

• 论 著 •

贵州省汉族人群类风湿关节炎患者 TRAF1/C5 基因多态性研究*

梁爱凤¹, 费 樱^{2△}

(1. 复旦大学附属中山医院青浦分院检验科, 上海 201700;

2. 贵阳医学院附属医院微生物免疫科, 贵州贵阳 550004)

摘要:目的 探讨肿瘤坏死因子受体相关因子 1(TRAF1)/补体 5(C5)单核苷酸多态性与类风湿关节炎(RA)的相关性。**方法** 提取 300 例 RA 患者(RA 组)和 300 例健康者 DNA(对照组),实时荧光定量 PCR 方法检测 TRAF1/C5 基因 rs3761847 和 rs10818488 的单核苷酸多态性。**结果** TRAF1/C5 存在基因多态性,但 RA 组与对照组比较基因多态性位点的单倍体基因型和等位基因频率的差异均无统计学意义($P>0.05$)。连锁不平衡分析发现 rs3761847 与 rs10818488 之间存在强连锁不平衡。rs3761847 位点 A 等位基因与类风湿因子(RF)阴性($P=0.001, OR=0.57, 95\%CI:0.41\sim0.79$),抗 CCP 抗体(抗-CCP)阴性($P=0.001, OR=0.51, 95\%CI:0.35\sim0.76$)及抗 Sa 抗体阴性均相关($P=0.02, OR=0.72, 95\%CI:0.55\sim0.94$);rs10818488 位点 G 等位基因仅与 RF 阳性相关($P=0.01, OR=1.40, 95\%CI:1.09\sim1.81$)。**结论** TRAF1/C5 基因多态性可能与贵州汉族人群 RA 的遗传易感性无关。

关键词:肿瘤坏死因子受体相关因子; 补体; 单核苷酸多态性; 类风湿关节炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)03-0310-03

Association of the TRAF1/C5 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Han population of Guizhou Province*

Liang Aifeng¹, Fei Ying^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China; 2. Department of Clinical microbiology and Immunology, the Affiliated Hospital of

Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To explore the association between the tumor necrosis factor receptor-associated factor 1(TRAF1)/complement component 5(C5) single nucleotide polymorphism and rheumatoid arthritis patients. **Methods** Two groups of people were included in the study; 300 rheumatoid arthritis(RA) patients(RA group) and 300 healthy individuals(control group). Real-time PCR was used to test the single nucleotide polymorphisms rs3761847 and rs10818488 of TRAF1/C5. **Results** There was no significant difference ($P>0.05$) of TRAF1/C5 rs3761847 and rs10818488 polymorphism between the two groups. The linkage disequilibrium analysis results showed that there was strong linkage disequilibrium between rs3761847 and rs10818488. For the RF, anti-CCP and anti-Sa negative RA patients, the difference in the frequency of A allele of rs3761847 between the RA patients and matched controls was statistically significant($P=0.001, OR=0.57, 95\%CI:0.41-0.79; P=0.001, OR=0.51, 95\%CI:0.35-0.76; P=0.02, OR=0.72, 95\%CI:0.55-0.94$). Significant difference for the frequency of G allele of rs10818488 between RF positive RA patients and control groups was observed($P=0.01, OR=1.40, 95\%CI:1.09-1.81$). **Conclusion** TRAF1/C5 gene polymorphism may not associate with susceptibility of RA patients in Han population in Guizhou.

Key words: tumor necrosis factor receptor-associated factor; complement component; single nucleotide polymorphisms; rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(RA)是一种系统性自身免疫性疾病,其病因尚不明确,遗传、环境和免疫因素共同发挥作用。RA作为一种多基因遗传疾病,目前已知的RA易感基因主要有肿瘤坏死因子(TNF)、人类白细胞抗原(HLA)-DR、白细胞介素(IL)及肽酰基精氨酸脱亚胺酶-4(PADI4)等。已有报道表明位于9号染色体短臂33-34位点的肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF1)/补体5(C5)基因是RA的易感基因,且与抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体阳性相关^[1],而后者是RA早期诊断、病情评估和疗效检测的有效指标之一。RA的遗传异质性使得不同人种之间的遗传学研究结果常不一致。本研究首次以贵州汉

族人群为研究对象,通过实时荧光定量PCR(Real-time PCR)方法检测TRAF1/C5基因多态性,并探讨该基因与RA患者相关血清学指标之间的关系,旨在探讨该基因与贵州汉族人群RA患者遗传易感性之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2011年10月至2013年1月贵阳医学院附属医院肾内科门诊及病房的300例RA患者全血,均为汉族,其中男性72例、女性228例,平均年龄(50.3±14.6)岁,所有RA病例均符合美国风湿病学会(ACR)和欧洲抗风湿联盟(RULAR)2010年联合推出的类风湿性关节炎诊断标准^[2];按

* 基金项目:贵阳市科技计划项目[(2010)筑科农合同第1社-17号]。 作者简介:梁爱凤,女,检验技师,主要从事分子生物学检测方面的研究。 △ 通讯作者,Email:645903661@qq.com。

照民族、年龄和性别匹配的原则选取健康体检者 300 例作为对照组,其中男性 66 例,女性 234 例,平均年龄(50.5±14.1)岁,均排除其他自身免疫性疾病及肿瘤等。所有纳入对象均为无血缘关系的个体。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 酚-氯仿法提取受检者外周血 DNA,检测纯度和浓度后-20℃保存。

1.2.2 Real-time PCR SNP 分型 采用 Taqman-MGB 探针对 TRAF1/C5 基因 rs3761847 和 rs10818488 位点进行基因分型,所用 Real-time PCR 探针购自 ABI 公司。在罗氏 LightCycler 480Real-time PCR 仪上进行反应。

1.2.3 血清学指标检测 检测 RA 组类风湿因子(RF)、抗 CCP 抗体(抗-CCP)和抗 Sa 抗体(抗-Sa)三项血清学指标,采用 RF 胶乳凝集法测定试剂盒(购自上海捷门生物技术合作公司)检测 RF 水平,抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体酶联免疫检测试

剂盒(购自上海科新生物技术股份有限公司)检测抗-CCP 水平,抗 Sa 抗体 IgG 酶联免疫吸附法检测试剂盒(购自欧蒙医学诊断技术有限公司)检测抗-Sa 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对结果进行分析。计算两组各个基因型及等位基因频率,并进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,各组基因型及等位基因频率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,同时计算比值比(OR)和 95%置信区间(95%CI)。用 SHEsis 在线分析软件对 TRAF1/C5 基因 rs3761847 和 rs10818488 两个位点进行连锁不平衡分析。

2 结果

2.1 TRAF1/C5 基因与 RA 相关性分析 在贵州汉族 RA 患者中,TRAF1/C5 基因的两个核苷酸多态性(SNPs)位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡。与对照组比较,RA 组两个 SNPs 位点基因型频率分布差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 RA 组与对照组 TRAF1/C5 SNPs 基因型和等位基因频率的比较

基因位点	分组	n	单倍体基因型频率[n(%)]			等位基因频率[n(%)]	
			GG	GA	AA	G	A
rs3761847	RA 组	300	75(25.0)	156(52.0)	69(23.0)	306(51.0)	294(49.0)
	对照组	300	63(21.0)	147(49.0)	90(30.0)	273(45.5)	327(54.5)
rs10818488	RA 组	300	90(30.0)	144(48.0)	66(22.0)	324(54.0)	276(46.0)
	对照组	300	75(25.0)	153(51.0)	72(24.0)	303(50.5)	297(49.5)

2.2 连锁不平衡和单倍体基因型分析 对 rs3761847 和 rs10818488 两个 SNPs 位点的基因型信息在对照组中进行连锁不平衡分析,发现这两个位点存在高度连锁不平衡($D' = 1.000, r^2 = 0.852$),见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。理论上这两个位点共可组成 4 种单倍体基因型,笔者对其中频率大于 0.03 的 3 种单倍体基因型进行了进一步的分析比较:在对照组和 RA 组中 3 种单倍体基因型的分布无统计学差异($P>0.05$),见表 2。

2.3 TRAF1/C5 基因与 RF、抗-CCP、抗-Sa 水平的相关性分析 与对照组相比,rs3761847 位点 A 等位基因与 RF 阴性($P=0.001, OR=0.57, 95\%CI: 0.41\sim 0.79$),抗-CCP 阴性($P=0.001, OR=0.51, 95\%CI: 0.35\sim 0.76$)及抗-Sa 阴性相关($P=0.02, OR=0.72, 95\%CI: 0.55\sim 0.94$),rs10818488 位

点 G 等位基因仅与 RF 阳性组相关($P=0.01, OR=1.40, 95\%CI: 1.09\sim 1.81$),见表 3、4。

表 2 RA 组和对照组中的单倍体基因型频率分析

单倍体基因型	基因型频率*		χ^2	P	OR(95%CI)
	RA 组 (n=300)	对照组 (n=300)			
AA	0.02	0.04	3.42	0.07	0.53(0.27~1.05)
AG	0.47	0.50	1.61	0.21	0.86(0.69~1.08)
GA	0.44	0.46	0.33	0.56	0.94(0.75~1.17)

*: 在 LD 分析时舍弃了两组中频率小于 0.03 的单倍体基因型。

表 3 TRAF1/C5 rs3761847 位点基因型频率和等位基因频率的自身抗体分层比较

分组	n	基因型[n(%)]			等位基因[n(%)]			
		GG	GA	AA	A	P	OR	95%CI
对照组	300	63(21.0)	147(49.0)	90(30.0)	327(54.5)	—	—	—
RF 阳性组	204	42(20.6)	108(52.9)	54(26.5)	216(52.9)	0.63	0.94	0.73~1.21
RF 阴性组	96	33(34.4)	48(50.0)	15(15.6)	78(40.6)	0.001	0.57	0.41~0.79
抗-CCP 阳性组	237	48(20.2)	132(55.7)	57(24.1)	246(51.9)	0.40	0.90	0.71~1.15
抗-CCP 阴性组	63	27(42.9)	24(38.1)	12(19.0)	48(38.1)	0.001	0.51	0.35~0.76
抗-Sa 阳性组	141	30(21.3)	75(53.2)	36(25.5)	147(52.1)	0.51	0.91	0.69~1.21
抗-Sa 阴性组	159	45(28.3)	81(50.9)	33(20.8)	147(52.1)	0.02	0.72	0.55~0.94

—: 无数据。

表 4 TRAF1/C5 rs10818488 位点基因型频率和等位基因频率的自身抗体分层比较

分组	n	基因型[n(%)]			等位基因[n(%)]			
		GG	GA	AA	G	P	OR	95%CI
对照组	300	72(24.0)	153(51.0)	75(25.0)	303(50.5)	—	—	—
RF 阳性组	204	36(17.6)	96(47.1)	72(35.3)	240(58.8)	0.01	1.40	1.09~1.81
RF 阴性组	96	30(31.3)	48(50.0)	18(18.7)	84(43.7)	0.10	0.76	0.55~1.06
抗-CCP 阳性组	237	42(17.7)	123(51.9)	72(30.4)	267(56.3)	0.06	1.26	0.99~1.61
抗-CCP 阴性组	63	24(38.1)	21(33.0)	18(28.6)	57(45.2)	0.28	0.81	0.55~1.91
抗-Sa 阳性组	141	33(23.4)	66(46.8)	42(29.8)	150(53.2)	0.46	1.11	0.84~1.48
抗-Sa 阴性组	159	33(20.7)	78(49.1)	48(30.2)	174(54.7)	0.22	1.18	0.90~1.56

—:无数据。

3 讨论

TRAF1 介导 TNF 受体 1、2 和 CD40 参与的信号转导途径,而 TNF 是 RA 发病机制中的重要细胞因子^[3]。TRAF1 还与 T 细胞的活化增殖有关^[4],TRAF1 基因敲除的小鼠 T 细胞过度增殖或受到 T 细胞受体复合物刺激时过度增殖以应答 TNF。TRAF1 在这些信号转导途径中起到负调节作用以维持炎症反应的环境^[5],从而在 RA 中发挥作用。虽然 TRAF1 在多种受体介导的信号通路中起作用,但 TRAF1 的分子机制还没有完全阐明,其在 RA 中作用有待于进一步研究。补体途径也参与了 RA 的发病,C5 裂解成促炎症反应的 C5a 和 C5b,进而启动攻膜复合物的形成。RA 患者关节滑液持续的炎症反应与高水平的 C5a 同时存在^[6]。小鼠模型研究证实了 C5 基因是 RA 的候补基因,同时证明了 C5 缺陷的小鼠可抵抗炎性关节,表明了 C5 基因在炎症反应中的作用^[7-8]。因此,C5 在 RA 发病机制中可能通过上调 RA 患者关节腔内补体活化程度来起作用。

本研究发现 TRAF1/C5 的两个 SNPs 存在基因多态性,但 RA 组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),可能与贵州汉族人群 RA 易感性无关,这一结果与其他人种研究结果不尽相同^[1,9-10]。这一情况说明 RA 的遗传异质性,不同人种之间遗传学研究结果常不相同。经连锁不平衡分析发现 TRAF1/C5 两个 SNPs 位点在对照组人群中呈现高度连锁不平衡($D' = 1.000, r^2 = 0.852$),与 HapMap 发布的数据基本一致($r^2 = 1$),但构建的单倍体基因型则与 RA 发病不相关($P>0.05$)。由于国内外大量的病例-对照研究均局限于验证基因与 RA 患者的关联性,较少涉及这些多态性位点的单倍体基因型,因此单倍体基因型与 RA 的关系有待于不同种族、大样本量的研究证实。另外本研究还发现 TRAF1/C5 基因 rs3761847 位点 A 等位基因与 RF 阴性、抗-CCP 阴性及抗-Sa 阴性相关,这表明该位点可能增加自身抗体阴性 RA 者的易感性;rs10818488 位点 G 等位基因仅与 RF 阳性相关,表明该位点可能在 RF 阳性者 RA 的发病中起重要作用,但是受到标本量的影响,这些结果还有待于进一步加大样本量进行分析,目前的研究结果也存在争议^[1,9]。

本研究首次以贵州汉族人群为研究对象,结果显示 TRAF1/C5 SNPs 基因型或多态性位点可能与贵州汉族人群

RA 的发病无关,可能是由于受到样本量较小,TRAF1/C5 SNPs 单倍体基因型及等位基因与 RA 患者血清学指标之间的关系没有得到很好的证实。

参考文献

- [1] Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genome-wide study[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(12): 1199-1209.
- [2] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria; an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 69(9): 2569-2581.
- [3] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.
- [4] Sabbagh L, Srokowski CC, Pulle G, et al. A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(49): 18703-18708.
- [5] Tsitsikov EN, Laouini D, Dunn IF, et al. TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling; enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice[J]. *Immunity*, 2001, 15(4): 647-657.
- [6] Högåsen K, Mollnes TE, Harboe M, et al. Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in rheumatoid arthritis synovial fluid[J]. *J Rheumatol*, 1995, 22(1): 24-28.
- [7] Wang Y, Kristan J, Hao L, et al. A role for complement in antibody-mediated inflammation; C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis[J]. *J Immunol*, 2000, 164(8): 4340-4347.
- [8] Ji H, Gauguier D, Ohmura K, et al. Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(3): 321-330.
- [9] Zhu J, Zhang D, Wu F, et al. Single nucleotide polymorphisms at the TRAF1/C5 locus are associated with rheumatoid arthritis in a Han Chinese population[J]. *BMC Med Genet*, 2011, 12(1): 53.
- [10] 朱婷婷, 赵东宝. 肿瘤坏死因子受体相关因子 1 基因多态性与上海市汉族人群类风湿关节炎患者疾病易感相关性的研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2011, 15(1): 22-25.

(收稿日期:2014-11-10)

(上接第 309 页)

中的意义[J]. *河北医学*, 2013, 19(2): 302-304.

- [7] 于天华, 遇红梅, 梁海英, 等. 5050 名患者 Rh 分型及不规则抗体鉴定结果分析[J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(8): 756-758.
- [8] 朱碎永, 朱燕英, 林甲进. 新生儿 Rh 溶血病的检查分析及预防[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2007, 15(3): 68-69.

- [9] 蔡葵, 陈卓文, 容伯芬. 输血病人的意外抗体筛查[J]. *医学检验与临床*, 2012, 23(2): 37-38.

- [10] 伍伟健, 罗海玲, 黄昌海, 等. 佛山地区无偿献血者 Rh 血型分布情况调查[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(2): 182-185.

(收稿日期:2014-10-10)