

TNIP1 基因 rs7708392 多态性的检测 及其与系统性红斑狼疮的相关性*

白丽霞, 李 璐 (北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518036)

摘要:目的 检测 TNIP1 基因的单核苷酸多态性(SNP), 并分析各种基因型与系统性红斑狼疮(SLE)的关联性。方法 收集 2013~2016 年期间北京大学 297 例符合美国风湿病学诊断标准的 SLE 患者, 和无相关症状的 351 例健康体检对照者的血液标本, 用非标记探针法高分辨率熔解曲线的方法, 检测 TNIP1 基因 rs7708392(G/C)位点的多态性。结果 TNIP1 基因 rs7708392 位点的多种基因型在非标记探针法高分辨率熔解曲线中分辨出来。SLE 患者 GG, GC, CC 三种基因型出现的频率依次为 36.0%, 51.5% 和 12.5%, 对照组则分别为 32.5%, 46.7% 和 20.8%, 经卡方检验, 两组别基因频率的差异有统计学意义($\chi^2=7.940, P=0.019$)。次要等位基因(C)的出现与关节炎发病率($P=0.013, OR=0.65, 95\% CI=0.47\sim0.92$)和异常的核抗体($P=0.022, OR=0.68, 95\% CI=0.49\sim0.95$)相关。TNIP1 基因 SNP 与 SLE 其他的诊断标准没有关联。结论 在中国人群中, TNIP1 基因 rs7708392 多态性与 SLE 的疾病风险, SLE 诊断指标中的关节炎和抗核抗体相关。

关键词:肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 相互作用蛋白 1; 系统性红斑狼疮; 高分辨率熔解曲线

中图分类号:R593.241; Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)05-066-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.018

Identification of the Polymorphisms of rs7708392 in TNIP1 Gene and the Association with Systemic Lupus Erythematosus

BAI Li-xia, LI Lu (Department of Clinical Laboratory,
Shenzhen Hospital of Peking University, Guangdong Shenzhen 518036, China)

Abstract: **Objective** To identify the single nucleotide polymorphism (SNP) of the gene of TNIP1 using high resolution melting (HRM) analysis with unlabeled probe, and further analyse the association with systemic lupus erythematosus. **Methods** 297 patients that fulfilled the American College of Rheumatology criteria for SLE and 351 ethnically matched healthy controls were recruited from Shenzhen Hospital of Peking University. The association of TNIP1 SNP rs7708392 (G/C) was determined by high resolution melting (HRM) analysis with unlabeled probe in SLE patients and healthy controls. **Results** HRMA with unlabeled probe successfully distinguished all genotypes. Genotype frequencies of GG, GC and CC among SLE patients were 36.0%, 51.5% and 12.5%, respectively, while the frequencies among healthy control were 32.5%, 46.7% and 20.8%. Statistically significant differences were observed in both genotype frequencies for rs7708392 in the SLE patients as compared with the controls. Minor allele (C) of rs7708392 ($P=0.031, OR 0.78, 95\% CI 0.63\sim0.98$) was found to be protective against SLE. The association of SNP rs7708392 with the diagnostic criteria of SLE was also examined. Minor allele (C) exerts protective effect on the incidence of arthritis ($P=0.013, OR=0.65, 95\% CI=0.47\sim0.92$) and abnormalities of antinuclear antibody ($P=0.022, OR=0.68, 95\% CI=0.49\sim0.95$). TNIP1 SNPs were irrelevant to other diagnostic criteria of SLE. **Conclusion** Polymorphisms of rs7708392 in TNIP1 gene were associated with disease risk, as well as arthritis and autoantibody production, of systemic lupus erythematosus in Chinese population.

Keywords: TNF α induced protein 3 interacting protein 1 (TNIP1); systemic lupus erythematosus (SLE); high resolution melting analysis (HRMA)

系统性红斑狼疮(SLE)是一种炎症性自身免疫疾病, 受到遗传和环境等因素的影响^[1,2]。最近, 一系列的全基因组关联研究(GWAS)鉴定出了一些在 SLE 中功能未知的易感基因^[3]。有报道, TNF α 诱导蛋白 3 (TNFAIP3 或者 A20) 相互作用蛋白 1 (TNIP1) 的基因多态性与多种自身免疫性疾病风险相关^[4]。TNIP1 是 NF-KB 信号通路的负调节因子^[5], 在 SLE 病人中, TNIP1 基因多

态性尚未有研究。本实验旨在检测 SLE 病人 TNIP1 基因的单核苷酸多态性, 并进一步探索其在 SLE 的发病过程中所起的作用, 实验发现了 TNIP1 基因 rs7708392 位点存在多种基因型, 基因频率在 SLE 病人组与健康对照组中存在差异, 且与一定的 SLE 症状相关。

1 材料和方法

1.1 研究对象 来自本院的 297 例符合美国风湿

* 作者简介: 白丽霞(1975—), 女, 主管技师, E-mail: bailixia1102@163.com。

病学会标准^[6]的系统性红斑狼疮患者(27例男性和270例女性,平均年龄29岁)和351例种族匹配的健康对照者(31例男性和320例女性,平均年龄28岁)。对照组没有SLE的家族史和相关症状。

1.2 主要试剂和仪器 主要试剂有:依诺金公司基因组DNA提取试剂盒,Thermal Science PCR试剂盒,BioFire Defense LCGreen染料,Sigma矿物油等。主要仪器有:BIO-RAD C1000™ Thermal Cycler PCR仪,Idaho Technology HR-1 High Resolution Melter 高分辨熔解分析仪,以及配套HR-1 Instrument Control 分析软件,高速离心机,-80℃冰箱,-20℃冰箱,4℃冰箱,纯水制备系统等。

1.3 方法

1.3.1 全血基因组DNA提取:抽取两组受试者外周静脉血2 ml于真空抗凝管中,200 r/min离心5 min分离血浆和血细胞,取其中200 μl血细胞,根据依诺金基因组DNA提取试剂盒的说明书提取基因组DNA,并置于-80℃冰箱保存。

1.3.2 PCR扩增和基因型分析:如Montgomery^[7]所介绍的方法,基因型由非标记探针法高分辨率熔解曲线区分出来。所有的引物和探针是由Light Scanner 探针设计软件(Idaho Technology公司,美国)设计。PCR引物的序列如下:正向引物5'-TGGTCAATTCTCCCAACCGA-3',反向引物5'-ACTTCAAGGTCAGACCCTAAA-3',基因分型中用到的3个非标记的C3封闭的探针如下:探针5'-GCTGATTCCAGTTATTGTGAC-TAGTCTACT-3'。

1.4 统计学分析 采用Fisher检验和卡方检验比较患者和对照组次要等位基因频率,是否符合Hardy-Weinberg平衡,来分析SNP与疾病的关联。关联性的表示为比值比(OR)与95%的置信区间(CI)。连锁不平衡(LD)和单体型分析采用SHEsis软件进行。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型分辨 见图1,图2。rs7708392SNP(G>C)三种基因型(GG,GC和CC)由非标记探针法高分辨率熔解曲线准确地区分开来。

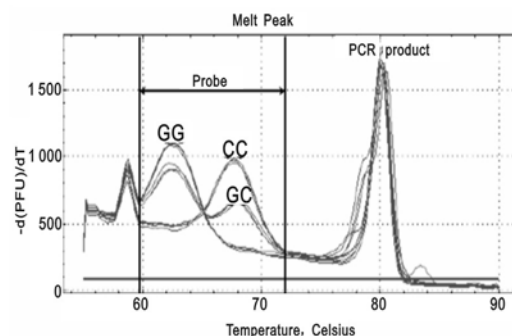
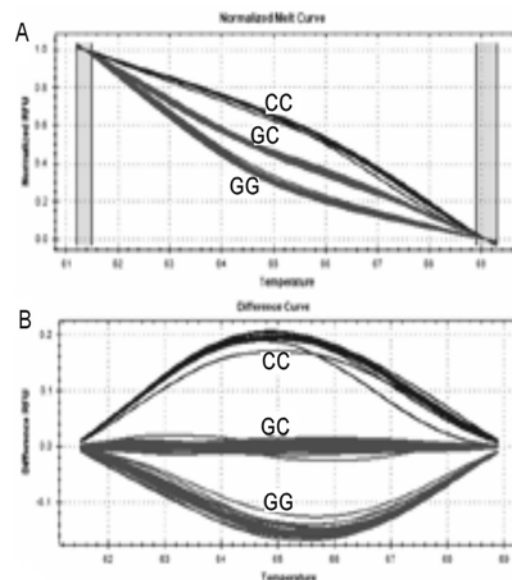


图1 探针区域内分辨出来的三种基因型(GG,GC和CC)



(A)校正后的熔解曲线。野生型GG基因型呈现出最低的熔解温度。(B)将杂合子(GC)曲线作为基线,得到三种基因型(GG,GC和CC)的差分曲线。

图2 rs7708392 SNP基因分型图非标记探针区域的校正曲线图和差分曲线图

2.2 rs7708392多态性与SLE的关联性 见表1。在SLE患者和健康对照组中TNIP1基因rs7708392基因型和等位基因频率。差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 SLE患者和对照组TNIP1基因rs7708392 SNP的基因型和位点频率[频率(%)]

组别	n	GG	GC	CC	χ^2	P	G	C	χ^2	P	OR(95%CI)
病例	297	107(36.0)	153(51.5)	37(12.5)	7.940	0.019	367(61.8)	227(38.2)	6.685	0.031	0.78(0.63~0.98)
对照	351	114(32.5)	164(46.7)	73(20.8)			392(55.8)	310(44.2)			

注:SNP=单核苷酸多态性;SLE=系统性红斑狼疮;OR=比值比;95%CI=95%可信区间。

2.3 rs7708392多态性与SLE诊断标准的关联性 见表2。rs7708392次要等位基因(C)与关节炎发生率相关。表3显示了rs7708392次要等位基

因(C)与异常抗核抗体出现相关。TNIP1基因SNP与SLE其他实验室检查参数和临床症状的发生率之间没有明显的关联。

表 2 TNIP1 rs7708392 SNP 与 SLE 患者临床症状的关联性[频率(%)]

临床症状		n	GG	GC	CC	χ^2	P	G	C	χ^2	P	OR(95%CI)
皮疹	阳性	161	59	83	19	0.159	0.923	201	121	0.121	0.728	0.94 (0.68~1.31)
	阴性	136	48	70	18			166	106			
光敏性	阳性	90	32	47	11	0.026	0.987	111	69	0.002	0.969	1.01 (0.70~1.44)
	阴性	207	75	106	26			256	158			
关节炎	阳性	181	74	90	17	6.819	0.033	238	124	6.160	0.013	0.65 (0.47~0.92)
	阴性	116	33	63	20			129	103			
口咽溃疡	阳性	74	27	39	8	0.247	0.884	93	55	0.093	0.761	0.94 (0.64~1.38)
	阴性	223	80	114	29			274	172			

表 3 TNIP1 rs7708392 SNP 与 SLE 患者实验室检查指标的关联性[频率(%)]

项 目		n	GG	GC	CC	χ^2	P	G	C	χ^2	P	OR(95%CI)
造血系统疾病	阳性	187	63	98	26	1.691	0.429	224	150	1.530	0.216	1.24(0.88~1.76)
	阴性	110	44	55	11			143	77			
蛋白尿	≥0.5 g/24h	101	35	52	14	0.322	0.851	122	80	0.250	0.617	1.09(0.77~1.55)
	<0.5 g/24h	196	72	101	23			245	147			
抗核抗体	≥1:320	168	67	87	14	6.882	0.032	221	115	5.214	0.022	0.68(0.49~0.95)
	<1:320	129	40	66	23			146	112			
抗-DNA	阳性	189	72	97	20	2.089	0.352	241	137	1.712	0.191	0.80(0.57~1.12)
	阴性	108	35	56	17			126	90			
抗核糖核蛋白抗体	阳性	81	31	41	9	0.335	0.846	103	59	0.304	0.581	0.90(0.62~1.31)
	阴性	216	76	112	28			264	168			
Smith 抗体	阳性	68	24	37	7	0.488	0.783	85	51	0.038	0.845	0.96(0.65~1.43)
	阴性	229	83	116	30			282	176			
Ro 抗体(SSA)	阳性	118	43	61	14	0.066	0.968	147	89	0.042	0.837	0.97(0.69~1.35)
	阴性	179	64	92	23			220	138			
La 抗体(SSB)	阳性	72	25	38	9	0.074	0.963	88	56	0.037	0.848	1.04(0.71~1.53)
	阴性	225	82	115	28			279	171			
补体 C3 & C4	减少	133	49	79	15	1.840	0.399	177	109	0.003	0.960	0.99(0.71~1.38)
	正常	164	58	74	22			190	118			

3 讨论 与聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)和等位基因特异性 PCR(AS-PCR)等方法相比,高分辨率熔解曲线分析(HR-MA)是一个高效且廉价的 SNP 检测方法^[8]。然而,这种方法难以区分熔解温度差异小于 0.4℃ 的野生型和同义突变体。非标记探针法 HRMA 的潜在优势在我们工作中得到了充分的发挥。靶向结合感兴趣的 SNP 的 C3 端封闭探针,使得熔解温度变化可以放大到 3~4℃,从而熔解温度差异小的 SNP 也较易被探测。

作为一个 NF-KB 信号通路的负调节因子, TNIP1 可能在 NF-κB 相关的免疫应答中起重要作用。最近的研究表明,高加索人群中 TNIP1 基因多态性与系统性红斑狼疮的疾病风险相关^[9]。我们在中国人群中发现 rs7708392(G/C)与 SLE 疾病风险也相关,这和另一份关于日本 SLE 相关人群中的研究结果一致^[10],我们还分析了

rs7708392SNP 与 SLE 不同诊断标准之间的关联性。rs7708392 与 SLE 的临床症状(如关节炎)和实验室检查的参数(如系统性红斑狼疮抗核抗体)的关联也进一步证明了它在 SLE 中的潜在作用。关节炎和异常抗核抗体可以反映自身免疫反应的严重程度,这也意味着,至少在中国大陆的人群中 TNIP1 基因 rs7708392 位点的多态性不仅是 SLE 一个特异性风险因子,还是判断 SLE 严重程度的指标。然而,目前尚不清楚 rs7708392 与 SLE 发病和严重程度存在关联的机制。rs7708392 在 SLE 或其他自身免疫性疾病中的作用机制有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 严静霞,高丽霞,吴霞,等,Th17 细胞在系统性红斑狼疮伴发心血管疾病中的意义探讨[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(6):52-54,58.
Yan JX, Gao LX, Wu X, et al. Evaluate the significance of Th17 cells in systemic lupus (下转 73 页)

- erythematosus with cardiovascular disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(6): 52-54, 58.
- [2] 张玲英,洪 华,叶长林,等,系统性红斑狼疮患者肿瘤坏死因子,白介素 8 水平及意义[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(1): 67-68.
- Zhang LY, Hong H, Ye CL, et al. The level and significance of TNF- α and IL-8 in systemic lupus erythematosus patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2005, 20(1): 67-68.
- [3] Graham RR, Hom G, Ortmann W, et al. Review of recent genome-wide association scans in lupus[J]. J Intern Med, 2009, 265(6): 680-688.
- [4] He CF, Liu YS, Cheng YL, et al. TNIP1, SLC15A4, ETS1, RasGRP3 and IKZF1 are associated with clinical features of systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population[J]. Lupus, 2010, 19(10): 1181-1186.
- [5] Verstrepen L, Carpentier I, Verhelst K, et al. ABINs: A20 binding inhibitors of NF-kappa B and apoptosis signaling[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(2): 105-114.
- [6] Hochberg MC. Updating the american college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725.
- [7] Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis[J]. Nat Protoc, 2007, 2(1): 59-66.
- [8] 覃彦平,秦 雪,曹 昭,等. 广西肝癌人群 IL-23 Rrs11805303 位点单核苷酸多态性相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(1): 51-53.
- Qin YP, Qin X, Cao Z, et al. Correlation of polymorphism of IL-23R gene rs11805303 loci with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Guangxi [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(1): 51-53.
- [9] Gateva V, Sandling JK, Hom G, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL-10 as risk loci for systemic lupus erythematosus[J]. Nat Genet, 2009, 41(11): 1228-1233.
- [10] Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, et al. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(5): R174.