

# TLR3 基因单核苷酸多态性与儿童紫癜性肾炎的相关性

屈凤祥 常红 林毅

(青岛大学附属医院儿科, 山东 青岛 266003)

**[摘要]** 目的 探讨 TLR3 基因单核苷酸多态性与儿童过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)及紫癜性肾炎(Henoch-Schönlein purpura nephritis, HSPN)易感性的相关性。方法 选择 HSP 患儿 174 例作为病例组, 选择同期体检的 162 例健康儿童作为对照组。根据病例组患儿在随访过程中是否合并肾脏损害分为 HSP 组、HSPN 组。采用多重聚合酶链反应技术(M-PCR)靶向捕获 TLR3 基因 rs35311343、rs121434431、rs199768900、rs768091235、rs1244010954 位点, 通过高通量测序技术对所有样本的上述位点进行测序, 根据测序结果进行各位点基因型以及基因频率的统计分析。结果 病例组与对照组 TLR3 基因 rs35311343、rs121434431、rs199768900、rs768091235、rs1244010954 位点的各基因型频率和各等位基因频率比较, 差异无显著意义( $P>0.05$ )。病例组中 HSP 组与 HSPN 组 TLR3 基因 rs121434431、rs199768900、rs768091235、rs1244010954 位点的各基因型频率和各等位基因频率比较, 差异无显著性( $P>0.05$ ); rs35311343 位点的基因型频率与等位基因频率比较差异有显著性( $\chi^2=9.492, OR=2.662, 95\%CI=1.342\sim 5.281, P<0.05$ )。结论 TLR3 基因 rs35311343 位点 CG 基因型与儿童过敏性紫癜肾脏受累有关, 等位基因 G 可能是 HSPN 的易感基因。

**[关键词]** 紫癜, 过敏性; Toll 样受体 3; 多态性, 单核苷酸; 肾炎; 高通量核苷酸序列分析; 儿童

**[中图分类号]** R726.92; R554.6

**[文献标志码]** A

**Association of single nucleotide polymorphisms of the TLR3 gene with Henoch-Schönlein purpura in children** QU Fengxiang, CHANG Hong, LIN Yi (Department of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the association of single nucleotide polymorphisms of the TLR3 gene with susceptibility to Henoch-Schönlein purpura (HSP) and Henoch-Schönlein purpura nephritis (HSPN) in children. **Methods** A total of 174 children with HSP were enrolled as case group, and 162 healthy children who underwent physical examination during the same period of time were enrolled as control group. The children in the case group were divided into HSP group and HSPN group according to the presence or absence of renal damage during follow-up. Multiplex polymerase chain reaction was used for targeted capture of the rs35311343, rs121434431, rs199768900, rs768091235, and rs1244010954 loci of the TLR3 gene, high-throughput sequencing was performed for the above loci of all samples, and a statistical analysis was performed for the genotype and gene frequency of each locus. **Results** There were no significant differences in the genotype and allele frequencies of the rs35311343, rs121434431, rs199768900, rs768091235, and rs1244010954 loci of the TLR3 gene between the case group and the control group ( $P>0.05$ ). For the case group, there were no significant differences in the genotype and allele frequencies of the rs121434431, rs199768900, rs768091235, and rs1244010954 loci of the TLR3 gene between the HSP group and the HSPN group ( $P>0.05$ ), while there was a significant difference in the genotype and allele frequencies of the rs35311343 locus between the two groups ( $\chi^2=9.492, OR=2.662, 95\%CI=1.342\sim 5.281, P<0.05$ ). **Conclusion** The CG genotype of the rs35311343 locus of the TLR3 gene is associated with renal involvement in children with HSP, and allele G may be a susceptibility gene for HSPN.

**[KEY WORDS]** Purpura, schoenlein-henoch; Toll-like receptor 3; Polymorphism, single nucleotide; Nephritis; High-throughput nucleotide sequencing; Child

儿童过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)是一种常发生于儿童的小血管炎, 可导致各种临床症状, 如皮肤紫癜、关节炎和(或)关节痛、腹痛和肾脏受累。据报道, 20%~55%的过敏性紫癜患儿会发生肾脏受累<sup>[1]</sup>, 其中部分肾损害可进展为肾

功能不全, 这决定了 HSP 患儿的远期预后。目前 HSP 的发病率呈逐年增高趋势, 但是其确切的病因和发病机制仍不十分清楚。T 细胞功能改变、细胞因子分泌异常、炎症递质参与、凝血与纤溶机制紊乱以及易感基因等多方面因素可能均参与了该病的发病过程<sup>[2]</sup>。

Toll 样受体(TLRs)是一种非特异性的天然免疫受体, 可特异性识别 dsRNA, 最终诱导一型干扰

**[收稿日期]** 2023-10-19; **[修订日期]** 2024-01-18

**[基金项目]** 青岛大学附属医院临床医学+X 科研项目(2019+X017)

**[通讯作者]** 常红, Email:18661802671@yeah.net

素以及炎性细胞因子、趋化因子的产生。TLR3 基因存在多个单核苷酸多态性(SNP)位点,而编码区 DNA 序列中 SNP 的出现会影响到 TLR3 蛋白的结构、功能或表达水平,引起下游信号通路功能障碍,从而导致自身免疫性疾病发生风险升高。因此,本研究旨在对 TLR3 基因 rs35311343、rs121434431、rs199768900、rs768091235、rs1244010954 的 SNP 与 HSP 以及紫癜性肾炎(Henoch-Schönlein purpura nephritis, HSPN)的相关性进行研究和探讨,以期 HSPN 的个性化治疗提供理论依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选择 2017 年 1 月—2019 年 12 月青岛大学附属医院儿科收治的 174 例 HSP 患儿作为病例组,根据病例组患儿在随诊期间是否出现肾脏受累表现,分为 HSP 组(104 例)和 HSPN 组(70 例),病例组患儿随访时间至少为 6 个月,平均的随诊时间为(9.1±2.7)月。此外,选择同一时期儿童保健科体检的 162 例年龄匹配的健康儿童作为对照组。

### 1.2 诊断标准

HSP 的诊断参考 2006 年 EULAR/PReS 制定儿童血管炎的分类标准<sup>[3]</sup>。紫癜性肾炎的诊断参考中华医学会儿科学分会肾脏病学组 2009 年制定的紫癜性肾炎的诊治循证指南(试行)中的标准<sup>[4]</sup>。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 标本收集及 DNA 提取** 清晨采集所有受试者空腹外周静脉血 2 mL,置于 EDTA 抗凝管中,使用-80 °C 超低温冰箱保存备用。使用天根生化科技(北京)有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。

**1.3.2 目的基因 SNP 分析** 应用 Primer 3 软件针对目的基因全长进行特异性多重引物设计(表 1)。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。PCR 反应扩增条件:94 °C 预变性 3 min;然后 95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,72 °C 延伸 5 min,共 30 个循环。将扩增后的 DNA 进行 qPCR 检测。按照 SOP 标准将桥式 PCR 产物放置 Illumina X-10 平台上机测序。根据测序结果进行各位点基因型及基因频率的统计分析。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行数据的统计分析,以 Sequencer 4.9 软件对测序结果进行分析。定性资料采用例(率)表示,两组间定性资料的比较采用卡

方检验,采用 95%CI 和优势比(OR)评价基因位点与各组间的相关性。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度 (bp)
Rs35311343	F:5'-TAAAGTGGACAAATCTCACTATGC-3' 24 R:5'-AGGCAAGGGAAATACTTTGTTAG-3' 24	
Rs121434431	F:5'-GAAATTCTCGATTTGCAGCATAAC-3' 24 R:5'-TATTAAAGACAGATGCTGGAAGTG-3' 24	
Rs199768900	F:5'-TTAGATTCAAGGTACATCATGCAG-3' 24 R:5'-GCTACTTGCAATTTATGACGAAAAG-3' 24	
Rs768091235	F:5'-ACTCCCAAGATTGATGATTTTTTC-3' 24 R:5'-TTAGGTTGAGTATGTGTAAGGGAG-3' 24	
Rs1244010954	F:5'-GGGAACATTTCTCTTCAATGGAA-3' 23 R:5'-CAAGTACACACTTAAAATTCACA-28 ATGT-3'	

## 2 结果

### 2.1 病例组与对照组 TLR3 基因各位点基因型频率和等位基因频率比较

病例组与对照组患儿 TLR3 基因 rs35311343、rs121434431、rs199768900、rs768091235、rs1244010954 位点的各基因型频率和各等位基因频率比较,差异无显著性( $P>0.05$ ),见表 2、3。

表 2 病例组与对照组中 TLR3 基因各位点的基因型频率比较[例(χ/%)]

SNP 位点	基因型	对照组	病例组	χ <sup>2</sup>	P
rs35311343	CC	138(85.2)	135(77.6)	3.180	0.075
	CG	24(14.8)	39(22.4)		
rs121434431	CC	101(62.3)	105(60.3)	1.971	0.373
	TC	17(10.5)	27(15.6)		
	TT	44(27.2)	42(24.1)		
rs199768900	AA	33(20.4)	28(16.1)	1.131	0.568
	AG	28(17.3)	34(19.5)		
	GG	101(62.3)	112(64.4)		
rs768091235	CC	37(22.8)	35(20.1)	2.611	0.271
	TC	17(10.5)	11( 6.3)		
	TT	108(66.7)	128(73.6)		
rs1244010954	AA	29(17.9)	25(14.4)	1.109	0.574
	AG	30(18.5)	38(21.8)		
	GG	103(63.6)	111(63.8)		

### 2.2 病例组的 HSP 组与 HSPN 组中 TLR3 基因各位点基因型频率和等位基因频率比较

病例组当中,HSP 组与 HSPN 组患儿 TLR3 基因的 rs121434431、rs199768900、rs768091235 以及 rs1244010954 位点的各基因型频率和各等位基因频率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );HSPN 组患儿 TLR3 基因 rs35311343 位点的 CG 基因型

频率明显高于 HSP 组患儿( $\chi^2 = 9.492, P < 0.05$ ); HSPN 组患儿 *TLR3* 基因 rs35311343 位点 G 等位基因频率明显地高于 HSP 组患儿( $\chi^2 = 8.294, P < 0.05$ ),携带 G 等位基因的患儿发生 HSP 合并肾脏损伤的风险明显地增加( $OR = 2.662, 95\% CI = 1.342 \sim 5.281$ )。见表 4、5。

**表 3 病例组与对照组中 *TLR3* 基因各位点的等位基因频率比较[例( $\chi$ /%)]**

SNP 位点	等位基因	对照组	病例组	OR(95%CI)	P
rs35311343	C	300(92.6)	309(88.8)	0.634(0.372~1.080)	0.091
	G	24(7.4)	39(11.2)		
rs121434431	C	219(67.6)	237(68.1)	1.024(0.740~1.415)	0.887
	T	105(32.4)	111(31.9)		
rs199768900	A	94(29.0)	90(25.9)	0.854(0.608~1.198)	0.360
	G	230(71.0)	258(74.1)		
rs768091235	C	91(28.2)	81(23.3)	0.777(0.549~1.099)	0.153
	T	233(71.9)	267(76.7)		
rs1244010954	A	88(27.2)	88(25.3)	0.908(0.643~1.280)	0.581
	G	236(72.8)	260(74.7)		

**表 4 HSP、HSPN 组中 *TLR3* 基因各位点基因型频率比较[例( $\chi$ /%)]**

SNP 位点	基因型	HSP 组	HSPN 组	$\chi^2$	P
rs35311343	CC	89(85.6)	46(65.7)	9.492	0.002
	CG	15(14.4)	24(34.3)		
rs121434431	CC	59(56.7)	46(65.7)	1.450	0.484
	TC	18(17.3)	9(12.9)		
	TT	27(26.0)	15(21.4)		
rs199768900	AA	14(13.5)	14(20.0)	1.325	0.516
	AG	21(20.2)	13(18.6)		
	GG	69(66.3)	43(61.4)		
rs768091235	CC	21(20.1)	14(20.0)	0.077	0.962
	TC	7(6.7)	4(5.7)		
	TT	76(73.1)	52(74.3)		
rs1244010954	AA	13(12.5)	12(17.1)	1.449	0.484
	AG	21(20.2)	17(24.3)		
	GG	70(67.3)	41(58.6)		

**表 5 HSP、HSPN 组 *TLR3* 基因各位点等位基因频率比较[例( $\chi$ /%)]**

SNP 位点	等位基因	HSP 组	HSPN 组	OR(95%CI)	P
rs35311343	C	193(94.6)	116(82.9)	2.662(1.342~5.281)	0.004
	G	15(5.4)	24(17.1)		
rs121434431	C	136(66.7)	101(72.1)	0.729(0.457~1.164)	0.185
	T	72(33.3)	39(27.9)		
rs199768900	A	49(24.0)	41(29.3)	0.744(0.485~1.208)	0.231
	G	159(76.0)	99(70.7)		
rs768091235	C	49(24.0)	32(22.9)	1.040(0.626~1.729)	0.879
	T	159(76.0)	108(77.1)		
rs1244010954	A	47(23.0)	41(29.3)	0.705(0.433~1.148)	0.159
	G	161(77.0)	99(70.7)		

### 2.3 Hardy-Weinberg 平衡定律检测

Hardy-Weinberg 平衡定律检测的结果显示,受试对象的基因型分布频率差异无显著统计学意义( $P > 0.05$ ),证明受试群体达到遗传平衡,即具有群体代表性。

### 3 讨 论

HSP 是一种常见的由 IgA 介导的系统性血管炎性疾病。4~6 岁儿童发生率最高<sup>[5]</sup>,大多数 HSP 患儿预后极佳。部分患儿病变累及肾脏,可导致不可逆肾脏病。对于 HSP 患儿的临床表现、诊断、治疗已经有了诸多研究,但是关于该病病因与发生机制尚不明确<sup>[6]</sup>。SAITO 等<sup>[7]</sup>研究发现,HSPN 患者的外周血单核细胞中 *TLR3* 基因的表达水平出现明显上调。

TLR 是一个细胞受体家族,在人类其由 10 个成员组成(TLR1~10),由免疫细胞和非免疫细胞不同亚群表达<sup>[8]</sup>。TLRs 产生的信号通过 MAPK 途径和 NF- $\kappa$ B 途径转导,招募细胞内促炎因子和共刺激分子,激发机体炎症反应<sup>[9]</sup>。TLR3 是病毒双链 RNA 的病原体识别受体,已有研究证实 TLR3 会触发 MRL1pr 小鼠中已建立的免疫复合物疾病的恶化<sup>[10]</sup>。目前已有研究发现 *TLR3* 基因的 SNP 与骨关节炎(OA)<sup>[11]</sup>、1 型糖尿病(T1DM)<sup>[12]</sup>、哮喘<sup>[13]</sup>、系统性红斑狼疮(SLE)<sup>[14]</sup>、膀胱癌<sup>[15]</sup>等疾病有关。该基因多态性的改变可能会导致自身免疫性疾病发生风险增高。

本研究中,*TLR3* 基因 rs35311343、rs121434-431、rs199768900、rs768091235、rs1244010954 位点与 HSPN 的发病无明显相关性,该结果可能与各分组选择样本量过少有关系,从而可能导致实验结果出现偏差,后期会通过加大样本量进一步研究。*TLR3* 基因 rs35311343 位点的 CG 基因型以及 G 等位基因频率均与 HSPN 的发病率升高有关系,统计结果提示等位基因 G 在 HSP 组与 HSPN 组中差异也有显著性。因此可以推测,与携带 C 等位基因的 HSP 患儿相比,携带 G 等位基因的 HSP 患儿发生 HSP 后,其合并肾脏损害的风险相应增高。

有学者研究了 TNF- $\alpha$  预处理对多肌苷-聚胞苷酸(polyIC)诱导的 *TLR3* 信号转导的作用,结果显示 *TLR3*/IFN- $\beta$ /RIG-I/CCL5 轴的活化参与了狼疮肾炎的发展,polyIC 可诱导产生短暂性蛋白尿,促使尿 CD80 的排泄,并可增加肾小球足细胞 CD80 的产生,提示 *TLR3* 信号转导参与了活动性肾病综

合征蛋白尿的发生<sup>[16-17]</sup>。

感染是多数 HSP 患儿的诱发因素,中性粒细胞趋化因子 CXC 基序趋化因子 1(CXCL1/GRO $\alpha$ )是强中性粒细胞趋化因子<sup>[18]</sup>。研究发现 TLR3 信号的激活可以诱导肾小球膜细胞中 CXCL1 的表达,其在区域炎症反应中起重要作用<sup>[19]</sup>。另外,肾小球内皮细胞(GECs)中的黏附分子 E-选择素在 GECs 中起重要作用,免疫荧光法检测发现,CXCL1 在新月型和新月型紫癜性肾炎患者肾组织活检标本中表达增高<sup>[18]</sup>。肾小球系膜炎性趋化因子/细胞因子的表达在紫癜性肾炎的发病过程中起着关键作用,细胞因子过度活化可引起全身或局部免疫反应,甚至与自身免疫相互作用,直接或间接造成肾脏损害。

综上所述,TLR3 基因 rs35311343 位点等位基因 G 可能是儿童 HSP 肾脏损害的危险因素,基因调控致患儿血清细胞因子水平改变可能是其致病原因。TLR3 基因多态性对 HSPN 的易感性和患儿的预后具有重要影响。TLR3 基因多态性的研究为患儿的个体化治疗提供了新的方向。

**伦理批准和知情同意:**本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

**作者声明:**常红、屈凤祥参与了实验设计;常红、屈凤祥、林毅参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

[1] JAUHOLA O, RONKAINEN J, KOSKIMIES O, et al. Renal manifestations of Henoch-Schonlein purpura in a 6-month prospective study of 223 children[J]. Arch Dis Child, 2010,95(11):877-882.

[2] RIGANTE D, CASTELLAZZI L, BOSCO A, et al. Is there a crossroad between infections, genetics, and Henoch-Schönlein purpura? [J]. Autoimmun Rev, 2013,12(10):1016-1021.

[3] 吴小川. 儿童过敏性紫癜循证诊治建议解读[J]. 中华儿科杂志, 2013,51(7):508-511.

[4] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(二):紫癜性肾炎的诊治循证指南(试行)[J]. 中华儿科杂志, 2009,47(12):911-913.

[5] GARDNER-MEDWIN J M M, DOLEZALOVA P, CUMMINS C, et al. Incidence of Henoch-Schönlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins[J]. Lancet, 2002,360(9341):1197-1202.

[6] TRNKA P. Henoch-Schönlein purpura in children[J]. J Paediatr Child Health, 2013,49(12):995-1003.

[7] SAITO A, KOMATSUDA A, KAGA H, et al. Different ex-

pression patterns of toll-like receptor mRNAs in blood mononuclear cells of IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis[J]. Tohoku J Exp Med, 2016,240(3):199-208.

[8] DUFFY L, O'REILLY S C. Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases: Recent and emerging translational developments[J]. Immunotargets Ther, 2016,5:69-80.

[9] VIDYA M K, KUMAR V G, SEJIAN V, et al. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals[J]. Int Rev Immunol, 2018,37(1):20-36.

[10] PATOLE P S, PAWAR R D, LICHTNEKERT J, et al. Coactivation of Toll-like receptor-3 and-7 in immune complex glomerulonephritis[J]. J Autoimmun, 2007,29(1):52-59.

[11] YANG H Y, LEE H S, LEE C H, et al. Association of a functional polymorphism in the promoter region of TLR-3 with osteoarthritis: A two-stage case-control study[J]. J Orthop Res, 2013,31(5):680-685.

[12] PIRIE F J, PEGORARO R, MOTALA A A, et al. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in South African Blacks with type 1 diabetes[J]. Tissue Antigens, 2005,66(2):125-130.

[13] RANJITH-KUMAR C T, MILLER W, SUN J C, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms on Toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells[J]. J Biol Chem, 2007,282(24):17696-17705.

[14] LASKA M J, TROLDORF A, HANSEN B, et al. Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females[J]. Rheumatology (Oxford), 2013,53(1):48-55.

[15] SINGH V, SRIVASTAVA N, KAPOOR R, et al. Single-nucleotide polymorphisms in genes encoding toll-like receptor-2, -3, -4, and -9 in a case-control study with bladder cancer susceptibility in a North Indian population[J]. Arch Med Res, 2013,44(1):54-61.

[16] IMAIZUMI T, AIZAWA T, HAYAKARI R, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically enhances polyinosinic-polycytidylic acid-induced toll-like receptor 3 signaling in cultured normal human mesangial cells: Possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis[J]. Clin Exp Nephrol, 2015,19(1):75-81.

[17] ISHIMOTO T, SHIMADA M, GABRIELA G, et al. Toll-like receptor 3 ligand, polyIC, induces proteinuria and glomerular CD80, and increases urinary CD80 in mice[J]. Nephrol Dial Transplant, 2013,28(6):1439-1446.

[18] LIU Q, IMAIZUMI T, KAWAGUCHI S, et al. Toll-like receptor 3 signaling contributes to regional neutrophil recruitment in cultured human glomerular endothelial cells[J]. Nephron, 2018,139(4):349-358.

[19] IMAIZUMI T, AIZAWA T, SEGAWA C, et al. Toll-like receptor 3 signaling contributes to the expression of a neutrophil chemoattractant, CXCL1 in human mesangial cells[J]. Clin Exp Nephrol, 2015,19(5):761-770.