

# 安徽汉族人群 *PDCD1* 基因单核苷酸多态性与系统性红斑狼疮易感性分析

叶冬青 尹婧 李向培 张国庆 张永青 王茜 刘慧慧

**【摘要】** 目的 探讨程序性细胞死亡基因(*PDCD1*)单核苷酸多态性(SNP)对安徽籍汉族人群系统性红斑狼疮(SLE)患者易感性的影响。方法 利用病例对照研究方法,收集 122 例 SLE 确诊患者和 143 名正常对照的血标本,用酚-氯仿-蛋白酶 K 提取法提取基因组 DNA,用 DNA 单向测序法进行 SNP 因子检测和筛查。结果 *PDCD1* 基因 7809 位点的基因型全部为 G/G 型,*PDCD1* 基因 7872 位点存在 C 和 T 2 种多态性,*PDCD1* 基因 8162 位点存在 G 和 A 2 种多态性,在两组中分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.55, \chi^2 = 11.85, P < 0.05$ )。*PDCD1* 基因 7872 位点,病例组 C/C、C/T、T/T 基因型频率分别为 36.1%、41.8%、22.1%,对照组分别为 51.7%、35.0%、13.3%,两组间基因型分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.411, P < 0.05$ );*PDCD1* 基因 8162 位点病例组 G/G、G/A、A/A 基因型频率分别为 50.1%、20.3%、28.6%,对照组分别为 57.6%、20.8%、22.6%,两组间等位基因型分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.547, P < 0.05$ )。*PDCD1*-7872 杂合型、*PDCD1*-8162 杂合型可能具有阻止汉族人发生 SLE 的作用( $OR = 0.583, OR = 0.485$ )。结论 安徽籍汉族人群 *PDCD1* 基因 7809 位点不呈现 SNP,7872 和 8162 位点 SNP 与 SLE 的易感性相关。

**【关键词】** 系统性红斑狼疮;程序性细胞死亡基因;单核苷酸多态性

**The analysis on single nucleotide polymorphism of *PDCD1* and systemic lupus erythematosus susceptibility among Han indigenous in Chinese population** YE Dong-qing\*, YIN Jing, LI Xiang-pei, ZHANG Guo-qing, ZHANG Yong-qing, WANG Qian, LIU Hui-hui. \*Department of Epidemiology & Biostatistics, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

**【Abstract】** **Objective** To explore the frequencies and polymorphic distribution of intron 4 of programmed cell death 1 (*PDCD1*) gene, and to analyze its relation to the susceptibility of developing systemic lupus erythematosus (SLE) in indigenous Han Chinese from Anhui province. **Methods** Blood samples from 122 patients with confirmed SLE and 143 controls were collected for a case-control study. DNA of the subjects was extracted and amplified by polymerase chain reaction (PCR). The single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *PDCD1* 7809 locus, 7872 locus and 8162 locus were further confirmed by direct DNA sequencing and BLAST. **Results** The *PDCD1* 7809 locus was identified as type G/G among all the subjects investigated. There were significant difference at *PDCD1* 7872 locus with C/T polymorphism and 8162 locus with G/A polymorphism between SLE patients and controls ( $\chi^2 = 8.55, \chi^2 = 11.85, P < 0.05$ ). The frequencies of genotype for 7872 locus with types of C/C, C/T and T/T in SLE patients were 36.1%, 41.8% and 22.1%, while in control they were 51.7%, 35.0% and 13.3%, respectively. There was significant difference in the frequency of mutation in 7872 locus between SLE patients and controls ( $\chi^2 = 7.411, P < 0.05$ ). The genotype frequencies of *PDCD1* 8162 locus G/G, G/A and A/A in SLE patients were 50.1%, 20.3% and 28.6%, while in control they were 57.6%, 20.8% and 22.6%, respectively. There was significant difference in the frequency of mutation in 8162 locus alleles between SLE patients and controls ( $\chi^2 = 7.547, P < 0.05$ ). The genotype of *PDCD1*-7809 (C/T) and *PDCD1*-8162 (G/A) seemed to have the function of preventing the development of SLE ( $OR = 0.583, OR = 0.485$ ). **Conclusion** The genotype of *PDCD1* gene 7809 locus was G/G in all indigenous Han Chinese, while the SNPs of *PDCD1* gene 7872 locus and 8162 locus might affect the susceptibility to SLE development.

**【Key words】** Systemic lupus erythematosus; Programmed cell death 1 gene; Single nucleotide polymorphisms

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371247);安徽省教育厅重点科研基金资助项目(2002kj175ZD)

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(叶冬青、尹婧、张国庆、张永青、王茜、刘慧慧);安徽省立医院风湿科(李向培)

研究发现,程序性细胞死亡基因(*PDCD1*)是系统性红斑狼疮(SLE)一个强候选基因,*PDCD1*基因缺失小鼠出现类似SLE的症状<sup>[1,2]</sup>。目前已经发现该基因共有9个单核苷酸多态性(SNP)位点,其中有3个位于*PDCD1*基因的第4个内含子中,与欧洲和墨西哥人SLE的发病有关。转录因子调控*PDCD1*的转录,酪氨酸抑制基序与抑制自身反应细胞的自身耐受有关。*PDCD1*基因缺失将导致自身耐受丧失,使淋巴细胞长期处于超敏感状态<sup>[2]</sup>。本次研究通过对安徽籍汉族人群SLE患者和正常对照的DNA进行测定,检测*PDCD1*基因3个SNP位点在汉族人群中的分布情况并探讨其与SLE的相关性。

### 对象与方法

1. 研究对象:病例组为安徽省立医院风湿科2002年1月至2003年12月门诊和住院的SLE患者,共122例,其中女性120例,男性2例,平均年龄 $34.66 \pm 11.52$ 岁。SLE诊断标准采用美国风湿病学会1982年制订的SLE诊断标准<sup>[3]</sup>,符合其中4条者可确诊。并从安徽省合肥、巢湖、六安等地区的城市和农村社区人群中选择无血缘关系的143名正常人作为对照,其中女性137人,男性6人,平均年龄 $34.68 \pm 7.80$ 岁。两组在性别和年龄构成之间差异均无统计学意义( $P=0.294, P=0.992$ )。

2. 主要试剂及仪器:琼脂糖购自Sigma公司,聚合酶链反应(PCR)扩增试剂为Promega和TaKaRa公司产品,使用高保真酶。体外DNA扩增采用Biometra Tgradient 96 梯度PCR仪和T-1 PCR扩增仪。

#### 3. 方法:

(1)基因组DNA的提取:采用标准的酚-氯仿-蛋白酶K提取法,提取受试对象白细胞中的基因组DNA,溶于40  $\mu$ l TE液中,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存,使用前用去离子水稀释至10 ng/ $\mu$ l。

(2)目的基因的PCR扩增:自行设计引物/扩增*PDCD1*基因的第4内含子,自行设计引物,正链:5'-GGGCAGAGGTGGAAGGACA-3',反链:3'-GAAATCCAGCTCCCCATAGTCC-5'。扩增片段长度为658 bp。25  $\mu$ l反应体系包括:10 mmol/L dNTPs 0.5  $\mu$ l, 5 mmol/L引物各2  $\mu$ l, 10 $\times$  buffer 2.5  $\mu$ l,模板DNA 2  $\mu$ l, Taq(5 U/ $\mu$ l)0.3  $\mu$ l,去离子水15.7  $\mu$ l。进行94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min;然后94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58.5 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$  延伸

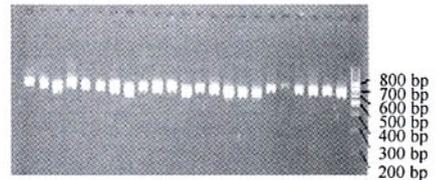
7 min, 16 $^{\circ}\text{C}$  停止。对PCR产物进行2%琼脂糖80 V电压电泳30 min。由上海联合基因公司、上海孟德尔公司、大连宝生物有限公司对PCR产物进行纯化和测序。做BLAST判断3个位点的基因型的分布。

(3)统计学分析:采用Epi Info 6.04录入资料并进行核对,用SPSS 10.0软件进行统计分析,用 $\chi^2$ 检验分析*PDCD1*基因第4内含子SNP与SLE的易感性(当基因频率很低时用Fisher's精确概率检验),OR的估计用Woolf's公式。

(4)质量控制:研究中所有的实验方法均通过预试验摸索最佳反应条件和反应体系,所涉及的试剂均按操作要求严格执行。PCR测序的结果按5%的比例进行复检,要求复检与初检的结果符合率达到100%。

### 结 果

1. PCR产物电泳条带:PCR体外扩增产物在UVI Pro凝胶成像系统下观察,其条带均介于需要扩增的片段范围内,故可以判断PCR产物为*PDCD1*基因的目的片段(图1)。



注:右边第1条泳道为Marker;其余泳道均为PCR产物

图1 *PDCD1*基因第4内含子包含3个SNP位点的PCR扩增产物电泳图(658 bp)

2. *PDCD1*基因第4内含子测序结果:通过DNA测序和BLAST同源性检测,发现在安徽籍汉族人中*PDCD1*基因第4内含子存在2个SNPs位点,分别在7872位点(C/T)和8162位点(G/A),而*PDCD1*基因7809位点的基因型全部为G/G型,不呈现SNP位点。

3. 病例组与对照组*PDCD1*基因7872和8162位点的SNP分布:通过DNA测序,发现*PDCD1*基因在7872位点存在C和T 2种SNP,在病例组与对照组中分布差异有统计学意义( $\chi^2=8.55, P<0.05$ )。*PDCD1*基因在8162位点存在G和A 2种SNP多态性,在病例组与对照组中分布差异有统计学意义( $\chi^2=11.85, P<0.05$ )(表1)。

表1 PDCD1 基因 7872、8162 位点 SNP 多态性在两组间的分布

PDCD1 基因位点	多态性	病例组 (n = 122)	对照组 (n = 143)	OR 值(95% CI)	χ <sup>2</sup> 值	P 值
7872	C	139(0.57)	198(0.69)	0.59(0.41~0.85)	8.55	0.0030
	T	105(0.43)	88(0.31)			
8162	G	128(0.52)	192(0.67)	0.54(0.37~0.78)	11.85	0.0005
	A	116(0.48)	94(0.33)			

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分比(%)

4. 病例组与对照组基因型频率分布:测序发现 PDCD1 基因 7872 位点存在 C/C、C/T、T/T 3 种基因型,在病例组与对照组中分布差异有统计学意义(χ<sup>2</sup> = 7.411, P < 0.05)(表 2)。PDCD1 基因 8162 位点存在 G/G、G/A、A/A 3 种基因型,在两组间分布差异有统计学意义(χ<sup>2</sup> = 7.547, P < 0.05)(表 3)。

表2 病例组 (n = 122) 与对照组 (n = 143) PDCD1 基因 7872 位点基因型的分布

组别	基因型			χ <sup>2</sup> 值	P 值
	C/C	C/T	T/T		
病例	44(0.36)	51(0.42)	27(0.22)	7.411	0.025
对照	74(0.52)	50(0.35)	19(0.13)		

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分比(%)

表3 病例组 (n = 122) 与对照组 (n = 143) PDCD1 基因 8162 位点基因型的分布

组别	基因型			χ <sup>2</sup> 值	P 值
	G/G	G/A	A/A		
病例	52(0.50)	24(0.20)	46(0.30)	7.547	0.023
对照	82(0.58)	28(0.21)	33(0.23)		

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分比

5. PDCD1 基因 7872、8162 位点基因单体型对 SLE 易感性的影响:病例组 CCGG 基因单体型频率低于对照组(OR = 0.41, P = 0.000),校正后差异有统计学意义(Pc < 0.05)。病例组 CCAA 基因单体型频率高于对照组(OR = 2.59, P = 0.001),校正后差异有统计学意义(Pc < 0.05)。病例组 CTAA 基因单体型频率低于对照组(OR = 2.43, P = 0.015),

但校正后差异无统计学意义(Pc > 0.05)。病例组 TTGG 基因单体型频率高于对照组(OR = 5.31, P = 0.005),校正后差异有统计学意义(Pc < 0.05)。其余基因单体型之间差异无统计学意义(P > 0.05)(表 4)。

6. 转录因子结合位点的鉴定:用 TFSEARCH 数据库(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)来推断 PDCD1 基因 7809、7872、8162 位点 SNP 多态性可能影响转录因子的结合情况。结果发现 PDCD1 基因的 7809、7872、8162 位点 SNP 多态性可能影响转录因子 AML-1a、USF、E47、EGR-1、GATA-1、MZF-1 等的结合(图 2)。

```

CCACCTGCG/ag TCTCCGGGG TGCCCGGCC ATGTGTGTC CTGCCTGCGG
USF AML-1a AML-1a
TCTCCAGGG TGCCGGGCC Ac/tGCGTGTGC CCGCTGCGG TCTCTGGGG
AML-1a
... AGGGGTGGT GCCCAGATC ACACAGAGGG CAGTGGTGG ACAGCTCAGG
MZF1 AML-1a
GTAAGCAGCT Cg/tTAGTGGGG GGGCCAGGTT CGGTGCCGT ACTGCAGCCA
MZF1
    
```

图2 PDCD1 基因 7809、7872、8162 位点 SNP 多态性可能对转录因子结合的影响

讨 论

目前人们对内含子功能的研究尚处于起步阶段,内含子还可能提供有关生命起源进化的大量信息。内含子具有调控基因表达和基因转录的功能,

表4 PDCD1 基因 7872、8162 位点基因单体型对 SLE 易感性的影响

7872 位点	8162 位点	病例组 (n = 122)	对照组 (n = 143)	合计 (n = 265)	OR 值	χ <sup>2</sup> 值	P 值
C/C	G/G	28(64.0)	63(85.0)	91(77.0)	0.41	11.24	0.000
C/C	G/A	6(14.0)	6(8.0)	12(10.0)	1.23	0.13	0.723
C/C	A/A	10(23.0)	5(7.0)	15(13.0)	2.59	3.05	0.001
C/T	G/G	12(24.0)	16(15.0)	28(27.0)	0.91	0.06	0.808
C/T	G/A	16(31.0)	21(5.0)	37(37.0)	0.92	0.05	0.815
C/T	A/A	23(45.0)	13(80.0)	36(36.0)	2.43	5.97	0.015
T/T	G/G	12(44.0)	3(32.0)	15(33.0)	5.31	7.85	0.005
T/T	G/A	2(8.0)	1(42.0)	3(7.0)	2.47	-	0.590
T/T	A/A	13(48.0)	15(26.0)	28(60.0)	1.05	0.03	0.874

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分比(%)

起着转录增强子或抑制子的作用。Prokunina 等<sup>[1]</sup>的研究发现, *PDCD1* 基因内含子 7809 位点 SNP 在日耳曼人、瑞典人、欧洲裔美国人和墨西哥人中分布存在差异。用 TFSEARCH 数据库来推断 *PDCD1* 基因 7809 位点可能影响转录因子的结合情况, 7809 位点位于 *PDCD1* 内含子 4 的类增强子结构内, 7809 位点的 SNP 改变了 runt 相关的转录因子 (AML1) 与内含子增强区的结合位点, 使 *PDCD1* 异常调控, 导致自身耐受失调, 慢性淋巴细胞超活化等 SLE 样的反应, 与 SLE 的发生密切相关。

*PDCD1* 基因及其编码产物 PD-1 在 SLE 的发病过程中起到十分重要的作用。编码产物 PD-1 分子是免疫球蛋白超家族的成员之一, 是一个抑制性受体, 通过其胞浆区的 2 个酪氨酸残基与下游的信号分子作用而发挥对免疫应答的负性调控功能。PD-1 缺陷鼠可能发生血管球性肾炎和/或风湿性疾病和肥厚性心肌病。PD-1 和 Fas 在狼疮样自身免疫性疾病的发生过程中具有协同作用。自身反应性 TCR(2C-TCR) 转基因鼠在剔除 PD-1 基因后可自发发生移植物抗宿主样疾病, 部分小鼠出生后 10 周内死亡。其余则表现为体重减轻, 脾肿大和不同程度的皮肤损害。病变鼠的心脏、肺及肾脏可发生系统性炎症细胞浸润, PD-1 基因缺陷是发生移植物抗宿主样疾病的重要原因, PD-1 在防止 BALB/c 鼠发生自身免疫性扩张性心肌病方面发挥了重要作用<sup>[4,5]</sup>。

本研究发现安徽籍汉族人群 *PDCD1* 基因 7809 位点不呈现 SNP, 与 Prokunina 等<sup>[1]</sup> 研究结果不一致。7809 位点多态性分布差异可能是各人群间遗传异质性所致, 提示此基因型与中国人 SLE 的发病可能不相关, 但由于 7809-C 型等位基因在所研究人群中分布频率较低 (3%~25%), 所以, 关于安徽籍汉族人群是否存在 7809-C 型等位基因还有待于进一步扩大样本量进行研究。

本研究对 *PDCD1* 基因 7872 和 8162 位点 SNP 在安徽籍汉族人群中的分布情况调查发现, 7872 和 8162 位点 SNP 在 SLE 患者和正常对照组中的分布情况存在差异, 7872-C 型和 8162-G 型等位基因在 SLE 患者和对照组中的分布频率均高于 7872-T 型和 8162-A 型等位基因。 *PDCD1*-7872 和 *PDCD1*-8162 杂合型可能具有抑制汉族人发生 SLE 的作用 (OR = 0.583, OR = 0.485)。 *PDCD1* 基因 7872 和 8162 位点 SNP 可能对转录因子 AML-1a、E47、

EGR-1、GATA-1、MZF-1 等的结合起调控作用, AML-1a 可以作为负调节因子, 与急性淋巴瘤的发病有关, 可改变 32Dcl3 鼠骨髓细胞对末端粒细胞分化和细胞增殖中粒细胞克隆刺激因子的应答。转录因子 AML-1a 的结合位点被 *PDCD1* 基因 7809 位点 SNP 破坏, 使 *PDCD1* 基因异常调控, 导致自身耐受失调, 慢性淋巴细胞超活化等 SLE 样的反应<sup>[1]</sup>。USF 是一种转录活化剂, 可能在染色体组合过程中对稳定的起始前复合物的形成有指导作用<sup>[6]</sup>。E47 是 MEF-1 复合物的一部分, 诱导 MyoD 超磷酸化和诱导 IgH 转录, 也具有 IgH 刺激性<sup>[7]</sup>。EGR-1 在有丝分裂刺激后会短暂表达, 在 HTLV-I 或 HTLV-II 感染后呈构成性表达<sup>[8]</sup>。MZF-1 对视黄酸应答, 可能与造血过程有关<sup>[9]</sup>。目前尚不能确定 7872 和 8162 位点 SNP 对 *PDCD1* 基因的转录效率和表达的影响, 进一步进行细胞培养和蛋白质功能方面的相关研究, 有助于分析内含子的 SNP 对 *PDCD1* 基因的转录效率和 PD-1 表达的影响。

#### 参 考 文 献

- 1 Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, et al. A regulatory polymorphism in *PDCD1* is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet*, 2002, 32: 666-669.
- 2 Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, et al. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q. *J Autoimmun*, 2000, 14: 169-178.
- 3 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum*, 1982, 25: 1271.
- 4 Bolstad AI, Eiken HG, Rosenlund B, et al. Increased Salivary Gland Tissue Expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in Primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2003, 48: 174-185.
- 5 Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, 2001, 291: 319.
- 6 Zwartkruis F, Hoeymakers T, Deschamps J, et al. Characterization of the murine Hox-2.3 promoter: involvement of the transcription factor USF (MLTF). *Mech Dev*, 1991, 33: 179-190.
- 7 Schlissel M, Voronova A, Baltimore D. Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes*, 1991, 5: 1367-1376.
- 8 Wright JJ, Gunter KC, Mitsuya H, et al. Expression of a zinc finger gene in HTLV-I and HTLV-II-transformed cells. *Science*, 1990, 248: 588-591.
- 9 Morris JF, Hromas R, Rauscher III FJ. Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 1786-1795.

(收稿日期: 2004-10-14)

(本文编辑: 尹廉)