

云南汉族人群 Tim-3 启动子区-1516G>T 位点多态性与系统性红斑狼疮关联性研究*

高 辉, 彭传梅[△], 付晓野, 曹向红, 董玉琳, 王 杨(昆明医科大学附属延安医院医学检验科, 昆明 650051)

【摘要】 目的 探讨 T 细胞免疫球蛋白域和黏蛋白域蛋白(Tim)-3 启动子区-1516G>T 位点基因多态性与云南高原地区汉族人群系统性红斑狼疮(SLE)的遗传易感性及其相关自身抗体的表达有无关联。**方法** 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应方法对 132 例云南汉族 SLE 患者和 120 例健康体检者 Tim-3 启动子区多态性位点-1516G>T 的基因多态性进行检测,同时采用间接免疫荧光法和线性免疫印迹法检测其双链 DNA 抗体、Sm 抗体、核糖核蛋白抗体三种自身抗体。采用直接计数法计算基因型和等位基因频率,进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,基因型和等位基因频率的组间比较、各自身抗体和基因型的相关性比较均采用 χ^2 检验。**结果** 云南汉族人群 Tim-3 启动子区多态性位点-1516G>T 的基因型 GG、GT、TT 在 SLE 组频率为:0.818 2、0.181 8、0.000 0,在对照组频率为:0.916 7、0.075 0、0.008 3,其基因型和等位基因频率在两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 云南汉族人群 Tim-3 启动子区-1516 位点存在单核苷酸多态性变异,且其多态性变异与系统性红斑狼疮遗传易感性相关,但其不同基因型可能不会影响 SLE 相关自身抗体的表达。

【关键词】 系统性红斑狼疮; T 细胞免疫球蛋白域黏蛋白域蛋白-3; 基因多态性; 遗传易感性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)08-1034-03

Association analysis of Tim-3 -1516G>T polymorphism with systemic lupus erythematosus in a han population of Yunnan Province* GAO Hui, PENG Chuan-mei[△], FU Xiao-ye, CAO Xiang-hong, DONG Yu-lin, WANG Yang (Department of Medical Laboratory, The Affiliated Yanan Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650051, China)

【Abstract】 Objective The aim of the present study was to analyze the association between the Tim-3 polymorphism -1516G>T and susceptibility to systemic lupus erythematosus(SLE) in a group of Han population from Yunnan province. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis(PCR-RFLP) was used to detect the polymorphism of -1516G>T site in 132 SLE patients and 120 controls, and we used indirect immunofluorescence assay and liner immunoblotting to detect three related autoantibodies of SLE, which include the anti-double stranded DNA(dsDNA)antibody, the anti-Sm antibody and the anti-RNP antibody. We used direct counting method to calculate the genotype and allele frequencies to conduct the Hardy-Weinberg equilibrium test, and we used χ^2 test to compare the difference of the genotypic and allelic frequencies between SLE and control groups and the correlation of autoantibodies and genotypes. **Results** We found there are statistically significant differences in genotype and allele frequency of -1516G>T between SLE and control group($P<0.05$); The genotype(GG, GT, TT) frequency in the SLE group is 0.818 2, 0.181 8 and 0.000 0, which in the control group is 0.916 7, 0.075 0 and 0.008 3 respectively. **Conclusion** The -1516 site of Tim-3 gene has SNP variations, the -1516G>T genotype maybe related with the susceptibility to SLE in a Han population of Yunnan province, but different genotypes may not affect the expression of related autoantibodies of SLE.

【Key words】 SLE; Tim-3; gene polymorphism; susceptibility

系统性红斑狼疮(SLE)是一种临床表现多样、涉及机体许多系统和脏器的自身免疫性疾病,其发病率在种族、地区上差别很大。SLE 的病因和发病机制尚未完全清楚,一般认为遗传、环境等为其发病诱因。T 细胞在 SLE 的发病过程中扮演重要角色,在其发病的不同环节均存在辅助性 T 细胞(Th)1/Th2 的不平衡性^[1]。T 细胞免疫球蛋白域和黏蛋白域蛋白(Tim)基因家族是 Mcintire 等^[2]于 2001 年发现的一个新的基因家族。小鼠 Tim 家族基因共有 8 个成员(Tim 1~8),人 Tim 家族基因与小鼠有高度的同源性,在人类 Tim 家族发现

只有 3 个基因,分别为 Tim-1、Tim-3 和 Tim-4,无 Tim-2,定位于染色体 5q33.2 区域。人 Tim-3 基因全长约 23 kb,包含有 7 个外显子,编码产物为 301 个氨基酸。Monney 等^[3]用定量 RT-PCR 方法检测 Tim-3 基因在许多细胞系(Th1、Th2、DCs、B 细胞)以及 SJL 小鼠的 T、B、CD11b⁺ 细胞上的表达,发现 Tim-3 mRNA 只高表达于 Th1 细胞。由此表明 Tim-3 是重要的免疫调节分子,在自身免疫性疾病等 Th1/Th2 相关性疾病中发挥重要作用。国内外研究显示,人类 Tim-3 的启动子区和编码区均存在多态性的变化,这些多态性可能与哮喘、过敏性

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学联合专项项目(2011FB232)。

作者简介:高辉,女,主任医师,硕士,主要从事临床血液学检验和分子生物学检验方面的研究。

[△] 通讯作者, E-mail:meizimh@sina.com。

鼻炎和类风湿性关节炎(RA)等疾病的易感性相关^[4-7]。Tim 家族基因是否参与 SLE 的发生、发展目前少有报道。云南地处高原、紫外线辐射较强,为 SLE 高发地区,因此,笔者对云南高原地区汉族人群 Tim-3 启动子区多态性位点-1516G>T 的多态性与 SLE 以及与 SLE 相关自身抗体的关联进行研究,为探索 SLE 易感的遗传因素提供数据支持,为揭示 SLE 发病机制提供新的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 10 月至 2013 年 10 月在本院风湿免疫科就诊的 SLE 患者 132 例,其中男 16 例,女 116 例;年龄 18~58 岁;SLE 患者符合 2009 年美国风湿病协会修订的 SLE 分类诊断标准。对照组为 120 例云南地区健康体检者,其中男 27 例,女 93 例;年龄 22~67 岁,无自身免疫性疾病相关病史。所有对象均为三代以内居住在云南本地汉族居民,所有对象均无血缘关系。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪 (DA7600, China);电泳仪 (Bio-rad, USA);凝胶成像系统 (Bio-rad, USA);荧光显微镜 (Leica, Germany);测序仪 (ABI3730, USA)。人全血基因 DNA 提取试剂盒 (Axygen, USA);TaqDNA 聚合酶 1 U (Omega, USA);dNTPs (Omega, USA);琼脂糖 (Biowest, Spain);荧光染料 (EB, USA);荧光免疫印迹试剂盒 (Omon, Germany);测序试剂盒 (ABI, USA)。

1.3 方法

1.3.1 自身抗体检测 在知情同意的原则下,采集 SLE 患者及健康体检者乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝静脉血 2 mL。SLE 组及对照组均采用荧光免疫印迹试剂盒 (Omon, Germany) 检测三种自身抗体:双链 DNA 抗体 (dsDNA)、Sm 抗体、核糖核蛋白 (RNP) 抗体。

1.3.2 模板 DNA 提取 采用人全血基因 DNA 提取试剂盒 (Axygen, USA) 提取 SLE 患者及健康体检者外周血基因组 DNA,方法严格按照试剂盒说明书进行,提取产物溶于 TE 缓冲液,-20 °C 保存。

1.3.3 PCR 反应 参照 GenBank 中 Tim-3 DNA 序列 (编号 AC023133),利用 Primer Premier 5.0 软件自行设计合成一对引物,P1:5'-GCC TTG ACC AAG TTC ATG CT-3'和 P2:5'-ACC ACC CCG GAT AAT TTT GT-3',PCR 反应体系总体积 25 μL:包括基因组 DNA 100 ng,10×PCR 缓冲液 2.5 μL,2.0 mmol/L Mg²⁺、dNTPs 各 10 nmol,引物 P1 和 P2 各 15 pmol, TaqDNA 聚合酶 1U (Omega, USA),不足体积用灭菌双蒸水补充至 25 μL。PCR 反应循环参数:94 °C 预变性 5 min,94 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 60 s,35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

1.3.4 酶切、琼脂糖电泳 PCR 产物用 Bsl I 内切酶 (Omega, USA) 酶切;PCR 产物 5 μL,10×酶切缓冲液 1 μL,限制性内切酶 2 U,灭菌双蒸水 3.9 μL,混匀,55 °C 酶切 3 h。酶切产物用 2% 琼脂糖电泳、EB 染色,观察条带。根据电泳图确定基因型。

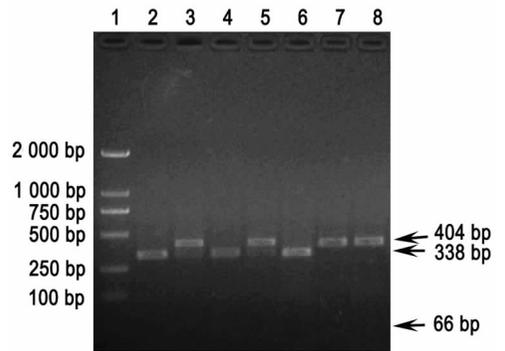
1.3.5 测序 选取部分代表不同基因型的扩增产物送上海生物工程公司测序,验证电泳结果。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计分析,采用直接计数法计算基因型和等位基因频率,进行 Hardy-Weinberg 平衡检验 (P>0.05),基因型和等位基因的组间比较、各自身抗体和基因型的相关性比较均采用 χ² 检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tim-3 启动子区-1516G>T 位点多态性采用 PCR-RFCP

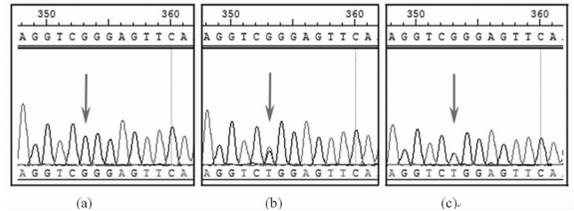
分析,PCR 扩增产物长度为 404 bp。酶切产物获得 3 种基因型,即纯合子 GG 基因型:有 338、66 bp 2 个片段;杂合子 GT 基因型:可见 404、338 和 66 bp 3 个片段;纯合子 TT 基因型:仅有 404 bp 1 个片段,见图 1。



注:1 为 marker;2、4、6 为 GG 基因型;3、5 为 GT 基因型;7 为 TT 基因型;8 为 PCR 产物。

图 1 -1516G>T 位点 PCR 及酶切产物电泳图

2.2 基因型测序分析图 Tim-3 基因启动子-1516G>T 位点 GG、GT、TT 基因型测序分析图,见图 2。



注:(a)GG 基因型;(b)GT 基因型;(c)TT 基因型。

图 2 -1516G/T 位点基因型测序分析图

2.3 基因型与等位基因频率分布 根据 PCR 产物酶切电泳结果,记录各样本的基因型,并采用直接计数法统计基因型,计算等位基因频率。SLE 组和对照组-1516G>T 位点基因型频数分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 (P>0.05),达到遗传平衡,具有群体代表性,见表 1。χ² 检验结果显示,SLE 组与对照组-1516G>T 位点基因型和等位基因频率分布比较,差异有统计学意义 (P<0.05),见表 2。

表 1 Tim-3 基因-1516G/T 位点基因型频数分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验

基因型	SLE 组		对照组	
	实际频数	理论频数	实际频数	理论频数
GG	108.00	109.09	110.00	109.25
GT	24.00	21.82	9.00	10.50
TT	0.00	1.09	1.00	0.25
χ ²	1.320		2.437	
P	0.517		0.296	

2.4 三种 SLE 相关自身抗体 (双链 DNA 抗体、Sm 抗体、RNP 抗体) 检测结果表明,SLE 组三种自身抗体检测阳性率均高于对照组,差异有统计学意义 (P<0.05),见表 3。SLE 组各基因型三种自身抗体检测结果,见表 4。经 χ² 检验,SLE 组中双链 DNA 抗体、Sm 抗体、RNP 抗体检测阳性率与 Tim-3 基因启动子-1516G>T 位点基因分型均无相关性 (P>0.05),见表 4。

表 2 Tim-3 基因-1516G/T 位点基因型及等位基因频率分布[n(%)]

组别	基因型分布			等位基因频率	
	GG	GT	TT	G	T
SLE 组	108(81.82)	24(18.18)	0(0.00)	240(90.91)	24(9.09)
对照组	110(91.67)	9(7.50)	1(0.83)	229(95.42)	11(4.58)
χ^2		7.282		3.953	
P		0.026		0.047	

表 3 2 组三种自身抗体检测阳性率比较(%)

组别	双链 DNA 抗体	Sm 抗体	RNP 抗体
SLE 组	32.8	37.7	42.6
对照组	0.0	0.0	0.0

表 4 SLE 组各基因型中三种自身抗体检测结果[n(%)]

基因型	双链 DNA 抗体		Sm 抗体		RNP 抗体	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
GG	74(68.5)	34(31.5)	64(59.3)	44(40.7)	60(55.6)	48(44.4)
GT	14(58.3)	10(41.7)	18(75.0)	6(25.0)	15(62.5)	9(37.5)

3 讨 论

人类基因组单核苷酸多态性是基因组变异中最常见的一种形式,在人类基因组中大概每 1 000 个碱基就有 1 个 SNP。不同人群之所以对疾病的易感程度有所区别、同种疾病的临床表型不同以及对药物会产生不同反应,部分受到 SNP 的影响。SNP 作为第 3 代遗传标记,在复杂疾病的基因定位、关联分析、个体疾病易感性分析、同种疾病临床表型分析以及药物基因组学的研究中发挥着越来越重要的作用。许多研究均表明, Tim 基因遗传多态性与多种自身免疫性疾病和过敏性疾病的易感性、临床表型有着密切的关系,且不同种族、不同地区之间由于遗传特征不同导致多态性变异亦不同,但 Tim 基因多态性与 SLE 的关联研究尚处于起步阶段^[8-10]。

本研究通过 PCR-RFLP 技术对 132 例 SLE 患者和 120 例健康人群 Tim-3 启动子区多态性位点-1516G>T 的多态性进行分析。SLE 组与对照组-1516G>T 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,达到遗传平衡,具有群体代表性。两组间基因型及等位基因频率比较,差异均有统计学意义,表明云南汉族人群 Tim-3 启动子区多态性位点-1516G>T 的多态性与 SLE 的遗传易感性相关。

在 SLE 众多相关自身抗体中,双链 DNA 抗体、Sm 抗体、RNP 抗体三种抗体的检测意义尤为明显,其可能与疾病发病机制、疾病严重程度等密切相关^[11]。本研究也发现,SLE 组三种自身抗体检测阳性率均高于对照组,差异有统计学意义。细胞因子基因编码区的多态性可以通过抑制与特异性细胞因子受体的结合、启动靶细胞或靶分子的信号转导通路和二级信号通路,从而影响其编码蛋白的结构和表达。相应地,这些变异也能够影响自身免疫反应,导致自身免疫性疾病不同的病情严重程度以及自身抗体水平的差异,因此笔者分析了 SLE 三种自身抗体检测阳性率与 Tim-3 基因启动子区-1516G>T 位点基因型的关系,发现三种自身抗体检测阳性率与 Tim-3 基因启动子区-1516G>T 位点基因分型均无明显相关性,提示 Tim-3 基因-1516G>T 位点不同基因型可能不会影响 SLE 相关自身抗体的表达,但其对 Tim-3 基因表达水平的影响及 SLE 疾病严重程度的影响尚有待于进一步研究证实。

参考文献

- [1] 周广宇,杨永净. 系统性红斑狼疮中 T 细胞作用的研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2005,28(5):274-277.
- [2] Mcintire JJ, Umetsu SE, Akbari O, et al. Identification of Tapr(an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family[J]. Nat Immunol, 2001, 2(12): 1109-1116.
- [3] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease[J]. Nature, 2002, 415(6871):536-541.
- [4] Du WT, Zhao HF, Xu JH, et al. The role of T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule-3 polymorphisms in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Hum Immunol, 2009, 70(6):398-402.
- [5] Xu J, Yang Y, Liu X, et al. The -1541 C>T and +4259 G>T of TIM-3 polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Chinese Hui population[J]. Int J Immunogenet, 2011, 38(6):513-518.
- [6] Yang S, Chen W, Dun H, et al. The relationship between polymorphisms in the promoter region of Tim-3 and unexplained recurrent spontaneous abortion in Han Chinese women[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2013, 11(11):104-111.
- [7] Liao JY, Zhang Q, Liao Y, et al. Association of T-Cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3 (Tim-3) polymorphisms with susceptibility and disease progression of HBV infection[J]. PloS One, 2014, 9(5): e98280-98287.
- [8] 王燕,刘志连,孙捷,等. 新疆维吾尔族和汉族人群 Tim-3 启动子区 rs6555849 位点多态性与变应性鼻炎的相关性研究[J]. 中华耳鼻喉头颈外科, 2011, 46(9):712-717.
- [9] Munoz-Valle JF, Valley Y, Padilla-Gutierrez JR, et al. The +49A>G CTLA-4 polymorphisms is associated with rheumatoid arthritis in Mexican population[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(9/10):725-728.
- [10] Wu Q, Hu L, Cai P, et al. Association analysis of Tim-1 -232G>A and 5383-5397 insertion/deletion polymorphisms with childhood asthma and total serum immunoglobulin E levels in middle China[J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009, 19(2):146-153.
- [11] 李俊,罗娇,徐巍,等. 多种自身抗体联合检测对系统性红斑狼疮的诊断价值及意义[J]. 浙江大学学报:医学版, 2010, 39(4):390-394.