

[文章编号] 1000-2200(2015)01-0014-03

· 基础医学 ·

# 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 基因多态性与 Graves 病复发的相关性研究

查秀婧<sup>1</sup>, 毕娅欣<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 (CTLA)-4 基因多态性与 Graves 病 (GD) 复发的相关性。**方法:**选择 102 例 GD 复发患者 (A 组 60 例为停药 3 年内复发 60 例, B 组为 3 年后复发 42 例)、40 例 GD 初发患者和 80 名健康人群 (正常对照组), 应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态技术进行 CTLA-4 基因外显子 1 第 17 密码子 49 位点 A/G 多态性检测。**结果:**CTLA-4 基因第一外显子 49 位点基因型及等位基因的频率分布显示, GD 初发组患者 GG 基因型频率及 G 等位基因频率均高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。GD 复发 A 组 GG 基因型频率均高于 B 组和初发组 ( $P < 0.01$ ), B 组 GG 基因型频率高于 GD 初发组 ( $P < 0.01$ )。**结论:**CTLA-4 基因外显子 1 第 17 密码子 49 位点 A/G 多态性与 GD 的发生存在相关性, 该位点 GG 基因型可能是 GD 患者对抗甲状腺药物疗效差及早期复发的原因。

**[关键词]** Graves 病; 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4; 复发; 基因多态性

[中图分类号] R 581.1

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.01.005

## The correlation of the polymorphism of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene and recurrence of Graves' disease

ZHA Xiu-jing, BI Ya-xin

(1. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233040;

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the correlation of the polymorphism of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) gene and recurrence of Graves' disease (GD). **Methods:** The A/G polymorphisms of CTLA-4 gene exon seventeenth codon 49 locus in 102 patients with GD recurrence, who included 60 recurrence cases within 3 years of withdrawal drug (A group) and 42 recurrence cases after 3 years of withdrawal drug (B group), 40 primary GD patients (primary group) and 80 healthy people (normal control group) were detected using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. **Results:** The frequency distribution of genotype and allele in CTLA-4 gene exon 1 of 49 locus showed that the frequency of GG genotype and G allele in primary GD patients were higher than those in normal control group ( $P < 0.01$ ), the frequency of GG genotype in A group was higher than that in B group and primary group ( $P < 0.01$ ), and the frequency of GG genotype in B group was higher than that in primary group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** The A/G polymorphism of CTLA-4 gene exon seventeenth codon 49 locus is related to the GD occurrence, the GG genotype of which may be the reason of the poor effect of antithyroid drugs and early recurrence in GD patients.

**[Key words]** Graves' disease; cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4; recurrence; gene polymorphism

[收稿日期] 2014-08-19

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第二附属医院 内分泌科, 安徽 蚌埠 233040; 2. 蚌埠医学院第一附属医院 内分泌科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 查秀婧 (1983 -), 女, 硕士研究生, 住院医师。

[通信作者] 毕娅欣, 主任医师。E-mail: biyaxin@medmail.com.cn

Graves 病 (Graves' disease, GD) 是内分泌系统的常见疾病, 是自身免疫性甲状腺病的一种, 大量的流行病学证据<sup>[1-2]</sup>表明, 遗传因素在发病中起重要作用。细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen, CTLA-4) 基因与 GD 发病的关系近年来日益受到重视。CTLA-4 基因多态

[10] Ford NJ, Dorsa DM. 17beta-estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin [J]. *Steroids*, 2002, 67 (?): 1029 - 1040.

[11] Kaja S, Yang SH, Wei J, et al. Estrogen protects the inner retinal from apoptosis and ischemia-induced loss of Ves1-IL/Homer 1c immunoreactive synaptic connections [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (7): 3135 - 3162.

[12] Wickham LA, Gao J, Toda I, et al. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNA in the eye [J]. *Acta Ophthalmologica*, 2000, 78 (2): 146 - 153.

[13] 朱远军, 金敏, 高宗银, 等. 雌激素对兔视网膜缺血再灌注损伤中的谷氨酸浓度的影响 [J]. *中华眼底病杂志*, 2007, 23 (5): 321 - 323.

(本文编辑 刘畅)

性导致的分子表达和功能缺陷,可能参与了 GD 的发病、缓解及复发过程。本研究旨在探讨 CTLA-4 第 1 外显子 49 位点 A/G 多态性与 GD 的相关性,以及与 GD 患者抗甲状腺药物治疗后复发的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 病例选择** 选择蚌埠医学院第一附属医院 102 例 GD 复发患者、40 例 GD 初发患者及 80 名健康人群。102 例 GD 复发患者中男 26 例,女 76 例;中位年龄 32.2 岁;有 GD 病史,经抗甲状腺药物正规治疗 1 年半以上,停药至少 6 个月后复发患者,其中根据停药后的复发时间分为两个亚组:停药 3 年内复发者 60 例为 A 组,3 年后复发者 42 例为 B 组。初发组 40 例患者中男 11 例,女 29 例;中位年龄 26.0 岁。80 名健康人群(正常对照组)中男 24 名,女 56 名;中位年龄 28.3 岁;为体检中心的健康人群(无甲状腺疾病及其他自身免疫性疾病)。患者均有明显的高代谢征候群,甲状腺弥漫性肿大,伴或不伴突眼,游离三碘甲状腺原氨酸、游离四碘甲状腺原氨酸升高,促甲状腺激素降低,甲状腺吸碘率增高,排除甲状腺炎、高功能腺瘤、毒性结节性甲状腺肿、甲状腺癌等。

## 1.2 方法

**1.2.1 仪器及试剂** 基因组 DNA 提取:抽取静脉血 3 ml,EDTA-K2 抗凝管保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱,采用宝生物工程(大连)有限公司提供的 DV811A DNA 提取试剂盒提取外周血白细胞 DNA。PCR 相关试剂及限制性内切酶 Nco I、Msp I 由上海生工生物技术有限公司提供。

**1.2.2 引物设计及合成** 根据 Genebank 查找到对应基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计上下游引物,由上海生工生物工程有限公司合成。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'。扩增的目的基因片段长 327 bp。

**1.2.3 PCR 扩增反应体系** PCR Master mix (TaqDNA 聚合酶,  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs) 5.0  $\mu\text{l}$ , 上游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ , 下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 2.0  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$  TE 缓冲液 3.0  $\mu\text{l}$ , 加 dd H<sub>2</sub>O 至总体 25  $\mu\text{l}$ 。94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 后再进入循环, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 共 35 次循环。末次循环 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

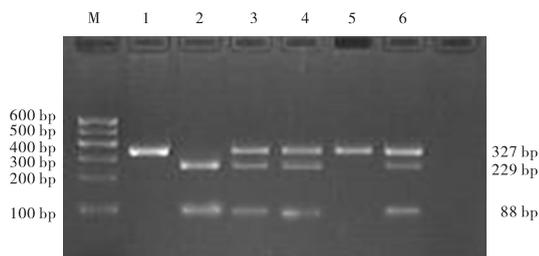
**1.2.4 限制性酶切反应** 反应体系包含 PCR 反应

产物 8.0  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$  Buffer G 1.5  $\mu\text{l}$ , 去离子水 4.5  $\mu\text{l}$ , Bbv I 2 U, 充分混匀后低速离心 15 s, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 4 h, 将反应管置于 65  $^{\circ}\text{C}$  温箱 20 min, 使酶失活, 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.3 统计学方法** 采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验基因型和等位基因频率及  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

**2.1 CTLA-4 基因 PCR 和酶切产物结果** CTLA-4 基因以上述反应体系经 PCR 反应扩增后, 琼脂糖凝胶电泳后紫外分析仪下观察, 可见扩增产物为 327 bp 的片段。CTLA-4 基因 PCR 产物经限制性内切酶 Bbv I 酶切, GG 基因型酶切后有 88 bp、229 bp 2 个片段, AG 基因型酶切后有 88 bp、229 bp、327 bp 3 个片段, AA 基因型只有 327 bp 1 个片段(见图 1)。



M: Marker; 1、5:AA基因型;2:GG基因型;3、4、6:AG基因型  
图1 GG、AG、AA基因型电泳分析图

**2.2 各组基因型及等位基因频率比较** 经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验, 表明各基因型频率已达遗传平衡, 具有群体代表性。研究显示, GD 初发组患者 GG 基因型频率及 G 等位基因频率均高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。GD 复发 A 组和 B 组患者 GG 基因型频率及 G 等位基因频率亦均高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。GD 复发 A 组和 B 组 GG 基因型频率均高于 GD 初发组 ( $P < 0.01$ ), 而 GD 复发 A 组患者 GG 基因型频率亦高于 B 组 ( $P < 0.01$ ) (见表 1)。

## 3 讨论

Graves 病是一种器官特异性自身免疫性疾病, 遗传因素在发病过程中起着至关重要的作用: GD 的发生有明显的家族聚集性, GD 患者家族成员的患病危险性高于普通人群; 同卵双生子的患病一致率明显高于异卵双生子。Brix 等<sup>[3]</sup>认为在 GD 的发病中遗传因素占到 79% 的作用, 但 GD 并不遵循典型的孟德尔式遗传, 其遗传易感性可能由多个外显率不同的基因所决定, 并受环境的影响, 这给易感基因的研究带来了很大困难。但随着人类基因组序列

表1 不同组间 CTLA-4 基因第一外显子 49 位点基因型及等位基因的频率分布比较

分组	n	基因型			等位基因		
		AA	AG	GG	n	A	G
正常对照组	80	34	36	10	160	104	56
GD 初发组	40	6	21	13**	80	33	47**
GD 复发 A 组	60	3	25	32 $\Delta\Delta$ **	120	31	89**
GD 复发 B 组	42	3	30	9 $\Delta\Delta$ ** 9 $\Delta\Delta$ ##	84	36	48**
合计	222	46	112	64	444	204	240
$\chi^2$	—		55.81			43.97	
P	—		<0.01			<0.01	

两两比较;与对照组比较\*\* $P < 0.01$ ;与 GD 初发组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与 GD 复发 A 组比较## $P < 0.01$

和单核苷酸多态性(SNPs)的研究发展,使 GD 易感基因的鉴定取得了一定进展<sup>[4]</sup>。

CTLA-4 是一种膜蛋白,人的 CTLA-4 基因位于第 2 号染色体 q33 区,有 4 个外显子和 3 个内含子。CTLA-4 基因多态性可影响 CTLA-4 分子的表达,而 CTLA-4 功能和/或表达异常可导致自身免疫性疾病的发生、发展<sup>[5-7]</sup>。Khalaf 等<sup>[8]</sup>研究认为,CTLA-4 外显子 1 多态性是中国人系统性红斑狼疮的易感因素。由此可见 CTLA-4 基因和自身免疫性疾病之间有着广泛的联系。Vaidya 等<sup>[9]</sup>研究表明,CTLA-4 外显子 1 的 49 处 G 多态和内含子 1 的多态与 GD 有相关性,而启动子区的多态则与 GD 无相关性。赵玉芹等<sup>[10]</sup>发现在亚洲和欧洲人群中 CTLA-4 + 49 G 等位基因可能增加 GD 的发生风险。

国内 CTLA-4 基因多态性与 GD 的发病、发展、缓解及复发的相关研究近年则较少,我们设计的本实验以探求皖北地区人群两者间的相关性。结果显示,GD 初发组 GG 基因型比率和 G 等位基因比率均较正常对照组高( $P < 0.01$ );GD 复发 A 组 GG 基因型比率较 GD 复发 B 组高( $P < 0.01$ );复发 A 组 GG 基因型比率较初发组高( $P < 0.01$ )。提示 CTLA-4 基因外显子 1 49A/G 多态性与 GD 有相关性,且影响 GD 患者抗甲状腺药物治疗停药后缓解的持续时间,与 GD 的早期复发有关,该结果与 Wang 等<sup>[11]</sup>的研究结果相一致。

CTLA-4 多态性导致 GD 的发生、发展及复发可能有以下几种原因:(1)外显子 1G 等位基因与机体对 T 细胞的增殖控制减低有关,其对免疫的抑制作用降低;(2)A/G 49 SNP Ala/Thr 的置换会导致 CTLA-4 蛋白的表达及糖基化的效率减低;(3)外显

子 1 A49G 的 G 等位基因的 SNP 还与甲状腺抗体、甲状腺球蛋白及甲状腺过氧化物酶抗体的增加密切相关;(4)外显子 1 A49G 与 3'UTR 的 AT 重复序列及其下游的 SNPs 如 CT60、内含子 1 C1882T 等存在着连锁不平衡,GD 的发生可能与这些多态性改变相关联。总之,CTLA-4 基因多态性通过何种机制影响 GD 的发生、发展及复发尚不明确,确切的机制有待于更深入、大范围的临床研究证实。

#### [参 考 文 献]

- [1] Chu X, Pan CM, Zhao SX, *et al.* A genome-wide association study identifies two new risk loci for Graves' disease [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(9): 897 - 901.
- [2] Gu LQ, Zhu W, Zhao SX, *et al.* Clinical associations of the genetic variants of CTLA-4, Tg, TSHR, PTPN22, PTPN12 and FCRL3 in patients with Graves' disease [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 72(2): 248 - 255.
- [3] Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, *et al.* Evidence for a major role of heredity in Graves' disease; a population-based study of two Danish twin cohorts [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(2): 930 - 934.
- [4] 李萍, 李永哲. 单核苷酸多态性及其分型技术在自身免疫性疾病研究中的应用进展 [J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(12): 1116 - 1121.
- [5] Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, *et al.* Pillars article: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation [J]. *J Immunol*, 2011, 187(7): 3466 - 3474.
- [6] Ueda H, Howson JM, Esposito L, *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease [J]. *Nature*, 2003, 423(6939): 506 - 511.
- [7] Jihen B, Mouna S, Fayza A, *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(9): 1473 - 1477.
- [8] Khalaf AT, Song JQ, Gao TT, *et al.* CTLA-4 gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Chinese population [J/OA]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 167395.
- [9] Vaidya B, Oakes EJ, Imrie H, *et al.* CTLA4 gene and Graves disease: association of Graves disease with the CTLA4 exon 1 and intron 1 polymorphisms, but not with the promoter polymorphism [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 58(6): 732 - 735.
- [10] 赵玉芹, 刘晓青, 刘玮. 欧亚人群中 CTLA-4 + 49 基因多态性与 Graves 病遗传易感性关系的 Meta 分析 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(19): 3241 - 3244.
- [11] Wang PW, Liu RT, Juo SH, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 polymorphism and relapse of Graves' hyperthyroidism after antithyroid withdrawal [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(1): 169 - 173.

(本文编辑 刘璐)