维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0022-03

重庆地区汉族人 PTPN22 基因多态性与 Graves 病的关联研究

郑瑞芝,张素华,李 蓉,汪志红,汪茂荣,万小莉,梁 松

(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨重庆地区汉族人 Graves 病(GD)与蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 22(PTPN22)基因外显子 14 C1858T 多态性的相关性。方法:运用 PCR-RFLP 技术分析 283 例 GD 患者和 218 例正常人 PTPN22 基因 1858 位点基因型,计算并比较两组基因型和等位基因频率。结果:PTPN22 基因 1858 位点 CC、CT 和 TT 3 种基因型分布频率在 GD 组和正常组分别为 97.2%、2.8%、0 和 97.7%、2.3%、0(χ^2 分别为 0.139 和 0.002,P 值分别为 0.71 和 0.96)。其基因型和等位基因频率两组相比无统计学意义,未检出纯合子 TT 基因型,极少 T 等位基因。结论:PTPN22 基因外显子 14 C1858T 多态性与重庆地区汉族人群 GD 的发生无相关性。

【关键词】Graves 病;蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 22;多态性

【中国图书分类法分类号】R392.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-06

Study on the relationship between polymorphism of PTPN22 and Graves' disease of Han nationality in Chongqing area

ZHENG Rui-zhi, et al

(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship between the polymorphism of PTPN22 gene exon14 C1858T and Graves' disease (GD) in Han Group in Chongqing area. *Methods*: The PTPN22 gene C1858T alleles were typed by polymerase chain reaction based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method in 283 GD patients and 218 normal subjects. The comparisons of genotype and allele frequencies were made between GD patients and normal group. *Results*: The frequencies of CC、CT and TT genotype in GD patients and normal group were 97.2%, 2.8%, 0% respectively, Their χ^2 were 0.139 and 0.002 respectively, and p were 0.71 and 0.96 respectively. There was no significant difference of the genotypes and allele frequencies at position-1858 of PTPN22 in GD patients compared with those of normal group, and there was no TT genotype and a few T alleles. *Conclusion*: There is no correlation between the polymorphism of PTPN22 gene exon14 C1858T and GD patients in Han nationality of Chongqing.

【Key words】 Graves' disease; Protein tyrosine phosphatase non-receptor22; Polymorphism

Graves 病(Graves' disease,GD)是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病,其病因复杂,是遗传和环境相互作用的结果。由于易感基因受种族和地理环境因素的影响,目前尚未发现一种特异性遗传学标志可以预测 GD 的发生。有证据显示:PTPN22 基因外显子 14 多态性(rs2 476 601,C1 858T)与 GD 相关,为 GD 的易感基因[1],但报道不一。本研究运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)技术研究 PTPN22 基因外显子 14 第 1 858 位点 C/T 的多态性,探讨是否为中国重庆地区汉族人 GD 的易感基因。

1 对象与方法

1.1 研究对象

GD 组为重庆医科大学附属第一医院内分泌门诊于 2005 年 4 月~2006 年 12 月就诊的无亲缘关系的 GD 患者。其诊断依据为:(1)高代谢症候群的临床症状,(2)弥漫性甲状腺肿和(或)突眼体征,(3)血浆游离甲状腺素(FT3、FT4)升高和(或)总甲状腺素(TT3、TT4)升高和超敏促甲状腺激素水平(uTSH)降低,(4)TRAb 阳性,并排除其它原因引起的甲状腺功能亢进者。对照组为无血缘关系的同一所医院门诊的健康体检者。2 组均为汉族,均排除其它自身免疫性疾病和严

作者介绍:郑瑞芝(1973-),女,博士,
主要研究方向:自身免疫性甲状腺疾病的发病机理。
通讯作者:张素华,女,教授,E-mail:zhangsuhua@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局科学基金资助项目(04-2-111)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

重心、肝、肾疾病。GD 患者 283 例,男 88 例,女 195 例,平均年龄(39±13)岁(11~70 岁),病程 0~20 年。其中初发甲亢 55 例,TRAb 阳性者 41 例(74.5%),有家族史 85 例,有突眼体征者 156 例。正常对照 218 人,男 77 人,女 141 人,平均年龄(41±12)岁(15~58 岁)。两组年龄,性别差异无统计学意义。

1.2 实验方法

1.2.1 病史采集 研究方案经院伦理委员会批准,受试者签署书面的知情同意书。对所有研究对象按照统一制定的表格进行详细的病史询问及体格检查。

1.2.2 生化指标的测定 对研究对象进行甲状腺功能测定(uTSH、FT3、FT4 和(或)TT3、TT4),初发 GD 患者行 TRAb 测定,全部 GD 患者行 TgAb(甲状腺球蛋白抗体)和 TPOAb(甲状腺过氧化物酶抗体)测定,除 TRAb 用放免法外,余均用化学发光法测定。

1.2.3 PCR 扩增反应及基因分型

1.2.3.1 基因组 DNA 的提取 取受试者 EDTA 抗凝的外周血 1ml,经蛋白酶 K 和 RNA 酶消化,酚-氯仿法抽提,无水乙醇沉淀,提取外周血白细胞基因组 DNA,紫外分光光度仪定量。

1.2.3.2 PCR 扩增反应 上游引物:5'-TCACCAGCTTCCT-CAACCAC-3',下游引物:5'-ACTGATAATGTTGCTTCA-3',引物由上海英俊公司合成。目的片段为 218bp。反应体系 25μl,包括:10×PCR Buffer 2.5μl;$MgCl_2$(25mmol/L)1.5μl;dNTP(2.5mmol/L)2.0μl;上、下游引物(20pmol/μl)各为 0.4μl;DNA 模板 1.5μl;Taq 酶(5U/μl)0.2μl;ddH_2O(双蒸水)16.5μl。94℃预变性 5min,94℃变性 30s,58.5℃退火 30s,72℃延伸 30s,35 个循环,最后 72℃延伸 5min,4℃保存。产物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3.3 PCR 产物进行基因分型-RFLP 方法 消化体系为 15μl,限制性内切酶 *Rsa* Ⅰ(百萃生物科技有限公司)0.4μl(4U),Buffer 1.5μl, PCR 产物 8μl,ddH_2O 11.1μl,37℃温浴 16b。酶切产物于 2.5%琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色进行基因型鉴定。

1.3 统计学处理

运用 χ^2 检验判断多态位点的基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡),计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料用率表示,运用 SPSS10.0 对数据进行处理,两组间比较采用 t 检验和 χ^2 检验,P 值<0.05 认为有统计学意义。

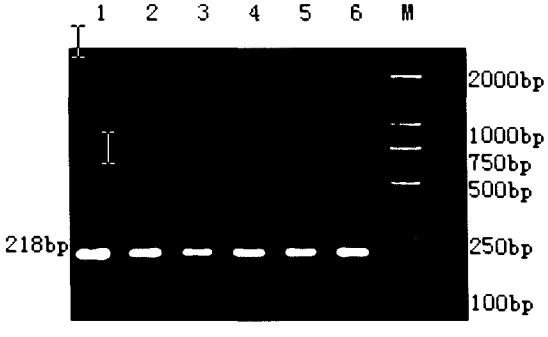
2 结 果

酶切电泳结果有 3 种基因型,其中 TT 基因型产生 218bp 1 个片段,CC 基因型产生 176bp 和 42bp 2 个片段。杂合子 CT 基因产生 218bp、176 bp 和 42bp 3 个片段,42bp 小片段电泳未显示,电泳结果见图 1 和图 2。

表 1 PTPN22 基因外显子 14C 1858T 基因型和等位基因分布的比较

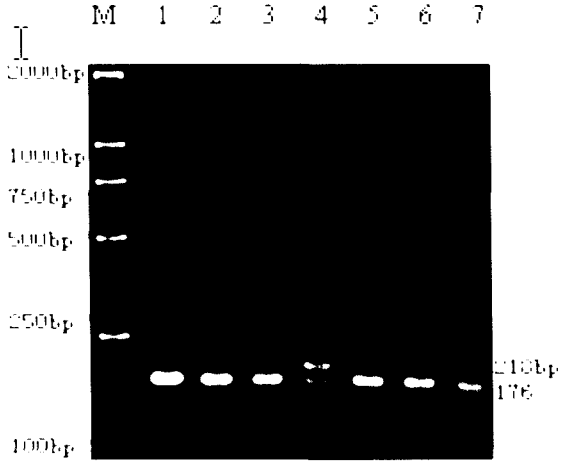
组别	n(男/女)	基因型	例(%)		等位基因	频次(%)
		CC	CT	TT	C	T
正常对照组	218(77/141)	213(97.7)	5(2.3)	0(0)	431(98.9)	5(1.1)
GD 组	283(88/195)	275(97.2)	8(2.8)	0(0)	558(98.6)	8(1.4)
χ^2			0.139		0.137	
P 值			0.71		0.96	

P<0.05 有统计学意义



1~8 泳道为 PCR 扩增产物

图 1 部分样本 PTPN22 基因外显子 14 PCR 产物琼脂糖凝胶检测结果



1、2、3、5、6、7 泳道有 1 个片段(CC 基因型),
4 泳道有 218bp 和 176bp 2 个片段(CT 基因型)

图 2 1~7 泳道为 *Rsa* Ⅰ酶切产物

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

GD 以遗传易感为背景，感染和(或)精神等因素下诱发体内的免疫功能紊乱，免疫耐受、识别和调节功能减退，抗原特异性 Ts 功能缺陷而导致的自身免疫性疾病。

PTPN22 基因位于 1P13.3~13.1，包含 16 个外显子和 15 个内含子，其编码的淋巴酪氨酸磷酸酶(LYP)属于酪氨酸磷酸酶(PTPs)家族。LYP 通过与 Src 酪氨酸激酶 C 端(Csk)相互作用，使已磷酸化的Src 家族 Lck，Fyn 和 Zap-70 酪氨酸激酶脱磷酸化，使其失活，中断 T 细胞激活信号通路，从而下调 T 细胞信号[2]。另外，LYP 还通过与 Csk 结合协同抑制 T 细胞信号，与转接分子生长因子受体连接蛋白 2(Grb2)相互作用，在 T 细胞信号中起负调节作用[2]。1 858 位点 C→T 错义突变，引起 LYP 蛋白 620 位密码子由精氨酸(1 858C)突变为色氨酸(1 858T)，导致其功能改变，与 Csk 亲和力明显降低，对 T 细胞激活信号通路抑制不足，从而引起 T 细胞活性增强，可能诱发自身免疫性疾病[3]。Velaga 等[1]对英国人群研究发现 PTPN22 1 858T等位基因是 GD 的主效易感等位基因。Skorka[4]在波兰人群中研究发现，PTPN22 1 858T 与 GD 相关，且与发病年龄呈负相关，TT 基因型发病年龄最早 20.8 岁，CT 基因型次之 35 岁，CC 基因型发病年龄最迟 42 岁(均为平均年龄)。研究发现PTPN22 1 858T 等位基因与 1 型糖尿病(T_1DM)[5]、类风湿性关节炎(RA)[6]、系统性红斑狼疮(SLE)[6]等多种自身免疫性疾病相关。

但研究发现，重庆地区汉族人群中 PTPN22 基因外显子 14 第 1 858 位点 CC、CT 和 TT^3 种基因型分布频率在 GD 组和正常组分别为 97.2%、2.8%、0 和 97.7%、2.3%、0 (χ^2 分别为 0.139 和 0.002，P 值分别为 0.71 和 0.96)，仅存在极少 T 等位基因，没检出突变的纯合子 TT 基因型。Ray 等[7]对亚洲印度人研究 PTPN22 基因多态性与特发性甲状旁腺功能减退症的关系，发现 PTPN22 1 858T 等位基因在亚洲人群出现频率很低，病例组和对照组分别为 4/160(2.5%)和 5/386(1.3%)，与研究结果相似。对不同人群的研究表明，1 858T 等位基因频率在地理位置上差异较大，在健康人群中，1 858T 等位基因频率在欧洲由北向南降低，在英国和芬兰人群中约 12.5%，而在意大利和西班牙人群中 6%，在非洲中部和亚洲人群中几乎不存在。研究统计结果显示，PTPN22 基因 1 858 位点基因型和等位基因频率分布与对照组相比，无统计学意义，提示该位点多态性与重庆地区汉族人群 GD 无相关性。Criswell 等[8]对来自多重自身免疫性疾病遗传协会（MADGC）的 265 个家庭的研究发现，PTPN22 1 858T 与桥本甲状腺炎(HT)明显相关，但与 GD 无显著相关；日本也报道 PTPN22 基因 C1 858T 多态性与 GD 无相关性[9]，与本研究结论相似。PTPN22 1 858T 等位基因不是重庆地区汉族人群 GD 的易感基因，除种族和地理因素外，可能与亚洲人群 PTPN22 1 858T 等位基因出现频率极低有关，应进一步扩大样本量，在其它地区和族群中进一步验证。

参 考 文 献

[1] Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, et al. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease[J]. Clin Endocrinol Metab, 2004;89(11):5 862-5 865.

[2] Hill RJ, Zozulya S, Lu YL, et al. The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation [J]. Exp Hematol, 2002;30(3):237-244.

[3] Ladner MB, Bottini N, Valdes AM, et al. Association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene with type 1 diabetes[J]. Hum Immunol, 2005;66(1):60-64.

[4] Skorka A, Bednarczuk T, Bar-Andziak E, et al. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose-dependent correlation with age of onset[J]. Clinical Endocrinology, 2005;62(6):679-682.

[5] Hermann K, Lipponen M, Kiviniemi T, et al. Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variantregulates insulin autoimmunity and progression to type1 diabetes[J]. Diabetologia, 2006;49(6):1 198-1 208.

[6] Lee YH, Rho YH, Choi SJ, et al. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases-a meta-analysis [J]. Rheumatol, 2007;46(1):49-56.

[7] Ray D, Tomar N, Gupta N, et al. Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 (PTPN22) gene R620W variant and ,sporadic idiopathic hypoparathyroidism in Asian Indians[J]. Immunogenet, 2006;33(4):237-340.

[8] Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) col-

(下转第 28 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

力,从而易于发生浸润、转移[11]。本研究用直线加速器产生的 X 射线照射 A549 细胞,试图增加细胞膜上 E-cadherin 与 β-catenin 的表达,进而减弱其体外侵袭力,从根本上抑制 A549 细胞的远处转移。实验结果显示,射线照射后,贴壁细胞脱落增加,细胞变圆,体积缩小,核固缩出现,核颜色加深,折光性增强,随着照射剂量增加和照射后时间的推移,上述形态表现越明显。X 射线对 A549 细胞增殖的抑制作用是随着照射剂量的增加而增加的。X 射线照射后,胞膜和胞质上的 E-cadherin 和 β-catenin 的表达均有不同程度的增加,并随着照射剂量的增加而增加,说明 X 射线影响了 E-cadherin/β-catenin 在细胞中的分布,这可能是因为 β-catenin 的"胞内库"由 2 部分构成,射线照射后与 E- 钙粘蛋白结合的胞膜部分增加,而胞核中参与细胞增殖、分化的部分减少。X 射线照射后,抑制了 A549 细胞的生长,并通过上调胞膜上 E- 钙粘蛋白与 β-catenin 的表达,降低其体外侵袭力,最终有效抑制 A549 细胞的远处转移。本研究从粘附分子角度探寻了放疗抑制肿瘤转移的机制,并证实放射对于肺腺癌治疗是有效的,它可以通过上调 E- 钙粘蛋白和 β-catenin 在细胞中的表达,增加细胞间的粘附力,降低肿瘤细胞的侵袭力,最终抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。这为临床运用放射治疗抑制肿瘤转移提供了重要的实验依据。

参 考 文 献

[1] Haz an RB,Qiao R,Keren R,et al.Cadherin switch in tumor progression[J]. Ann N Y Acad Sci,2004;1014:155-163.

[2] Beavon IR. The E-cadherin catenin complex in tumour metastasis:structure,function and regulation[J]. Eur J Cancer,2000;36(13):1 607-1 620.

[3] 范 凯,王 辉,王 彦,等.X 射线照射诱导鼻咽癌细胞 hMSH2 的表达[J]. 肿瘤防治研究,2006;33(2):94-96.

[4] 胡 军,邵淑娟,赵瑾瑶,等.RNA 干扰技术抑制上皮性钙黏附分子表达对 HO 8 910 细胞的影响[J].解剖学报,2007;38(2):196-199.

[5] Takahashi Y,Teshima T,Kawaguchi N,et al. Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose[J]. Cancer Res,2003;63(14):4 253-4 257.

[6] Susskind H,Hymowitz MH,Lau YH,et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2003;56(4):1 161-1 169.

[7] Cronauer MV,Schulz WA,Ackermann R,et al. Effects of WNT/beta-catenin pathway activation on signaling through T-cell factor and androgen receptor in prostate cancer cell lines[J]. Int J Oncol,2005;26(4):1 033-1 040.

[8] Brembeck FH,Ros á rio M, Birchmeier W.Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin[J]. Curr Opin Genet Dev,2006;16(1):51-59.

[9] Lowy AM,Knight J,Groden J.Restoration of E-cadherin/beta-catenin expression in pancreatic cancer cells inhibits growth by induction of apoptosis[J]. Surgery,2002;132(2):141-148.

[10] Oloumi A,McPhee T,Dedhar S.Regulation of E-cadherin expression and beta catenin / Tcf transc riptional activity by the integrin linked kinase[J]. Biochim Biophys Acta,2004;1691(1):1-15.

[11] 李 晶,李 珏,王吾如. E 钙粘蛋白 /catenin 复合体在人非小细胞肺癌细胞系中的表达[J]. 解剖学报,2002;33(3):331-333.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 24 页)

lection:the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes[J]. Hum Genet,2005;76(4):561 - 571.

[9] Ban Y,Tozaki T,Taniyama M,et al. The codon 620 single nucleotide polymorphism of the protein tyrosine phosphatase-22 gene does not contribute to autoimmune thyroid disease susceptihility in theJapanese[J]. Thyroid,2005;15(10):1 115-1 118.