文章编号:1000-5404(2010)11-1155-03

论著

PADI4基因多态性与类风湿关节炎的相关性研究

钟 兵[1],方勇飞[1],李 华[2],万 萍[1],杨 菲[2],王 勇[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院中西医结合科[1],基础医学部全军免疫学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨重庆地区汉族人群肽酰精氨酸脱亚胺基酶4(peptidylarginine deiminase 4, PADI4)单核苷酸多态性(SNP)与类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)之间的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)法检测302例RA患者和322名健康对照者的PADI4 rs874881 SNP多态性,同时检测类风湿因子(Rheumatoid factor,RF)、抗环瓜氨酸肽抗体(cyclic citrullinated peptide, CCP)和抗角蛋白抗体(anti-keratin antibody, AKA)3种RA的特异性自身抗体。**结果** 健康对照组PADI4 rs874881 C/C、C/G和G/G基因型频率分别为0.332、0.488和0.180;RA组分别为0.295、0.474和0.232,与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。RA组RF、抗CCP抗体和抗AKA抗体检测阳性率、滴度水平与PADI4 rs874881基因分型均无相关性($P>0.05$)。**结论** 重庆汉族人群PADI4 rs874881多态性与RA的易感性无关,与RF、CCP及AKA等抗体的阳性率无相关性。

[关键词] 肽酰精氨酸脱亚胺基酶4;关节炎,类风湿;基因多态性
[中图法分类号] R593.220.2; R394.3; R394.5 **[文献标志码]** A

Correlation of peptidylarginine deiminase 4 gene polymorphism and rheumatoid arthritis

Zhong Bing[1], Fang Yongfei[1], Li Hua[2], Wan Ping[1], Yang Fei[2], Wang Yong[1] ([1]Department of Integrated of Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To investigate the correlation between the peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) gene polymorphism and rheumatoid arthritis (RA) in Han population from Chongqing. Methods Blood samples of 302 identified RA patients hospitalized in our department from June 2006 to October 2007 and 322 matched normal controls were collected. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the PADI4 rs874881 single nucleotide polymorphisms. Rheumatoid factor (RF), anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody and anti-keratin antibody (AKA) were also detected. Results Two alleles, a wild type C and a variant allele G were identified in the PADI4 rs874881. The genotype frequencies of C/C, C/G and G/G were 0.332, 0.488, and 0.180 respectively in the normal controls and 0.295, 0.474, and 0.232 respectively in the RA population. The distribution of the PADI4 rs874881 allele frequencies in Chongqing Han population was in consistence with Hardy-Weinberg equilibrium. There was no statistical difference in the frequencies of PADI4 rs874881 between RA and normal controls. No association was found when patients were classified according to the positive rates of RF, anti-CCP and AKA. Conclusion The polymorphism of the PADI4 rs874881 is not associated with rheumatoid arthritis in Han population from Chongqing. No Statistical difference is found between the PADI4 rs874881 polymorphisms and the positive rates of RF, anti-CCP and AKA in RA patients.

[Key words] peptidylarginine deiminase 4; rheumatoid arthritis; gene polymorphism

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300452) and the Scientific Program of Traditional Chinese Medicine of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-1-15). Corresponding author: Fang Yongfei, E-mail: fyfalan@163.com; Wang Yong, E-mail: wangyongjhy@tom.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因未明的累及滑膜为主的系统性自身免疫性疾病,多呈渐进型发展,晚期出现关节畸形和强直,致残率较高,严重影响患者的生活和工作能力。近年来,抗环瓜氨酸化蛋白抗体(anti-cycled citrulliated protein antibody, 以下简称抗CCP抗体)对于早期、非典型、类风湿因子阴性的RA患者的诊断价值受到广泛关注。

[基金项目] 国家自然科学基金(30300452);重庆市卫生局中医药科研项目(2008-1-15)
[通信作者] 方勇飞,E-mail: fyfalan@163.com
王 勇,E-mail:wangyongjhy@tom.com

一项荟萃分析结果表明,与类风湿因子(rheumatoid factor, RF)相比,抗CCP抗体对于诊断RA具有较高的敏感性与特异性[1]。肽酰精氨酸脱亚胺基酶(peptidylarginine deiminase, PADI)是催化精氨酸转化为瓜氨酸的关键性酶。2003年,日本学者首先发现PADI4基因单核苷酸和单倍体型多态性与RA的易感性相关[2]。随后德国、北美、韩国等的研究显示了相同的结果[3,4]。但在英国、西班牙和法国人群中却未能显示出相关性[5,6]。有的学者据此提出PADI4与RA的易感性受人种限制的推论。为了解中国汉族人群中PADI4基因多态性与RA的相关性,我们进行了本项研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

RA患者302例,为2006年6月至2007年10月本院住院患者。男性56例,女性246例,年龄(46.8±13.2)岁,符合1987年美国风湿病协会(ARA)修订的RA分类标准。病程(6.8±7.6)年,起病年龄(39.9±13.2)岁,晨僵时间(64.8±68.9)min,肿胀关节(9.5±8.3)个,压痛关节(11.9±9.6)个,DAS28(28个关节的疾病活动指数评分)(5.3±1.4)分,RF阳性率75.8%,CCP抗体阳性率76.3%,抗角蛋白抗体(anti-keratin antibody, AKA)阳性率25.3%。对照组为重庆地区322例健康献血者,男性73例,女性247例,年龄(42.63±14.3)岁,两组年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 基因多态性检测

1.2.1 模板DNA提取 EDTA抗凝外周血2 ml,DNA抽提采用Promega Wizard® Genomic Purification Kit。提取的基因组DNA溶于TE缓冲液,-20℃保存。

1.2.2 聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)检测基因型 在GenBank中检索PADI4基因的DNA序列和PADI4 rs874881的位点信息,采用Primer 5.0设计引物(上游:5′-GTCCAGTGGGTGTTTGTT-3′,下游:5′- CTGCCACATTGTATTTCTTT-3′),扩增产物为331 bp。PCR反应体系总体积25 μl,含10×PCR缓冲液2.5 μl,Mg^{2+} 2.0 mmol/L,dNTPs 200 μmol/L,引物各0.2 μmol/L,*Taq* DNA聚合酶1.25 U,基因组DNA 50 ng,不足体积用灭菌双蒸水补充至25 μl。将反应物置94 ℃预变性5 min后,94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s进行35个循环,最后72 ℃延伸2 min。

1.2.3 PCR产物的限制性酶切及电泳 参考文献[6]进行:PCR产物采用DNA纯化试剂盒(购自天根公司)进行纯化后,再用*Msp* Ⅰ限制性内切酶(购自日本TaKaRa公司)进行酶切。酶切反应总体积为10 μl,含10×T缓冲液1 μl,0.1% BSA 1 μl,*Msp* Ⅰ 0.5 μl,纯化后PCR产物5 μl,加灭菌双蒸水至总体积10 μl,37℃酶切1.5 h。EB染色,2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。每个基因型各取20个样本经DNA测序证实(上海生工公司)。

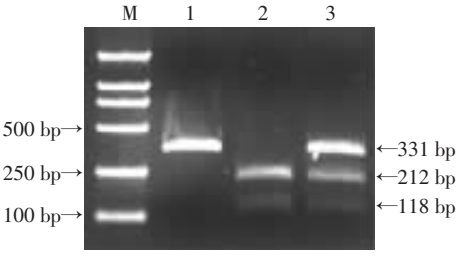
1.3 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件包进行统计学分析。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(HWE)。各基因型及等位基因频率比较、自身抗体与基因型相关性比较均采用χ^2检验,PADI4 rs874881与RA易感性的相关性分析采用条件逻辑回归分析,计算P值、相对危险度(*OR*)、95%可信区间(95% *CI*)。

2 结果

2.1 PADI4 rs874881 C/G基因型分析

Msp Ⅰ限制性内切酶的识别序列为C^CGG,经酶切后电泳呈现331 bp 1条片段为CC型,呈现212、118 bp 2条片段为GG型,呈现331、212、118 bp 3条片段为CG型。基因型电泳结果见图1。



M:标准(DL 2000);1:CC型;2:GG型;3:CG型

图1 PADI4 rs874881基因位点酶切电泳分型结果

2.2 重庆地区汉族人群PADI4 rs874881 SNP分析

RA组与健康对照组的基因型分布和等位基因频率均符合Hardy-Weinberg平衡定律,表明其基因频率达到遗传平衡,具有群体代表性。2组均以CG型杂合子最为常见,CC型、GG型纯合子递次之。经χ^2检验,3种基因型组间差异无统计学意义($P=0.501$),等位基因频率亦无显著性差异,见表1。

表1 PADI4 rs874881位点基因型和等位基因频率分布[例(%)]

组别	基因型频率			等位基因频率	
	C/C	C/G	G/G	C	G
RA组	89(29.5)	143(47.4)	70(23.2)	321(0.53)	283(0.47)
健康对照组	107(33.2)	157(48.8)	58(18.0)	371(0.58)	273(0.42)

2.3 PADI4 rs874881多态性与RA易感的相关性分析

经302例RA患者和322例健康对照组的PADI4 rs874881等位基因的逻辑回归分析,结果显示PADI4 rs874881多态性与RA易感性无统计学意义上的相关性($OR=1.198$, 95% *CI* = 0.958~1.498, $P=0.113$)。

2.4 RA组基因型和3种自身抗体检测结果分析

RF、抗CCP抗体和抗AKA的阳性率与PADI4 rs874881基因多态性无显著相关性($P>0.05$)。RF和抗CCP抗体的抗体滴度在PADI4 rs874881各等位基因之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 PADI4 rs874881等位基因频率与RA特异性抗体的相关性分析

项目	n	基因型($\bar{x}\pm s$)			P值	突变基因($\bar{x}\pm s$)		P值
		C/C	C/G	G/G		C/C	C/G+G/G	
RF阳性率	293	62(71.3)	110(79.1)	50(74.6)	0.393		160(77.7)	0.154
RF(IU/ml)	218	430.9±595.9	347.8±486.6	379.1±502.0	0.610	-	357.7±490.1	0.351
CCP阳性率	287	63(75.0)	105(77.8)	51(75.0)	0.858	-	156(76.8)	0.423
CCP(IU/ml)	216	143.6±92.2	136.6±109.7	135.2±160.4	0.916	-	136.1±127.8	0.678
AKA阳性率	209	18(29.0)	27(27.8)	8(16.0)	0.215	-	35(23.8)	0.266

3 讨论

PADI4 基因位于第 1 号染色体短臂 36 区,编码一 663 个氨基酸的蛋白酶,此酶可催化蛋白中的精氨酸残基脱亚氨基,转变为瓜氨酸残基,这一过程称为瓜氨酸化。近年来的研究表明,蛋白质瓜氨酸化可能与 RA 的自身抗原提呈、T 细胞活化、抗体形成和炎症反应密切相关。2003 年,Suzuki 等[2]通过对日本人群 830 例 RA 和 736 例对照中染色体 1p36 的 NT_034376.1 区域进行基因扫描发现 PADI4 基因多态性与 RA 的易感性相关。但随后在多个种群的研究中显示了一个值得争议的结果,Meta 分析显示东亚人种 PADI4 基因多态性与 RA 易感性相关,而欧洲人种则不相关[7,8]。

Suzuki 等用位于 PADI4 基因外显子区域的 4 个 SNP(rs11203366、rs11203367、rs874881 和 rs1748033)定义了 ACCC 和 GTGT 两种最常见的单倍型,GTGT 是 RA 易感性单倍型,ACCC 是 RA 非易感性单倍型[2]。韩国学者 Kang 等[4]用 PADI4 rs11203366、rs11203367 和 rs874881 3 个 SNP 位点定义单倍型,发现 ACC 和 GTG 两个单倍型占所有样本的 99.8%,能更好地反应 RA 易感的相关性(OR = 1.5,95% CI = 1.3 ~ 1.8,$P = 1.2 \times 10^{-5}$)。我们比较了 3 个不同种族的研究发现,PADI4 rs11203366、rs11203367、rs874881 3 个位点呈现几乎完全性的连锁(>99%),且每个位点均单独与 RA 易感性相关[2,4,5]。因此我们认为只需检测其中 1 个位点即可反应另 2 个位点的基本信息,故我们只选择 rs874881 作为检测位点。我们的研究显示 PADI4 rs874881 位点的基因型频率在健康献血员和 RA 患者中分别为 0.332、0.488、0.180 和 0.295、0.474、0.232,符合 Hardy-Weinberg 平衡。条件逻辑回归分析显示 PADI4 rs874881 等位基因与 RA 易感性无关(OR = 1.20,95% CI = 0.958 ~ 1.498, P = 0.113),这与文献[3,5]的结果一致。我们认为一方面这可能是由于中国汉族人群与日本人群的种族差异性造成的,因为其他的几项研究已显示了这种种族差异性。另一方面,本研究虽未显示统计学的差异性,但对比 RA 组与健康对照组的等位频率约有 5% 左右的差异性,若增大样本量可能得出阳性结果。

此外,我们还比较了 RF 阳性率、RF 滴度、抗 CCP 抗体阳性率、抗 CCP 抗体滴度、AKA 阳性率与 PADI4 rs874881 等位基因的相关性,未发现有统计学差异。Suzuki 等[2]2003 年最早提示 PADI4 基因多态性与 ACPA 阳性率有关(P = 0.038)。但更多的证据显示 ACPA 的产生与 PADI4 基因无关[9,10],而是与 SE 阳性的 HLA-DRB1 基因相关[11,12]。最近的一项研究显示,RA 早期(病程≤34 个月)的抗 CCP 抗体水平与 PADI4 基因相关,晚期则与 SE 阳性的 HLA-DRB1 相关[13],但我们的数据也未能显示有统计学意义的相关性(P > 0.05)。因此,PADI4 基因与中国汉族人群 RA 易感的相关性还有待进一步研究结果以证实。

参考文献:

[1] Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, *et al*. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2007, 146(11): 797 - 808.

[2] Suzuki A, Yamada R, Chang X, *et al*. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis[J]. Nat Genet, 2003, 34(4): 395 - 402.

[3] Hoppe B, Haupl T, Gruber R, *et al*. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(2): R34.

[4] Kang C P, Lee H S, Ju H, *et al*. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(1): 90 - 96.

[5] Barton A, Bowes J, Eyre S, *et al*. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(4): 1117 - 1121.

[6] Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, *et al*. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(4): 587 - 593.

[7] Lee Y H, Rho Y H, Choi S J, *et al*. PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis[J]. Rheumatol Int, 2007, 27(9): 827 - 833.

[8] Vossenaar E R, van-Venrooij W J. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(3): 107 - 111.

[9] Poor G, Nagy ZB, Schmidt Z, *et al*. Genetic background of anticyclic citrullinated peptide autoantibody production in Hungarian patients with rheumatoid arthritis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1110: 23 - 32.

[10] Farago B, Talian G C, Maasz A, *et al*. Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies[J]. Clin Exp Rheumatol, 2007, 25(4): 523 - 528.

[11] Irigoyen P, Lee A T, Wener M H, *et al*. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(12): 3813 - 3818.

[12] Kapitany A, Szabo Z, Lakos G, *et al*. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis[J]. Isr Med Assoc J, 2008, 10(1): 32 - 36.

[13] Cha S, Choi C B, Han T U, *et al*. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(5): 1454 - 1463.

(**收稿**: 2010-05-06;**修回**: 2010-05-26)

(编辑 汪勤俭)