

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00155

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

郭心灵¹, 尤崇革^{1*}, 王丽萍², 马克君¹, 周雅丽¹, 施鑫鹤¹, 李菲菲¹, 郝莉娜³

1. 兰州大学第二医院中心实验室, 兰州 730030

2. 兰州大学第二医院风湿科, 兰州 730030

3. 兰州大学第二医院检验中心, 兰州 730030

[摘要] **目的** 探讨 TNF- α 及其受体基因多态性与我国西北地区汉族人群类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 易感性及其血清学指标的相关性。**方法** 利用高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 技术对 452 例 RA 患者和匹配的 356 例正常对照人群的 TNF- α 及其受体 6 个 SNP 位点 (TNFA -857C>T, TNFA -863C>A, TNFA -308G>A, TNFA -238G>A, TNFR1-383A>C, TNFR2-exonT>G) 的基因多态性进行病例-对照研究。此外, 采用临床常规方法测定 RA 患者的抗环瓜氨酸肽抗体 (anti-CCP) 和类风湿因子 (RF), 分析其与 6 个 SNP 位点的相关性。**结果** TNFA -308GA 和 -863CA 基因型在 RA 病例组和正常对照组中频率分布差异有统计学意义 ($P=0.001, P=0.002$), TNFA -238GA, TNFA -238AA 及 TNFR2-exonTG, TNFR2-exonGG 基因型在两组间频率分布差异无统计学意义 ($P=0.701, P=0.999, P=0.825, P=0.330$)。由 TNFA 3 个位点构成的单倍型 -238G/-308A/-863C(GAC)、-238G/-308G/-863A(GGA) 和 -238G/-308G/-863C(GGC) 在两组间的频率分布差异均有统计学意义 ($P=0.016, P=0.033, P=0.023$)。TNF- α 及其受体基因多态性与 RA 血清学指标 (RF, anti-CCP) 未见明显相关性。**结论** TNFA -308GA 和 TNFA -863CA 与中国西北地区汉族人群 RA 易感性相关; TNFA 单倍型 GAC, GGA 和 GGC 与 RA 易感性相关; TNF- α 及其受体基因多态性与 RA 患者血清学指标未见明显相关性。

[关键词] 类风湿性关节炎; 肿瘤坏死因子 α ; 单核苷酸多态性; 疾病易感性; 血清学

[中图分类号] R 593.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0155-05

Correlation analysis of gene polymorphisms of TNF- α and its receptors with rheumatoid arthritis susceptibility and related serological markers

GUO Xin-ling¹, YOU Chong-ge^{1*}, WANG Li-ping², MA Ke-jun¹, ZHOU Ya-li¹, SHI Xin-he¹, LI Fei-fei¹, GAO Li-na³

1. Central Laboratory, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China

2. Department of Rheumatism, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China

3. Clinical Laboratory Center, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation of gene polymorphisms of TNF- α and its receptor with rheumatoid arthritis (RA) susceptibility and the related serological markers in the Han nationality living in northwest China. **Methods** The gene polymorphisms of TNF- α and its receptor (TNFA -857C>T, TNFA -863C>A, TNFA -308G>A, TNFA -238G>A, TNFR1-383A>C, TNFR2-exonT>G) were determined by high resolution melting (HRM) in 452 RA patients and 356 controls in a case-control manner. Anti-cyclic citrullinated protein antibodies (anti-CCP) and rheumatoid factors (RF) were measured by clinical conventional methods, and their association with the gene polymorphisms of TNF- α and its receptor was analyzed. **Results** Significant differences were found in the distribution frequencies of TNFA -308GA and -863CA between RA cases and healthy controls ($P=0.001, P=0.002$), but not in the frequencies of TNFA -238GA, TNFA -238AA, TNFR2-exonTG or TNFR2-exonGG ($P=0.701, P=0.999, P=0.825, P=0.330$). In addition, significant differences were also found in the distribution frequencies of TNFA haplotypes of -238G/-308A/-863C(GAC), -238G/-308G/-863A

[收稿日期] 2011-09-08 **[接受日期]** 2011-12-20

[基金项目] 甘肃省科技支撑计划 (090NKC094). Supported by Science & Technology Supporting Project of Gansu Province, China (090NKC094).

[作者简介] 郭心灵, 硕士生. E-mail: guoxll@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0931-8942893, E-mail: youchg04@yahoo.com.cn

(GGA) and -238G/-308G/-863C(GGC) between the two groups ($P=0.016$, $P=0.033$, $P=0.023$). Furthermore, we found that RA serological markers (RF, anti-CCP) were not significantly correlated with the gene polymorphisms of TNF- α and its receptors. **Conclusion** TNFA -308GA and TNFA -863CA are associated with RA susceptibility in Han nationality living in northwest China, so are the TNFA haplotypes of GAC, GGA and GGC. Gene polymorphisms TNF- α and its receptor have no significant correlation with RA serological markers.

[Key words] rheumatoid arthritis; tumor necrosis factor-alpha; single nucleotide polymorphism; disease susceptibility; serology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2): 155-159]

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性系统性自身免疫性疾病,以渐进性关节损伤和关节滑膜周围结缔组织异常性增生为特征,至今病因未明。有研究指出RA的发病主要是受环境因素的影响^[1],和遗传因素也有一定的关系^[2-3]。RA的血清学指标主要有类风湿因子(rheumatoid factor, RF)和抗环瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated protein antibody, anti-CCP),通常将二者结合诊断RA^[4-7]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种促炎细胞因子,与TNF受体(包括TNFR1和TNFR2)结合发挥效应^[8],其表达量过高时会引发一系列异常反应^[9]。研究表明RA患者活动期,关节滑膜腔液及血清中TNF- α 及其可溶性受体水平显著增高^[3, 10-11],而且针对RA患者体内TNF- α 的生物制剂治疗在改善RA症状方面取得了明显疗效,表明TNF- α 及其受体在RA发病过程中发挥重要作用^[12-13]。

由于TNF- α 及其受体水平受基因调控,因此本研究应用高分辨率溶解曲线(high resolution melting, HRM)技术对TNF- α 及其受体的基因多态性进行分析,并就其与RA患者的血清学指标的相关性进行分析。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集2010年5月至2011年7月在兰州大学第二医院风湿科住院的RA患者452例,均符合1987年美国风湿病学会诊断标准,其中男性104例,女性348例,平均年龄(47.12 \pm 15.36)岁;对照组来自本院同时期门诊体检的健康人356例,其中男性85例,女性271例,平均年龄(47.65 \pm 13.25)岁,病例组与对照组性别比例差异无统计学意义。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 收集研究对象的外周EDTA抗凝血标本及临床资料,采用日本Fujifilm

公司的全血DNA提取试剂盒,严格按照说明书操作提取基因组DNA,所得的DNA标本保存在-40℃冰箱。

1.2.2 血清中RF及anti-CCP的测定 检测RA患者的血清学指标(RF和anti-CCP),RF由乳胶凝集法测定,anti-CCP(<5 IU/ml为阴性)由德国欧蒙公司的ELISA法检测试剂盒检测。

1.2.3 所选位点的基因多态性分析 选取可能与RA患者及其临床指标相关的6个SNP位点,包括TNFA -857(rs179924, C>T)、TNFA -863(rs1800630, C>A)、TNFA -308(rs1800629, G>A)、TNFA -238(rs361525, G>A)、TNFR1 -383(rs2234649, A>C)和TNFR2-exon(rs1061622, T>G)。针对各位点设计合适的引物(表1),由上海生工生物工程服务有限公司合成。优化各位点PCR反应条件,扩增目标DNA片段,利用HRM技术进行各位点基因分型。所用仪器为东胜创新生物科技有限公司的黑金刚PCR仪和澳大利亚Corbett公司的Rotor-Gene 6000。PCR扩增条件:95℃预变性3 min;95℃变性25 s,62℃退火延伸40 s,10个循环;95℃变性25 s,57℃退火20 s,72℃延伸30 s,27个循环;最后72℃延伸2 min。HRM分析条件:96℃变性30 s,45℃退火30 s,收集从72℃到90℃溶解曲线数据,依据溶解曲线峰型的改变进行基因分型。

1.2.4 测序验证 随机选取各位点不同特征峰的扩增产物各3份送上海生工生物工程服务有限公司测序,以验证HRM的分型结果是否正确。

1.3 统计学处理 采用在线软件SHEsis分析RA病例组和对照组中TNF- α 及其受体基因多态性的分布情况;各位点基因型的风险评估用比值比(OR)及其95%可信区间(95%CI)表示,运用SPSS 17.0软件进行logistic回归分析;采用 χ^2 检验分析RA患者中TNF- α 及其受体基因多态性与血清学指标的关系。检验水准(α)为0.05。

表1 TNF- α 及其受体各位点的 PCR 引物及产物长度

Tab 1 PCR primer sequences and expected PCR product length of TNF alpha and its receptor gene sites

dbSNP	Gene type		Primer sequence (5'→3')	Length (bp)
rs361525	TNFA -238G>A	P1	GGG TCC TAC ACA CAA ATC AGT	79
		P2	CCC CTC ACA CTC CCC ATC C	
rs1800629	TNFA -308G>A	P1	CCC CAA AAG AAA TGG AGG CAA TAG G	68
		P2	GTA GGA CCC TGG AGG CTG AAC	
rs179924(rs1800630)	TNFA -857C>T(-863C>A)	P1	ACC ACA GCA ATG GGT AGG AG	114
		P2	TCC TGG AGG CTC TTT CAC TC	
rs2234649	TNFR1-383A>C	P1	CTT GGT GTT TGG TTG GGA GT	153
		P2	AGG AAG AGC TGG AGG AGG AG	
rs1061622	TNFR2-exonT>G	P1	CTC CTC CTC CAG CTG TAA CG	139
		P2	GTG TTG GGA TCG TGT GGA C	

2 结果

2.1 TNF- α 及其受体基因多态性 HRM 分析及测序验证结果 随机选取 45 份 TNF- α 及其受体 6 个 SNP 位点不同特征峰的 PCR 产物进行测序, 验证的结果与 HRM 基因分型完全一致。

2.2 RA 病例组和对照组中 TNF- α 及其受体基因多态性分析 各位点 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析结果显示 TNFA -857C>T 和 TNFR1-383A>C 两个位点在对照组中基因型分布不具有遗传代表性 ($P<0.05$), 故不进行统计学分析。对

剩余 4 个位点, 以本位点野生型为参照分别对杂合型和突变纯合型作 logistic 回归分析, 结果(表 2)显示基因型 TNFA -308GA 和 TNFA -863CA 在病例组和对照组之间的分布差异有统计学意义 ($P=0.001, P=0.002$)。此外, 对位于同一条染色体上的 3 个 TNFA 位点 (-238G>A、-308G>A 和 -863C>A) 进行单倍型分析, 结果(表 3)显示单倍型 -238G/-308A/-863C(GAC)、-238G/-308G/-863A(GGA)、-238G/-308G/-863C(GGC) 在病例组和对照组之间的分布差异有统计学意义 ($P=0.016, P=0.033, P=0.023$)。

表2 TNF- α 及其受体基因多态性与 RA 易感性的相关性Tab 2 Correlation of TNF- α and its receptor gene polymorphisms with RA susceptibility

Genotype	Case n(%)	Control n(%)	P	OR (95%CI)
TNFA -238G>A				
GG	410(90.7)	319(89.6)		1.000
GA	40(8.9)	37(10.4)	0.701	0.909(0.560-1.477)
AA	2(0.4)	0(0.0)	0.999	-
TNFA -308G>A				
GG	422(93.4)	307(86.2)		1.000
GA	30(6.6)	49(13.8)	0.001	0.437(0.269-0.710)
TNFA -863C>A				
CC	406(89.8)	296(83.1)		1.000
CA	45(10.0)	60(16.9)	0.002	0.523(0.344-0.795)
AA	1(0.2)	0(0.0)	1.000	-
TNFR2-exonT>G				
TT	310(68.6)	242(68.0)		1.000
TG	132(29.2)	109(30.6)	0.825	0.966(0.709-1.316)
GG	10(2.2)	5(1.4)	0.330	1.730(0.574-5.212)

表 3 RA 病例组和健康对照组中同一染色体上 TNFA 3 个位点多态性单倍型分布

Tab 3 Haplotype distribution of three TNFA site polymorphisms in both RA cases and healthy controls

TNFA haplotype	Case n(%)	Control n(%)	χ^2	P value	OR (95%CI)
-238A/-308G/-863C	39(4.3)	24(3.3)	0.958	0.328	1.295(0.770-2.178)
-238G/-308A/-863C	25(2.8)	36(5.0)	5.86	0.016	0.531(0.316-0.893)
-238G/-308G/-863A	47(5.2)	55(7.7)	4.536	0.033	0.635(0.427-0.944)
-238G/-308G/-863C	788(87.1)	582(81.7)	5.191	0.023	1.387(1.046-1.839)

Frequency<0.03 was ignored in this table

2.3 病例组中 TNF- α 及其受体基因多态性与血清学指标的关系 根据 RF 和 anti-CCP 的测定结果对病例组分组做 TNF- α 及其受体基因多态性统计分析,结果显示 TNF- α 及其受体基因多态性与两个指标未见明显相关性。

3 讨论

类风湿性关节炎是一种全身性多关节受损的自身免疫性疾病,具体机制仍未明确,可能是环境、遗传^[14]、感染^[15]等因素综合作用的结果。本研究结果显示 TNFA -308G>A 和 TNFA -863C>A 的杂合型分布频率在病例组和对照组之间差异有统计学意义($P=0.001, P=0.002$), TNFA -308GA 和 TNFA -863CA 基因型在对照组中比例较高,可能与降低 RA 患病风险相关,对机体有保护作用($OR=0.437, 95\%CI: 0.269\sim 0.710; OR=0.523, 95\%CI: 0.344\sim 0.795$)。Al-Rayes 等^[16]发现在沙特阿拉伯地区 TNFA -308A 在对照组中频率高于 RA 病例组,类似的结论在华东地区汉族研究人群^[17]、台湾^[18]、匈牙利^[19]等地方均有报道,这与本研究结论一致。Rodríguez-Carreón 等^[20]的研究结果提示墨西哥地区 TNFA -308A 在 RA 病例组中分布高于对照组,西班牙、美国、澳大利亚等地区的研究也显示类似的结论。Fakhfakh Karray 等^[21]提出土耳其地区 TNFA -308G>A 基因多态性在 RA 病例组和对照组之间分布频率没有明显差异。由于基因多态性的分布受地域民族等因素影响,而且实验方法及标本情况不同也同样影响着基因多态性的分布,因此结论仍需进一步研究验证。Boehm 等^[22]发现 TNFA -863CC 与 RA 患者外周血中 TNF- α 水平升高相关,也有研究提出携带-863AA 的人群患某些疾病(如系统性红斑狼疮、慢性阻塞性

肺疾病等)的概率明显低于携带-863CC 的人群^[23-24],推测-863AA 突变基因能限制 TNF- α 及其受体基因的表达, TNF- α 合成较少,阻止病情的发展。TNFA -238GA、TNFA -238AA、TNFR2-exonTG 和 TNFR2-exonGG 基因型在本实验结果中均未呈现与 RA 易感性有统计学相关($P=0.701, P=0.999, P=0.825, P=0.330$),提示这两个位点的突变基因可能不会影响 RA 的患病风险。

此外,对位于同一条染色体上的 TNFA -238G>A、-308G>A 和 -863C>A 3 个位点构成的单倍型进行分析,发现单倍型 GAC、GGA、GGC 在病例组和对照组之间分布差异有统计学意义($P=0.016, P=0.033, P=0.023$)。其中 GAC、GGA 降低了 RA 发病的风险($OR=0.531, 95\%CI: 0.316\sim 0.893; OR=0.635, 95\%CI: 0.427\sim 0.944$),而 GGC 可能会增加人群患 RA 的风险($OR=1.387, 95\%CI: 1.046\sim 1.839$)。

将 TNFA -238G>A、-308G>A、-863C>A 和 TNFR2-exonT>G 与 RA 患者血清学指标(RF 和 anti-CCP)进行分析,未发现有统计学关联,这提示血清学指标 RF 和 anti-CCP 与 TNF- α 及其受体的基因多态性无相关性。

虽然 TNFA -308G>A 和 -863C>A 在 RA 病例组与对照组中分布差异有统计学意义,这并不能完全证实它们是 RA 的易感基因,可能是与易感基因连锁的遗传标志,或者是基因的相互作用,因此还要做进一步验证。单倍型 GAC、GGA、GGC 有助于 RA 的诊断及预后。考虑到地区、人群及标本量的差异,仍需做大量的实验验证所得结果,以便得到正确的结论应用于临床为患者服务。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Boissier M C. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis[J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78: 230-234.
- [2] Gregersen P K, Silver J, Winchester R J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1987, 30: 1205-1213.
- [3] Karlson E W, Chibnik L B, Tworoger S S, Lee I M, Buring J E, Shadick N A, et al. Biomarkers of inflammation and development of rheumatoid arthritis in women from two prospective cohort studies[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 641-652.
- [4] Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review[J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65: 845-851.
- [5] Nielen M M, van der Horst A R, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma I E, van de Stadt R J, Aarden L, et al. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64: 1199-1204.
- [6] Schellekens G A, Visser H, de Jong B A, van den Hoogen F H, Hazes J M, Breedveld F C, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43: 155-163.
- [7] Kroot E J, de Jong B A, van Leeuwen M A, Swinkels H, van den Hoogen F H, van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43: 1831-1835.
- [8] Sainz J, Salas-Alvarado I, López-Fernández E, Olmedo C, Comino A, García F, et al. TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2010, 23: 423-436.
- [9] Elahi M M, Asotra K, Matata B M, Mastana S S. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792: 163-172.
- [10] Oregón-Romero E, Vázquez-Del Mercado M, Ruiz-Quezada S L, Navarro-Hernández R E, Rangel-Villalobos H, Martínez-Bonilla G, et al. Tumor necrosis factor alpha -308 and -238 polymorphisms in rheumatoid arthritis. Association with messenger RNA expression and sTNF-alpha[J]. *J Investig Med*, 2008, 56: 937-943.
- [11] Cope A P, Aderka D, Doherty M, Engelmann H, Gibbons D, Jones A C, et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases[J]. *Arthritis Rheum*, 1992, 35: 1160-1169.
- [12] Emonts M, Hazes M J, Houwing-Duistermaat J J, van der Gaast-de Jongh C E, de Vogel L, Han H K, et al. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study[J]. *BMC Med Genet*, 2011, 12: 36.
- [13] Zwerina J, Redlich K, Schett G, Smolen J S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1051: 716-729.
- [14] Winchester R J. Genetic aspects of rheumatoid arthritis[J]. *Springer Semin Immunopathol*, 1981, 4: 89-102.
- [15] Hyrich K L, Inman R D. Infectious agents in chronic rheumatic diseases[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2001, 13: 300-304.
- [16] Al-Rayes H, Al-Swailem R, Albelawi M, Arfin M, Al-Asmari A, Tariq M. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphism in Saudi rheumatoid arthritis patients[J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2011, 4: 55-63.
- [17] Chen R, Fang M, Cai Q, Duan S, Lv K, Cheng N, et al. Tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Han population of Eastern China[J]. *Rheumatol Int*, 2007, 28: 121-126.
- [18] Yen J H, Chen C J, Tsai W C, Lin C H, Ou T T, Wu C C, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan[J]. *J Rheumatol*, 2001, 28: 1788-1792.
- [19] Balog A, Gál J, Gyulai Z, Zsilák S, Mándi Y. Tumour necrosis factor-alpha and heat-shock protein 70-2 gene polymorphisms in a family with rheumatoid arthritis[J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2004, 51: 263-269.
- [20] Rodríguez-Carreón A A, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez J M, Pérez-Hernández N, Montes de Oca J V, 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.
- [21] Fakhfakh Karray E, Bendhifallah I, BenAbdelghani K, Hamzaoui K, Zakraoui L. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in regional Tunisian population[J]. *J Infect Dis Immunity*, 2011, 3: 30-35.
- [22] Boehm J, Hauner K, Grammer J, Dietrich W, Wagenpfeil S, Braun S, et al. Tumor necrosis factor-alpha -863 C/A promoter polymorphism affects the inflammatory response after cardiac surgery[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011, 40: e50-e54.
- [23] Ramos E M, Lin M T, Larson E B, Maezawa I, Tseng L H, Edwards K L, et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease[J]. *Arch Neurol*, 2006, 63: 1165-1169.
- [24] Chen Y C, Liu S F, Chin C H, Wu C C, Chen C J, Chang H W, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha-863C/A gene polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Lung*, 2010, 188: 339-347.