

TNFAIP3 基因 rs5029939 位点与重症肌无力相关研究

李尧, 孙金梅, 陈彬, 姜彬, 王淑辉, 张拥波

摘要 目的:探讨肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3(TNFAIP3)基因rs5029939位点多态性与重症肌无力(MG)的相关性。**方法**:98例中国北方成年MG患者(MG组)和87例健康对照(对照组)纳入研究。采用SNPscanTM多重SNP分型试剂盒检测MG组和对照组rs5029939基因位点的基因型,并进行组间和组内基因型的比较。**结果**:MG患者TNFAIP3基因rs5029939位点C/C、C/G、G/G基因型及等位基因G出现的频率与对照组比较差异无统计学差异($P>0.05$)。将病例组按照性别、发病年龄、是否伴发胸腺瘤、抗AChR抗体是否阳性及临床分型进行亚组分析,结果显示抗乙酰胆碱受体抗体阴性患者rs5029939位点的G基因频率显著低于抗乙酰胆碱受体阳性患者($P=0.046$, $OR=0.328$, 95%CI 0.115-0.935),其余各亚组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论**:TNFAIP3基因rs5029939位点多态性与MG患者抗AChR抗体表达相关。

关键词 重症肌无力;肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3;单核苷酸多态性

中图分类号 R741;R741.02;R746 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20220666

本文引用格式:李尧, 孙金梅, 陈彬, 姜彬, 王淑辉, 张拥波. TNFAIP3 基因 rs5029939 位点与重症肌无力相关研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(4): 205-207.

Correlation between rs5029939 Locus Polymorphism of TNFAIP3 Gene and Myasthenia Gravis LI Yao, SUN Jin-mei, CHEN Bin, JIANG Bin, WANG Shu-hui, ZHANG Yong-bo. Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract Objective: To analyze the correlation between rs5029939 locus polymorphism of the tumor necrosis factor α -induced protein 3 (TNFAIP3) gene and myasthenia gravis (MG). **Methods:** Ninety-eight adult MG patients from northern China (MG group) and 87 healthy controls (control group) were recruited. The polymorphisms were determined by SNPscanTM technique, and results were compared between and within the two groups. **Results:** There was no statistical difference in the TNFAIP3 rs5029939 locus C/C, C/G, and G/G genotypes nor in frequency of the G allele between the MG group and control group ($P>0.05$). MG group patients were divided into subgroup according to gender, onset age, concurrent thymoma, anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody, and clinical classification, and data analysis showed that the frequency of the G allele in patients negative for the anti-acetylcholine receptor was significant lower than that in patients positive for the anti-acetylcholine receptor ($P=0.046$, $OR=0.328$, 95% CI 0.115-0.935). Comparisons between all other subgroups revealed no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** Our result indicate that rs5029939 polymorphism of the TNFAIP3 gene is associated with the expression of the anti-AChR antibody in MG patients.

Keywords myasthenia gravis; tumor necrosis factor α induced protein 3; single nucleotide polymorphism

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是主要由抗乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR)抗体介导、细胞依赖的自身免疫疾病。病因不详,发病机制由多种抗体、蛋白、细胞因子及遗传代谢因素共同参与^[1]。肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3(tumor necrosis factor α induced protein 3, TNFAIP3)是重要的核因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)调控蛋白,可通过多种途径调控NF- κ B的表达和细胞凋亡,参与机体的免疫调节,特别在关闭特异性免疫中起重要作用^[2]。研究发现TNFAIP3基因与系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等多种自身免疫性疾病的发病相关,其中rs5029939位点尤为受到关注^[3,4]。本研究通过探索TNFAIP3基因rs5029939位点多态

性与MG患者的相关性,寻找中国MG患者发病的易感基因。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随访并收集首都医科大学附属北京友谊医院神经科收治的成年MG患者103例,其中完成TNFAIP3基因rs5029939位点基因分型的98例纳入研究。MG的诊断基于典型的病史、查体、疲劳试验及新斯的明实验阳性,同时需满足至少以下2项实验室检查中的1项:①血清中抗乙酰胆碱受体抗体阳性;②肌电图显示典型电生理学特征:低频重频电刺激检查波幅递减 $>10\%$ 。同时排除其他原因导致的肌无力综合征。健康对

作者单位

首都医科大学附属
北京友谊医院神经
科

北京 100050

基金项目

国家自然科学基金
(No. 81801334)

收稿日期

2022-11-17

通讯作者

张拥波

yongbozhang@

ccmu.edu.cn

照组为来自与患者相同地区、身体健康、无自身免疫疾病史和家族史的成人 87 名。

1.2 方法

基因分型及抗体检测:采用 SNPscanTM 多重 SNP 分型试剂盒检测 MG 组和对照组 rs5029939 基因位点的基因型,利用酶连接反应的高特异性实现对 SNP 位点等位基因的识别,然后通过连接探针末段引入不同长度的非特异序列以及通过连接酶加接反应获得位点对应的不同长度连接产物,利用标记荧光的通用引物对连接产物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增,通过荧光毛细管电泳对扩增产物进行电泳分离,最后通过对电泳图谱的分析获取各个 SNP 位点的基因型。应用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检查患者血浆中抗 AChR 抗体,抗体水平用抑制率表示^[5]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件处理数据。计算各组基因型和等位基因的频率,分析其是否符合 Hardy-Weinberg 平衡, χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例特征

入组 MG 患者的基本信息见表 1。发病年龄 15 ~ 86 岁,平均(44.73±17.08)岁;病程 8 ~ 220 个月,中位数为 49 个月。根据其性别、发病年龄、抗 AChR 抗体是否阳性、是否伴发胸腺瘤及临床分型(眼肌型和全身型)分组;发病年龄≤50 岁定义为早发型 MG,发病年龄>50 岁定义为晚发型 MG^[6];同时根据患者血清抗 AChR 抗体检查结果分为抗体阴性(seronegative MG, SNMG)组和抗体阳性(seropositive MG, SPMG)组。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡

MG 患者和健康对照组 TNFAIP3 rs5029939 等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=0.95$),具有群体代表性。

2.3 相关分析

TNFAIP3 基因 rs5029939 基因型组间比较结果显示,等位基因 G 在 MG 组和对照组出现的频率分别为

4.8%和 4.4%,差别无统计学意义($P>0.05$);3 种基因型(CC/CG/GG)在 MG 组和对照组中的分布差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

TNFAIP3 基因 rs5029939 基因型组内比较结果显示,抗 SNMG 组 rs5029939 位点的 G 基因频率较 SPMG 组明显减低($P=0.046$, $OR=0.328$, 95%CI 0.115-0.935),但 2 组间 rs5029939 基因型差异无统计学意义($P=0.068$, $OR=0.347$, 95%CI 0.120-1.008);其余各亚组均未发现显著统计学差异,见表 3。

3 讨论

MG 是一种遗传、环境及其他未知因素共同导致的复杂性自身免疫性疾病,免疫相关基因在其发病过程中可能存在重要的作用^[1]。同时,MG 的发生与多种淋巴细胞,抗体及细胞因子相关^[7]。TNFAIP3 基因产物 A20 是多种细胞中 NF- κ B 的调控蛋白,同时为抑制自身炎症反应所必须。TNFAIP3 在炎症和免疫过程的负向调节中扮演重要角色,研究显示其参与风湿性关节炎^[8]、系统性红斑狼疮^[4]及多发性硬化^[9]等多种自身免疫性相关性疾病的发病。而一项全基因组关联分析(Genome Wide Association Study, GWAS)研究进一步发现 rs5029939 位点与系统性红斑狼疮密切相关^[9]。动物学研究表明,A20 基因缺乏的大鼠会出现多器官损

表 1 入组的 MG 患者临床特征(例)

临床数据	例数(男/女)
总数	98(59/39)
发病年龄	
15 ~ 50 岁(早发型)	55(30/25)
>50 岁(晚发型)	43(30/13)
抗 AChR 抗体	
抗体阳性 MG(SNMG)	50 (35/15)
抗体阴性 MG(SPMG)	48 (25/23)
胸腺	
有胸腺瘤	30(16/14)
无胸腺瘤	68(35/33)
临床分型	
眼肌型 MG	40(22/18)
全身型 MG	58(32/26)

表 2 MG 患者和对照组在 rs5029939 位点基因型的相关性分析

SNPs	最小等位基因频率		基因型	基因型频数		P 值	
	MG 组	对照组		MG 组	对照组	共显性	隐性
rs5029939	4.8%	4.4%	CC	91.1%	91.4%	0.48	0.7
			CG	8.1%	8.4%		
			GG	0.8%	0.2%		

表3 各组及各亚组 rs5029939 位点基因型和等位基因 G 的分布特征

基因	对照组	女性		男性		抗 AChR 抗体		发病年龄		胸腺瘤		临床分型	
		MG 组	对照组	MG 组	对照组	阳性	阴性	15-50 岁	>50 岁	阳性	阴性	眼肌型	全身型
CC	91.4%	91.4%	90.8%	90.7%	92.0%	89.1%	95.9%	92.8%	88.3%	92.2%	90.6%	88.3%	92.7%
CG	8.4%	8.2%	8.8%	8.1%	8.0%	9.9%	4.1%	6.8%	10.4%	5.8%	9.1%	11.0%	6.5%
GG	0.2%	0.4%	0.4%	1.2%	0%	3%	0	0.4%	1.3%	1.9%	0.3%	0.7%	7.8%
G	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.06	0.02 ^①	0.04	0.06	0.05	0.06	0.06	0.04

注: ^①SNMG 组 rs5029939 位点的 G 基因频率较 SPMG 组明显减低, 具有统计学差异 ($P=0.046$, $OR=0.328$, $95\%CI\ 0.115-0.935$)

伤,如肠道上皮细胞基因敲除大鼠因为上皮凋亡增加而易感结肠炎;敲除骨髓原始细胞 A20 基因的大鼠容易罹患多发关节炎;而敲除树突状细胞基因的大鼠出现脾和淋巴结肿大。树突状细胞 A20 的下调能够增强 T 细胞激活能力,同时免疫调节性 T 细胞能够增强抗肿瘤和抗免疫缺陷病毒细胞的免疫应答^[13]。

目前国内外研究尚未报道 *TNFAIP3* 基因位点与 MG 相关性^[11,12]。研究显示 *TNFAIP3* 基因与中国北方地区晚发型 MG 患者发病相关^[13];本研究继续探索,并通过亚组分析发现 rs5029939 位点多态与抗 AChR 抗体的相关。

本研究发现 rs5029939 位点 G 基因频率在健康人群中为 4.4%,较单倍体型图(Haplotype Map, HapMap)数据库中中国北京汉族人群的 5.8%和日本东京人群的 10.7%低,而较犹他州的欧洲西部和北部后裔的 2.7%高 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>),这与 *TNFAIP3* 基因 rs5029939 频率在不同种群中存在差异相关。

大多数自身免疫性疾病,性别差异明显,多为女性发病率较高,而性别差异对于疾病进展的快慢和程度也有一定影响^[14]。本研究中女性患者占总数的 60%。我国 15%~40%的 MG 患者会伴发胸腺瘤^[15],而本研究中 30.6%伴发胸腺瘤。本研究还将患者按年龄、发病类型进行分组分析,未发现阳性结果。

本研究显示 *TNFAIP3* 基因 rs5029939 位点多态性与中国北方地区 MG 患者抗 AChR 抗体表达相关。现有研究已表明 *TNFAIP3* 基因 rs2230926 位点变异能导致 A20 蛋白 127 位置上的苯丙氨酸为半胱氨酸所替代,进而降低 A20 的关闭特异性免疫的作用,同时,rs5029941 位点突变能够将 A20 蛋白 125 位置上丙氨酸为缬氨酸所代替从而对其作用产生影响,但具体作用机制不明确。文献报道 rs5029941 突变后与炎症性肠病易感相关,然而对系统性红斑狼疮的发病起到保护作用,这种差异性作用可能与影响的 T 细胞类型不同相关^[16]。目前已有研究尚未阐明 rs5029939 位点变异后基因表达变化,故有必要对 rs5029939 位点变异后

TNFAIP3 基因表达的变化及基因进行更全面探索,探索其与抗 AChR 抗体表达之间的关系。

参考文献

[1] Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity[J]. Lancet Neurol, 2009, 8: 475-490.

[2] Zhang Y, Zhou P, Lu F, et al. A20-Binding Inhibitor of Nuclear Factor- κ B Targets β -Arrestin2 to Attenuate Opioid Tolerance[J]. Mol Pharmacol, 2021, 100: 170-180.

[3] Zedan MM, Attia ZR, Abd El Azeem RA, et al. Genetic Polymorphisms in Genes Involved in the Type I Interferon System (IFIH1/MDA-5, TNFAIP3/A20, and STAT4): Association with SLE Risk in Egyptian Children and Adolescents[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 3349-3358.

[4] Graham RR, Cotsapas C, Davies L, et al. Genetic Variants Near TNFAIP3 on 6q23 are Associated with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)[J]. Nat Genet, 2013, 21: 994-999.

[5] Cai Y, Han L, Zhu D, et al. A Stable Cell Line Expressing Clustered AChR: A Novel Cell-Based Assay for Anti-AChR Antibody Detection in Myasthenia Gravis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 666046.

[6] Aarli JA. Myasthenia gravis in the elderly: Is it different[J]? Ann N Y Acad Sci, 2008, 1132: 238-243.

[7] 汤旒, 张宁, 谷有全, 等. 辅助性 T 细胞亚群在重症肌无力中的作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15: 732-734.

[8] Sun B, Yang M, Hou J, et al. Chromosomal abnormalities related to fever of unknown origin in a Chinese pediatric cohort and literature review[J]. Orphanet J Rare Dis, 2022, 17: 292.

[9] Perga S, Montarolo F, Martire S, et al. Overexpression of the ubiquitin-editing enzyme A20 in the brain lesions of Multiple Sclerosis patients: moving from systemic to central nervous system inflammation[J]. Brain Pathol, 2021, 31: 283-296.

[10] Graham RR, Cotsapas C, Davies L, et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus[J]. Nat Genet, 2008, 40: 1059-1061.

[11] Zagoriti Z, Georgitsi M, Giannakopoulou O, et al. Genetics of myasthenia gravis: a case-control association study in the Hellenic population[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 484919.

[12] Yang HW, Xie Y, Zhao Y, et al. TNFAIP3 gene rs7749323 polymorphism is associated with late onset myasthenia gravis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96: e6798.

[13] 赵媛, 谢琰臣, 孙亮, 等. TNFAIP3 基因 rs2230926 多态性与重症肌无力的相关性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2010, 17: 42-45.

[14] Zammit NW, McDowell J, Warren J, et al. TNFAIP3 Reduction-of-Function Drives Female Infertility and CNS Inflammation[J]. Front Immunol, 2022, 13: 811525.

[15] Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune Disease[J]. Front Neuroendocrinol, 2014, 35: 347-69.

[16] Zhang Y, Yu L, Ke J. Pathological Features and Prognosis of Thymoma With or Without Myasthenia Gravis[J]. Front Surg, 2022, 9: 726673.

(本文编辑:唐颖馨)