

青海汉族 Graves 病甲状腺肿大与 CTLA-4 基因多态性相关性研究

王淑琼¹, 罗玮², 范培云²

青海省人民医院 (青海 西宁 810000)

摘要:目的 探讨细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 基因外显子 1 的 A/G 多态性与青海汉族弥漫性毒性甲状腺肿 (Graves disease, GD) 患者甲状腺肿大的相关性。

方法 采用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性分析 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法, 检测 90 例青海汉族 GD 患者 CTLA-4 基因外显子 1 的基因型及等位基因, 按有无甲状腺肿大分组后比较基因型及等位基因频率, 并检测两组人血清促甲状腺激素受体抗体水平。**结果** CTLA-4 基因 1+49A/G 位点 GG 基因型频率及 G 等位基因频率、AA 基因型频率及 A 等位基因频率在甲状腺肿大组、无甲状腺肿大组分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 两组比较 TRAb 阳性率, 发现甲状腺肿大 GD 组 TRAb 阳性率高于无甲状腺肿大 GD 组, 差异有显著统计学意义 ($P<0.001$)。**结论** CTLA-4 外显子 1 的 G 等位基因可能与青海汉族 GD 患者发生甲状腺肿大不相关。

关键词: CTLA-4 基因多态性; Graves 病; 甲状腺肿大; 青海汉族

弥漫性毒性甲状腺肿是一种器官特异性自身免疫性疾病, 是由多个基因与环境因素相互作用而引起的复杂多基因病, 其发病机制尚未完全明确, 促甲状腺激素受体自身抗体 (thyroid-stimulating hormone receptor antibody, TRAb) 被认为是引起 GD 主要的和直接的原因。GD 最常见的症状和体征是高代谢症候群、甲状腺肿大以及突眼等, 但临床上也有部分 Graves 病患者的甲状腺并不肿大, 表明 Graves 病患者的甲状腺肿存在个体差异, 并受某些因素影响。近年来研究认为细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (Cytotoxic T lymphocyte associated Antigen

中图分类号: R581.1

文献标识码: A

作者简介: 王淑琼 (1979-) 女, 青海籍, 汉族, 硕士, 主治医师 内分泌专业 E-mail: qhxnwangsq@126.com

通讯作者: 姚勇利, E-mail: 13997063197@126.com

4,CTLA-4) 基因可能为 GD 发病最重要的遗传易感基因, 但其是否也和 GD 甲状腺肿大发生相关联呢? 为此, 本研究 90 例 GD 患者按有无甲状腺肿大分为两组, 通过多聚酶链反应-限制性片断长度多态性(PCR-RFLP)方法, 检测其 CTLA-4 基因外显子 1+49 位点的 A/G 多态性, 比较两组 AA、AG、GG 基因型及 A、G 等位基因频率及 TRAB 水平, 从分子生物学水平分析可能影响 Graves 病患者甲状腺肿大的因素。

1 材料与方**法**

1.1 材料 将 90 例青海汉族 Graves 病患者按有无甲状腺肿大分两组(两组均无其它甲状腺疾病及其它自身免疫性疾病)。GD 组病例来源于青海省人民医院 2011 年 6 月至 2014 年 2 月就诊的门诊和住院的汉族患者, 参照人民卫生出版社《内科学》第七版中 GD 的诊断标准入选病例; 甲状腺肿大组包括: 甲状腺外观无肿大但是能触及者和甲状腺既能看到又能触及者。所有研究对象均为青海籍并出生本地的无亲缘关系的汉族世居居民, 共 90 例, 其中男性 20 例, 女性 70 例, 年龄 15~66 岁, 平均年龄(40.5±25.5)岁; 90 例汉族 GD 患者中甲状腺肿大组(69 例)、不伴甲状腺肿大组(21 例)。

1.2 方**法**

1.2.1 外周血基因组 DNA 提取 全部观察对象于清晨空腹时抽取肘静脉血 5 毫升, 用 EDTA 抗凝, 30 分钟内, 3000 转/分钟, 离心 10 分钟, 分装血浆和血细胞, 负 80 度冰箱保存。采用 TIANGEN, 兰州恒兴生物科技有限公司的基因组提取试剂盒提取外周血基因组 DNA。

1.2.2 聚合酶链反应扩增 上游引物: 5' -CCA CGG CTT CCT TTC TCG TA-3', 下游引物: 5' -AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG-3' 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。反应体系总体积为 50ul, 包括: dNTPs(2 mmol / L)1 ul, 上、下游引物(10 pmol / 微升)各 5 ul, 模板 DNA(0. 2~0. 4 p. g / 斗 1)5 ul, Taq

DNA 聚合酶(5 U / I 上 I)0.5 ul, MgCl₂(25 mmol / L)3 ul, 10xPCR 缓冲液 5 ul, 无菌去离子水 25 ul。反应条件: 95 度预变性 2 分钟后, 按下列程序循环 40 次: 95 度变性 20 秒; 65 度退火 30 s, 72 度延伸 30 s。末次循环后 72 度延伸 10 分钟, 后置 4 度 18 小时结束反应。每一 PCR 产物取 4 μl, 以 1. %琼脂糖凝胶 80 V 电泳分离, 用美国 Kodak Digital2 Science System DC2120 凝胶成像系统扫描成像。

1.2.3 限制性内切酶反应 限制性内切酶 Bbv I(BioLabs. Inc. New England 纽英伦生物技术有限生产)。反应体系总体积 20 ul, 10 x NE Buffer 2 ul, DNA16 ul, 内切酶 0.5ul, 无菌去离子水至 1.5ul。37 度温育 16 h, 取出后置 65℃水浴 20 分钟终止反应。酶切产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外线检测。

1.2.4 TRAb 检测: 所有研究对象均于空腹抽取静脉血 3~5 ml, 用肝素钠抗凝, 离心后留取血清标本, 存放于-20℃冰箱, 于我院核医学科批量检测 TRAb。人血清促甲状腺激素受体抗体放射受体分析试剂盒由天津协和医药科技有限公司提供。

1.2.5 统计方法 运用 Hardy-Weinberg 平衡规律检测样本代表性, 医学统计软件 SPSS 17.0 处理基因型和等位基因频率结果。计数资料各百分率比较用卡方检验, 计量资料采用 t 检验及单因素方差分析, 关联性分析采用独立性检验, 关

联系数采用 ϕ 系数表示, $\phi = \sqrt{\frac{x^2}{n}}$ 。检验显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验: 为了考察资料的可靠性, 对研究对象 CTLA-4 基因型频率进行了 Hardy-Weinberg 平衡检验, 见表 1。检验结果显示: $\chi^2 = 3.383$, $P > 0.05$, 说明 GD 组基因型实际频数与期望频数的差异没有统计学意义, 可以接受三个基因型频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡的假设, 所选人群

是一个遗传平衡的群体，该位点的基因型比例在所研究人群中相对恒定，样本具有群体代表性，可用于群体遗传学研究。

表 1 利用 χ^2 检验 GD 组 CTLA-4 基因型的 Hardy-Weinberg 平衡

| | A/A | A/G | G/G | 合计 |
|----------------------|--------|--------|--------|----------------|
| 实得频率(O) | 5 | 47 | 38 | 90 |
| 预期频率 | np^2 | $2npq$ | nq^2 | n |
| 预期频数(C) | 9.044 | 38.972 | 41.984 | 90 |
| $\chi^2 = (C-O)^2/C$ | 1.810 | 1.650 | 0.378 | $\chi^2=3.383$ |

2.2 甲状腺肿大组和无甲状腺肿大组 CTLA-4 基因 1+49A/G 位各基因型频率及 G 等位基因频率比较

CTLA-4 基因 1+49A/G 位点各基因型(AA、AG、GG)频率及等位基因频率在 GD 患者甲状腺肿大组和无甲状腺肿大组中分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 2。酶切后的电泳结果见图 1。

表 2 GD 组按有无甲状腺肿大分层后 CTLA-4 基因 1+49A/G 位各基因型频率及 G 等位基因频率比较 (%)

| 组别 | 例数 | 基因型 | | | 等位基因 | |
|----------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | A/A | A/G | G/G | A | G |
| 无甲状腺肿大 | 21 | 2 (9.5) | 9 (42.9) | 10 (47.6) | 13 (30.9) | 29 (69.1) |
| 甲状腺肿大 | 69 | 10 (14.5) | 29 (42.0) | 30 (43.5) | 49 (35.5) | 89 (64.5) |
| χ^2 | | | 0.363 | | | 0.296 |
| P | | | 0.834 | | | 0.586 |

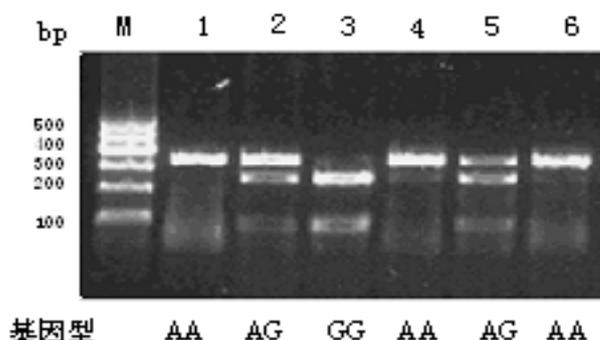


图 1 CTLA-4 外显子 1 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳图

2.3 Graves 病甲状腺肿大与 TRAb 的关联性

90 例 GD 患者按有无甲状腺肿大分为两组，比较两组 TRAb 的阳性率，差异有显著统计学意义($P < 0.001$)；GD 甲状腺肿大与 TRAb 的关联性比较：关联系数 $\phi = 0.618$ ， $P < 0.001$ ，说明二者有较强的关联性。

表 3 Graves 病甲状腺肿大与 TRAb 的关联性[n,(%)]

| 组别 | n | TRAb (+) | TRAb (-) |
|----------|----|-----------|-----------|
| 无甲状腺肿大 | 21 | 5 (23.8) | 16 (76.2) |
| 甲状腺肿大 | 69 | 61 (88.4) | 8 (11.6) |
| χ^2 | | 34.353 | |
| P | | <0.001 | |

3 讨论

GD 是一种由 T 淋巴细胞介导的器官特异性自身免疫性疾病，是由遗传因素和环境因素相互作用所致的多基因病，遗传因素在其病理过程中发挥着重要作用，大约 80%GD 的易感性可归因于遗传因素。近年来认为，CTLA-4 基因可能为

GD 重要的遗传易感基因，其分子产物与 T 细胞的活化密切相关，贯穿整个免疫系统，并影响 GD 的发生、发展，其中 CTLA-4 基因外显子 1+49 位点多态性认为与 GD 的发病密切相关，但其是否也和 GD 患者甲状腺肿大的发生相关联？由于各民族间在等位基因及单倍型分布频率上存在的差异以及地理域的差异，不同地

区、不同人种、不同年龄人群中进行研究国内外研究结果并不一致。Park 等

【1】

对韩国人的研究表明 GD 甲状腺肿大发生与 CTLA-4+49G 等位基因相关连。

Cho 等【2】通过对朝鲜 GD 患者的 CTLA-4+49，CT60，J031，J030，and

J027.1 等多个基因位点的研究后认为 CTLA-4 基因和朝鲜人 GD 甲状腺肿大发生无相关性。

甲状腺自身抗体 TRAb 是引起 GD 主要的和直接的原因, GD 患者 TRAb 刺激甲状腺滤泡上皮细胞的增生, 从而引起甲状腺肿大, 而诸多研究表明 CTLA-4 基因的 G 等位基因与 TRAb 的产生有显著相关性【3】; Tomer 等【4】对 GD 患者 CTLA-4 外显子 1 A/ G 多态性进行分析, 结果提示 A/ G(49) SNP 与甲状腺自身抗体 TRAb 的产生显著相关。Zaletel【5】对美国白种人中多个 AITD 的家族进行基因谱扫描,显示甲状腺自身抗体阳性的个体易感基因座位在染色体 2q33, 且证明与 CTLA-4 基因相关, 与正常对照组相比, 这些家族 G 等位基因型明显增多, 充分显示了 CTLA-4 A /G(49)单核苷酸多态性与甲状腺自身抗体的产生有显著相关性 (P=0.02)。本研究结果显示: GD 病例按有无甲状腺肿大分组后 CTLA-4 基因 1+49A/G 位各基因型频率及 G 等位基因频率比较两组间不存在差异, 两组 AA 基因型频率、GG 基因型频率比较不存在差异, 提示 CTLA-4 基因 1+49G 等位基因可能不是青海汉族 GD 患者发生甲状腺肿大的易感基因; 但两组 TRAB 水平比较存在差异, 说明在 GD 甲状腺肿大患者中 CTLA-4 外显子 1 A/ G 多态性与甲状腺体自身抗体 TRAb 的产生不一定相关, 与 Cho 等研究结果一致。

此外, 从细胞生物学的角度,甲状腺肿大被认为是甲状腺细胞凋亡和增殖失衡, GD 时, 由于 CTLA-4 外显子 1 A/ G 多态性与甲状腺体自身抗体 TRAb 的产生显著相关, 而 TRAb 能抑制 Fas 抗原在甲状腺细胞的表达, 从而抑制 Fas 与 FasL 的相互作用介导的甲状腺细胞凋亡,促进甲状腺细胞增生,进而引起甲状腺肿大【6】。细胞生长因子也被认为是甲状腺细胞增殖的关键因素, 其以内分泌、旁分泌和自分泌等方式广泛而精细地调节甲状腺细胞的生长、分化和功能, 参与甲状腺疾病的发生发展过程, 已经发现多种细胞生长有 IGF-1、FGF、vEGF、HGF、TGF- β 等, 而 CTLA-4 可促进 T 细胞分泌 TGF- β 等

因子【7】，从而促进甲状腺肿大。

不同民族，不同地区、不同人种、研究结果不一致可能原因如下：1、多基因疾病的发生由许多基因共同参与，多个基因效应的累积导致疾病的最终结局，但是每个基因对疾病表现型的贡献率可能很小，因此在定位识别时难以被发现。2、GD 存在遗传异质性或基因外显不全，导致其易感基因的相互关联和相互作用亦存在种族、地区甚至家系的差异。3、GD 的遗传模式尚未确定，使基因与基因之间，基因与环境之间的关系难以预料；4、分析方法上还存在许多不足和缺陷，很多时候容易受单基因疾病研究思路的影响；目前的研究多为对单个基因或数个基因的 SNP 位点的研究，缺乏规模系统性的研究。5、人群的社会地位、生活习惯等诸多因素的存在，使抽样时难以合理分层，对研究结果可能会产生很较大影响。事实上，对于 GD 这类多基因疾病，目前还没有一种方法能够全部鉴定多基因疾病的基因，只有掌握了 GD 的遗传模式，才能够准确的预测基因-基因和基因-环境之间的相互作用，才能对 GD 的危险因素和它们之间的关系进行全面完整的分析。相信随着现代分子生物学技术和遗传统计学、生物信息学的进一步发展，GD 易感基因的鉴定一定会有重大突破。

参考文献:

- [1]. Park YJ,Chang HK,Park DJ,et al. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans[J]. *Thyroid*, 2000,1(6):453-459.
- [2].Cho IL,Chung JH, Kim IS, et al. Lack of a genetic association between the CTLA-4 gene and Graves'disease in Koreans[J].*Thyroid*,2006,16(3):23-29.
- [3] Khalilzadeh O, Mojazi Amiri H, Tahvildari M, et al Pretibial myxedema is associated with polymorphism in exon 1 of CTLA-4 gene in patients with Graves' ophthalmopathy [J]. *Arch Dermatol Res* ,2009 , 301(10) : 719-723 .
- [4] Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, et al. CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86 :1687 - 1693.
- [5]. Zaletel K, Krhin B, Gaberscek S, et al.The influence of the exon 1 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene on thyroid antibody production in patients with newly diagnosed Graves'disease . *Thyroid*, 2002, 12 (5) :

373-376.

[6].Basolo F, Caligo MA, Pinchera A,et al.Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinico-pathological parameters, retinoblastoma gene product, and Ki67 labeling index.Thyroid, 2000,10(9):741-746.

[7]. Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells[J].J Exp Med,1998,188(10), 1849-1857.