·论　著·

云南汉族人群 Tim-1 外显子 4 上 5509-5511delCAA 基因多态性与类风湿关节炎关联性研究*

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

摘　要：目的　探讨 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 基因多态性与云南高原地区汉族人群类风湿关节炎（RA）的遗传易感性有无关联。**方法**　采用 PCR-DNA 测序法对 196 名云南汉族 RA 患者和 190 名健康体检者 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 基因多态性进行检测，同时采用间接免疫荧光法检测其类风湿因子（RF）、抗环瓜氨酸肽（CCP）、抗角蛋白抗体（AKA）3 种自身抗体。**结果**　RA 组和对照组 Tim-1 外显子 4 上多态性位点 5509-5511delCAA 的基因型及等位基因频率差异有统计学意义（$P<0.05$）；RA 组 Tim-1 外显子 4 上 5509-5511delCAA 位点不同基因型中 3 种自身抗体，RF、CCP 阳性率检测的差异无统计学意义（$P>0.05$），而 AKA 阳性率检测的差异有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**　云南汉族人群 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 位点存在多态性变异，且其多态性变异与 RA 遗传易感性相关，其不同基因型不会影响 RA 相关自身抗体 RF、CCP 的表达，而对 AKA 的表达有影响。

关键词：类风湿关节炎；　T 细胞免疫球蛋白域黏蛋白域蛋白-1；　基因多态性；　遗传易感性
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.005　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)01-0012-03

Association analysis of 5509-5511delCAA polymorphism in Tim-1 exon4 with rheumatoid arthritis in Han population of Yunnan province

Cao Xianghong, Peng Chuanmei△, Gao Hui, Fu Xiaoye, Dong Yulin, Wang Yang
(*Department of Medical Laboratory, Affiliated Yanan Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan* 650051, *China*)

Abstract: Objective　To analyze the association between the polymorphism of 5509-5511delCAA in exon4 of Tim-1 gene and the susceptibility to rheumatoid arthritis(RA) in a group of Han population from Yunnan province. **Methods**　The PCR-DNA sequencing analysis was used to detect the polymorphism of 5509-5511delCAA in exon4 of Tim-1 gene in 196 RA Han nationality patients and 190 individuals of healthy physical examination(control). The indirect immunofluorescence assay was adopted to detect the three related aotuantibodies of RA, including the rheumatoid factors(RF) and the anti-cyclic citrullinated peptide(Anti-CCP) and the anti-keratin antibodies(AKA). **Results**　There were statistically significant differences in genotype and allele frequency of 5509-5511delCAA between the RA group and the control group($P<0.05$); the positive rate of RF and the anti-CCP between different genotypes of 5509-5511delCAA in the RA group had no statistically significant differences($P>0.05$), but the positive rate of AKA between different genotypes of 5509-5511delCAA in the RA group had statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion**　The 5509-5511delCAA site of Tim-1 exon4 has the polymorphic variation, the 5509-5511delCAA genotype maybe related with the genetic susceptibility to RA in Han population of Yunnan province, the different genotypes does not affect the expression of RF and the anti-CCP, but affects the expression of AKA.

Key words: rheumatoid arthritis;　T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein -1;　gene polymorphism; susceptibility

类风湿关节炎（RA）是一种常见的以关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫性疾病，病因至今尚未完全清楚，一般认为免疫、遗传、感染、内分泌等为其发病诱因，而 T 细胞一直被认为与 RA 有密切的联系，因为它们代表滑膜浸润细胞中主要细胞亚群。实验证明 T 细胞尤其是 $CD4^+$ T 细胞参与 RA 的激发与延续[1]。

T 细胞免疫球蛋白域黏蛋白域蛋白（Tim）基因家族是 McIntire 等于 2001 年通过定位克隆技术发现的一个新的基因家族。小鼠 Tim 家族基因共有 8 个成员（Tim1～8），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[2]。Tim-1 基因是 Tim 基因家族第一个被发现的成员，许多研究表明 Tim-1 是重要的免疫调节分子，在自身免疫病、过敏性疾病等 Th1/Th2 相关性疾病中发挥重要作用[3]。

近年来，国内外的研究显示人类 Tim-1 的启动子区和编码区均存在多态性的变化[4-8]，这些多态性与哮喘、过敏性鼻炎和 RA 等疾病的相关性因种族、地区、民族的差异而不尽相同。因此，对 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 基因多态性与云南高原地区汉族人群 RA 的遗传易感性多态性进行研究，为探索 RA 易感的遗传因素提供数据支持，为揭示 RA 发病机理提供新的依据。

*　基金项目：云南省教育厅科学研究基金（2011C094）；云南省应用基础研究计划自筹项目（2013FZ237）。　作者简介：曹向红，女，主任医师，主要研究方向为自身免疫性疾病的发病机理。　△　通讯作者：E-mail：meizimh@sina.com。

1　资料与方法

1.1　一般资料　RA 患者 196 例，其中男性 72 例，女性 124 例，年龄 25～75 岁。RA 患者符合 2009 年美国风湿病协会修订的 RA 诊断标准。对照组为 190 名云南地区健康体检者，其中男性 87 例，女性 103 例，年龄 22～67 岁，无自身免疫性疾病相关病史。所有对象均为 3 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　仪器主要有 PCR 扩增仪（DA7600 公司）、电泳仪（美国的 Bio-rad 公司）、凝胶成像系统（美国的 Bio-rad 公司）、荧光显微镜（德国的 Leica 公司）、测序仪（美国的 ABI3730 公司）。试剂有人全血基因 DNA 提取试剂盒（美国的 Axygen 公司）、TaqDNA 聚合酶 1U（美国的 Omega 公司）、dNTPs（美国的 Omega 公司）、琼脂糖（西班牙的 Biowest 公司）、荧光染料（美国的 EB 公司）、荧光免疫印迹试剂盒（德国的 Omon 公司）、测序试剂盒（美国的 ABI 公司）。

1.3　方法

1.3.1　模板 DNA 提取　在知情同意的原则下，采集 RA 患者及健康体检者 EDTA 抗凝静脉血 2 mL。RA 组及对照组均采用荧光免疫印迹试剂盒检测 3 种自身抗体：类风湿因子（RF）、抗环瓜氨酸肽（CCP）、抗角蛋白抗体（AKA）。采用人全血基因 DNA 提取试剂盒提取 RA 患者及健康体检者外周血基因组 DNA，方法严格按照试剂盒的说明书进行，提取产物溶于 TE 缓冲液，－20 ℃保存。

1.3.2　PCR 反应　参照 GenBank 中 Tim-1 DNA 序列（编号 AC026777），利用 Primer Premier 5.0 软件自行设计合成一对引物：P1：5′-GAA CGA GCA CCA CTG TTC CA-3′；P2：5′-TTA CCT GGT TCA TGG TTC TG-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 Mg^{2+}、dNTPs 各 10 nmoL，引物 P1 和 P2 各 15 pmoL，TaqDNA 聚合酶 1U，不足体积用灭菌双蒸水补充至 25 μL。PCR 反应循环参数：94 ℃预变性 5 min，94 ℃ 40 s，55 ℃ 40 s，72 ℃ 60 s，35 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。

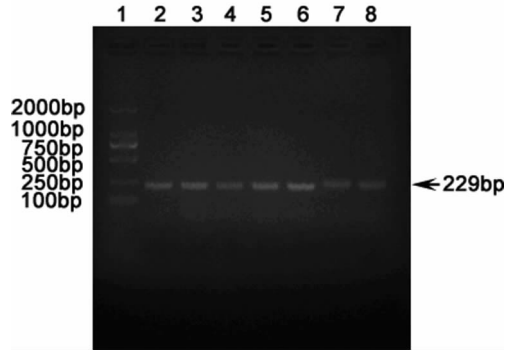
1.3.3　电泳　PCR 产物用 2%琼脂糖电泳、EB 染色，紫外凝胶成像系统成像，观察条带纯度。

1.3.4　测序　高纯度的 PCR 产物送上海生物工程公司测序。

1.4　统计学处理　采用测序分析软件 DNA-Star 对测序结果进行分析，计算基因型和等位基因频率，进行 Hardy-Weinberg 平衡检验，基因型和等位基因的组间比较、各自身抗体和基因型的相关性比较均采用 SPSS17.0 统计软件进行 χ^2 检验分析，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结　　果

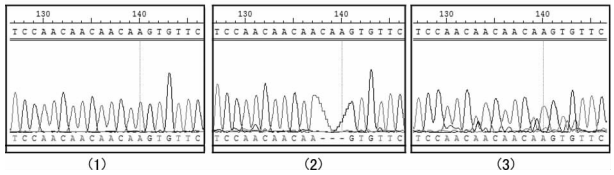
2.1　PCR 扩增　Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 多态性采用 PCR-DNA 测序方法分析，PCR 扩增产物长度为 229 bp，见图 1。



1：标志物；2～8：PCR 产物（229 bp）

图 1　5509-5511delCAA 位点 PCR 产物电泳图

2.2　基因型测序分析图　Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 不同基因型测序分析图，见图 2。



（1）基因类型 1：ins/ins 纯合子型（2）基因类型 2：del/del 纯合子型（3）基因类型 3：del/ins 杂合子型

图 2　5509-5511delCAA 位点不同基因型测序分析图

2.3　基因型与等位基因频率分布　采用测序分析软件 DNA-Star 对测序结果进行分析，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。5509-5511delCAA 位点基因型频数分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律，达到遗传平衡，具有群体代表性，见表 1。χ^2 检验结果显示，RA 组与健康对照组 5509-5511delCAA 位点基因型和等位基因频率分布差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 2。

表 1　Tim-1 基因外显子 4 上 5509-5511delCAA 基因型频数分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验

基因型	RA 组		χ^2	P	对照组		χ^2	P
	实际频数（n）	理论频数（n）			实际频数（n）	理论频数（n）		
ins/ins	156	153.58			169	168.63		
del/ins	35	39.83	2.886	0.236	20	20.73	0.233	0.889
del/del	5	2.58			1	0.64		

表 2　Tim-1 基因外显子 4 上 5509-5511delCAA 位点基因型及等位基因频率分布

组别	n	基因型分布[n(%)]			χ^2	P	等位基因频率[n(%)]		χ^2	P
		ins/ins	del/ins	del/del			ins	del		
RA 组	196	156(79.59)	35(17.86)	5(2.55)	7.282	0.026	347(88.52)	45(11.48)	7.883	0.005
对照组	200	169(88.94)	20(10.53)	1(0.53)			358(94.21)	22(5.79)		

2.4　3 种 RA 相关自身抗体(RF、CCP、AKA)检测结果表明，RA 组 3 种自身抗体检测阳性率均高于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)。经 χ^2 检验，RA 组中 RF、CCP 检测阳性率与 Tim-1 基因外显子 4 上 5509-5511delCAA 位点基因分型均无相关性($P>0.05$)。抗角蛋白抗体 AKA 检测阳性率与 Tim-1 基因外显子 4 上 5509-5511delCAA 位点基因分型显著相关($P<0.05$)，见表 4。

表 3　RA 组和对照组三种自身抗体检测阳性率比较(%)

组别	RF	CCP	AKA
RA 组	90.14	69.51	61.50
对照组	2.00	0.00	0.00

表 4　RA 组各基因型中 3 种自身抗体检测结果[n(%)]

基因型	RF		CCP		AKA	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
ins/ins	6(3.85)	150(96.15)	58(37.18)	98(62.82)	42(26.92)	114(73.08)
del/ins	2(5.71)	33(94.29)	12(34.29)	23(65.71)	17(48.57)	18(51.43)
del/del	1(20.00)	4(80.00)	1(20.00)	4(80.00)	2(40.00)	3(60.00)

3　讨　论

人类基因组单核苷酸多态性(SNPs)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。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愈来愈重要的作用。这种多态性在不同种族群体具有差异性。近年来，很多学者相继提出遗传因素在自身免疫性疾病发病因素中占据重要位置[9]。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[10-14]。

本研究通过 PCR-DNA 测序技术对 196 名云南高原地区汉族 RA 患者和 200 名健康人群的 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 多态性进行分析。RA 组与对照组 5509-5511delCAA 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($P<0.05$)，表明云南汉族人群 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 多态性与 RA 的遗传易感性相关。这与马荣红等[15]研究结果一致。

在 RA 众多相关自身抗体中，RF、CCP、AKA 3 种抗体的检测意义尤为明显，它们可能与疾病发病机制、疾病严重程度等密切相关[16]，，本研究发现 RA 组 3 种自身抗体检测阳性率均高于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)。另外，RA 组 3 种自身抗体中 RF、CCP 检测阳性率与 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 基因分型均无明显相关性，而抗角蛋白抗体 AKA 检测阳性率与 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 基因分型显著相关，说明 Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 不同基因型不会影响 RF、CCP 的表达，而对 AKA 的表达有影响。因此，Tim-1 外显子 4 上的 5509-5511delCAA 不同基因型是否与 RA 病情严重程度相关以及其通过何种途径影响 AKA 抗体的表达都有待于进一步研究证实。

参考文献

[1] 李晶，侯晓华. 基于系统生物医学理论的老年类风湿性关节炎的免疫诊治[J]. 实用老年医学，2010，(3)：191-195.

[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] Kuchroo VK, Umetsu DT, Dekruyff RH, et al. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(6): 454-462.

[4] Wu QW, Cai PC, Wang L, et al. Family-based association study of Tim-1 and Tim-3 gene polymorphisms with childhood asthma in Chinese trios[J]. Int Arch Allorgy Immunol, 2009, 150(3): 252-260.

[5] Mou Z, Shi J, Tan Y, et al. Xu G and Li H[J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2010, 20(1): 3-8.

[6] Chae SC, Song JH, Yc L, et al. The association of the exon4 variations of Tim-1 gene with allergic diseases in a Korean population [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(2): 346-350.

[7] 崔天盆，金晶，刘昌玉，等. 湖北汉族儿童 TIM-1 基因多态性与变应性哮喘关系的研究[J]. 中华医学遗传学杂志，2004，21(4)：403-406.

[8] 黄娜，鹿玲，袁丽萍，等. T 细胞免疫球蛋白域黏蛋白域蛋白-1-1454 位点基因多态性与儿童过敏性紫癜的关系研究[J]. 中国实用儿科杂志，2010，25(2)：139-142.

[9] Raychaudhuri S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2010, 22(2): 109-118.

[10] Chae SC, Song JH, Shim SC. The exon 4 variations of Tim-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population [J]. Biochem and Biophys Res Commun, 2004, 315(1): 971-975.

[11] Munoz-Valle JF, Valley, Padilla-Gutierrez JR, et al. The+49a>G CTAL-4 polymorphisms is associated with rheumatoid arthritis in Mexican population[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(9): 725-728.

[12] Wu Q, Hu L, Cai P, et al. Chen F and Kong L[J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009, 19(2): 146-153.

[13] Noguchi E, Nakayama J, Kamioka M, et al. Insertion/deletion coding polymorphisms in hHAVcr-1 are not associated with atopic asthma in the Japanese population [J]. Genes&Immunity, 2003, 4(2): 170-173.

[14] Li WX, Chen GM, Yuan H, et al. Polymorphisms of the TIM-1 and TIM-3 genes are not associated with systemic lupus erythematosus in a Chinese population[J]. Mutagenesis, 2011, 26(4): 507-511.

[15] 马荣红，崔天盆，胡丽华. TIM-1 外显子 4 基因多态性与类风湿关节炎关系的研究[J]. 中华风湿病学杂志，2006，10(10)：603-606.

[16] 陈平，樊卫. CCP 抗体、AKA 和 RF 检测对类风湿关节炎早期诊断的临床价值[J]. 检验医学与临床，2012(20)：2584-2585.

(收稿日期：2014-11-15)