

# 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 基因型与 中国南方人群 Graves' 病的关系

姚 斌, 郝李敏, 严晋华, 李延兵, 翁建平  
(中山大学附属第一医院内分泌科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4)基因第一外显子 A/G(49)多态性与中国南方汉族人群 Graves' 病的关系。【方法】用 PCR-RFLP 确定 CTLA-4 基因第 1 外显子 49 位点基因型,分析广东地区汉族人 Graves' 病患者(GD 组)120 例及 123 名正常人(对照组)CTLA-4 基因多态性。并把 GD 患者按性别、家族史、TRAb、突眼等分别分两亚组后分析 CTLA-4 基因第 1 外显子 A49G 位点基因型及等位基因的频率。【结果】CTLA-4 基因第 1 外显子 49 位点 G 等位基因频率在 GD 组为 0.704,对照组为 0.679,A 等位基因频率在 GD 组为 0.296, 对照组为 0.321, 基因型频率 GG 在 GD 组为 0.483, 对照组为 0.447,AA 在 GD 组为 0.089,对照组为 0.075,二组间均无统计学差异, $P$  值均 $>0.05$ 。在 GD 组,按性别、家族史、TRAb 及突眼进行分亚组后分析,CTLA-4 基因 A49G 位点的基因型、等位基因频率也没有表现出差异( $P$  值均 $>0.05$ )。【结论】CTLA-4 基因第一外显子 A/G(49)多态性可能不是中国南方汉族人 Graves' 病的主要易感因素。

**关键词:** 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4; 基因; Graves' 病; 多态性

中图分类号:R581

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)06-0654-05

## Relationship Between Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen- 4 Gene and Graves' Disease in Chinese Southern Han Population

YAO Bin, HAO Li-min, YAN Jin-hua, LI Yan-bing, WENG Jian-ping

(Department of Endocrinology and Metabolism, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the association between the exon 1 A/G (49) polymorphism in cytotoxic T lymphocyte associated antigen- 4 gene (CTLA-4) and Graves' disease in Chinese Southern Han Population. 【Methods】The method of PCR restriction fragment length polymorphism analysis was used to define the genotype of the exon 1 A/G (49) in CTLA-4 gene. A total of 120 Graves' disease patients (GD group) and 123 normal peoples (control group) were enrolled. All subjects were from Guangdong district. The patients in the GD group were subdivided into two subgroups according to sex and familial history, TRAb and ophthalmopathy to study their gene frequencies of the exon 1 A/G (49) in CTLA-4. 【Results】In the exon 1(49) of CTLA4 gene, the frequencies of G allele were 0.704 and 0.679 in GD group and control group; the frequencies of A allele were 0.296 and 0.321 in GD group and control group; the genotype frequencies of GG were 0.483 and 0.447 in GD group and control group; the genotype frequencies of AA were 0.089 and 0.075 in GD group and control group; the phenotypic frequencies did not differ significantly between the two groups ( $P > 0.05$ ); the distributions of the alleles were similar in the two groups ( $P > 0.05$ ). In GD group, when the patients were subgrouped by sex, familial history, TRAb, and ophthalmopathy, the frequencies of the genotypes in exon 1 of the CTLA-4 A49G gene were also not significant different (all  $P > 0.05$ ). 【Conclusion】This study suggests that the polymorphism of exon 1 A/G (49) in CTLA4 gene are not susceptible gene to Graves' disease for the Chinese Southern Han Population.

**Key words:** cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4; gene; Graves' disease; polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(6):654-658]

收稿日期:2005-01-17

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(20001340)

作者简介:姚 斌(1963-),浙江台州人,硕士,副主任医师,硕士生导师,广东省内分泌学会副主任委员. E-mail: bin@medmail.com.cn

Graves'病(GD)是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病,是自身免疫性甲状腺病之一。GD病的发病机制和病因未明,与大多数自身免疫性疾病一样,易感性由遗传因素和环境因素共同决定的。尽管已进行了大量的研究,GD发病的遗传学机制至今尚未阐明。近年来一些种族的研究发现,细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)基因与GD的发病有关联,认为可能是GD的易感基因<sup>[1]</sup>。CTLA-4是一种跨膜蛋白,表达于活化的T细胞表面,对T细胞的扩增起到抑制作用,保持免疫应答的平衡状态。由于遗传异质性的存在,相同的等位基因在不同的民族可能所起的作用不同,本研究旨在探讨CTLA-4基因与广东地区汉族人GD发病及临床表现之间的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

GD组共有120例,收集于我院门诊及病房就诊的无亲缘关系的GD患者,均为广东地区汉族人。其中男35例,女85例,年龄(36.6±12.8)岁,体质指数(body mass index, BMI)(19.87±2.83)kg/m<sup>2</sup>,其中31例有GD家族史,36例伴突眼,87例TRAb阳性。GD诊断根据临床有甲亢表现及甲状腺功能检测确诊,排除1型糖尿病、桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病。正常对照组(对照组)共123例,均来自我院公开招募的健康志愿者,均无GD及1型糖尿病、桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病家族史,彼此之间无亲缘关系,男46例,女77例,年龄(52.4±13.6)岁, BMI(21.45±1.78)kg/m<sup>2</sup>,均无甲亢临床症状,甲状腺功能检测正常,TRAb检测均为阴性。

### 1.2 DNA提取

取外周静脉血4 mL,柠檬酸钠抗凝,用酚/氯仿法提取白细胞DNA。

### 1.3 CTLA-4基因第1外显子49位点基因多态性检测

用PCR-RFLP确定CTLA-4基因第1外显子49位点基因型,上游引物5'-GCTCTACTTCCTGAGACCT-3',下游引物5'-AGTCTCACTCACC TTTGCAG-3',引物由上海生物工程公司合成。PCR反应体系包括基因组DNA 3.0 μL,10×缓冲液2.5 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>1.5 μL,2 mmol/L dNTP0.5 μL,

20 μmol/L上游引物0.6 μL,20 pmol/L下游引物0.6 μL,Taq酶2.0 U,总体积25.0 μL。经94℃预变性5 min后再进入循环,94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸40 s,共35个循环,末次循环后于72℃延伸10 min,最后4℃保存。PCR扩增产物的BbvI酶切:PCR扩增产物8.0 μL,去离子三蒸水4.5 μL,10×缓冲液1.5 μL,限制性内切酶BbvI(NEB公司)2 U,总体积15.0 μL。37℃酶切16 h。酶切产物用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,硝酸银染色进行基因型鉴定。

### 1.4 基因型分析

分析GD患者按性别、家族史、TRAb情况、有无突眼等分组后CTLA-4基因A49G位点基因型、等位基因频率等的特点。

### 1.5 统计学方法

研究样本的群体代表性用Hardy-Weinberg平衡检验确认,计量资料以均数±标准差表示,组间基因型频率、等位基因频率的比较用χ<sup>2</sup>检验,统计学处理采用SPSS11.0 for Windows软件。

## 2 结果

### 2.1 CTLA-4基因第1外显子49位点基因型

含A49G位点的PCR扩增产物作琼脂糖电泳,扩增片段长度为162 bp,49位点基因型为G/G时,162 bp的PCR产物被消化为88 bp和74 bp 2个片断;而49位点为A/A时则不能被酶切,电泳后只有1条162 bp片断;若49位点为A/G时,则有3条片断,分别是74 bp、88 p和162 bp(见图1)。并且PCR产物在377 DNA Sequence (ABI PRISM™)仪上

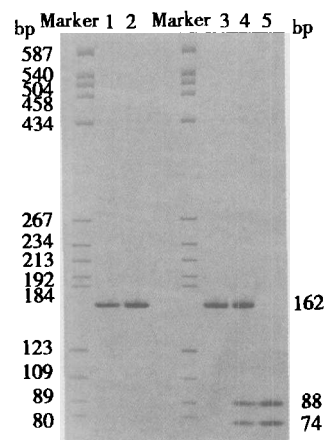


图1 CTLA-4基因扩增结果

Fig.1 PCR result of CTLA-4 gene

1,2:162 bp PCR product, 3,4,5:BbvI digested; 3:AA,4:AG,5:GG

进行测序,检测的结果与 GenBank 已知序列相符。根据实际观察值和期望值代入 Hardy-Weinberg 平衡公式进行检验

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{期望值} - \text{观察值})^2}{\text{期望值}}$$

正常对照组  $\chi^2=0.485, P>0.25$ , GD 组  $\chi^2=0.239, P>0.5, P$  值均大于 0.05, 说明基因型实际频数与期

望频数的差异没有统计学意义,三个基因型其分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。

## 2.2 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型及等位基因频率

正常对照组与 GD 病组 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型频率、等位基因频率及  $\chi^2$  检验,结果见表 1 和表 2。

$\chi^2$  检验结果显示,在正常对照组与 GD 组就

表 1 正常对照组与 GD 组 CTLA-4 A49G 基因型频率的比较

Table 1 The frequencies of the genotypes in exon 1 of the CTLA-4 A49G gene in GD group and control group

Group	n	AA	AG	GG	$\chi^2$	P
Control	123	11 (0.089)	57 (0.463)	55 (0.447)	0.388	0.823
GD	120	9 (0.075)	53 (0.442)	58 (0.483)		

表 2 正常对照组与 GD 组 CTLA-4 A49G 等位基因频率的比较

Table 2 The frequencies of the alleles of the A/G polymorphism in exon 1 of the CTLA-4 gene in GD group and control group

Group	n	A	G	$\chi^2$	P	OR(95%CI)
Control	123	79(0.321)	167(0.679)	0.365	0.546	1.126(0.766, 1.655)
GD	120	71(0.296)	169(0.704)			

OR; odds ratio; CI; confidential interval

CTLA-4 A/G<sup>49</sup> 的基因型和等位基因频率进行比较时, P 值均大于 0.05, 差异无统计学意义。且两组之间携带 G<sup>49</sup> 等位基因的优势比的 95% 置信区间为 (0.766, 1.655), 接受零假设, 总体优势比为 1, 进一步说明两组之间无统计学差异。提示 G<sup>49</sup> 等位基因在所研究群体的 GD 发病中并不起主要决定性的

作用,不是发病所必需的易感基因。

## 2.3 GD 按性别分组后 CTLA-4 基因型

GD 按性别分组后 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因频率及无统计学检验,结果见表 3。

在 GD 患者中,进行组内对照,比较不同性别

表 3 GD 按性别分组后 CTLA-4 基因外显子 1 A49G 位点基因型及等位基因频率

Table 3 The frequencies of the genotypes and alleles in exon 1 of the CTLA-4 A49G gene in GD grouped by sex

GD	n	Genotypes <sup>1)</sup>			Alleles	
		AA	AG	GG	A <sup>2)</sup>	G
Male	35	1 (0.029)	13 (0.371)	21 (0.600)	15 (0.214)	55 (0.786)
Female	85	8 (0.094)	40 (0.471)	37 (0.435)	56 (0.329)	114 (0.671)

1)  $\chi^2=3.609, P=0.165$ ; 2)  $\chi^2=3.280, P=0.07$

CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因频率  $\chi^2$  检验结果显示 P 值均大于 0.05, 无统计学差异。组内比较进一步说明 GD 发病与等位基因 G<sup>49</sup> 在所研究的群体中不存在性别关联。

## 2.4 GD 按家族史分组后 CTLA-4 基因型

GD 按家族史分组后 CTLA-4 基因外显子 1A49G 位点基因型及等位基因的比较及  $\chi^2$  检验,结果见表 4。

在 GD 患者中按家族史分组后,比较 CTLA-4

基因 A49G 位点基因型、等位基因频率  $\chi^2$  检验结果显示 P 值均大于 0.05, 无统计学差异。

## 2.5 GD 按 TRAb 分组后 CTLA-4 基因型

GD 按 TRAb 分组后 CTLA-4 基因外显子 1 A49G 位点基因型及等位基因的比较及  $\chi^2$  检验,结果见表 5。GD 患者按 TRAb 的检测结果进行分组,比较 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因的频率,  $\chi^2$  检验结果显示 P 值均大于 0.05, 无统计学差异。说明 TRAb 阳性组未携带更多的易感基因。

表4 GD按家族史分组后 CTLA-4 基因外显子1 A49G 位点基因型及等位基因频率

Table 4 The frequencies of the genotypes and alleles in exon 1 of the CTLA-4 A49G gene in GD grouped by familial history

Familial history	Genotypes <sup>1)</sup>			Alleles <sup>2)</sup>	
	AA	AG	GG	A	G
Yes (89)	8 (0.090)	40 (0.449)	41 (0.461)	56 (0.315)	122 (0.685)
No (31)	1 (0.032)	13 (0.419)	17 (0.548)	15 (0.242)	47 (0.758)

1)  $\chi^2=1.163$ ,  $P=0.446$ ; 2)  $\chi^2=1.197$ ,  $P=0.274$

## 2.6 GD按有无突眼分组后 CTLA-4 基因型

GD按有无突眼分组后 CTLA-4 基因外显子1 A49G 位点基因型及等位基因的比较及  $\chi^2$  检验, 结果见表6。为了明确突眼的患者是否携带更多的 G<sup>49</sup> 等位基因, 以患 GD 但不伴有突眼作为对照, 比

较 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因的频率,  $\chi^2$  检验结果显示  $P$  值均大于 0.05, 无统计学差异。说明在所研究的群体中, GD 伴有突眼的患者和 GD 不伴有突眼的患者等位基因的携带水平并不存在统计差异。

表5 GD按 TRAb 分组后 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型及等位基因频率的比较

Table 5 The frequencies of the genotypes and alleles in exon 1 of the CTLA-4 A49G gene in GD grouped by TRAb

TRAb	Genotypes <sup>1)</sup>			Alleles <sup>2)</sup>	
	AA	AG	GG	A	G
Negative (33)	3 (0.091)	16 (0.485)	14 (0.424)	22 (0.333)	44 (0.667)
Positive (87)	6 (0.069)	37 (0.425)	44 (0.506)	49 (0.282)	125 (0.718)

1)  $\chi^2=0.674$ ,  $P=0.714$ ; 2)  $\chi^2=0.606$ ,  $P=0.436$

表6 GD组按突眼分组后 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型及等位基因频率的比较

Table 6 The frequencies of the genotypes and alleles in exon 1 of the CTLA-4 A49G gene in GD grouped by ophthalmopathy

Ophthalmopathy	Genotypes <sup>1)</sup>			Alleles <sup>2)</sup>	
	AA	AG	GG	A	G
Yes(84)	6 (0.071)	37 (0.440)	41 (0.488)	49 (0.292)	119 (0.708)
No(36)	3 (0.083)	16 (0.444)	17 (0.472)	22 (0.306)	50 (0.694)

1)  $\chi^2=0.061$ ,  $P=0.970$ ; 2)  $\chi^2=0.047$ ,  $P=0.829$

## 3 讨论

### 3.1 CTLA-4 基因第1外显子49位点基因多态性与GD的关系

GD的发病率越来越高, 它的发病与遗传、免疫及环境因素有关。这方面研究较多的是 HLA 等位基因, 但随着研究的深入, 发现 HLA 等位基因与 GD 的相关性较弱<sup>[2]</sup>, 提示 GD 可能还同其他基因有关。许多研究均证明, CTLA-4 基因存在多态性, 与 GD 等自身免疫性疾病密切相关, 国内也有 GD 病与 CTLA-4 基因多态性之间关系研究的报道, 如王巧宏等<sup>[3]</sup>分别在东、西部中国汉族人群中用病例对照的方法研究发现 CTLA-4 基因多态性与 GD 有关, 但金迎等<sup>[4]</sup>为了确定位于染色体 2q31-q33 区的 CTLA-4 基因是否是中国北方汉族人 GD 的主要易

感基因。采用家系连锁分析的方法进行研究, 结果显示染色体 2q31-q33 区的 CTLA-4 基因不存在与中国北方汉族 GD 相连锁的基因位点。本研究则在中国南方人群对 120 名 GD 病患者及 123 名正常对照者用病例对照的方法研究发现 CTLA-4 基因外显子 1 区 G 等位基因频率在 GD 患者中为 0.704, 在正常对照组为 0.679, A 等位基因频率在 GD 患者中为 0.296, 在正常对照组为 0.321, 基因型频率 GG 在 Graves' 病患者中为 0.483, 在正常对照组为 0.447, AA 在 Graves' 病患者中为 0.089, 在正常对照组为 0.075, 二组间均无统计学差异,  $P$  值均  $>0.05$ 。这与国内东、西部中国汉族人群研究的结果不同, 提示 CTLA-4 基因 1 号外显子 A49G 多态性与广东汉族人(中国南方人群)GD 无明显关联。

### 3.2 CTLA-4 基因多态性与 GD 患者性别、家族史、突眼等的关系

由于 GD 发病女性明显高于男性, Donner 等<sup>[5]</sup>的研究结果认为 GD 患者与正常对照的等位基因携带水平有着明显的性别差异,  $P < 0.002$ , 我国青岛的研究也进行了性别的比较<sup>[6]</sup>, 未发现统计学差异。我们在 GD 患者中, 比较不同性别 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因频率, 经  $\chi^2$  检验结果显示  $P$  值均大于 0.05, 无统计学差异, 说明 GD 发病与等位基因 G<sup>49</sup> 在所研究的群体中不存在性别关联。

GD 的发病呈现明显的家族聚集现象, GD 家庭成员患病率明显高于普通人群, 同卵双胞胎患病率高达 60%。我们所研究的群体, 家族史阳性率为 25.8%, 家族聚集现象常提示疾病的遗传倾向明显, 这种遗传因素是否就是 CTLA-4 基因多态性所致抑或与其他基因有关? 为了明确有家族史的患者所携带的 CTLA-4 等位基因与无家族史的患者是否不同, 在 GD 患者中按家族史分组后, 比较 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因频率,  $\chi^2$  检验结果显示  $P$  值均大于 0.05, 无统计学差异。家族史的比较说明本组 GD 患者中, 有家族史的 GD 患者所携带的 CTLA-4 基因与无家族史的 GD 患者比无明显差异。

GD 是器官特异性的自身免疫性疾病, TRAb 是人类特有的一种直接抗促甲状腺激素受体的自身抗体, 由 B 淋巴细胞产生的不均一性的多克隆抗体。免疫指标的异常对疾病的诊断、预后均有重要的意义。我们所研究的群体, TRAb 阳性率为 72.5%, 为了明确 TRAb 阳性的患者所携带的等位基因与 TRAb 阴性的患者是否不同, 在 GD 患者中按 TRAb 的检测结果进行分组, 比较 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因的频率,  $\chi^2$  检验结果显示  $P$  值均大于 0.05, 无统计学差异。说明 TRAb 阳性组与 TRAb 阴性的患者相比 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型无明显差别。

GD 患者中, 约有 25%~50% 伴有眼征, GD 患者突眼的发生与遗传因素有一定关联。Bijayeswar 等<sup>[7-9]</sup>研究了 278 例 GD 伴突眼、GD 无突眼及正常对照组人群 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因的频率, 发现 GD 伴突眼患者 GG、AG 基因型频率明显高于 GD 无突眼患者 ( $P=0.012$ )。而且结果提示 GG、AG 基因型频率与突眼严重程度明显相关, ATA (美国甲状腺协会) 分级突眼度在 5-6 级、3-4 级及 1-2 级患者分别与 0 级 GD 患者比较其 OR 及 95%CI 分别是 3.06 (1.54-6.08,  $P=0.001$ )、1.67 (1.01-2.07,  $P=0.030$ ) 及 1.49 (0.81-2.73,  $P=0.126$ )。在本研究中所选的突眼患者均表现有 GD 的其它特征, 并且同时排除了由于其它疾病引起突眼的可能, 在 120 例患者中有 36 例伴有突眼, 占 30.0%。为了明确本组 GD 伴突眼的患者是否携带

更多的 G<sup>49</sup> 等位基因, 以患 GD 但不伴有突眼作为对照, 比较 CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因的频率, 经  $\chi^2$  检验结果显示  $P$  值均大于 0.05, 无统计学差异。说明在所研究的群体中, GD 伴有突眼的患者和 GD 不伴有突眼的患者 CTLA-4 等位基因的携带水平并不存在统计差异, 说明遗传异质性的存在。

因此, 本研究结果显示定位于染色体 2q31-q33 区 CTLA-4 基因可能不是中国广东地区汉族人 GD 的主要易感基因, 同一基因在不同种族中所起的作用可能有所不同。在 GD 组, 按性别、家族史、TRAb 及突眼进行分组研究, CTLA-4 基因 A49G 位点基因型、等位基因的频率也没有表现出差异, 进一步说明 CTLA-4 基因第 1 外显子 49 位点基因多态性可能不是中国广东地区汉族人 Graves 病的主要易感基因。

#### 参考文献:

- [1] Hassen HK, Mohamed B, Noura BE, *et al.* CTLA-4 gene polymorphisms in Tunisian patients with graves' disease[J]. *Clinical Immunology*, 2001, 101(3): 361-5.
- [2] Roman SH, Greenberg, D, Rubinstein P, *et al.* Genetics of autoimmune thyroid disease: lack of evidence for linkage to HLA within families[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 74(3): 496-503.
- [3] 王巧宏, 任跃忠. 中国人 CTLA-4 基因外显子 1 多态性与 Graves 病的相关性[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, 19(4): 297-9.
- [4] 金迎, 贾松涛, 滕卫平等. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 基因与中国北方汉族 Graves 病连锁关系研究[J]. *中华内科杂志*, 2002, 41(12): 809-12.
- [5] Donner H, Rm H, Walfish PG, *et al.* CTLA-4 Alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type I diabetes mellitus[J]. *J Clin Endocri Metab*, 1997, 82(1): 143-6.
- [6] 王雯, 王斐, 马瑞欣等. 自身免疫性甲状腺病 CTLA-4 基因外显子 1A/G49 多态性研究[J]. *免疫学杂志*, 2001, 17(2): 116-8.
- [7] Vaidya B, Imrie H, Perros P, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte antigen -4 (CTLA -4) gene polymorphism confers susceptibility to thyroid associated orbitopathy[J]. *Lancet*, 1999, 354(9180): 743-4.
- [8] Ban Y, Concepcion ES, Villanueva R, *et al.* Analysis of immune regulatory genes in familial and sporadic graves' disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(9): 4562-8.
- [9] Nakkash-Chmairie H, Makki RF, Abdelhamid E, *et al.* CTLA-4 gene polymorphism and its association with Graves' disease in the Lebanese population [J]. *Eur J Immunogenet*, 2004, 31(3): 141-3.

(编辑 张思健)