

STAT4 基因 rs7574865 多态性与中国汉族人群克罗恩病的相关性

庞 智^{1,2*}, 郑连民¹, 尹少朋¹, 皇甫照², 施瑞华³

(¹南京医科大学附属苏州市立医院北区消化内科, 江苏 苏州 215008; ²苏州市消化系疾病与营养研究中心, 江苏 苏州 215008; ³南京医科大学第一附属医院消化内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:分析信号转导及转录激活因子 4(signal transducer and activator of transcription 4, STAT4)基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点 rs7574865 G>T 的多态性与中国汉族人群克罗恩病发生的相关性。方法:选取汉族克罗恩病患者 318 例与健康对照者 318 例作为研究对象,抽提基因组 DNA,采用聚合酶链式反应和直接测序方法检测 STAT4 基因 SNP 位点 rs7574865 的基因型,计算基因型与基因频率,采用 χ^2 检验进行组间比较。结果:STAT4 基因 rs7574865 多态位点 GG、GT 和 TT 基因型频率在病例组中分别为 0.110、0.431 和 0.459,在对照组中分别为 0.097、0.450 和 0.453,G 和 T 等位基因的频率在病例组分别为 0.325 和 0.675,在对照组分别为 0.322 和 0.678,该位点基因型和等位基因分布在病例组与对照组均无统计学差异($P > 0.05$)。结论:STAT4 基因 rs7574865 G>T 位点单核苷酸多态性与中国汉族人群克罗恩病发生无明显相关性。

[关键词] 信号转导及转录激活因子 4; 克罗恩病; 单核苷酸多态性; 汉族人群

[中图分类号] Q754

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-077-05

Association of the STAT4 gene rs7574865 polymorphism in the Chinese Han population with Crohn's disease

PANG Zhi^{1,2*}, ZHEN Lian-ming¹, YIN Shao-peng¹, HUANG Fu-zhao², SHI Rui-hua³

(¹Department of Digestion, Suzhou City Hospital Affiliated to NJMU, Suzhou 215008; ²Research Center of Digestion Disease and Nutrition, Suzhou 215008; ³Department of Digestion, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association of a single nucleotide polymorphism (SNP), rs7574865 G>T, of the signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) with Crohn's disease (CD) in the Chinese Han population. **Methods:** Genomic DNA from 636 individuals of Chinese Han origin including 318 patients with CD and 318 healthy controls was analyzed for the SNP (rs7574865) of the STAT4 gene. SNP rs7574865 G>T was genotyped by polymerase chain reaction and direct sequencing. A Chi-square test was used to determine the association of SNP with CD. **Results:** The frequencies of genotypes GG, TG and TT at SNP rs7574865 G>T were 0.110, 0.431 and 0.459 in CD patients, while 0.097, 0.450 and 0.453 in healthy controls. The frequency of G or T allele was 0.325 or 0.675, respectively in CD patients, while 0.322 or 0.678 in healthy controls. **Conclusion:** These findings indicate that no significant difference is observed between STAT4 polymorphism and Crohn's disease in the Chinese Han population.

[Key words] signal transducer and activator of transcription 4; Crohn's disease; single nucleotide polymorphism; Chinese Han population

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 077-081]

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是慢性非特异性胃肠道炎症性疾病, 主要包括溃疡

性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)^[1-2]。过去欧洲和北美人群中 IBD 发病率较高, 亚洲人群发病率较低, 然而近 20 年来 IBD 在亚洲人群中的发病呈现明显增高趋势。IBD 的病因和发病机制尚未完全明确, 目前认为 IBD 的发病是由环境、遗传、感染和免疫等多种因素相互作用

[基金项目] 江苏省医学重点学科开放课题资助项目 (KF200936-6)

*通讯作者, E-mail: pangzhi0273@sina.com

所致。同卵双生子共患病率高,IBD 的家族聚集现象和 IBD 发病的种族差异性提示遗传因素是 IBD 发病过程中的一个重要因素。全基因组关联研究与传统方法相结合用以探索基因变异与发病风险的关系已使人们对于 IBD 的发生发展的认识有了很大提高。自从 2001 年 Hugot 等^[3]确定第 1 个 CD 易感基因 CARD15/NOD2 以来,已相继发现了多个与 IBD 发病相关的易感基因和易感单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点,有关基因型与临床表型的关系也有报道。可以明确的是 IBD 是一种复杂的多基因疾病,其易感性涉及多个基因位点,且有着显著的种族差异性。迄今为止还没有找到与我国乃至亚洲 IBD 人群明显相关的基因和 SNP 位点,因此有必要在亚洲人群中展开大规模的易感基因及易感突变位点的筛查。

信号转导和转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 家族是近年来发现的一类转录因子,STAT4 位于染色体 2q32.2~2q32.3,是 T 细胞、NK 细胞、树突状细胞和巨噬细胞等免疫调控细胞内 IL-12/STAT4/IFN- γ 信号转导途径的关键组成元件,是 IL-12 诱导免疫调控细胞产生 IFN- γ 的关键调控因子,介导 IL-12 的免疫反应与调节 T 细胞的分化。最近的研究揭示 STAT4 基因的突变与系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 和类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 明显相关,表明多种自身免疫性疾病具有共同的易感基因^[4-7],进一步的研究指出,STAT4 基因存在多种单核苷酸多态性,其中 SNP rs7574865 位点是 SLE、RA、白塞氏病 (Behcet's disease, BD) 等自身免疫性疾病共同的易感基因位点^[7-8]。为在汉族人群中研究 STAT4 基因与 CD 发生的可能相互作用,本研究在国内首次对 STAT4 基因单核苷酸多态位点 rs7574865 与中国汉族人群 CD 的相关性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2007 年 1 月~2011 年 9 月在南京医科大学附属苏州市立医院消化科门诊就诊或住院的临床诊断资料完整、彼此无血缘关系的 CD 患者 318 例 (诊断标准依据中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组制定的《中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》)^[9],其中男 154 例,女 164 例,平均年龄 (37.16 \pm 11.36) 岁;所有患者均除外合并其他自身

免疫性疾病,近 1 个月未使用糖皮质激素治疗,近 3 个月未使用过免疫抑制剂,无近期明确感染病史,无严重心、肺和神经、精神疾病,并除外糖尿病及其他内分泌疾病患者,肝、肾功能损害者。服用避孕药的女性育龄患者以及创伤者等。健康对照组 318 例,均为门诊体检健康者,其中男 156 例,女 162 例,平均年龄 (36.68 \pm 12.28) 岁;两组间年龄和性别没有显著性差异 (P 均 $>$ 0.05)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

采集 EDTA 抗凝静脉血 2 ml,按 DNA 抽提试剂盒 (SK1342,上海生工生物工程公司) 操作步骤提取白细胞基因组 DNA,溶解于 TE 缓冲液,定量后 -20°C 保存。

1.2.2 STAT4 基因 rs7574865 G>T 位点多态性分析

按照 GenBank 中提供的基因组序列 (NC_000002.10) 自行设计 1 对引物:上游:5'-TACGGAT-GTCTTTGAAGGTAGTG-3';下游:5'-GTAAATGTCA-GCAGTCATCAGAGA-3',扩增包括 rs7574865 G>T 位点在内的片段,PCR 产物全长 449 bp。

PCR 扩增反应体系 20 μl ,内含基因组 DNA 200 ng, dNTP 各 200 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 21.5 mmol/L, 5 \times PCR 缓冲液 4 μl , *Taq* 酶 2 U,上、下游引物各 10 pmol,灭菌三蒸水补至 20 μl 。PCR 扩增反应条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,36 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 6 min。以上反应在 PE480 基因扩增仪进行。

1.2.3 PCR 产物胶回收及测序

按 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (SK1131,上海生工生物工程公司) 操作步骤回收 PCR 产物,回收后的 PCR 产物至上海生工生物工程技术服务公司测序。

1.2.4 基因频率与基因型频率的计算

运用哈迪-温伯格定律 (genetic equilibrium law), 设定 A%、a% 分别表示基因 A 和 a 的频率, AA、Aa、aa 分别表示 AA、Aa、aa 3 种基因型频率 (个数)。根据遗传平衡定律,则有: $A\% = (2 \times AA + Aa) / [2 \times (AA + Aa + aa)] \times 100\%$; $a\% = (2 \times aa + Aa) / [2 \times (AA + Aa + aa)] \times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 15.0,根据所测位点各基因型的分布计算基因型和等位基因频率,并行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,组间基因型和等位基因频率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料特点的比较

CD 组和健康对照组的性别构成比、年龄差异无统计学意义(P 均 > 0.05 ,表 1)。

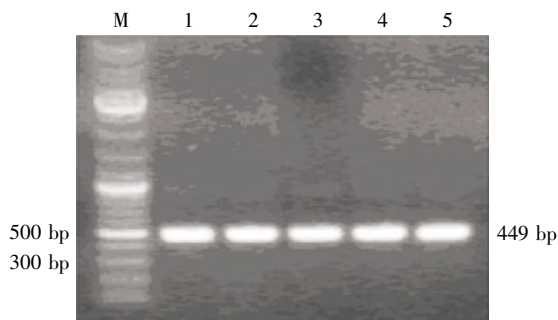
2.2 STAT4 SNP rs7574865 PCR 基因扩增片段的电泳结果

STAT4 SNP rs7574865 PCR 基因扩增的目的片段为 449 bp(图 1)。

表 1 克罗恩病组和健康对照组的一般临床资料比较

Table 1 The clinical characteristics of patients with CD and healthy controls

	CD 组	健康对照组	P 值
例数(n)	318	318	$P > 0.05$
性别(男)	154	156	$P > 0.05$
年龄(岁)	37.16 ± 11.36	36.68 ± 12.28	
疾病活动指数(CDAI)	191.22 ± 78.62		
病史(年)	9.29 ± 5.22		
疾病分类(维也纳分类, n) ^[10]			
A1/A2	244/106		
L1/L2/L3/L4	92/120/236/72		
B1/B2/B3	318/135/68		



M:DNA Marker;1-5:样本的扩增结果。

图 1 STAT4 SNP rs7574865 PCR 基因扩增片段的电泳图

Figure 1 The PCR results of STAT4 SNP rs7574865

2.3 CD 患者 STAT4 SNP rs7574865 基因 PCR 产物的测序图

PCR 产物测序结果见图 2, 测序结果都为单峰的是纯合基因型,rs7574865 基因位点(箭头标注)野生型为 G,可发生 SNP 突变为 T。G/G 型为灰色单峰(图 2A),G/T 型为灰色和红色重叠的套峰(图 2B),T/T 型为红色单峰(图 2C)。CD 组和健康对照组中 3 种基因型频率统计见表 2。

2.4 STAT4 基因 SNP rs7574865 位点的基因型、等位基因频率分析

根据测序结果判断并记录个体的基因型(表 2), χ^2 检验病例组与对照组在该位点基因型及等位基因频率分布,均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律($P > 0.05$)。该位点的基因型以及等位基因频率在病例组与对照组间无统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来许多临床和动物实验研究均表明,遗传因素与 CD 的发生密切相关。目前 CD 易感基因的研究受到重视,自 2001 年发现第一个明确的 CD 易感基因 NOD2/CARD15 之后^[11-13],国外文献又报道发现 IL23R、ATG16L1、IRGM、NKX2-3、PTPN2 和 STAT4 基因多态性与 CD 均有相关^[14-17],由此可见 CD 是复杂的多基因共同作用的疾病。单基因病与多基因病不同在于,前者是通过改变蛋白质编码区导致病变,后者是由一些分布在基因表达调控区域(比如启动子区域)的突变所致,这些小效应突变可以改变基因的表达水平而影响基因的功能,STAT4 基因突变可能会改变其转录水平而影响 Th1 与 Th2 细胞的分化平衡,从而在 CD 的发生中发挥作用。该基因多态位点是否与 CD 相关,以及相关位点在 CD 发生的具体作用需明确。

业已明确,CD 是一种免疫失衡性疾病,Th1 型免疫增强伴随 Th2 型免疫减弱,故 Th1 型细胞因子的分泌,会诱导各种病理变化,从而诱导 CD 的发生,调节 Th1 与 Th2 细胞的分化平衡对 CD 的预防与治疗有积极的意义。由于二者分化相互拮抗,抑制其中一种类型细胞因子的产生可以减弱同种类型的分化,从而影响 Th1 与 Th2 细胞的分化平衡,例如,当 IL-4 受抑制时,Th1 细胞的分化将占优势。Th1 与 Th2 细胞的分化受多种因素制约,包括抗原递呈部位、免疫原物理形式、佐剂类型、抗原种类、

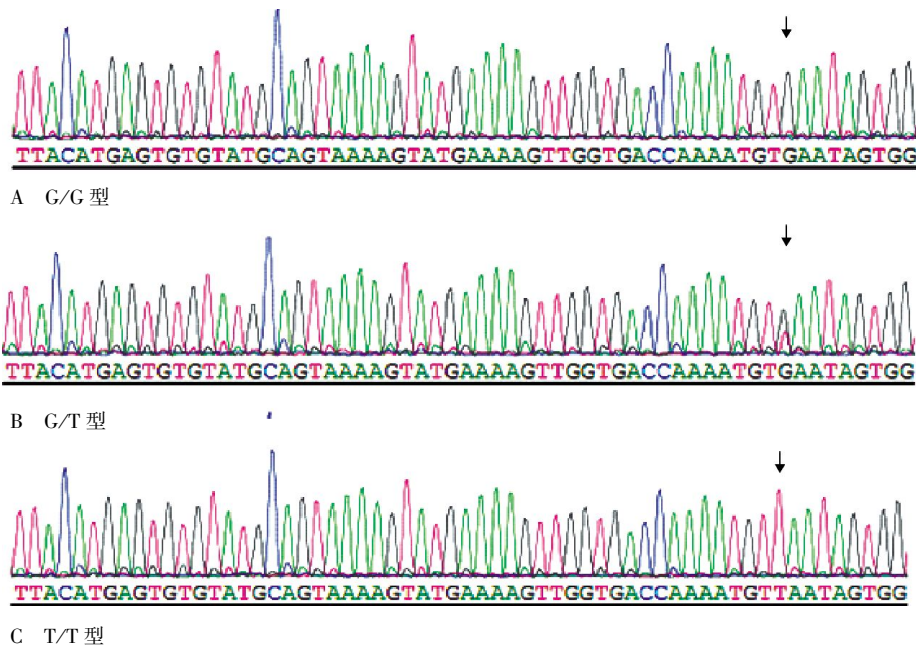


图 2 CD 患者 STAT4 SNP rs7574865 基因 PCR 产物的测序图
Figure 2 The sequencing results of STAT4 SNP rs7574865 in CD patients

表 2 STAT4 基因 SNP 位点的基因型、等位基因频率分析

Table 2 The frequencies of genotypes and allele frequency of SNP of STAT4

组别	n	基因型频率[n(%)]			P 值	OR(95%CI)	基因频率		P 值	OR(95%CI)
		GG	TG	TT			G	T		
克罗恩病组	318	35(0.110)	137(0.431)	146(0.459)	0.858	1.688(0.412~5.322)	0.352	0.648	0.412	1.106(0.702~1.348)
健康对照组	318	31(0.097)	143(0.450)	144(0.453)			0.347	0.653		

浓度和微环境中细胞因子等。某些特异的基因序列也会影响 Th1 与 Th2 细胞的分化，例如 STAT4、T-bet 是 Th1 细胞分化的转录因子^[18]。

作为 Th1 细胞分化过程中的关键因子，STAT4 依赖于 IL-12 在 Th1 细胞中特异表达。Wurster 等^[19]报道，在 STAT4 基因缺陷的小鼠中不能产生 Th1 细胞，说明 Th1 细胞的产生需要 STAT4 参与，但是 STAT4 在 Th1 细胞分化过程中的具体作用仍不十分清楚。在抗原刺激下，IFN- γ 可诱导幼稚 T 细胞分化并激活 STAT4，进一步促进 T-bet 的产生，从而激活 Th1 分化过程中的一系列反应。T-bet 随 IFN- γ 表达升高而升高，而且仅在 Th1 细胞中特异性表达。但 STAT4 与 T-bet 之间的关系尚需进一步研究。STAT4 基因在 Th1 细胞分化中是一个关键点，在 CD 的预防与治疗中也将是一个潜在的靶点。

Glas 等^[17]分析了白种人群 STAT4 基因中的 7 个常见多态位点，发现 STAT4 SNP rs7574865 多态位点与 CD 相关($P = 0.047$)。而 Diaz-Gallo 等^[20]在西班牙人群中并没有发现该 STAT4 基因多态位点与 CD 相

关，但认为与 UC 的遗传易感性显著相关 ($P = 0.012$)。这表明 STAT4 基因与 IBD 的相关性在不同种族中存在变异。在其他种族和人群中，对于 STAT4 基因单核苷酸多态位点与 CD 的相关性文献报道甚少。本研究首次对中国汉族人群 STAT4 基因 SNP 位点 rs7574865 G>T 进行了多态性分析，检测了该位点在 CD 病例组与健康对照组中的基因型以及等位基因频率的分布，组间比较显示：CD 患者该位点基因型频率及等位基因频率与正常人群基因型频率和等位基因频率差异无统计学意义，提示 STAT4 基因 rs7574865 G>T 位点与中国汉族 IBD 患者发病易感性可能无明显相关。本实验结果也进一步佐证了 IBD 易感基因多态性改变存在地域及种族的差异。

由于本研究病例数及地域较局限，故仍需行多中心大样本的队列研究，才能最终明确 STAT4 基因多态性与中国汉族 IBD 发病的相关性，可在我国 IBD 患者中进行包括全基因组关联研究在内的遗传危险因子相关检测，为进一步筛选中国人 IBD 的易感基因以及发展基因诊断和治疗提供依据。

[参考文献]

- [1] Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nat Rev Immunol*,2008,8(6): 458-466
- [2] Comalada M,Peppelenbosch MP. Impaired innate immunity in Crohn's disease [J]. *Trends Mol Med*,2006,12(9):397-399
- [3] Hugot JP,Chamaillard M,Zouali H,et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease[J]. *Nature*,2001,411(6837):599-603
- [4] Korman BD,Kastner DL,Gregersen PK,et al. STAT4:genetics,mechanisms,and implications for autoimmunity[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*,2008,8(5):398-403
- [5] 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
- [6] Orozco G,Alizadeh BZ,Delgado-Vega AM,et al. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis;a replication study in three European populations[J]. *Arthritis Rheum*,2008,58(7):1974-1980
- [7] Ji JD,Lee WJ,Kong KA,et al. Association of STAT4 polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus;a meta-analysis [J]. *Mol Biol Rep*,2010,37(1):141-147
- [8] Lee YH,Woo JH,Choi SJ,et al. Association between the rs7574865 polymorphism of STAT4 and rheumatoid arthritis;a meta-analysis[J]. *Rheumatol Int*,2010,30(5):661-666
- [9] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见 [J]. *中华内科杂志*,2008,47(1):73-79
- [10] Gasche C,Scholmerich J,Brynskov J,et al. A simple classification of Crohn's disease;report of the working party for the world congresses of gastroenterology,Vienna 1998 [J]. *Inflamm Bowel Dis*,2000,6(1):8-15
- [11] Buhner S,Buning C,Genschel J,et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease;role of CARD15 3020insC mutation? [J].*Gut*,2006,55(3):342-347
- [12] Hisamatsu T, Reinecker HC, Reinecker HC, et al. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells [J]. *Gastroenterology*,2003,124(4):993-1000
- [13] Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression [J]. *Gut*,2004,53(11):1658-1664
- [14] Massey DC, Parkes M. Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease [J]. *Autophagy*,2007,3(6):649-651
- [15] Cummings JR, Cooney R, Pathan S, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene[J]. *Inflamm Bowel Dis*,2007,13(8):941-946
- [16] Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility [J]. *Nat Genet*,2007,39(7):813-815
- [17] Glas J, Seiderer J, Nagy M, et al. Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene;rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset [J]. *PLoS ONE*,2010,5(4):e10373
- [18] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment [J]. *Cell*,2000,100(6):655-669
- [19] Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6[J]. *Oncogene*,2000,19(21):2577-2584
- [20] Diaz-Gallo LM, Palomino-Morales RJ, Gómez-García M, et al. STAT4 gene influences genetic predisposition to ulcerative colitis but not Crohn's disease in the Spanish population;a replication study [J]. *Hum Immunol*,2010,71(5):515-519

[收稿日期] 2011-04-06