 检验及非条件Logistic回归统计分析,rs10181656位点基因型和等位基因频率在两组中的差异具有统计学意义,rs16833431位点基因型和等位基因频率在两组中的差异未达到统计学意义(表2)。

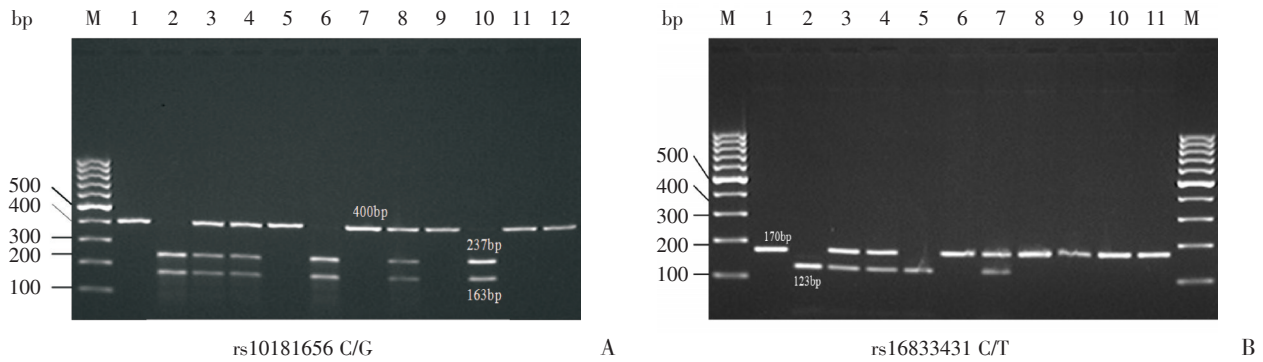


图1 STAT4基因两位点的PCR产物酶切后的电泳图

Fig.1 Typical band patterns of PCR-RFLP products in two local of STAT4 gene

Panel (A) is the band pattern for rs10181656. Lane 1, 5, 7, 9, 11 and 12 indicated C/C genotype; Lane 2, 6, 10 indicated G/G genotype; Lane 3, 4, 8 indicated C/G genotype; Panel (B) is the band pattern for rs16833431. Lane 1, 6, 8, 9, 10, 11 indicated T/T genotype; Lane 2 and 5 indicated C/C genotype; Lane 3, 4, 7 indicated T/C genotype; M represented 100 bp DNA ladder.

表2 rs10181656及rs16833431位点的基因型及等位基因在各组的频率及统计分析

Table 2 Genotype and allele frequencies of rs10181656 and rs16833431 loca in STAT4 gene in each groups

Loca	Genotype allele	Case group n (%)	Control group n (%)	χ^2 value	P value	OR(95%CI)
rs10181656	C/C	82(36.0)	83(46.4)	6.978	0.031 ¹⁾	1
	C/G	109(47.8)	80(44.7)	2.255	0.133 ²⁾	-
	G/G	37(16.2)	16(9.0)	6.547	0.011 ²⁾	0.472(0.221,0.827)
	C/C	82(36.0)	83(46.4)	-	-	-
	C/G+G/G	146(64.0)	96(53.6)	4.503	0.034 ²⁾	0.650(0.436,0.968)
	C/G	109(47.8)	80(44.7)	-	-	-
	C/C+G/G	119(52.2)	99(55.3)	0.391	0.532 ²⁾	-
	G/G	37(16.2)	16(9.0)	-	-	-
	C/C+C/G	191(83.8)	163(91.1)	4.704	0.030 ²⁾	1.973(1.059,3.678)
	C	273(59.9)	246(68.7)	-	-	-
rs16833431	G	183(40.1)	112(31.3)	6.793	0.009 ³⁾	0.679(0.507,0.909)
	T/T	112(49.1)	90(50.3)	-	-	-
	T/C	86(37.7)	72(40.2)	-	-	-
	C/C	30(13.2)	17(9.5)	1.353	0.508 ¹⁾	-
	T/T	112(49.1)	90(50.3)	-	-	-
	T/C+C/C	116(50.9)	89(49.7)	0.054	0.817 ²⁾	-
	T/C	86(37.7)	72(40.2)	-	-	-
	T/T+C/C	142(62.3)	107(59.8)	0.265	0.607 ²⁾	-
	C/C	30(13.1)	17(9.5)	-	-	-
	T/T+T/C	198(86.8)	162(90.5)	1.316	0.251 ²⁾	-
T	310(68.0)	252(70.4)	-	-	-	
C	146(32.0)	106(29.6)	0.544	0.461 ³⁾	-	

1) was determined by Pearson's chi-square test for 3x2 contingency tables; 2), 3) was determined by Pearson's chi-square test for 2x2 contingency tables; 1) $P \leq 0.05$, 2) $P \leq 0.017$, 3) $P \leq 0.05$ are considered statistically significant. "-" represented vacancies or no significance.

3 讨论

妊娠是一种半同种异体移植过程,成功妊娠依赖于母方对父方抗原恰当的免疫耐受。而免疫耐受一旦打破,就可能導致不良妊娠结局,如子痫前期^[6]等。研究显示,由辅助性T细胞分化而来的Th1、Th2、Th17及Treg细胞及其之间的平衡,在维持正常妊娠中扮演着重要的角色^[7],Th1细胞的免疫作用及分泌的IL-2等炎症因子,对妊娠产生免疫毒害作用,而Th2细胞则对妊娠产生免疫耐受和保护作用^[8],Treg数量减少或Th17数量增加导致强烈的炎症反应和T细胞分化及功能的失调,进而导致子痫前期的发生^[9];而STAT4能够促进辅助性T细胞向Th1细胞分化^[10]及刺激Th17细胞的活化^[11],抑制Foxp3+Treg细胞的免疫抑制功能^[12]。而范广来等研究发现STAT4在子痫前期患者胎盘及血清组织中都是高表达状态^[5],由此推测子痫前期患者中增高的STAT4通过JAK-STAT信号通路改变Th1/Th2/Th17/Foxp3+Treg细胞的免疫平衡状态,正常妊娠时免疫耐受遭到破坏,进而引起子痫前期的发病。

从生殖免疫的角度,免疫耐受异常可能是子痫前期与自然流产共同的发病原因^[6],目前研究显示子痫前期不仅与复发性自然流产拥有共同的易感基因,而且与免疫性疾病亦有着共同的易感基因,如HLA-G^[2]、Foxp3^[3]等。研究发现,STAT4基因rs10181656位点G等位基因明显增加SLE^[13]等免疫性疾病的发病风险。本研究显示,子痫前期患者rs10181656 GG基因型及G等位基因频率显著高于对照组;与C等位基因和CC基因型比较,携带G等位基因和GG基因型患者发生子痫前期的风险明显增加(OR = 0.679, 0.650)。Sigurdsson等研究发现在SLE患者中携带rs10181656 G危险等位基因的患者的成骨细胞中出现了STAT4基因过度表达的现象^[14],而我们前期研究发现在自然流产病人中rs10181656 G等位基因与STAT4基因表达量成正相关^[15],但在子痫前期患者中是否存在rs10181656 G等位基因与STAT4基因表达相关,导致高频率的G等位基因,使子痫前期患者中STAT4基因的表达量增加而引发子痫前期,还需要实验进一步的确定。

rs10181656位点位于STAT4基因的第三内含

子,尽管mRNA前体在转录为mRNA的成熟过程中被剪切掉了,没有参与编码STAT4蛋白,但是目前研究认为,在真核细胞基因组内的进化过程中保留下来的大量内含子携带了靶基因的调控功能,在基因进化过程起到了积极的作用^[16]。STAT4基因的广阔第三内含子(占STAT4基因长度一半以上),在人类长久的进化过程中被保留下来,可能是人类进化过程中的潜能所在,还有待于继续进化,但是考虑到人类基因是最节俭的基因,是最大化实现人体细胞资源的优化配置,所以更可能是存在鲜为人知的特殊功能,可能通过突变等调控STAT4基因的转录及影响剪切异构体的表达^[17]。不过,在子痫前期中rs10181656位点多态性调控STAT4基因表达的机制还有待进一步的确定和探讨。

rs16833431位点位于STAT4基因的启动子区,我们推测其可能与STAT4基因的转录调控有关,但是孙保东等^[18]研究了rs16833431位点多态性与SLE的相关性,得出了阴性结果,而我们的研究发现三种基因型和C、T等位基因频率在病例组和对照组的分布无统计学意义($P = 0.508, 0.461$),rs16833431位点不是STAT4基因对子痫前期的易感位点。

综上,本研究首次发现了STAT4基因rs10181656位点多态性与子痫前期相关。计划进一步实验证实,在子痫前期中rs10181656位点G等位基因与STAT4基因表达量的相关关系,从而为通过调控STAT4表达水平使得Th1/Th2/Th17/Treg细胞恢复正常妊娠的平衡状态,提供理论参考,进而期望子痫前期得到防治。

参考文献

- [1] 王松存, 杜美蓉, 李大金. 母-胎免疫耐受研究进展[J]. 科学通报, 2016, 61(27): 2996-3001.
Wang SC, Du MR, Li DJ. Research progress of maternal-fetal tolerance [J]. Chin Sci Bull, 2016, 61(27): 2996-3001.
- [2] Pabalan N, Jarjanazi H, Sun C, et al. Meta-analysis of the human leukocyte antigen-G (HLA-G) 14 bp insertion/deletion polymorphism as a risk factor for pre-eclampsia [J]. Tissue Antigens, 2015, 86(3): 186-194.
- [3] Norouzian M, Rahimzadeh M, Rajaee M, et al. FoxP3 gene promoter polymorphism affects susceptibility to

- preeclampsia [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77 (12) : 1232-1238.
- [4] Li YG, You ZS, Wu ZG, et al. Association of polymorphisms in signal transducer and activator of transcription 4 gene and the susceptibility to unexplained recurrent spontaneous abortions [J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2013, 48(9): 671-675.
- [5] 范广来, 魏红, 武荣, 等. STAT4 和 STAT6 在子痫前期胎盘及血清组织中的表达及意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(06): 1264-1267.
- Fan GL, Wei H, Wu R, et al. Expressions of STAT4 and STAT6 in placenta and serum of patients with preeclampsia and the significance [J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2016, 31(06): 1264-1267.
- [6] Wilczynski JR. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia—the same basic mechanism? [J]. *Hum Immunol*, 2006, 67(7): 492-511.
- [7] Mjosberg J, Berg G, Jenmalm MC, et al. FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(4): 698-705.
- [8] Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a Th2 phenomenon? [J]. *Immunol Today*, 1993, 14(7): 353-356.
- [9] Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, et al. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia [J]. *J Reprod Immunol*, 2012, 93(2): 75-81.
- [10] Nishikomori R, Usui T, Wu CY, et al. Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signaling [J]. *J Immunol*, 2002, 169(8): 4388-4398.
- [11] Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells [J]. *J Immunol*, 2007, 178(8): 4901-4907.
- [12] Xu J, Yang Y, Qiu G, et al. Stat4 is critical for the balance between Th17 cells and regulatory T cells in colitis [J]. *J Immunol*, 2011, 186(11): 6597-6606.
- [13] Alarcon-Riquelme ME, Ziegler JT, Molineros J, et al. Genome-wide association study in an Amerindian ancestry population reveals novel systemic lupus erythematosus risk loci and the role of European admixture [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(4): 932-943.
- [14] Sigurdsson S, Nordmark G, Garnier S, et al. A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5 [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(18): 2868-2876.
- [15] 李银广, 李婕, 刘俊, 等. 信号转导和转录激活因子4基因 rs10181656 位点的多态性与不明原因复发性自然流产相关性 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(4): 551-555.
- Li YG, Li J, Liu J, et al. Association of rs10181656 polymorphism in signal transducer and activator of transcription 4 gene with susceptibility to unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(4): 551-555.
- [16] Fedorova L, Fedorov A. Introns in gene evolution [J]. *Genetica*, 2003, 118(2-3): 123-131.
- [17] Korman BD, Kastner DL, Gregersen PK, et al. STAT4: Genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2008, 8(5): 398-403.
- [18] 孙保东, 洪小平, 蔡文虹, 等. STAT4 基因启动子区单核苷酸多态性与系统性红斑狼疮相关性研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 3(13): 999-1000.
- Sun BD, Hong XP, Cai WH, et al. The relevant research of STAT4 rs16833431 single nucleotide polymorphism with susceptibility of systemic lupus erythematosus in the Chinese Han ethnic population from Shenzhen [J]. *J Clin Exp Med*, 2013, 3(13): 999-1000.

(编辑 余菁)