

· 论 著 ·

Tim-4 基因 rs7700944 位点多态性与宁夏回族人 RA 的关联性分析*

徐金瑞, 杨 易, 周 晶, 孙晶莹

(宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘要:目的 对宁夏回族人 Tim-4 基因 rs7700944 位点多态性与类风湿关节炎(RA)的关联性进行分析,旨在为 RA 的早期预防提供理论依据。方法 采用限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,对宁夏回族 210 例 RA 患者(RA 组)和 198 名健康个体(对照组)Tim-4 基因 rs7700944 位点进行基因型检测及分析。结果 在对照组及 RA 组间,基因型频率($\chi^2=29.051$)及等位基因频率($\chi^2=14.106$)的分布差异均有统计学意义($P<0.01$);等位基因 A 的频率在对照组中显著高于 RA 组,OR(95%CI)为 0.549(0.400~0.752);而等位基因 G 的频率在对照组中显著低于 RA 组,OR(95%CI)为 1.823(1.330~2.498)($P<0.01$)。结论 Tim-4 基因 rs7700944 位点多态性与宁夏回族人 RA 的发生具有关联性,其中等位基因 G 为宁夏回族人易患 RA 的危险因子,而等位基因 A 为保护因子。

关键词:多态性,限制性片段长度;等位基因;关节炎,类风湿;Tim-4 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.25.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)25-2575-02

Correlation between rs7700944 SNP of Tim-4 gene and rheumatoid arthritis in Ningxia Hui ethnicity*

Xu Jinrui, Yang Yi, Zhou Jing, Sun Jingying

(Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between rs7700944 SNP of Tim-4 gene and rheumatoid arthritis(RA) in Ningxia Hui ethnicity to provide theoretic basis for taking early prevention of RA. **Methods** The polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) genotyping method was carried out to examine SNP at rs7700944 site in Tim-4 gene, including 210 Ningxia Hui RA patients and 198 ethnically matched non-arthritis(non-RA) controls. **Results** The statistical analysis demonstrated the genotype and allele frequencies at this polymorphic site for RA patients were significantly different from non-RA cohorts in the Ningxia Hui population($\chi^2=29.051$ and 14.106, $P<0.01$). A allele was more frequent in the non-RA Hui individuals than that without RA, and OR(95%CI) value was 0.549(0.400-0.752). In contrast, G allele was less common in Hui non-RA individuals than that in RA patients, and OR(95%CI) value was 1.823(1.330-2.498)($P<0.01$). **Conclusion** rs7700944 polymorphism of Tim-4 gene may be strongly associated with RA susceptibility in Ningxia Hui ethnicity. G allele is the risk factor of RA and A allele is the protective factor of RA in Ningxia Hui ethnicity.

Key words: polymorphism, restriction fragment length; alleles; arthritis, rheumatoid; Tim-4 gene

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属自身免疫性疾病,主要表现为关节滑膜慢性炎症性病变。在我国,RA 患病率为 0.3%,严重时会导致劳动力丧失或致残^[1]。遗传与环境因素共同作用导致 RA 发生。双胞胎 RA 患病率高于普通人群,且 RA 具有轻度的家族聚集倾向,均表明遗传因素参与了 RA 发病^[2]。2001 年,McIntire 等^[3]在研究哮喘基因中发现一个新的基因家族,即 T 细胞免疫球蛋白域黏蛋白域蛋白(T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein, Tim)。人类 Tim 基因位于 5q33.2 上,目前已确定有 Tim-1, Tim-3 及 Tim-4 3 个成员。Tim-4 主要表达于成熟的树突状细胞、巨噬细胞的细胞膜表面^[4],通过与其受体 Tim-1 相结合发挥作用,促进 Th2 细胞的分化与增殖,对一些免疫性疾病产生调节作用^[5]。由于历史上禁止与异族通婚,宁夏回族人形成了遗传学上的“隔离人群”。已有研究表明,宁夏回族具有特殊的遗传结构,与汉族及其他民族间存在差异^[6]。目前,国内外尚未见有关 Tim-4 基因多态性与 RA 关联性的研究报道。本研究对

宁夏地区回族人 Tim-4 基因 rs7700944 位点的多态性进行分析,探讨该位点的变异与宁夏地区回族人 RA 发生的关联性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据知情同意原则,收集宁夏不同地区回族人外周静脉血样本,RA 患者 210 例,健康个体 198 名。个体间无血缘关系,追溯 3 代均为同一民族,且在宁夏居住 3 代以上。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用常规的酚/氯仿提取法提取基因组 DNA,并溶于 TE 缓冲液中备用。

1.2.2 引物 参照 GeneBank 中 Tim-4 基因序列及相关文献设计合成引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,上游引物:5'-CTT AGC TGG CTT AGG AGT AGC-3',下游引物:5'-GGT CCA CGA TAA AGG AGA AA-3'。

1.2.3 PCR 反应 PCR 反应体系 25 μ L:DNA 模板(40 ng/ μ L)

* 基金项目:宁夏科技厅自然科学基金资助项目(NZ0933)。

表 1 两组 rs7700944 位点多态性分布[n(%)]

组别	基因型			等位基因	
	AG	GG	AA	A	G
对照组	113(57.36)	76(38.57)	8(4.07)	129(32.74)	267(67.26)
RA 组	65(30.95)*	134(63.81)*	11(5.24)*	88(20.95)*	332(79.05)*

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

1 μ L, 引物 P1、P2 各 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTP(10 mmol/L) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶(1 U/ μ L) 0.2 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μ L, 灭菌三蒸水 16.8 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进行 30 个循环, 每个循环为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s。最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 PCR 产物 3 μ L, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离。

1.2.4 限制性内切酶酶切 采用 Sac I 限制性内切酶(购自美国 NEB 公司)对 PCR 产物进行酶切, 反应体系 10 μ L: PCR 产物 3.5 μ L, 10 \times 酶切缓冲液 1 μ L, 限制性内切酶 2 U, 用灭菌三蒸水补齐至 10 μ L。经 37 $^{\circ}$ C 酶切 2~3 h, 产物经 8% 非变性凝胶电泳分离。

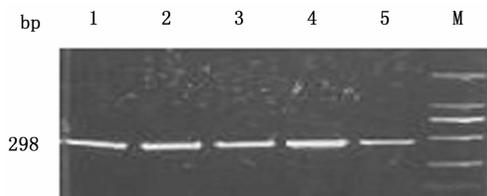
1.2.5 基因型的记录与分析 各样本的基因型判定根据酶切结果: AG 为 298、200、98 bp, GG 为: 200、98 bp, AA 为 298 bp。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 基因型频率、等位基因频率在两组中频率分布的差异及 Hardy-Weinberg 平衡检验均采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

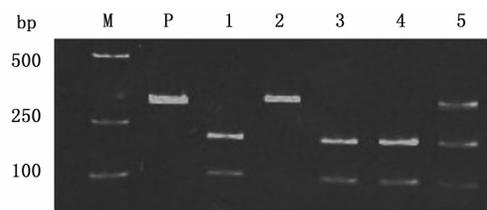
2.1 PCR 结果 扩增出的目的片段大小为 298 bp, 见图 1。

2.2 酶切结果 rs7700944 位点检出 3 种基因型: GG, AA 和 GG, 见图 2。



M: DNA 标记物; 1~5: PCR 产物。

图 1 rs7700944 位点 PCR 产物电泳图



M: DNA 标记物; 1, 3, 4: 基因型 GG; 2: 基因型 AA; 5: 基因型 AA; P: PCR 产物。

图 2 rs7700944 的 PCR 产物酶切电泳图

2.3 基因型与等位基因频率 由表 1 可见, rs7700944 位点基因型频率及等位基因频率在宁夏回族人群 RA 组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 29.051, 14.106, P < 0.01$)。等位基因 A 在对照组中的频率高于 RA 组, OR(95%CI) 为 0.549

(0.400~0.752), 而等位基因 G 在对照组中的频率低于 RA 组, OR(95%CI) 为 1.823 (1.330~2.498) ($P < 0.01$)。

3 讨论

以往研究表明, Tim 基因多态性与多种疾病的发生相关, 因此, 可根据其基因型预测个体对自身免疫性疾病的易感性^[7-9]。Chae 等^[10]研究发现, Tim-1 基因在启动子区和编码区共有 10 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 的变异与韩国人群哮喘的发生显著相关。Khademi 等^[11]发现, 由 Th1 和 Th2 细胞介导的疾病与 Tim 蛋白的参与具有一定关联性。王长青等^[12]研究发现, Tim-3 基因启动子区 2574 G>T 的变异可能与山西汉族人群变应性鼻炎易感性有关。张才成等^[13]研究了 Tim-3 基因启动子区-1541 和-574、4259 位点的变异, 发现 4259 T>G 与湖北汉族人 RA 易感性有关。有研究表明, Tim-3 基因-1541 C>T、4259 G>T 的变异及 Tim-1 基因-232 A>G、-1637 A>G 的变异与宁夏回族 RA 的发生有关^[14-15]。

本研究首次对宁夏回族人群 Tim-4 基因多态性与 RA 发生的关联性进行了研究。结果表明, rs7700944 位点基因型频率及等位基因频率在宁夏回族人群 RA 组与对照组间, 均存在极显著的差异。等位基因 G 为宁夏回族人群易患 RA 的风险因子, 而等位基因 A 为保护因子。

rs7700944 位点是位于 Tim-4 基因内含子 5 中 G>A 的突变, 该突变是否通过影响 Tim-4 基因的表达, 从而对免疫相关疾病产生间接影响, 尚需进一步研究证实。

本研究结果对宁夏回族 RA 的早期预防提供了参考数据, 并可在今后进一步开展该基因与其他疾病的相关性奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郭文正. 实用类风湿关节病学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2000: 18.
- [2] 孟济明, 邹和建. 结缔组织病新进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 308-309.
- [3] McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family[J]. Nat Immunol, 2001, 2(12): 1109-1116.
- [4] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin9 negatively regulates T helper type 1 immunity [J]. Nat Immunol, 2005, 6(12): 1245-1252.
- [5] Kuehn EW, Park KM, Smoml S, et al. Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(6): (下转第 2580 页)

社,1994:288-290.

- [7] 孙双权,陈忠,叶章群,等.两种大鼠膀胱测压方法的比较[J].中国比较医学杂志,2008,18(7):50-53.
- [8] Xiao CG. Reinnervation for neurogenic bladder: historic review and introduction of a somatic-autonomic reflex pathway procedure for patients with spinal cord injury or spinal bifida[J]. *Eur Urol*,2006,49(1):22-28.
- [9] Gillespie JI,Markerink-Van Ittersum M,de Vente J. Endogenous nitric oxide/cGMP signalling in the guinea pig bladder:evidence for distinct populations of sub-urothelial interstitial cells[J]. *Cell Tissue Res*,2006,325(2):325-332.
- [10] Hedlund P. Nitric oxide/cGMP-mediated effects in the outflow region of the lower urinary tract—is there a basis for pharmacological targeting of cGMP? [J]. *World J Urol*,2005,23(6):362-367.
- [11] Poladia DP,Bauer JA. Nitric oxide in the urinary bladder: involvement of auto-relaxation[J]. *Nitric Oxide*,2004,10(1):51-52.
- [12] Burnett AL,Calvin DC,Chamness SL,et al. Urinary bladder-urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption of neuronal nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans[J]. *Nat Med*,1997,3(5):571-574.
- [13] Diniz P,Soejima K,Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation[J]. *Nitric Oxide*,2002,7(1):18-23.
- [14] 陈跃来,岑珏,候文光,等.电针对大鼠不稳定膀胱逼尿肌及膀胱颈氮能神经递质的影响[J].*中西医结合学报*,2006,4(1):73-75.
- [15] 黄昭明,李静,郑少斌.脊髓损伤后膀胱氮能神经变化的动物实验研究[J].*解放军医学杂志*,2001,26(10):743-744.
- [16] 王钢,刘世清.高压氧对鼠损伤脊髓内神经生长相关蛋白表达的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2004,26(12):712-714.
- [17] 王钢,刘世清,王石顺.高压氧对损伤脊髓 GAP-43 mRNA 表达影响的实验研究[J].*中华航海医学与高气压医学杂志*,2004,11(4):217-219.
- [18] 王晓红,邵彬,王琴,等.高压氧治疗对脊髓损伤后大鼠神经细胞凋亡及行为学评分的影响[J].*重庆医学*,2010,39(8):935-936.
- [19] Dong H,Xiong L,Zhu Z,et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxi induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits[J]. *Anesthesiology*,2002,96(40):907-912.
- [20] 徐斌.脊髓针为主综合治疗法治疗外伤性截瘫 286 例疗效观察[J].*中国针灸*,1990,10(2):7-9.
- [21] 宋琳,李晓宁,王莹威,等.电针对急性脊髓损伤大鼠氧化应激反应的影响[J].*针灸临床杂志*,2011,27(1):55-57.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-05-22)

(上接第 2576 页)

F1326-1336.

- [6] 郭辰虹,王玉炯,舒畅,等.宁夏地区回族和汉族人群 4 个 STR 位点的遗传多态性分析[J].*山东大学学报:医学版*,2005,43(3):192-194.
- [7] Mcintire JJ,Umetu SE,Macauba SC,et al. Immunology: hepatitis A virus link to atopie disease[J]. *Nature*,2003,425(6895):576.
- [8] Chae SC,Park YR,Shim SC,et al. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Lett*,2004,95(1):91-95.
- [9] Chae SC,Park YR,Song JH,et al. The polymorphisms of Tim-1 promoter region are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population[J]. *Immunogenetics*,2005,56(10):696-701.
- [10] Chae SC,Song JH,Heo JC,et al. Molecular variations in the promoter and coding regions of human tim1 gene and their association in Koreans with asthma[J]. *Hum Immunol*,2003,64(12):1177-1182.
- [11] Khademi M,Illes Z,Gielen AW,et al. T cell Ig-and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis[J]. *J Immunol*,2004,172(11):7169-7176.
- [12] 王长青,彭诗东. Tim-3 基因的多态性与变应性鼻炎的相关性[J].*山西医药杂志*,2008,37(8):688-690.
- [13] 张才成,吴健民,崔天盆,等. Tim-3 启动子区基因多态性与类风湿关节炎之间关系的研究[J].*中华风湿病学杂志*,2005,9(9):526-529.
- [14] Xu JR,Yang Y,Liu XM,et al. Polymorphisms of the TIM-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in the Chinese Hui minority ethnic population[J]. *Genet Mol Res*,2012,11(1):61-69.
- [15] Xu JR,Yang Y,Liu XM,et al. The -1541 C>T and +4259 G>T of TIM-3 polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Chinese Hui population [J]. *Int J Immunogenet*,2011,38(6):513-518.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)