

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2013.04.0205

·论著·

## 系统性红斑狼疮患者信号转导及转录激活因子4基因单核苷酸多态性与其mRNA表达水平的相关性研究

李博<sup>1</sup>,胡秋侠<sup>2</sup>,钟贵芳<sup>3</sup>,何伟珍<sup>1</sup>,孔卫红<sup>1</sup>,陈雅硕<sup>1</sup>,谢燕<sup>1</sup>,陈新鹏<sup>1</sup>,戴莉萍<sup>1</sup>,黄进贤<sup>1</sup>,叶志中<sup>1</sup>

(1.深圳市第四人民医院香蜜湖风湿病分院风湿科,广东深圳518040;

2.深圳市福田区第二人民医院门诊,广东深圳518040;

3.深圳市第四人民医院急诊科,广东深圳518040)

**【摘要】目的** 探讨系统性红斑狼疮中信号转导和转录激活因子4(STAT4)基因rs7574865位点单核苷酸多态性(SNP)与其mRNA表达水平之间的相关性。**方法** 以TaqMan MGB探针法在163例SLE患者中对STAT4基因rs7574865位点的SNP进行分型,用TaqMan实时荧光定量聚合酶链反应法检测以上患者外周血单个核细胞(PBMC)中STAT4 mRNA表达水平,并分析两者之间的关系。**结果** SLE患者中G等位基因频率为49.7%,T等位基因频率为50.3%,G/G型纯合子患者的比例为22.7%,G/T型杂合子患者的比例为65.0%,T/T型纯合子患者的比例为12.3%。具有G/T型的SLE患者的STAT4 mRNA表达水平显著高于具有G/G型或T/T型的SLE患者( $P<0.05$ )。**结论** STAT4 rs7574865位点SNP与STAT4 mRNA表达水平具有相关性,具有G/T型的SLE患者的STAT4 mRNA表达水平显著增高。

**【关键词】** 信号转导和转录激活因子4;单核苷酸多态性;系统性红斑狼疮**【中图分类号】** R593.24<sup>1</sup>   **【文献标识码】** A   **【文章编号】** 1003—6350(2013)04—0471—03

基金项目:深圳市医学重点学科建设经费资助(编号:2005C10);深圳市科技计划项目(医疗卫生类)资助(编号:201002145)

通讯作者:李博。E-mail:genefan@163.com

低空腹及餐后血糖水平,二者比较差异无统计学意义。二者联合应用于糖尿病兔时,也可有效降低空腹及餐后血糖水平,但三组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示FGF-21具有调节血糖作用,其效果与胰岛素相当,FGF-21和胰岛素无协同降低血糖作用。我们的研究也发现,不同剂量FGF-21均可有效降低空腹及餐后血糖,中大剂量可较好降低血糖,而无低血糖反应出现,提示FGF-21不会出现类胰岛素低血糖反应。

脂毒性与糖尿病大血管病变的发生发展密切相关,有效调节脂代谢平衡、改善胰岛素抵抗可降低糖尿病微血管和大血管并发症的发生率。我们的研究发现,FGF-21可降低血浆总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇水平,增加高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。而胰岛素组也可有效调节血脂作用,提示FGF-21具有类胰岛素作用及调节脂类代谢作用<sup>[8]</sup>。我们的研究也发现,D组较B、C组可更有效地降低TC及LDL-C,升高HDL-C,提示FGF21和胰岛素可协同调节脂类的代谢,

综上所述,FGF-21在糖脂代谢的调节方面发挥重要作用,对防治糖尿病的大血管病变有重要意义。

### 参考文献

[1] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al.  $\beta$ -Cell deficit and in-

creased  $\beta$ -Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2003, 52(1): 102-110.

- [2] Lamarche B, Tchernot A, Moorjani S, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men: Prospective results from the Quebec cardiovascular study [J]. Circulation, 1997, 95(1): 69-75.
- [3] Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21 [J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774-781.
- [4] 高玲,陈琴,康丽娜,等.糖尿病和非糖尿病动脉粥样硬化兔模型的建立[J].中国实验动物学报,2007,15(3):279-281.
- [5] Rekhter MD. How to evaluate plaque vulnerability in animalmodels of atherosclerosis? [J]. Cardiovasc Res, 2002, 54: 36-41.
- [6] Olsen SH, Garbi M, Zampier N, et al. Fibroblast growth factor(FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGIFs [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 34226-34236.
- [7] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1492: 203-206.
- [8] Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21 [J]. Endocrinology, 2007, 148: 774-781.

(收稿日期:2012-09-13)

**Correlation of STAT4 gene single nucleotide polymorphism with mRNA level in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus.** LI Bo<sup>1</sup>, HU Qiu-xia<sup>2</sup>, ZHONG Gui-fang<sup>3</sup>, HE Wei-zhen<sup>1</sup>, KONG Wei-hong<sup>1</sup>, CHEN Ya-shuo<sup>1</sup>, XIE Yan<sup>1</sup>, CHEN Xin-peng<sup>1</sup>, DAI Li-ping<sup>1</sup>, HUANG Jin-xian<sup>1</sup>, YE Zhi-zhong<sup>1</sup>. 1. Department of Rheumatology, Xiangmihu Branch of Shenzhen Fourth People's Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong, CHINA; 2. Department of Outpatient, Shenzhen Futian Second People's Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong, CHINA; 3. Department of Emergency, Shenzhen Fourth People's Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong, CHINA

**[Abstract]** **Objective** To explore the impact of signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) on mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** Peripheral blood samples from SLE ( $n=163$ ) were used to detect STAT4 SNPs at locus rs7574865 by TaqMan MGB and to evaluate mRNA level of STAT4 in PBMC by TaqMan real-time RT-PCR. **Results** The prevalence rates of G allele and T allele were 49.7% and 50.3% respectively. The prevalence rates of G/G, G/T, T/T genotype were 22.7%, 65.0% and 12.3%, respectively. The mRNA level of STAT4 in PBMC was significantly higher in patients with G/T genotype than patients with G/G or T/T genotype ( $P<0.05$ ). **Conclusion** This study identified a strong association of STAT4 SNPs at locus rs7574865 with mRNA level in PBMC. Patients with G/T genotype showed higher STAT4 mRNA expression.

**[Key words]** Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4); Single nucleotide polymorphism; Systemic lupus erythematosus

系统性红斑狼疮(SLE)是一种常见的自身免疫性疾病,临床表现十分复杂,患者最显著的特征之一是血清中存在以抗核抗体(ANA)为代表的多种自身抗体。众多研究结果显示信号转导和转录激活因子4(STAT4)的基因单核苷酸多态性(SNP)在欧洲、北美、日本及非洲等多个种族SLE患者中均与SLE的发病相关<sup>[1-6]</sup>。但有关STAT4 SNP分型与其表达水平之间关系的研究国内尚未见报道。本研究旨在探讨中国广东省SLE患者中STAT4基因SNP与其mRNA表达水平之间的相关性。

## 1 资料与方法

1.1 病例选择 所有入选的163例(女149例,男14例)SLE患者均来自本院风湿科2006年9月至2012年5月间的门诊及住院患者,所有患者均符合美国风湿病学会(ACR)1997年修订的SLE分类标准。入选患者的年龄最小19岁,最大67岁,年龄中位数为41岁。所有同时合并有多发性肌炎、系统性硬化症、类风湿关节炎及其他弥漫性结缔组织病的患者均被排除。所有同时合并有移植植物抗宿主病、结节病、获得性免疫缺陷综合征及淋巴瘤的患者亦被排除。

## 1.2 方法

1.2.1 STAT4基因rs7574865位点SNP分析 采集EDTA抗凝静脉血5 ml,采用Qiagen公司的全血基因组小量DNA提取试剂盒进行全血DNA的抽提,置于-20℃冰箱保存。采用TaqMan MGB等位基因分型试剂盒(美国ABI公司,ABI: Applied Biosystems Inc)进行检测,引物及探针均购自美国ABI公司的试剂盒,操作完全按照说明进行。PCR反应总体积

为10 μl,含MgCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L,dNTP 0.25 mmol/L,引物0.9 μmol/L,探针0.3 μmol/L,ExTaq酶0.3 U,Rox 0.35 μl,DNA1 μl(15 ng)。扩增条件如下:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火60 s,40个循环。以上反应在9700型实时荧光定量PCR仪上进行。

1.2.2 STAT4 mRNA表达水平的检测 采集以上研究对象EDTA抗凝静脉血12 ml,用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC)。总RNA的抽提采用Trizol试剂,操作完全按照其说明。STAT4 mRNA表达水平的检测采用TaqMan实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应试剂盒(美国ABI公司)。引物及TaqMan探针的序列分别如下:正向引物序列为5'-CTACACATACGCCACCCTGACC-3',反向引物序列为5'-CTGCAGTAACCACCAGCTTCAT-3',TaqMan探针序列为5'-FAM-AGCCCCACTGCTGGCCTCACATA-MARA-3'。反应体系完全按照试剂盒说明。反应条件如下:60℃逆转录30 min,接着95℃10 min以激活Taq酶,然后95℃20 s,55℃30 s,72℃1 min进行35个循环。

1.3 统计学方法 采用SPSS18.0统计软件进行统计分析。具有不同基因型的三组患者的组间计量资料比较采用单因素方差分析,不同组间两两比较采用独立t检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 STAT4基因rs7574865位点等位基因的分布 应用TaqMan探针法检测STAT4基因rs7574865位点等位基因的分布,统计分析后显示SLE患者中G等位基因频率为49.7%,T等位基因频率为50.3%,

G/G型纯合子患者的比例为22.7%, G/T型杂合子患者的比例为65.0%, T/T型纯合子患者的比例为12.3%。对研究群体的各基因型分布,进行Hardy-Weinberg平衡检验,结果符合Hardy-Weinberg平衡( $P=0.98$ )。

**2.2 不同基因型SLE患者间STAT4 mRNA表达水平的比较** 不同基因型SLE患者间STAT4 mRNA表达水平的比较见表1。统计分析后发现具有G/T型的SLE患者的STAT4 mRNA表达水平显著高于具有G/G型或T/T型的SLE患者( $P<0.05$ )。

表1 不同基因型SLE患者中STAT4的mRNA表达水平( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数(%)	mRNA表达水平	F值	t值	P值
G/G型	37(22.7)	1.836±0.417	8.632 <sup>a</sup>		0.002
G/T型	106(65.0)	4.954±0.816		1.693	0.001 <sup>b</sup>
T/T型	20(12.3)	1.741±0.359		1.947	0.000 <sup>c</sup>

注:<sup>a</sup>三组间比较,<sup>b</sup>G/G型与G/T型比较,<sup>c</sup>T/T型与G/T型比较。

### 3 讨论

STAT4主要表达在细胞的胞浆,属于STAT转录因子家族中的一员,可以进入细胞核调节基因的转录与表达。STAT4基因位于人染色体2q32.2-2q32.3,以前的研究结果提示其临近区域2q33与SLE发病连锁<sup>[7]</sup>。Remmers等<sup>[1]</sup>报道发现STAT4基因rs7574865位点的SNP与北美类风湿关节炎及SLE患者的发病相关。Kobayashi等<sup>[2]</sup>在日本患者中、Palomino-Morales等<sup>[3]</sup>在哥伦比亚患者中及Yang等<sup>[4]</sup>在中国香港SLE患者中分别对以上研究结果进行了证实。Namjou等<sup>[5]</sup>后来在不同种族SLE患者中研究发现包括rs7574865位点在内的多个STAT4基因位点的SNP与SLE发病相关。Hellquist等<sup>[6]</sup>在芬兰患者中还报道发现STAT4基因rs7582694位点及rs10181656的SNP和正常人相比存在异常。还有两个不同的研究显示特定的STAT4基因型与SLE的某些临床表现相关,例如抗ds-DNA抗体、抗心磷脂抗体的产生、缺血性股骨头坏死及其他一些较严重的临床表现<sup>[8-9]</sup>。柏素云等<sup>[10]</sup>报道发现STAT4基因rs7574865位点的SNP与山东汉族SLE特定的临床表现相关。以上研究结果提示STAT4基因可能是SLE的易感基因,与SLE的发病相关。

本研究在中国大陆SLE患者中对STAT4基因rs7574865位点SNP及STAT4的mRNA表达水平进行了研究,结果发现SLE患者中G等位基因频率为49.7%,T等位基因频率为50.3%,G/G型纯合子患者的比例为22.7%,G/T型杂合子患者的比例为65.0%,T/T型纯合子患者的比例为12.3%。具有G/T型的SLE患者的STAT4 mRNA表达水平显著高于具有G/G型或T/T型的SLE患者。Abelson等<sup>[11]</sup>曾在2009年

报道发现STAT4基因rs3821236位点、rs3024866位点及rs7574865位点的SNP与STAT4 mRNA高表达水平相关。除此之外,未见其他有关STAT4基因多态性与STAT4表达之间关系的研究报道。

综上所述,中国大陆SLE患者中STAT4基因rs7574865位点SNP与STAT4 mRNA表达水平具有相关性,具有G/T型的SLE患者的STAT4 mRNA表达水平显著增高。提示STAT4基因作为SLE的易感基因,增加SLE发病风险的机制可能是基因多态性影响了STAT4的表达,但此结果尚有待进一步的研究证实。

### 参 考 文 献

- 1 Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [J]. N Engl J Med, 2007, 357(10): 977-986.
- 2 Kobayashi S, Ikari K, Kaneko H, et al. Association of STAT4 with-susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Japanese population [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(7): 1940-1946.
- 3 Palomino-Morales RJ, Rojas-Villarraga A, González CI, et al. STAT4 but not TRAF1/C5 variants influence the risk of developing rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Colombians [J]. Genes Immun, 2008, 9(4): 379-382.
- 4 Yang W, Ng P, Zhao M, et al. population differences in SLE susceptibility genes: STAT4 and BLK, but not PXK, are associated with systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese [J]. Genes Immun, 2009, 10(3): 219-226.
- 5 Namjou B, Sestak AL, Armstrong DL, et al. High-density genotyping of STAT4 reveals multiple haplotypic associations with systemic lupus erythematosus in different racial groups [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(4): 1085-1095.
- 6 Hellquist A, Sandling JK, Zucchelli M, et al. Variation in STAT4 is associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in a Finnish family cohort [J]. Ann Rheum Dis, 2009, 27(69): 883-886.
- 7 Cantor RM, Yuan J, Napier S, et al. Systemic lupus erythematosus genome scan: support for linkage at 1q23, 2q33, 16q12-13, and 17q21-23 and novel evidence at 3p24, 10q23-24, 13q32, and 18q22-23 [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50: 3203-3210.
- 8 Sigurdsson S, Nordmark G, Garnier S, et al. A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5 [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(18): 2868-2876.
- 9 Aylor KE, Remmers EF, Lee AT, et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus [J]. PLoS Genet, 2008, 4(5): 1004-1008.
- 10 柏素云, 张立民, 王翠香, 等. STAT4基因单核苷酸多态性与系统性红斑狼疮关系的研究[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(2): 183-185.
- 11 Abelson AK, Delgado-Vega AM, Kozyrev SV, et al. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk [J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(11): 1746-1753.

(收稿日期:2012-07-16)