

TNF- α 基因多态性与类风湿性关节炎相关性研究

王平¹ 贺艳丽² 曾筱倩¹ 王利民¹ 高云¹ 胡丽华¹

[摘要] 目的:探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)启动子区-308 基因多态性与湖北汉族人类风湿性关节炎(RA)易感性的关系。方法:用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性(PCR/RFLP)的方法对 113 例 RA 患者及 126 例健康人进行 TNF- α 的-308 位点多态性分析。结果:RA 组与对照组 TNF- α 的-308 位点的基因型频率和等位基因频率 G/G、G/A、A/A 之间差异无统计学意义($P>0.05$);并且 TNF- α 的-308 位点的基因多态性与 RA 活动期指标 ESR 和 CRP 高低无关。结论:TNF- α 启动子区-308 基因多态性不是类风湿性关节炎易感性和严重程度的一个风险因子。

[关键词] 肿瘤坏死因子;类风湿性关节炎;基因多态性

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.003

[中图分类号] R593.22 **[文献标志码]** A

Correlation between tumor necrosis factor- α gene polymorphism and susceptibility of rheumatoid arthritis

WANG Ping¹ HE Yanli² ZENG Xiaoqian¹ WANG Limin¹ GAO Yun¹ HU Lihua¹

(¹Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Center for Stem Cell Research and Application, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Abstract Objective: To investigate the correlation between tumor necrosis factor- α (TNF- α) -308 (G/A) gene polymorphism and susceptibility of rheumatoid arthritis(RA). **Method:** The polymorphism in the TNF- α -308 were determined by PCR-RFLP in 113 Rheumatoid arthritis patients and 126 controls. **Result:** There was no significant difference in the allele frequency of -308(G/A)site of TNF- α gene promoter region and genotype frequency G/G, G/A, A/A between RA patients and controls ($P>0.05$). Moreover, there was no association between TNF- α genotypes and disease activity measures, including the level of erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP). **Conclusion:** TNF- α -308 promoter polymorphism would be not a genetic risk factor for RA susceptibility and severity.

Key words tumor necrosis factor; Rheumatoid arthritis; Gene polymorphism

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病,病因尚不明确。目前认为它和遗传及感染等因素有关。HLA-DR、白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor-alpha, TNF- α)等遗传因素造成了RA的易感性^[1-2],而感染因素可能触发该疾病。TNF- α 作

为一种重要的炎性介质,在RA的发病过程中起着重要作用。近来多项研究提示TNF- α 启动子区-308 过高表达可影响RA的发生发展和预后^[3-4],但可能由于种族和地区因素,对两者相关性的结论尚不一致^[5,8-9]。因此,为进一步明确TNF- α 启动子区-308 基因多态性与中国RA人群的相关性,我们研究了湖北地区汉族人群中TNF- α 启动子区-308 位点基因多态性与RA发病的关系。

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉, 430022)

²华中科技大学同济医学院附属协和医院干细胞中心

[3] 中华人民共和国国家标准. GB18469-2001. 全血及成分血质量要求[S]. 北京:中国标准出版社,2002:9-10.
[4] 田兆松. 临床输血学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:246-265.
[5] 唐元艳,陈燕. 血液病患者血小板无效输注的原因探讨[J]. 临床血液学杂志,2005,18(4):223-225.
[6] Tynngrd N. Preparation, storage and quality control

of platelet concentrates [J]. Transfus Apher Sci, 2009,41:97-104.

[7] Cookson P, Sutherland J, Turner C, et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution [J]. Transfus Med, 2010,20:392-402.

(收稿日期:2014-06-03)

1 材料与方 法

1.1 标本来源

RA 标本来自我院风湿科 2002-02—2005-05 的门诊及住院患者 113 例,男 32 例,女 81 例;年龄 25~67 岁,平均 45±10 岁。其中 ESR 升高患者 56 例(魏氏法:女性>30 mm/h,男性>20 mm/h),C 反应蛋白(CRP)升高 62 例(CRP>8 mg/L)。诊断标准参照美国风湿病学会 1987 年确定的诊断标准,其中 68 例采用 RA 的综合治疗,包括一种非甾体类消炎止痛药(NSAIDS)或/和小剂量激素和二种慢作用药物(金诺芬、氨甲喋呤、柳氮磺胺吡啶和氯喹)。对照组为 126 例健康体检者,其中男 40 例,女 86 例;年龄 30~60 岁。以上研究对象均为湖北地区汉族人。

1.2 标本采集

采集静脉血 2 ml,EDTA 抗凝,2 000 r/min 离心 20 min,吸取白细胞用于提取模板 DNA。

1.3 血清 TNF-α 测定

采用酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒由军事医学科学院生物医学公司提供,正常参考范围:0~146 ng/L。

1.4 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测

采用酚-氯仿抽提法提取全血基因组 DNA。TNF-α 基因启动子区-308 位点的引物序列设计为:5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 及 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'。用常规方法进行 PCR。扩增条件为:反应总体积 25 μl,其中 10×Buffer 2.5 μl,25 mmol/L Mg²⁺ 2.5 μl,2 mmol/L dNTP 2.5 μl,引物各 0.5 μl,Taq 酶 1.0 U,ddH₂O 4.5 μl。采用 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 30 s,循环 35 次,72℃ 延伸 10 min。用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 PCR 产物,紫外灯下观察。鉴定后的产物用 Nco I (MBI Fermentas # ER0571) 酶切。酶切体系为:PCR 产物 5 μl,10×Buffer 1 μl,Nco I 内切酶 0.25 μl,dH₂O 3.75 μl,37℃ 水浴 16 h。用 8%~10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离酶切产物,EB 染色并参照 DNA 分子量确定各位点的基因型。

1.5 统计学处理

等位基因在全体、性别上的分布采用 Hardy Weinberg 平衡检验,等位基因频率及各组间基因型频率比较用 χ² 检验,各组检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数用 *t* 检验,使用 SPSS 软件进行分析。

2 结果

2.1 血清 TNF-α 检测结果

RA 组与对照组比较差异无统计学意义(*t*=

4.91, *P*<0.01);68 例 RA 患者采用综合治疗,血清 TNF-α 水平由治疗前的 2 654.41±1 936.45 ng/L 降至治疗后的 1 181.03±956.42 ng/L,差异有统计学意义(*t*=5.74, *P*<0.01)。结果见表 1。

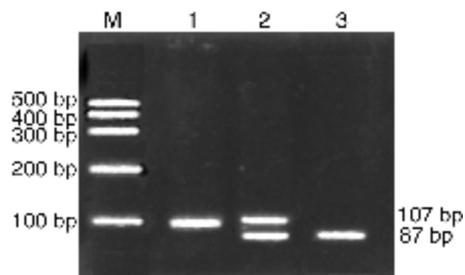
2.2 限制性片段长度多态性分析

TNF-α 基因启动子区-308 位点区域设计扩增片段为 107 bp。若无 Nco I 的酶切位点,产物大小即为 107 bp,片段判断为 AA 纯合基因型;若酶切后产生 87 bp 大小的片段,判断为 GG 纯合基因型(20 bp 分子量太小,电泳时隐入引物带),若酶切后同时出现 107 bp 和 87 bp 大小的片段,判断为 G/A 杂合型。

表 1 血清 TNF-α 检测结果

分组	例数	TNF-α/ng·L ⁻¹
对照组	126	107.05±8.05
RA 组	113	3 102.95±2 621.53 ¹⁾
治疗前组	68	2 654.41±1 936.45
治疗后组	68	1 181.03±956.42 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ *P*<0.01;与治疗前比较²⁾ *P*<0.01。



1:扩增片段,2:突变型杂合子,3:突变型纯合子。

图 1 TNF-α-308G/A 基因多态性 PCR-RFLP 电泳

2.3 TNF-α 基因-308 位点 PCR-RFLP 多态性分析

在 RA 组和健康对照组中 TNF-α-308 位点基因型分布经检验符合 Hardy Weinberg 平衡定律 (*P*>0.05)。2 组中 TNF-α 基因-308A 均为杂合子,未发生 A/A 突变纯合子个体。

2.4 TNF-α-308 位点基因型频率与等位基因频率比较

RA 组 TNF-α 基因多态性-308G 和-308A 的等位基因频率分别为 89.8% 和 10.2%,在健康对照组分别为 91.3% 和 8.7%。两者之间的基因型频率和等位基因频率差异无统计学意义(分别为 0.165 和 0.149, *P*>0.05),表明 TNF-α-308 位点基因多态性与类风湿性关节炎易感性无相关性。结果见表 2。

表 2 TNF- α -308 位点基因多态性分布情况

分组	例数	基因型频率/%			等位基因频率	
		G/G	G/A	A/A	-308G	-308A
对照组	126	104(82.5)	22(17.5)	0	91.3	8.7
RA 组	113	90(79.6)	23(20.4)	0	89.8	10.2
ESR 升高组	56	48(85.7)	8(14.3)	0	92.8	7.2
CRP 升高组	62	51(82.3)	11(17.7)	0	91.1	8.9

2.5 TNF- α -308 位点基因多态性与 RA 严重程度指标血沉(ESR)、CRP 相关性比较

CRP 升高组和 ESR 升高组与 TNF- α -308 位点基因型频率和等位基因频率见表 2。两组分别与 RA 组之间的基因型频率和等位基因频率均差异无统计学意义(分别为 0.165 和 0.149, $P > 0.05$)。结果表明 TNF- α -308 位点基因多态性与类风湿性关节炎严重程度无相关性。

3 讨论

TNF- α 是人体一种很重要的免疫调节和炎症刺激因子,主要由激活的单核巨噬细胞产生,在 RA 患者体内有较高水平,有研究显示 RA 患者治疗前后血清中 TNF- α 水平有显著差异,这表明在临床上针对抗 TNF- α 的治疗所取得的成效充分证实了它在促炎症反应中的所起的作用^[6-7]。而它的合成及合成量为遗传基因所控制,且有明显的个体差异。因此,在 RA 疾病中找到控制 TNF- α 高表达的基因位点及其基因型对于其治疗有很重要的意义。

目前研究较多的基因多态性位点是位于 TNF- α 基因启动子/增强子上游-308 处。其常见基因型为 G,少见基因型为 A。一般认为 TNF- α -308 的基因多态性与 RA 的易感性及严重程度有关,但存在争议^[8-9]。本研究显示:TNF- α -308 位点的基因型频率和等位基因频率在 RA 组和健康人群之间的差异无统计学意义($P > 0.05$),并且与疾病严重性指标 CRP 和 ESR 也无关联。表明 TNF- α -308 位点基因多态性与湖北汉族人 RA 的易感性及严重程度无关。提示其在 RA 中可能存在种族及地区差异性。

此外,也有研究认为 RA 的易感性及严重程度可能与 HLA-DR 等位基因有关^[9],下一步我们将扩大研究对象,对此予以证实。

参考文献

[1] Al-Timimi DJ, Rasool MT, Sulaiman DM. HLA-

DR/DQ Genotypes in Kurd Patients with Rheumatoid Arthritis; Relation to Disease Activity[J]. J Clin Diagn Res, 2014 May,8:CC01-4.

- [2] Jain M, Attur M, Furer V, et al Increased Plasma IL-17F Levels in Rheumatoid Arthritis Patients Are Responsive to Methotrexate, Anti-TNF, and T Cell Costimulatory Modulation [J]. Inflammation, 2014 Sep 21.
- [3] Kang JH, Park DJ, Lee JW, et al. Drug survival rates of tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. J Korean Med Sci, 2014,29:1205-1211.
- [4] De Vries-Bouwstra JK, Dijkmans BA, Breedveld FC. Biologics in early rheumatoid arthritis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2005,31:745-62.
- [5] 郭心灵,尤崇革,王丽萍,等. TNF- α 及其受体基因多态性与类风湿性关节炎易感性和血清学指标相关性分析[J]. 第二军医大学学报, 2012,2(2):155-159.
- [6] Marshall NJ, Wilson G, Lapworth K et al. Patients' perceptions of treatment with anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. a qualitative study[J]. Rheumatology, 2004,43:1034-1038.
- [7] Rodriguez-Carreón AA, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans[J]. J Autoimmun, 2005,24:63-68.
- [8] Pawlik A, Florczak M, Ostanek L et al. TNF-alpha -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis[J]. Scand J Rheumatol, 2005, 34: 22-26.
- [9] Van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, Schreuder GM et al. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility[J]. Arthritis Rheum, 2005,52:2637-2644.

(收稿日期:2014-11-12;2014-11-19)