

TNF $\alpha$  - 850C/T 基因多态性与 Graves 病的相关性赖绮云<sup>1</sup>, 冯锦辉<sup>2</sup>, 陈盛强<sup>3\*</sup>

**摘要** **目的** 探讨肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$ -850C/T 基因多态性与毒性弥漫性甲状腺肿(Graves 病)的关系。 **方法** 运用多聚酶链反应技术检测 60 例 Graves 病及 119 例正常人肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$ -850C/T 基因多态性。 **结果** Graves 病组肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$ -850C/C、T/C、T/T 表型频率分别为 0.7167、0.2667、0.0196, 对照组分别为 0.7899、0.1932、0.0168; Graves 病组 TNF $\alpha$ -850T、TNF $\alpha$ -863C 基因频率分别为 0.8500、0.1500, 对照组分别为 0.8866、0.1134; TNF $\alpha$ -850C/T 各种基因型频率在 Graves 病组与正常对照组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。 **结论** 肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$ -850C/T 基因多态性与 Graves 病无明显相关。

**关键词** Graves 病; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ -850C/T; 多态性

**中图分类号** R581 **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2011)12-1442-03

**Study on TNF $\alpha$ -850C/T polymorphisms in Graves disease patients.** LAI Yi-wen, FENG Jin-hui, CHEN Sheng-qiang. (1 Panyu hospital 2 Shiji Hospital of Panyu District, Guangzhou 511400, Guangdong P. R. CHINA 3 The second affiliated Hospital of GuangZhou Medical college, Guangzhou China, 510120)

**Abstract** **Objective** To investigate the relationship between tumor necrosis factor(TNF)-850C/T polymorphism and Graves. **Methods** the polymorphism of TNF $\alpha$ -850C/T gene was screened by PCR-RELP. **Results** the gene frequency of TNF $\alpha$ -850C/T in uveitis group was as followed, TNF $\alpha$ -850 C/C、T/C、T/T genotype frequency 0.7167、0.2667、0.019, TNF $\alpha$ -850 C、TNF $\alpha$ -850 T Gene frequency: 0.8500、0.1500. TNF $\alpha$ -850 C/C、T/C、T/T genotype frequency in control group was as followed: 0.7899、0.1932、0.0168, TNF $\alpha$ -850 C、TNF $\alpha$ -850 T Gene frequency 0.8866、0.1134, There were no significant differences in the frequencies of TNF $\alpha$ -850C/T gene between Graves patients and control group ( $P>0.05$ ).

**Conclusion** no evident association was found between TNF $\alpha$ -850C/T polymorphism and Graves.

**Key words:** TNF $\alpha$ -850C/T gene; Graves; disease; Polymorphism

研究证明,多种细胞因子如干扰素(IFN)、IL-1、IL-4、肿瘤坏死因子(TNF)等通过调节甲状腺细胞、眼球后脂肪细胞、成纤维细胞等与免疫细胞之间的相互作用,并改变他们的功能,参与毒性弥漫性甲状腺肿(Graves 病)的免疫病理过程。其中, TNF- $\alpha$  在 Graves 病发生和发展过程中的作用尤为关键。研究证实 TNF- $\alpha$  基因启动子区域-850 位点(转录起始位点上游第 850bp)存在基因多态性,这种基因多态性的存在可能影响 TNF

基因转录和表达,进而影响 TNF 的生物学功能<sup>[1]</sup>。TNF- $\alpha$  基因启动子-863 位点至-850 位点之间的寡核苷酸片断可能是 TNF- $\alpha$  关键的转录调节元件,在此区域发生的突变可能影响 TNF- $\alpha$  基本表达。为了解 TNF $\alpha$ -850C/T 基因多态性与 Graves 病的关系,本文利用聚合酶链式反应(PCR)技术对 Graves 病和对照者的 TNF $\alpha$ -850C/T 基因进行检测,初步探讨 TNF $\alpha$ -850C/T 基因多态性与 Graves 病的关系。

基金项目:番禺区科技项目(No.2009-z-97-1, No.2009-z-83-1)

作者单位:1.广州番禺中心医院,广东 广州 511400; 2.广州市番禺区石基人民医院,广东 广州 511450; 3.广州医学院第二附属医院,广东 广州 510260

作者简介:赖绮云(1972~),女,本科,副主任医师,主要从事内分泌专科工作。

\* 通讯作者 E-mail: chenshengq66@gmail.com

spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology 2002, 35(6):1522-1527.

[8] Karin KL, Yuzl M, Alistair HK et al. Genetic variability in hepatitis B viruses[J]. Gen Viro J, 2002, 83:1267-1280.

[9] Kao JH, Chen PJ, Lai MY et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B [J]. Gastroenterology 2000, 118(3):554-559.

[10] You J, Zhuang L, Cheng HY et al. A randomized controlled clinical study of thymosin alpha-1 versus interferon-alpha in [corrected]

patients with chronic hepatitis B lacking HBeAg in China [corrected][J]. J Chin Med Assoc 2005, 68(2):65-72.

[11] Ma JC, Wang LW, Li XJ et al. Relationship between HBV genotypes and anti-viral therapeutic efficacy of interferon-alpha [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2007, 6(2):166-171.

[12] Buster EH, Hansen BE, Lau GK et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B eantigen-positive chronic hepatitis B to peginteron-alfa[J]. Gastroenterology 2009, 137(6):2002-2009.

收稿日期 2011-09-09 编辑 吴中菲

## 1 对象与方法

1.1 对象 研究对象均为广东地区汉族人, 饮食结构相似, 各研究对象之间无血缘关系。60 例 Graves 病患者均是自 2008~2010 年在番禺区人民医院, 番禺区石碁人民医院就诊的患者中选取, 汉族人, 其临床表现均具有典型的高代谢症群, 不同程度的弥漫性甲状腺肿, 实验室检查符合甲状腺功能亢进改变, 其中男 28 人, 女 32 人, 年龄 25~72 岁, 平均年龄 41 岁; 对照组 121 名, 男 64 名, 女 57 名, 均来自广州医学院第二附属医院健康体检人员, 汉族人, 均无甲状腺疾病及家族史, 甲状腺功能检测在正常范围内, 经问诊无其他自身免疫性疾病。两组间性别和年龄差异无统计学意义。

## 1.2 方法

1.2.1 引物的设计及合成 在 UCSC Genome Browser 网上查找 TNF- $\alpha$  基因启动子区部分 DNA 序列 (31482447-31482586)。上游引物序列 TNF-P1: 5'-TCG AGT ATG GGG ACC CCC CGT T-3', 下游引物序列: TNF-P2: 5'-CCA GTG TGT GGC CAT ATC TTC TT-3'。特异性扩增 TNF- $\alpha$  基因启动子区 -850 位点附近的部分 DNA 序列, 经 PCR 扩增后目的基因片段长度大小为 128bp, 由上海生工公司合成。

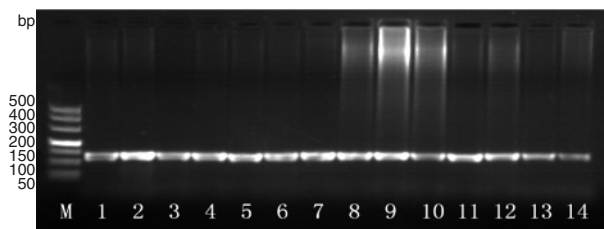
1.2.2 DNA 的提取 采用苯酚-氯仿法提取。

1.2.3 TNF $\alpha$  -850C/T 基因的检测 PCR 体系总体积为 30 $\mu$ l, 其中包括 DNA 模板 5 $\mu$ l, 2mmol/L 脱氧三磷酸核苷(dNTP) 2 $\mu$ l, 10 $\times$  PCR 缓冲液 4 $\mu$ l, 上、下游引物各 0.2 $\mu$ mol/L, TaqDNA 聚合酶 2.5U。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 然后以下列温度和时间循环 35 次: 94 $^{\circ}$ C 45s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 末次循环后均于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。PCR 扩增后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测是否有特异性的扩增产物。取 PCR 产物 25 $\mu$ l, 加 10U 的 HincII 内切酶 1 $\mu$ l, 10 $\times$  酶切缓冲液 3 $\mu$ l, 加双蒸水 ddH<sub>2</sub>O 补至总体积 30 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 酶切 3h。取 10 $\mu$ l TNF- $\alpha$  -850 基因酶切产物直接加样于 3.0% 琼脂糖凝胶的加样孔中, 室温下恒压 (120V) 电泳 35min 后取出, 然后置于紫外反射投射仪上观察电泳结果, 置于凝胶成像仪下拍照记录电泳图像。

1.3 统计学处理 所有数据均经统计软件 SPSS17.0 进行统计分析, 两组各等位基因频率利用两样本率的  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 TNF $\alpha$  -850C/T 基因 PCR 扩增结果 经 PCR 扩增后 TNF $\alpha$  -850C/T 基因目的片段大小为 128 bp。见图 1。随机在两组中各取 5 份标本, 每份重复 5 次 PCR 扩增, 均产生同样结果。

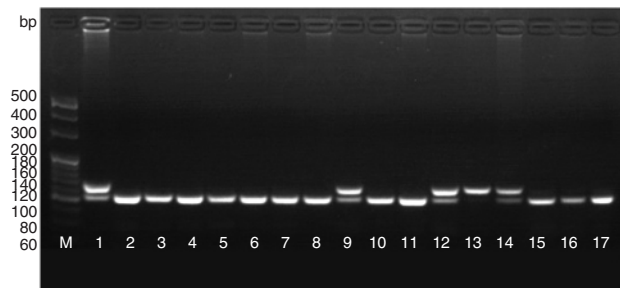


M: 100bp 分子量标准; 泳道 1-15 号的扩增产物的大小为 128bp

图 1 TNF $\alpha$  -850C/T 基因 PCR 扩增结果

2.2 TNF $\alpha$  -850C/T 等位基因的判定 标本经 PCR/RFLP 后可产生 3 种酶切格局: TNF-850 C/T 基因经特异性限制内切酶消

化后可出现 3 种不同大小的 DNA 片段组合, 分别为 C/C 基因型: 105bp、23bp; T/T 基因型: 128bp; C/T 基因型: 128bp、105bp、23bp。见图 2。结果中 23bp 由于片段小, 电泳于凝胶之外, 在图中未显示。



M 为 20 bp Ladder 分子量标准, 泳道 2-8, 15-17 基因型为 C/C; 泳道 1, 9, 12, 14 基因型为 C/T; 泳道 13 基因型为 T/T 杂合子基因型

图 2 TNF $\alpha$  -850C/T 位基因产物琼脂糖凝胶电泳图

2.3 Graves 病组和对照组 TNF $\alpha$  -850C/T 基因型频率与等位基因频率的分布 经 Hardy-Weinberg 平衡检验, TNF- $\alpha$  -850 基因各基因型频率观察值与期望值相吻合, 达到遗传平衡。Graves 病组和对照组的 TNF- $\alpha$  -850 基因分型并统计出其基因型频率及频数分布如表 1 所示。比较两组 TNF- $\alpha$  -850 基因型分布发现, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。在 Graves 病组和对照组中 TNF- $\alpha$  -850 C/C 基因型频率分别为 71.67% 和 78.99%, 两组间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。在 Graves 病组和对照组中 TNF- $\alpha$  -850 T/T 基因型频率分别为 1.67% 和 1.68%, 两组间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。在 Graves 病组和对照组中 TNF- $\alpha$  -850 C/T 基因型频率分别为 26.67% 和 19.32%, 两组间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。根据两组 TNF- $\alpha$  -850 基因型频数分布, 应用基因计数法统计出两组 TNF- $\alpha$  -850 等位基因频数分布如表 1 所示。采用  $\chi^2$  检验, 比较两组 TNF- $\alpha$  -850 等位基因分布上的差异  $P>0.05$ , 说明两组等位基因分布差异无统计学意义, 两组等位基因频率分布大致相似。正常人 TNF $\alpha$  -850 C/C 纯合子表型的频率最高, TNF $\alpha$  -850 C/T 杂合子频率次之, TNF $\alpha$  -850 T/T 纯合子频率最低。

表 1 Graves 病组和对照组 TNF $\alpha$  -850C/T 基因型频率与等位基因频率的分布

组别	例数	TNF $\alpha$ -850C/T 基因型频率 (%)			等位基因 (%)	
		C/C	C/T	T/T	C	T
Graves 病组	60	71.67 (43)	26.67 (16)	1.67 (1)	0.8500	0.1500
对照组	119	78.99 (94)	19.32 (23)	1.68 (2)	0.8866	0.1134

## 3 讨论

TNF $\alpha$  可诱导甲状腺组织内淋巴细胞和巨噬细胞的增殖和活化, 加强细胞毒性 T 细胞的作用, 调节白介素等其它细胞因子的产生, 从而在甲状腺免疫病理过程中发挥重要作用。体外实验表明, GD 患者 TEC 可表达 TNFmRNA, 而正常 TEC 无此作用。但 Graves 病时甲状腺组织内 TNF $\alpha$  的改变是否会引起外周血 TNF $\alpha$  的改变一直是医学界争论的焦点。研究发现外周血 TNF $\alpha$  高于正常人。研究认为, TNF 可以通过发挥以下几个方面的作用而诱发 Graves 病: ①与干扰素一起诱导 MHC 类基因的表达<sup>[6]</sup>。有研究表明, Graves 病、桥本甲状腺功能亢进、桥

本甲状腺炎等自身免疫性甲状腺疾病中,甲状腺滤泡上皮细胞异常表达 HLA 类抗原,但表达程度不同<sup>[7-9]</sup>。HLA 类抗原提呈甲状腺细胞抗原多肽给 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞,使得甲状腺细胞易被识别和杀伤;②TNF 因子与 IFN 等一起可增强 MHC I 类基因在甲状腺细胞上的表达<sup>[6]</sup>,甲状腺细胞上 MHC I 类基因的表达,使得甲状腺细胞成为抗原递呈细胞或使 TH 细胞与甲状腺细胞反应,促进细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)对甲状腺细胞的攻击;③TNF $\beta$  因子与 IL-1、IL-2 等细胞因子共同作用,启动体液免疫,产生较多的抗体;④TH1 细胞在 Graves 病中的主导作用使得抑制性 T 淋巴细胞的抑制作用相对减弱。TNF- $\alpha$  基因定位于 6 号染色体 HLA-DR 以及 HLA-B 基因位点之间的 HLA- 抗原基因簇上,即 6p21.3,其长度约 2.76kb,由 4 个外显子和 3 个内含子所组成。研究发现在 TNF- $\alpha$  基因启动子部位存在许多 SNPs 位点,如 -1031 (T/G)、-863 (C/A)、-851 (C/T)、-419 (G/C)、-376 (G/A)、-308 (G/A)、-238 (G/A)、-162 (G/A)及 -49(G/A)。因此,在 TNF- $\alpha$  基因 5'区存在高度多态性,而 3'区高度保守,这些 SNPs 位点可能通过影响转录活性而使其表达水平不同。研究已发现 TNF- $\alpha$  基因启动子多态性与免疫性疾病及感染性疾病的发生、发展和转归相关,主要通过影响 TNF- $\alpha$  的表达量来实现,也可以通过改变核蛋白或受体结合的方式来完成。Kula<sup>[6]</sup>等对波兰 Graves 病患者的研究发现,TNF- $\alpha$ -308A 与 Graves 病相关,Kamizono<sup>[7]</sup>同时发现 TNF- $\alpha$ -1031C、-863A 与日本人 Graves 病相关。TNF 的基因的 -850 (C $\rightarrow$ T 为在启动子区域转录起始位点上游第 850 位点的碱基 C 被碱基 T 代替了,碱基 C 存在的基因位点较常见,碱基 T 存在的基因位点则比较罕见,这一位点突变造成了限制性内切酶 HincII 识别位点的缺失,使被 T 替代的核苷酸序列不能被 HincII 识别并切断,即出现限制性片段长度多态性,称为 TNF $\alpha$ -850 的基因多态性。TNF $\alpha$  的基因多态性与 Graves 病的相关性的研究国外较多,认为 TNF $\alpha$  的基因多态性与 Graves 病有相关性<sup>[6-8]</sup>,但 TNF-850 的基因多态性与 Graves 病的相关性的未见报道。本研究表明,Graves 病组与对照组对比,TNF $\alpha$ -850 C/T 各基因型频率均无显著性差异( $P$ 均 $>0.05$ ),两组之间等位基因频率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。我们的研究结果显示,TNF $\alpha$ -850C/T 基因突变在 Graves 病组及正常对照组比较差异无统计学意义,提示在中国人中 TNF $\alpha$ -850C/T 基因多态性与 Graves 病无明显相关,虽然本研究没有发现 TNF $\alpha$ -850C/T

单核苷酸多态性与 Graves 病组的相关性,但由于葡萄膜炎是一种多基因遗传病,许多基因也可能与葡萄膜炎易感性有关,Kato 等<sup>[9]</sup>首次报道了 TNF $\alpha$  基因-850C/T 突变,并指出与 HLA-DR 基因不存在连锁不平衡现象。有研究证明,TNF $\alpha$ -850 这个 SNPs 位点影响与其相邻的两个 SNPs 位点即 TNF $\alpha$ -857 和 TNF $\alpha$ -863 的转录活性<sup>[9]</sup>。提示我们在研究基因突变对疾病发病的影响时,不应局限于单基因的分析,还应重视 TNF $\alpha$ -850 C/T 基因型与 TNF $\alpha$  其他位点的相互作用。

#### 参考文献:

- [1] Chopra IJ, Sakane S, Teco GNC. A study of the serum concentration of TNF $\alpha$  in thyroidal and nonthyroidal illnesses [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 72: 113.
- [2] Kallmann BA. Systemic bias of cytokines production toward cell mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves disease [J]. Diabetes, 1999, 46: 27-237.
- [3] Siddiqi A, Monson J P, Wood DF et al. Serum cytokines in thyrotoxicosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 84(2): 435.
- [4] Wenisch C, Myskiw, Gessl A et al. Circulating selections, intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 in hyperthyroidism [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 80(7): 2122.
- [5] Celik. Serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in hyperthyroid patients before and after propylthiouracil treatment [J]. Eur J Endocrinol, 2001, 132: 668.
- [6] Kula D, Jurecka B, Gubah E. Association of polymorphism of LT alpha and TNF genes with Graves' disease [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2001, 39(2): 77-78.
- [7] Kamizono S, Himhntsu Y, Seka N et al. A polymorphism of the 5' flanking region of tumor necrosis factor gene is associated with thyroid-related ophthalmopathy in Japanese [J]. Clin Endocrinol, 2000, 52(6): 759-764.
- [8] 吕兆琴, 孙斌. 肿瘤坏死因子基因多态性与 Graves 眼病的相关性研究 [J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(7): 634.
- [9] Kato T, Honda M, Kuwata S et al. Novel polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene: no association with narcolepsy [J]. Am J Med Genet, 1999, 88: 301-304.

收稿日期 2011-09-25 编辑 谢永慧