

CD40-1C/T 基因多态性与系统性红斑狼疮的相关性研究*

朱琴芳, 丁倩倩, 俞 钱, 李文静, 徐红星

(南京医科大学附属苏州市立医院本部检验科, 江苏苏州 215002)

摘要:目的 研究 CD40 基因 5'非翻译区(5'UTR)-1 位点 C/T 单核苷酸多态性(SNP)在该地区系统性红斑狼疮(SLE)人群中的分布,探讨其与 SLE 的易感相关性。方法 采用病例-对照研究方法,以 107 例门诊和住院 SLE 患者为研究对象,与 109 例正常对照组进行研究。应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)测定 CD40 基因-1 位点 C/T 单核苷酸多态性,计算基因型及等位基因频率;同时将 CD40 基因-1C/T 位点的三种基因型与 SLE 患者各种自身抗体检测结果进行比较。结果 CD40 基因-1C/T 位点的基因型频率在 SLE 组和对照组中的分布差异有统计学显著性意义($P=0.035$),其中 SLE 组的 CC 基因型频率明显高于对照组(OR 值=2.020, $P=0.016$),CT 基因型频率明显低于对照组(OR 值=0.528, $P=0.020$);而等位基因频率分布差异无统计学意义($P=0.114$)。SLE 患者的抗 RNP,抗 SSA,抗 SSB,抗 dsDNA 和抗组蛋白抗体在 CC 基因型中的阳性率最高。结论 CD40 基因 5'非翻译区-1 位点 CC 基因型可能与该地区 SLE 的发生有关。

关键词:CD40;系统性红斑狼疮;基因多态性

中图分类号:R593.241;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)06-046-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.013

Association of CD40 Gene Polymorphism with the Systemic Lupus Erythematosus

ZHU Qin-fang, DING Qian-qian, YU Qian, LI Wen-jing, XU Hong-xing

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated

Suzhou Minicipal Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Suzhou 215002, China)

Abstract:Objective To investigate the distribution of CD40 gene 5'-untranslated region(5'-UTR) -1 site C/T single nucleotide polymorphism (SNP) and to study its relationship with local systemic lupus erythematosus(SLE) population. **Methods** 107 cases were selected from outpatient and inpatient of SLE patients for the study, another 109 healthy person chosen from healthy examined people were control group. The genotype and allele frequencies of CD40 gene polymorphism were assayed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Meanwhile, the prevalences of every auto-antibodies in three genotypes were compared. **Results** Significant differences were observed in CD40-1C/T genotype frequency between the SLE group and control group ($P=0.035$). CC genotype frequency in SLE group was significantly higher than that in the control group (OR=2.020, $P=0.016$), and CT genotype was significantly lower than that in the control group (OR=0.528, $P=0.020$). However, there was no significant difference ($P=0.114$) about the allele frequency distribution between two groups. The prevalences of anti-RNP, anti-SSA, anti-SSB, anti-dsDNA and anti-histones antibodies in CC genotype were high. **Conclusion** CC genotype of CD40 gene 5'-untranslated region-1 site might be associated with the development of the systemic lupus erythematosus in this region.

Keywords:CD40;systemic lupus erythematosus(SLE);gene polymorphism

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多器官、多系统的自身免疫性疾病,多种遗传机制的异常参与了 SLE 的发病机制^[1]。CD40 是分子量为 48~50ku 的 I 型跨膜糖类蛋白抗原,属于肿瘤坏死因子受体家族,CD40 与其配体 CD40L 结合,是免疫细胞间重要的信号转导途径,对 T/B 细胞活化和细胞因子的产生起诱导作用,参与 Graves 病, SLES 等^[2]多种自身免疫性疾病的发生。CD40 基因位于 20 号染色体的长臂,由 9 个外显子和 8 个内含子构成,CD40 基因 5'UTR-1 位点位于 CD40

基因翻译起始密码子前一位,存在 T→C 多态性。据报道,CD40 基因多态性与某些疾病如甲状腺疾病、儿童哮喘等相关,国内也有 CD40 基因多态性与 SLE 疾病的相关性报道,本研究应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP),探讨 CD40 基因的多态性与 SLE 之间的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象 SLE 组:南京医科大学附属苏州市立医院本部 2010 年 9 月~2013 年 5 月门诊及

* 作者简介:朱琴芳(1977-),女,本科,主管技师,研究方向:免疫学,E-mail:13375197369@189.cn。

通讯作者:徐红星,女,主任技师,E-mail:xhx661118@163.com。

住院的107例SLE患者,空腹抽取EDTA-K₂抗凝全血标本。所有SLE患者均符合1997年美国风湿病学会诊断和治疗标准委员会所指定的分类标准^[3]。正常对照组:109例本院同期健康体检者,均排除各类自身免疫性疾病,且近期无感染性疾病,性别、年龄与SLE组患者相匹配。

1.2 主要试剂和仪器 TianGen生物技术有限公司的DNA提取试剂盒,欧蒙公司的免疫印迹试剂盒。仪器是ABI7500扩增仪及BIORAD凝胶成像系统,电泳仪。

1.3 检测方法

1.3.1 提取基因组DNA:抽取抗凝静脉血1ml,用乙二胺四乙酸抗凝,吸取200 μl进行基因组DNA提取。

1.3.2 设计和合成引物:参照文献^[4]设计合成引物,由上海捷瑞生物技术公司合成。

1.3.3 扩增目的基因:聚合酶链反应扩增体系为25 μl,包括浓度为100 ng/μl的模板DNA 2 μl,20 μmol/L的上游引物和下游引物各0.5 μl,2.5 mmol/L dNTP预混液12.5 μl,剩余扩增体系用灭菌双蒸水补充。聚合酶链反应扩增条件:预变性:94℃ 5 min;扩增:40次循环,其中变性:94℃ 30 s,退火:58℃ 35 s,延伸:72℃ 45 s;再72℃延伸10 min。取聚合酶链反应扩增产物10 μl,经过绿如兰染料染色,用浓度为2 g/dl琼脂糖凝胶进行电泳,然后在紫外灯下观察琼脂糖凝胶电泳结果,并参照DNA标准分子量判断其是否为320 bp的目的基因片段。

1.3.4 扩增产物的限制性酶切:取PCR扩增产物10 μl,用1uFast Digest NcoI(Fermentas公司)酶切CD40-1C/T位点,37℃反应10 min,反应终止后,酶切片段经绿如兰染料染色后用2 g/dl浓度的琼脂糖凝胶进行电泳,电泳结果的判断用BIORAD凝胶成像系统观察。

1.3.5 三种基因型的DNA序列测定:通过限制性酶切获知三种基因型,将各种基因型的扩增产物进行DNA序列测定,由苏州工业园区金唯智生物技术有限公司完成。

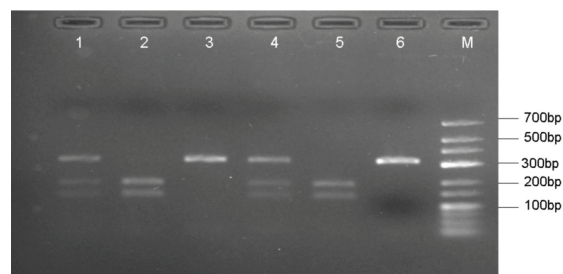
1.3.6 自身抗体检测:用免疫印迹法检测。

1.4 统计学分析 应用统计软件SPSS11.5,使用Hard-Weinberg平衡检验判断疾病组和对对照组的基因型和等位基因分布是否符合遗传平衡定律。使用 χ^2 检验进行计数资料各百分率的比较;用比值比(OR)和95%可信区间(CI)表示各基因型与发病风险的相关性。

2 结果

2.1 CD40-1C/T基因多态性酶切结果及测序结

果 经限制性内切酶Nco I酶切及2 g/dl琼脂糖凝胶电泳后,CD40基因-1C/T位点各基因型酶切结果见图1:CC基因型为136,184 bp两条带;CT基因型为320,184,136 bp三条带;TT基因型为320 bp一条带。三种基因型的测序结果见图2。



注:1,4:CT基因型;2,5:CC基因型;3:TT基因型;6:PCR扩增产物;M:DNA marker

图1 CD40基因型PCR扩增产物NcoI酶切结果

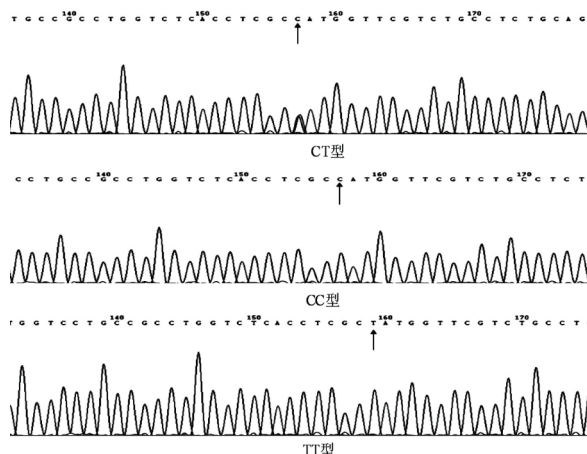


图2 CT,CC,TT三种基因型的测序结果

2.2 SLE组与对照组CD40-1C/T位点各基因型分布的Hardy-Weinberg平衡检验 用 χ^2 检验各基因型预测值与观察值之间差异是否具有统计学意义,用以确定基因型频率和等位基因频率分布是否符合Hardy-Weinberg平衡。对照组 χ^2 值为0.668,P值为0.716;SLE组 χ^2 值为1.59,P值为0.451,均符合遗传平衡定律。

2.3 对照组和SLE组CD40-1C/T位点多态性分析 SLE组与对照组基因型CC,CT,TT总体频率比较,差异具有统计学意义($P=0.035$),其中CC基因型频率SLE组明显高于对照组(OR值=2.020, $P=0.016$),CT基因型频率SLE组明显低于对照组(OR值=0.528, $P=0.020$),故推断CC基因型对于SLE的发生可能是个危险因素,结果见表1。等位基因C,T频率比较,差异无统计学意义($P=0.114$),具体结果见表1。

2.4 SLE患者CD40-1C/T位点三种基因型与各种自身抗体检测结果的比较 见表2。就各种自身抗体在三种基因型中出现的阳性率进行比较,其

中 RNP, SSA, SSB, dsDNA, 组蛋白抗体在 CC 基因型中的阳性率最高, Sm 抗体和 SSA 抗体在三种基因型中的阳性率差异有统计学意义 ($P=0.035$, 0.033)。

表 1 SLE 组与对照组 CD40-1C/T 位点基因及等位基因频率比较 [$n(\%)$]

项 目	SLE 组 ($n=107$)	对照组 ($n=107$)	OR 值 95%(CI)	χ^2	P
基因型 CC	44(41.1)	28(25.7)	2.020(1.136~3.598)	5.79	0.016
CT	42(39.3)	60(55.0)	0.528(0.307~0.907)	5.40	0.020
TT	21(19.6)	21(19.3)	1.023(0.522~2.008)	0.00	0.947
等位基因 C	730(60.7)	116(53.2)	1.361(0.929~1.994)	2.500	0.114
T	84(39.3)	102(46.8)	0.735(501~1.077)		

表 2 SLE 组与对照组 CD40-1C/T 位点三种基因型与自身抗体检测结果比较 [$n(\%)$]

自身抗体	CC($n=44$)	CT($n=42$)	TT($n=21$)	χ^2	P
RNP-Ab	30(68.2)	27(64.3)	11(52.4)	1.548	0.461
Sm-Ab	17(38.6)	20(47.6)	3(14.3)	6.695	0.035
SSA-Ab	33(75.0)	29(69.0)	9(42.9)	6.803	0.033
SSB-Ab	9(20.5)	4(9.5)	4(19.0)	2.116	0.347
dsDNA-Ab	12(27.3)	11(26.2)	4(19.0)	0.543	0.762
核小体抗体	17(38.6)	18(42.9)	9(42.9)	0.191	0.909
核糖体抗体	14(31.8)	15(35.7)	9(42.9)	0.758	0.685
组蛋白抗体	16(36.4)	15(35.7)	6(28.6)	0.421	0.810

3 讨论 SLE 是一种以自身抗体和免疫复合物产生为特征的免疫性疾病,累及多种器官和多种系统,好发于青年女性,其易发性与遗传基因密切相关。CD40 和 CD40L 是 T 淋巴细胞完全活化的第二信号。CD40 主要表达在 B 细胞、单核细胞和树突状细胞的表面,属 TNF-R 超家族,在 B 细胞活化、抗体产生和类别转换、记忆 B 细胞分化等方面发挥关键作用。近年来有关研究证实:活动期 SLE 患者 B 细胞表达 CD40 的比例及强度与 SLE 疾病活动指数 (DAI) 明显相关,表明 SLE 患者 CD40 的表达水平可望成为临床判断病情活动性的一个指标。

目前在 SLE 研究中发现与 SLE 疾病有关的细胞因子受体基因位点及其基因型,如人类 IL-10 基因-592C/A 多态性, TGF- β 1 启动子-509C/T 基因多态性, CTLA-4 基因多态性均与 SLE 之间存在着相关性^[5]。本研究就 CD40 基因的多态性与 SLE 疾病之间相关性进行了分析。

结果表明, SLE 组与对照组比较, 三种基因型 CC, CT 和 TT 总体频率差异具有统计学意义 ($\chi^2=6.714$, $P=0.035$), 其中 CC 基因型频率 SLE 组明显高于对照组, CT 基因型频率 SLE 组明显低于对照组, 同时, SLE 患者的抗 RNP, 抗 SSA, 抗 SSB, 抗 dsDNA, 抗组蛋白抗体在 CC 基因型中的阳性率最高。SLE 患者 CD40-1 基因位点的 T 碱基向 C 碱基存在的突变, 导致 SLE 易感性增加, 故推断 CC 基因型对于 SLE 的发生可能是个危险因素。有研究报道, CD40-1C/T 基因多态性与急性

冠状动脉综合症等患者 CD40 表达水平相关^[6]。故本研究推断 SLE 患者的 CC 基因型可能通过上调 CD40 基因转录和翻译效率, 使 SLE 患者产生较高水平的 CD40, 促使 B, T 细胞活化, 进而对 SLE 的发生产生作用。

综上所述, 携带 CC 基因型的个体患 SLE 的风险更高, 所以 CD40-1C/T 基因多态性与 SLE 的发生有一定的相关性, 临床应对这部分人群予以关注。但是, 单个 CD40-1C/T 基因多态性不能全面评估 CD40 基因对 SLE 的影响, 因此, 本实验进一步筛查了 CD40 基因的其它位点的多态性, 并进行多位点的连锁分析, 综合评价 CD40 基因对 SLE 的作用, 从而为临床治疗提供理论依据。

参考文献:

- [1] 汤媚妮, 龙海, 陆前进. 系统性红斑狼疮表观遗传学机制研究新进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2013, 42(2): 128-130.
Tang MN, Long H, Lu QJ. Advances of epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus [J]. Journal of Clinical Dermatology, 2013, 42(2): 128-130.
- [2] 李丽. 系统性红斑狼疮与自身免疫性甲状腺疾病相关性研究进展[J]. 医疗装备, 2011, 24(11): 42-43.
Li L. Systemic lupus erythematosus (SLE) and autoimmune thyroid diseases correlation research progress [J]. Medical Equipment, 2011, 24(11): 42-43.
- [3] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725.
- [4] Kim TY, Park YJ, Hwang JK, et al. A C/T polymorphism in the 5'-untranslated region of the CD40 Gene is associated with grave disease in Koreans [J]. Thyroid, 2003, 13(10): 919-925.
- [5] 任小英, 李燕, 任丽玲, 等. 人类白细胞介素 10 基因-592C/A 多态性与 SLE 相关性研究[J]. 中国医药指南, 2011, 9(4): 24-27.
Ren XY, Li Y, Ren LL, et al. The research of genetic association of interleukin-10 polymorphisms with systemic lupus erythematosus [J]. Guide of China Medicine, 2011, 9(4): 24-27.
- [6] Yan JC, Wang CQ, Du RZ, et al. Association analysis of CD40 gene polymorphism with acute coronary syndrome [J]. Chin Exp Med, 2010, 10(4): 253-258.

收稿日期: 2015-03-31

修回日期: 2015-04-09