

• 临床检验研究论著 •

## CD40 基因多态性与格雷夫斯病的相关性研究

黄加忠, 李 靖, 戴翠萍

(淮阴卫生高等职业技术学校, 江苏淮阴 223300)

**摘要:**目的 探讨 CD40 基因 5' 非翻译区<sub>1</sub> 位点核苷酸多态性与格雷夫斯病(GD)的相关性。方法 使用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术测定 128 例 GD 患者(实验组)和 150 例健康人群(对照组)CD40 基因 5' 非翻译区位点的基因型。结果 实验组 CD40 基因 5' 非翻译区域多态性 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 46.09%、28.91% 和 25%, 对照组分别为 28.67%、36.67% 和 34.66%, 实验组和对照组 3 种基因型的分布频率之间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验组等位基因 C 和 T 频率分别为 60.55% 和 39.45%, 对照组等位基因 C 和 T 频率分别为 47% 和 53%, 实验组和对照组 C、T 等位基因分布频率之间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。有突眼症状的 GD 患者的 CD40 基因 5' 非翻译区域的 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 64.1%、20.51% 和 15.38%, 无突眼症状的 GD 患者 3 中基因型频率分别为 38.02%、32.58% 和 29.2%; 有突眼症状 GD 患者和无突眼症状的 GD 患者的 3 种基因型频率之间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 有突眼症状 GD 患者的 C 和 T 的等位基因频率分别为 74.36% 和 25.64%, 无突眼症状 GD 患者的等位基因频率分别为 54.49% 和 45.51%, 有突眼症状 GD 患者和无突眼症状的 GD 患者 C 和 T 的等位基因频率之间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。GD 复发患者中 CD40 基因 5' 非翻译区域 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 60%、26.67% 和 13.33%, GD 初发患者中 3 种基因型的频率分别为 38.56%、30.12% 和 31.32%, 复发 GD 患者的 3 种基因型频率和初发患者比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 复发 GD 患者的 C 和 T 等位基因频率分别为 73.33% 和 26.67%, 初发患者的等位基因频率为 53.61% 和 46.38%, 复发患者和初发患者的等位基因频率之间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 CD40 基因 5' 非翻译区域多态性与 GD 的发病、症状和预后相关。

**关键词:** 格雷夫斯病; 抗原, CD40; 多态现象, 遗传

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)16-2099-02

## Correlation between CD40 gene polymorphism and Graves disease

Huang Jiazong, Li Jing, Dai Cuiping

(Huaiyin Advanced Vocational and Technical School of Health, Huaiyin, Jiangsu 223300, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the relationship between the polymorphism of CD40 gene 5' untranslated region position<sub>1</sub> site and Graves' disease(GD). **Methods** 128 cases of GD patients were recruited as experimental group while 150 cases healthy people were recruited as control group. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was used to analysis the genotype of CD40 gene 5' untranslated region position<sub>1</sub> site. **Results** The distribution frequencies of genotypes of CC, CT and TT of the CD40 gene 5' untranslated region position<sub>1</sub> site was 46.09%, 28.91% and 25% in the experimental group, while the control group were 28.67%, 36.67% and 34.66%, which was significantly different ( $P < 0.05$ ). The frequencies of allele C and T were 60.55% and 39.45% in the experimental group, while in the control group were 47% and 53%, which was significantly different( $P < 0.01$ ). The distribution frequencies of CC, CT and TT of the CD40 gene 5' untranslated region position<sub>1</sub> site were 64.1%, 20.51% and 15.38% in the GD patients with symptoms of exophthalmia, while GD patients without symptoms of exophthalmia were 38.02%, 32.58% and 29.2%, which was significantly different ( $P < 0.05$ ). The frequencies of allele C and T were 74.36% and 25.64% in the GD patients with symptoms of exophthalmia, while GD patients without symptoms of exophthalmia were 54.49% and 45.51%, which was significantly different( $P < 0.01$ ). The distribution frequencies of CC, CT and TT of the CD40 gene 5' untranslated region position<sub>1</sub> site were 60%, 26.67% and 13.33% in the GD patients with relapse, while initial onset patients with GD were 38.56%, 30.12% and 31.32%, which was significantly different( $P < 0.05$ ). The frequencies of allele C and T were 73.33% and 26.67% in the GD patients with relapse, while initial onset patients with were 53.61% and 46.38%, which was significantly different( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The polymorphism of CD40 gene 5' untranslated region position<sub>1</sub> site C/T was associated with pathogenesis, symptoms and prognosis of GD.

**Key words:** graves disease; antingens, CD40; polymorphism, genetic

格雷夫斯病(GD)又称为毒性弥漫性甲状腺肿,是一组以弥漫性甲状腺肿大和甲状腺功能亢进为主的症候群,其他的临床症状还包括突眼、胫前区水肿以及白细胞减少等<sup>[1]</sup>。目前关于 Graves 病的发病原因尚不明确,但有证据表明自身免疫的异常可能和 Graves 病的发病有关<sup>[2]</sup>。CD40 是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员之一,主要表达于 B 细胞、胸腺上皮细胞、树突状细胞等表面,其主要功能是参与细胞和体液免

疫并且在抗原递呈中发挥作用<sup>[3]</sup>。本研究利用限制性长度多态性聚合酶链式反应(RFLP-PCR)研究 CD40 基因 5' 非翻译区域<sub>1</sub> 位点单核苷酸多态性及其与甲亢患者症状预后的相关性。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择自 2008 年 7 月至 2010 年 1 月在本院内内分泌科就诊并且确诊为 GD 的患者 128 例作为实验组,其中男 54 例,女 74 例;年龄 22~76 岁,平均(46.34±12.56)岁;其中

有突眼症状者 39 例,无突眼症状者 89 例;有白细胞减少症状者 28 例,无白细胞减少症状者 100 例;初次发病者 83 例,经服药好转停药后复发者 45 例。对照组为在本院进行健康体检的健康人 150 例,既往无甲亢病史,其中男 61 例,女 89 例;年龄 23~75 岁,平均(47.13±13.14)岁。实验组和对照组的年龄、性别比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

**1.2 CD40 基因 5′非翻译区域基因型判定** 实验组和对照组均抽取静脉血 2 mL,使用酚-氯仿-异戊醇方法抽提 DNA,使用聚合酶链式反应(PCR)对目标片段进行扩增,引物由大连 TaKaRa 公司合成,正向引物序列为:5′-TGG GAA TGT TCT GGG GAA-3′;反向引物序列为:5′- AGG CCT CTT CCC CGA A- 3′;PCR 反应体系为:基因组 DNA 2 μL,10×PCR buffer 5 μL(大连 TAKARA 公司生产),dNTP(25 mmol/L,大连 TAKARA 公司生产)3 L,Taq DNA 聚合酶 0.5 μL (2.5 U,大连 TAKARA 公司生产),MgCl<sub>2</sub> 3 μL(25 mmol/L,大连 TAKARA 公司生产),正向引物 1 μL,反向引物 1 μL,加水至 50 μL。PCR 反应条件:94 ℃预变性 10 min;94 ℃变性 45 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,30 个循环;72 ℃延伸 5 min。取 PCR 产物 2 μL,Nco I 限制酶 2 μL,10×buffer 2 μL,加去离子水至 20 μL,37 ℃水浴过夜,反应产物 5 μL 加上样缓冲液 1 μL,在 2%的琼脂糖凝胶电泳 30 min,在紫外灯下观察结果并且摄影,通过酶切产物的条带大小判断判断基因型。有 184 bp 和 136 bp 条带为 CC 基因型,320 bp、184 bp 和 136 bp 条带为 CT 基因型,仅有 320 bp 条带为 TT 基因型。

**1.3 统计学处理** 所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 实验组与对照组 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型分布** 实验组 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 46.09%、28.91%和 25.00%,而对照组 3 种基因型的频率分别为 28.67%、36.67%和 34.66%,实验组和对照组 3 种基因型的分布频率之间的差异有统计学意义( $\chi^2=9.11,P<0.05$ )。实验组等位基因 C 和 T 频率分别为 60.55%和 39.45%,对照组等位基因 C 和 T 频率分别为 47.00%和 53.00%,实验组和对照组 C、T 等位基因分布频率之间的差异有统计学意义( $\chi^2=10.18,P<0.01$ )。见表 1。

表 1 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型以及等位基因分布

| 组别       | 基因型例数( <i>n</i> ) |    |    | 等位基因频数( <i>n</i> ) |     |
|----------|-------------------|----|----|--------------------|-----|
|          | CC                | CT | TT | C                  | T   |
| 实验组      | 59                | 37 | 32 | 155                | 101 |
| 对照组      | 43                | 55 | 52 | 141                | 159 |
| $\chi^2$ | 9.11              |    |    | 10.18              |     |
| <i>P</i> | <0.05             |    |    | <0.01              |     |

**2.2 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型与 GD 白细胞减少的关系** 白细胞减少的 GD 患者 D40 基因 5′非翻译区域 CC、CT 和 TT 基因型的分布频率分别为 53.57%、25%和 21.43%,而白细胞正常的 GD 患者的 3 种基因型的分布频率分别为 44%、30%和 26%;白细胞减少的 GD 患者的 C 和 T 等位基因频率分别为 68.07%和 31.93%,而白细胞正常的患者的等位基因频率分别为 57.73%和 42.27%。白细胞减少和正常的 GD 患者比较,CC、CT 和 TT 基因型频率及 C、T 等位基

因频率差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。

表 2 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型与等位基因和白细胞减少的关系

| 组别       | 基因型例数( <i>n</i> ) |    |    | 等位基因频数( <i>n</i> ) |    |
|----------|-------------------|----|----|--------------------|----|
|          | CC                | CT | TT | C                  | T  |
| 白细胞减少    | 15                | 7  | 6  | 37                 | 19 |
| 白细胞正常    | 44                | 30 | 26 | 112                | 82 |
| $\chi^2$ | 0.81              |    |    | 1.26               |    |
| <i>P</i> | >0.05             |    |    | >0.05              |    |

**2.3 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型与 GD 突眼症状之间的关系** 有突眼症状的 GD 患者的 CD40 基因 5′非翻译区域的 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 64.1%、20.51%和 15.38%,而无突眼症状的 GD 患者 3 中基因型频率分别为 38.02%、32.58%和 29.2%;有突眼症状 GD 患者和无突眼症状的 GD 患者的 3 种基因型频率之间的差异有统计学意义( $\chi^2=7.39,P<0.05$ );有突眼症状 GD 患者的 C 和 T 的等位基因频率分别为 74.36%和 25.64%,而无突眼症状 GD 患者的等位基因频率分别为 54.49%和 45.51%,有突眼症状 GD 患者和无突眼症状的 GD 患者 C 和 T 的等位基因频率之间的差异有统计学意义( $\chi^2=8.96,P<0.01$ )。见表 3。

表 3 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型与等位基因与 GD 突眼症状之间的关系

| 组别       | 基因型例数( <i>n</i> ) |    |    | 等位基因频数( <i>n</i> ) |    |
|----------|-------------------|----|----|--------------------|----|
|          | CC                | CT | TT | C                  | T  |
| 有突眼症状    | 25                | 8  | 6  | 58                 | 20 |
| 无突眼症状    | 34                | 29 | 26 | 97                 | 81 |
| $\chi^2$ | 7.39              |    |    | 8.96               |    |
| <i>P</i> | <0.05             |    |    | <0.01              |    |

**2.4 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型与 GD 复发之间的关系** 在复发的 GD 患者中 CD40 基因 5′非翻译区域 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 60%、26.67%和 13.33%,而初发患者中 3 种基因型的频率分别为 38.56%、30.12%和 31.32%,复发 GD 患者的 3 种基因型频率和初发患者的差异具有统计学意义( $\chi^2=6.81,P<0.05$ );复发 GD 患者的 C 和 T 等位基因频率分别为 73.33%和 26.67%,而初发患者的等位基因频率为 53.61%和 46.38%,复发患者和初发患者的等位基因频率的差异有统计学意义( $\chi^2=9.51,P<0.01$ )。见表 4。

表 4 CD40 基因 5′非翻译区域多态性基因型和等位基因与 GD 复发之间的关系

| 组别       | 基因型例数( <i>n</i> ) |    |    | 等位基因频数( <i>n</i> ) |    |
|----------|-------------------|----|----|--------------------|----|
|          | CC                | CT | TT | C                  | T  |
| 复发       | 27                | 12 | 6  | 66                 | 24 |
| 初发       | 32                | 25 | 26 | 89                 | 77 |
| $\chi^2$ | 6.81              |    |    | 9.51               |    |
| <i>P</i> | <0.05             |    |    | <0.01              |    |

## 3 讨 论

关于 GD 的发病原因,目前尚无明确的结论,大多数研究结果都认为 GD 自身免疫性疾病,其主要依(下转第 2102 页)

**2.2 HE4 和 CA125 联合检测用于绝经患者卵巢癌发病风险的预测情况** 见表 2,敏感度 88.89%,特异度 77.27%。两组患者发病风险的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**3 讨 论**

目前,唯一临床接受的卵巢癌血清标志物是 CA125,尽管总体来说 CA125 有较高的灵敏度,但是仅用它筛选卵巢良性肿瘤存在严重不足的。因为在生理情况(月经期或妊娠期)和一些良性疾病(子宫内膜异位等)以及肝硬化、心衰等疾病患者中其水平都可能升高<sup>[2]</sup>。HE4 基因最早是由 Kirchhoff 等<sup>[3]</sup>在人附睾上皮细胞中发现的,定位于染色体 20q12~13.1 上,全长只有 12 kb 左右,编码的蛋白质被认为是附睾特有的并与精子成熟有关的蛋白质。后来的免疫组化和基因芯片研究证实,在人正常组织中,HE4 主要在生殖道和近端气管上皮中有表达,唾液腺中也有较高表达,而正常卵巢组织中几乎无表达;在恶性肿瘤组织中,如卵巢恶性肿瘤中常见其表达上调,是卵巢恶性肿瘤中最常见的表达上调基因之一,在大多数非卵巢恶性肿瘤中不表达或低表达<sup>[3]</sup>。现在认为,HE4 是诊断卵巢癌的一种新型血清标志物,尤其对于早期卵巢癌的诊断,HE4 和 CA125 联合检测并计算风险值可提高诊断能力<sup>[4]</sup>。

本研究通过对 212 例卵巢癌患者、284 例卵巢良性肿瘤患者血清 HE4 和 CA125 水平检测并计算卵巢癌发病风险(ROMA)值发现,ROMA 值用于卵巢癌发病风险评估的敏感度和特异度,未绝经患者分别为 82.86%和 75.83%;绝经患者分别为 88.89%和 77.27%。高风险患者在卵巢癌中所占比例明显高于卵巢良性肿瘤组( $P<0.05$ )。

目前,HE4 在卵巢癌发病过程中的具体机制还尚未阐明,但国内近几年关于 HE4 的基础研究和临床实验资料报道逐渐

增多<sup>[5-7]</sup>。本研究表明 HE4 和 CA125 联合检测并计算及风险值在卵巢癌发病风险预测中有很高的应用价值。

**参考文献**

[1] Moore RG, Mcmeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian Cancer in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 40-46.

[2] Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM, et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian Cancer detection and monitoring for disease recurrence[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(3): 374-382.

[3] Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors[J]. Biol Reprod, 1991, 45(2): 350-357.

[4] 董丽, 吕晓红, 叶雪, 等. 血清人附睾分泌蛋白 4 和 CA125 水平检测在卵巢恶性肿瘤中的诊断价值[J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43(12): 935.

[5] 张东妹, 徐惠贞, 杨景阳. 血清 HE4 及 CA125 水平检测在早期卵巢恶性肿瘤诊断中的价值[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2010(4): 327-330, 334.

[6] 姚永良, 刘琴, 李祥元. 血清 HE4、TPS 和 CA125 联检在卵巢癌诊断中的应用价值[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(4): 409-411.

[7] 苏彤, 王晓岩, 刘辉, 等. 联合检测附睾蛋白 4 和肿瘤抗原 125 在卵巢癌患者血清中的水平及临床意义[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2011, 14(10): 1421-1423.

(收稿日期: 2013-05-08)

(上接第 2100 页)

据是在 GD 患者中存在抗 TSH 受体抗体 (TRAb)<sup>[4]</sup>。此外, 研究还表明遗传因素也是 GD 的起病的危险因素之一。现有的研究表明 GD 可能与 HLA 基因<sup>[5]</sup>及 FcRL3 基因<sup>[6]</sup>多态性相关。

GD 的免疫应答过程也依赖于免疫细胞间相互识别的多种抗原, 其中 CD40 是与 T 细胞和 B 细胞功能有关的一种表面抗原, 由 N 端信号肽、胞膜外区、跨膜区和胞浆区等区域组成, 主要表达于 B 细胞、胸腺上皮细胞、活化的单核/巨噬细胞、树突状细胞、造血祖细胞、上皮细胞、内皮细胞和部分肿瘤细胞系表面, 其主要功能为通过调节非受体型酪氨酸蛋白激酶, 活化 Rel/NF- $\kappa$ B 等转录因子, 诱导 Bcl-xL、Cdk4 和 Cdk6 蛋白活化, 并且能够导致 T 细胞免疫的负性调节, 引发自身免疫<sup>[3]</sup>。

通过对 GD 患者和健康人 CD40 基因 5'非翻译区域多态性基因型的分析, 发现 GD 患者的 CC 基因型的频率为 46.09%, 明显高于健康人( $P<0.05$ ), 并且 GD 患者的 C、T 等位基因频率分布与健康人, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 本研究表明, CD40 基因的 5'非翻译区域多态性和 GD 的易感性有关, 并且等位基因 C 可能是 GD 的易感基因, 本研究结果和罗惠辛等<sup>[7]</sup>研究结果相一致。

叶石敦等<sup>[8]</sup>研究表明, 通过 CD40 途径能够减少 CD8<sup>+</sup> 细胞的数量, 从而导致 GD 的预后变差, 提示 CD40 基因多态性可能与 GD 的预后相关。本研究表明有突眼症状的 GD 患者的 CC 基因型的频率明显高于没有突眼症状 GD 患者( $P<0.05$ ); C 等位基因的频率明显高于没有突眼症状 GD 患者( $P<0.01$ ); 同样, 复发的 GD 患者的 CC 基因型频率明显高于初发的患者( $P<0.05$ ), 复发的 GD 患者 C 等位基因也明显高于

初发的患者( $P<0.01$ )。本研究表明 CC 基因型和 GD 的突眼症状、与预后相关。

综上所述, CD40 基因 5'非翻译区域多态性基因型可能与 GD 的发病、症状和预后相关。

**参考文献**

[1] 余毅恺, 张木勋, 胡蜀红, 等. 影响甲亢患者药物治疗预后的因素分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2009, 25(2): 184-185.

[2] 吕兆琴, 孙斌. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  基因多态性与 Graves 眼病的相关性研究[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(7): 633-636.

[3] 文丽君, 刘海燕. 淋巴细胞表面 CD40 分子的表达和作用[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(5): 448-450.

[4] 韦华, 李凤玲, 方文珠, 等. 测定血清 TRAb、HA 在 Graves 眼病中的临床意义[J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(7): 19-21.

[5] 曾建业, 李山, 何凤屏, 等. 广西沿海地区 Graves 病与 HLA-DQA1、DRB1\*09 等位基因的相关性研究[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(2): 251-252.

[6] 郑瑞芝, 赵志刚, 张素华, 等. FcRL3 基因三个单核苷酸多态性与重庆汉族人群 Graves 病关联研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(6): 681-685.

[7] 罗惠辛, 张鹏, 邱明才. Graves 病甲亢和 CD40 基因单核苷酸多态性的相关性[J]. 天津医药, 2006, 34(4): 229-230.

[8] 叶石敦, 莫雪梅, 张光, 等. vMIP-II 各受体结合活性位点分析[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(23): 3546-3548.

(收稿日期: 2012-12-16)