

• 论著 •

2q33 区基因多态性与 Graves 病发病风险的研究

瞿茹怡 李圣贤 陆咏 刘威 刘炳丽 宋志毅

【摘要】 目的 观察 2q33 区 rs1024161(C/T), rs231726(C/T)和 rs10197319(G/A)位点基因多态性与 Graves 病发病及甲状腺自身抗体间的关系。**方法** 收集 Graves 病患者 600 例及 686 名正常对照者。采集病史,包括年龄、症状、甲状腺肿、突眼,测定甲状腺激素及甲状腺自身抗体[促甲状腺激素受体抗体(TRA b)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)]。同时留取血标本,抽提 DNA,用 TagMan-MGB 探针法进行基因分型。再分析不同基因型与甲状腺自身抗体(TRA b, TPOAb)的水平,及其与 Graves 病发病风险的关系。**结果** Graves 病患者 rs1024161 和 rs231726 的 TT 基因型频率(53.67% vs. 43.44%, $P=0.003$ 和 46.67% vs. 38.05%, $P=0.002$), rs10197319 的 GG 基因型频率(60.17% vs. 54.08%, $P=0.028$)均高于对照者。rs1024161(C/T), rs231726(C/T)和 rs10197319(G/A)位点基因多态性与性别、TRA b 和 TPOAb 水平无明显相关性。**结论** rs1024161, rs231726 和 rs10197319 位点基因多态性与 Graves 病的发病相关, 2q33 为 Graves 病的易感区段。

【关键词】 Graves 病;单核苷酸多态性;TagMan-MGB 探针;遗传易感性

Association between 2q33 gene polymorphism and Graves' disease Qu Ruyi*, Li Shengxian, Lu Yong, Liu Wei, Liu Bingli, Song Zhiyi. *Department of Internal Medicine, Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200092, China

Corresponding author: Lu Yong, Email: hxyly@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the association of the rs1024161(C/T), rs231726(C/T) and rs10197319(G/A) gene polymorphism with Graves' disease(GD). **Methods** Patients with GD ($n=600$) and normal control subjects ($n=686$) were enrolled. History, including age, signs, thyromegaly, and exophthalmos were collected. Meanwhile, the levels of thyrotropin receptor antibody(TRA b) and thyroid peroxidase antibody(TPOAb) were tested. Blood samples were collected to extract DNA, and the genotypes were determined by TagMan-MGB probe. The relationship between different genotypes and the levels of thyroid autoimmune antibodies(TRA b, TPOAb), and the risk of GD were analyzed. **Results** The frequencies of genotype TT of rs1024161, rs231726 (53.67% vs. 43.44%, $P=0.003$; 46.67% vs. 38.05%, $P=0.002$) and genotype GG of rs10197319 (60.17% vs. 54.08%, $P=0.028$) in patients with GD were higher than those in control subjects. There was no association between the rs1024161(C/T), rs231726(C/T) and rs10197319(G/A) polymorphism with gender, TRA b and TPOAb levels. **Conclusion** Rs1024161, rs231726 and rs10197319 polymorphism might have association with GD, and 2q33 region is a susceptible loci of GD.

【Key words】 Graves' disease; Single nucleotide polymorphism; TagMan-MGB probe; Genetic susceptibility

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 77-80)

Graves 病是一种器官特异性自身免疫性疾病,和自身免疫性甲状腺炎同属自身免疫性甲状腺疾病(AITD)。Graves 病是甲状腺功能亢进症(甲亢)最

主要的原因,约占甲亢的 80%~85%。早期的同胞对模型分析发现,在 Graves 病的发生、发展中,遗传因素可使患病风险增加 79%。先前研究发现,2q33 区段与多种自身免疫性疾病相关,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎和 1 型糖尿病等^[1-3]。研究者对 56 个日本 AITD 家系共 326 名成员进行全基因组关联研究,发现 2q33 是 AITD 的一个易感区段。我国遗传性自身免疫性甲状腺疾病研究组织开展了

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.02.002

作者单位:200092 上海市第一人民医院分院内科(瞿茹怡,陆咏);上海交通大学医学院附属仁济医院内分泌科(李圣贤);200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌科(刘威,刘炳丽,宋志毅)

通信作者:陆咏, Email: hxyly@sohu.com

针对中国汉族人群 Graves 病的多中心研究,发现在 2q33 区段内有一串连续分布的单核苷酸多态性 (SNP) 位点^[45]。笔者选择了其中 3 个位点(rs1024161, rs231726, rs10197319)进行验证,分析其与甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)和促甲状腺激素(TSH)受体抗体(TRAb)的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2009—2013 年在上海市第一人民医院分院和仁济医院门诊就诊的散发 Graves 病患者。Graves 病的诊断标准:临床表现和实验室检查结果支持甲亢,伴甲状腺弥漫性肿大(触诊和甲状腺多普勒超声检查证实);如伴浸润性突眼、TRAb 阳性和胫前黏液性水肿,则进一步支持诊断。桥本甲状腺炎、亚急性甲状腺炎、产后甲状腺炎、甲状腺自主性高功能腺瘤等所致甲状腺功能亢进者除外。另选择血浆可溶性-TSH、TRAb 和 TPOAb 水平均正常者为对照。最后,共计获得完整资料的 Graves 病患者 600 例,正常对照者 686 名。所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 数据采集 患者来院诊治时,收集基本资料,包括年龄、性别、病程、是否复发、治疗经过等;同时记录心率、突眼程度、甲状腺肿大水平、是否有震颤和胫前黏液性水肿等体征。

1.2.2 标本的采集及检测 收集受试者血清,应用化学发光法测定甲状腺激素水平、TRAb 和 TPOAb 的滴度。其中,TPOAb 在正常范围(0~35 IU/ml)为阴性;高于正常上限,但低于检测上限(600 IU/ml)的为阳性,高于检测上限的为强阳性。

1.2.3 试验方法 取 EDTA 抗凝血 2 ml,加入 15 ml 离心管,按要求依次加入蛋白酶 300 μ l 和裂解液 2.5 ml,56 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后,加无水乙醇 2.5 ml,颠倒混匀后震荡、转移到柱子中上机(Quick Gene610L Nucleic Acid Isolation System)抽提基因组 DNA。所得 DNA 检测浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的比值(Nanodrop

8000)。再予 0.8%的琼脂糖凝胶电泳,判断基因组 DNA 的完整性。用 TagMan-MGB 探针法(ABI PRISM[®]7900)进行 SNP 的检测,引物及探针由 ABI 公司设计提供。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 统计软件的卡方检验程序和 Excel 的四格表相结合进行基因型频率和等位基因频率统计;计数资料比较采用 χ^2 检验。相对危险度用优势比表示,采用 Woolf 法分析。Hardy-Weinberg 检验证实有群体代表性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

一般资料的结果显示,Graves 病患病的男:女比例为 1:5(101:499),符合我国甲亢好发于女性,男:女比例约为(1:6~1:4)的调查结果。Graves 病平均发病年龄为(35.1 \pm 13.5)岁,平均病程为(3.3 \pm 2.8)年。其中 TRAb 阳性率为 73.2%。TPOAb 阳性者为 61.5%,强阳性者为 37.2%,仅有 25.3%的患者 TPOAb 阴性。

病例对照研究结果发现,Graves 病患者中 rs1024161 位点 TT 纯合型,rs231726 位点 TT 纯合型及 rs10197319 位点 GG 纯合型均显著高于对照者 [$P=0.003$,优势比 (OR)=1.244,95%CI:1.106~1.399;OR=1.205, $P=0.002$,95%CI:1.073~1.353;OR=1.143, $P=0.028$,95%CI:1.013~1.290],见表 1。而每个位点分别按 3 种基因型进行统计分析,如表 2 所示,SNP rs1024161 和 rs231726,差异仍有统计学意义(P 值分别为 0.001 和 0.007),但 rs10197319 位点的差异无统计学意义($P=0.051$)。进一步分析等位基因频率发现,SNP rs1024161 和 rs231726 位点为 T 时,相对于 C,可显著增加 Graves 病的发病风险($P < 0.05$),而 rs10197319 位点为 G 或 A 时,组间差异没有统计学意义($P=0.1$),见表 3。

另外,SNP rs1024161、rs231726 和 rs10197319 位点与性别无关,亦与 TRAb 和 TPOAb 是否阳性无关(表 4)。

3 讨论

Graves 病是 AITD 最常见的类型,有一定的家族

表 1 Graves 病患者和对照者 rs1024161、rs231726 和 rs10197319 基因型的比较

| 组别 | rs1024161 | | rs231726 | | rs10197319 | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | TT(%) | CT+CC(%) | TT(%) | CT+CC(%) | GG(%) | AG+AA(%) |
| Graves 病组($n=600$) | 322(53.7) | 278(46.3) | 280(46.7) | 320(53.3) | 361(60.2) | 239(39.8) |
| 对照组($n=686$) | 298(43.4) | 388(56.6) | 261(38.1) | 425(62) | 371(54.1) | 315(45.9) |
| χ^2 值 | 13.406 | | 9.758 | | 4.833 | |
| P 值 | 0.003 | | 0.002 | | 0.028 | |

注:SNP:单核苷酸多态性

表 2 Graves 病患者和对照者 rs1024161、rs231726 和 rs10197319 位点 3 种基因型间的比较

| 组别 | rs1024161 | | | rs231726 | | | rs10197319 | | |
|------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|------------|-----------|---------|
| | TT(%) | CT(%) | CC(%) | TT(%) | CT(%) | CC(%) | GG(%) | GA(%) | AA(%) |
| Graves 病组(n=600) | 322(53.7) | 228(38) | 50(8.3) | 280(46.7) | 251(41.8) | 69(11.5) | 361(60.2) | 201(33.5) | 38(6.3) |
| 对照组(n=686) | 298(43.4) | 317(46.2) | 71(10.4) | 261(38.1) | 339(49.4) | 86(12.5) | 371(54.1) | 275(40.1) | 40(5.8) |
| χ^2 值 | 13.416 | | | 9.951 | | | 5.968 | | |
| P 值 | 0.01 | | | 0.007 | | | 0.051 | | |

注:SNP;单核苷酸多态性

表 3 Graves 病患者和对照者 rs1024161、rs231726 和 rs10197319 位点等位基因频率的比较

| 组别 | rs1024161 | | rs231726 | | rs10197319 | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | T(%) | C(%) | T(%) | C(%) | G(%) | A(%) |
| Graves 病组(n=600) | 872(72.7) | 328(27.5) | 811(67.6) | 389(32.4) | 923(76.9) | 277(23.1) |
| 对照组(n=686) | 913(66.6) | 459(33.5) | 861(62.8) | 511(37.2) | 1017(74.1) | 355(25.9) |
| χ^2 值 | 11.296 | | 6.56 | | 2.691 | |
| P 值 | 0.001 | | 0.010 | | 0.101 | |

注:SNP;单核苷酸多态性

表 4 Graves 病患者 rs1024161、rs231726 和 rs10197319 位点基因多态性与性别、TRAb 和 TPOAb 的关系

| 指标 | | rs1024161 | | | rs231726 | | | rs10197319 | | |
|-------|-----|-----------|-------|------|----------|-------|------|------------|-------|------|
| | | TT | CT+CC | P 值 | TT | CT+CC | P 值 | GG | AG+AA | P 值 |
| 性别 | 男 | 54 | 47 | 0.97 | 49 | 52 | 0.68 | 58 | 43 | 0.54 |
| | 女 | 268 | 231 | | 231 | 268 | | 303 | 196 | |
| TRAb | 阴性 | 87 | 74 | 0.91 | 74 | 87 | 0.83 | 98 | 63 | 0.83 |
| | 阳性 | 235 | 204 | | 206 | 233 | | 263 | 176 | |
| TPOAb | 阴性 | 80 | 72 | 0.86 | 68 | 84 | 0.86 | 87 | 65 | 0.60 |
| | 阳性 | 125 | 100 | | 111 | 114 | | 142 | 83 | |
| | 强阳性 | 117 | 106 | | 101 | 122 | | 131 | 92 | |

注:SNP;单核苷酸多态性;TRAb:促甲状腺激素受体抗体;TPOAb:甲状腺过氧化物酶抗体

倾向。在中国人群中,该病的发病率大约在 0.25%~1.09%。一般认为,Graves 病在遗传易感性的基础上,在感染、精神创伤和应激等因素作用下,诱发体内的免疫功能紊乱,进而导致发病。Graves 病患者血清中存在多种自身免疫性抗体,如甲状腺球蛋白抗体、TPOAb、TRAb 和 Na⁺/I⁻ 转运体抗体。其中最重要的抗体是 TRAb,80%~90%的甲亢患者血清中都能检测出 TRAb,未治疗的甲亢患者中,阳性率可达 95%。即使血清中抗体阴性,甲状腺组织也可检测到 TRAb。本研究中,TRAb 的阳性率为 73.2%,可能与患者入组时接受了抗甲状腺药物的治疗,部分患者抗体转阴有关。另外,TPOAb 阳性者也高达 74.7%。

研究选择位于 2q33 的 CD28、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)和诱导性 T 细胞共刺激因子(ICOS)基因簇区 3 个标签 SNP 位点:rs1024161、rs231726 和 rs10197319,在收集 Graves 病人群中进行验证,发现这 3 个点的基因型均有显著差异,支持

2q33 也可能是 Graves 病的易感区段。研究发现,rs1024161 位于 CTLA-4 基因的上游,而 rs231726 和 rs10197319 位于 CTLA-4-ICOS 基因间,靠近 CTLA-4 基因。在人染色体上 2q33,CD28、CTLA-4 和 ICOS 3 个基因依次排列,组成一个紧密连锁的基因簇。这些紧密连锁的基因簇的表达一般受协同调节,共同参与某一组功能的调控。CD28 和 CTLA-4 是其中最重要的一对正、负调节因子。当抗原递呈细胞上的 B7 分子呈低水平表达时,CTLA-4 因与 B7 分子具有高亲和力而占优势,阻止 T 细胞的激活。而当抗原递呈细胞表面高水平表达 B7 分子时,B7/CD28 信号转导途径占优势,T 细胞被激活并增殖、分化为效应细胞,并分泌白细胞介素-2 等细胞因子,后者进一步促进 T 细胞的活化。激活的 T 细胞大量分泌 CTLA-4 和 CD28,二者竞争性地与 B7 分子结合,调节 T 细胞的免疫应答。

先前研究发现,CD28、CTLA-4 和 ICOS 基因均

与 Graves 病的发病有关。CTLA-4 基因的 3' 非翻译区存在一个 (AT)_n 高度重复序列, 其多态性变化与 Graves 病明显相关。然而对韩国 Graves 病患者的研究发现, Graves 病与 CTLA-4 基因(AT)_n 重复片段无相关性。Pastuszak-Lewandoska 等^[6-7]发现, CTLA-4 基因外显子 1+49 位点 A/G 的 G 等位基因与 Graves 病相关。但该结论并未在巴西人群中得到验证^[8]。最近 Du 等^[9]发现在我国汉族人群中 CTLA-4 基因多态性与 Graves 病发病有关。以上研究表明, 不同种族对 CTLA-4 等位基因易感性存在很大差别。Wang 等^[10]发现, Graves 病患者的甲状腺滤泡上皮细胞和浸润的 B 淋巴细胞均有 ICOS 配体的表达, ICOS-ICOS 配体信号直接参与甲状腺滤泡上皮细胞的分化和增殖, 影响甲状腺局部免疫的始动、维持和放大, 参与 Graves 病的发病。

CD28、CTLA-4 和 ICOS 表达异常或功能失衡将导致甲状腺免疫调节异常, 产生自身抗体, 导致 Graves 病的发生。但在笔者的研究中, 这 3 个位点的基因多态性与 TPOAb 和 TRAb 的滴度间均未见显著相关。由于甲状腺自身抗体的产生受多个基因及环境的复杂调控。而笔者所选择的 3 个位点不在具体基因的功能区, 所以在本研究未见其与 TPOAb 和 TRAb 滴度相关。

本研究仅是基因多态性与疾病相关性的研究, 只能提示基因与疾病的可能关系, 缺乏相关基因的具体功能研究及其发病机制。目前选择的 3 个 SNPs 虽然与 Graves 病的发病有关, 但由于不在具体基因的功能区, 这些 SNP 的改变如何影响具体基因的表达和功能仍不清楚, 国外关于系统性红斑狼疮和过敏性鼻炎等的研究也定位于该区段, 也缺乏功能方面的研究^[1,11]。

总之, 现有的数据仅能提示 2q33 区段的 CD28-CTLA-4-ICOS 基因簇区是 Graves 病的易感位点。进一步在该区段进行深入研究, 确定具体的易感基因, 并进行相应的功能研究, 完善 Graves 病发病的分子机制, 才能有助于提高 Graves 病的诊治水平。

参 考 文 献

- [1] Cunninghame Graham DS, Wong AK, McHugh NJ, et al. Evidence for unique association signals in SLE at the CD28-CTLA4-ICOS locus in a family-based study[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(21):3195-3205.
- [2] Kim YO, Kim HJ, Kim SK, et al. Association of the CD28/CTLA4/ICOS polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(3):345-353.
- [3] Ei Wafai RJ, Chmairie HN, Makki RF, et al. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2011, 22(2):273-281.
- [4] 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.
- [5] Zhao SX, Pan CM, Cao HM, et al. Association of the CTLA4 gene with Graves' disease in the Chinese Han population[J]. PLoS One, 2010, 5(3):e9821.
- [6] Pastuszak-Lewandoska D, Domańska D, Rudzińska M, et al. CTLA-4 polymorphisms(+49 A/G and -318 C/T) are important genetic determinants of AITD susceptibility and predisposition to high levels of thyroid autoantibodies in Polish children-preliminary study[J]. Acta Biochim Pol, 2013, 60(4):641-646.
- [7] Pastuszak-Lewandoska D, Sewerynek E, Domańska D, et al. CTLA-4 gene polymorphisms and their influence on predisposition to autoimmune thyroid diseases (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis)[J]. Arch Med Sci, 2012, 8(3):415-421.
- [8] Namó Cury A, Longui CA, Kochi C, et al. Graves' disease in Brazilian children and adults: lack of genetic association with CTLA4 +49A>G polymorphism[J]. Horm Res, 2008, 70(1):36-41.
- [9] Du L, Yang J, Huang J, et al. The associations between the polymorphisms in the CTLA-4 gene and the risk of Graves' disease in the Chinese population[J]. BMC Med Genet, 2013, 14:46.
- [10] Wang F, Yan T, Chen L, et al. Involvement of inducible costimulator ligand (ICOSL) expression in thyroid tissue in hyperthyroidism of Graves' disease patients[J]. J Clin Immunol, 2012, 32(6):1253-1261.
- [11] Andiappan AK, Nilsson D, Halldén C, et al. Investigating highly replicated asthma genes as candidate genes for allergic rhinitis[J]. BMC Med Genet, 2013, 14:51.

(收稿日期: 2013-10-10)