

STAT4 基因单核苷酸多态性与云南汉族人群 SLE 发病的相关性研究

杨小蕾, 邓丹琪

(昆明医科大学第二附属医院皮肤科, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 研究云南地区汉族人群 STAT4 基因单核苷酸多态性 (SNP), 探讨其与 SLE 疾病的易感性。**方法** 结合国内外全基因组关联分析数据及本课题组前期研究结果, 采用 Sequenom MassArray 质谱阵列技术对 378 例 SLE 患者和 389 例正常对照进行 STAT4 基因 (rs10168266, rs10181656, rs11889341, rs13017460, rs1551443, rs16833249, rs2459611, rs3024879, rs3024886, rs3024894, rs3024895, rs3024933, rs3821236, rs4555370, rs6712821, rs7568275, rs7574865, rs7599504, rs8179673, rs932169) 20 个位点的基因分型。**结果** (1) STAT4 的 6 个 SNP 等位基因频率在云南人群 SLE 患者和正常对照组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并以 rs10181656 最为显著 ($P = 5.41E-09$), 且相关程度较欧洲人群高; (2) 对 STAT4 的 SNP 位点 rs10181656 进行分层分析, 病例组中的蝶型红斑、粘膜溃疡、血液改变、肾损害、抗 ds-DNA、ANA 和浆膜炎与对照组之间 G 等位基因频率比较分布均有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** STAT4 基因多态性与云南汉族人系统性红斑狼疮易感性相关; STAT4 基因 rs10181656 G 等位基因增加了 SLE 病人发生关节炎、蝶型红斑、肾损害、粘膜溃疡、抗 ds-DNA、ANA、血液改变、浆膜炎的风险。

[关键词] 系统性红斑狼疮; STAT4; 单核苷酸多态性

[中图分类号] R758.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2013) 06 - 0046 - 07

Association Study of Single Nucleotide Polymorphism in STAT4 and Systemic Lupus Erythematosus in the Han Population of Yunnan Province

YANG Xiao - lei, DENG Dan - qi

(Dept. of Dermatology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association between single nucleotide polymorphism (SNP) in the signal transducer and activator of transcription (STAT4) gene and the susceptibility of systemic lupus erythematosus (SLE) in Chinese Han population of Yunnan. **Methods** The Sequenom MassArray system was used to conduct the genotype in 20 SNPs of the STAT4 genes (rs10168266, rs10181656, rs11889341, rs13017460, rs1551443, rs16833249, rs2459611, rs3024879, rs3024886, rs3024894, rs3024895, rs3024933, rs3821236, rs4555370, rs6712821, rs7568275, rs7574865, rs7599504, rs8179673, rs932169) in 378 cases with SLE and 389 cases of normal control. **Results** Six SNPs of STAT4 gene tested here were significantly associated with SLE, particularly rs10181656 ($P = 5.41E-09$), and the association with SLE was significantly higher than that of European. When patients were assigned in subgroup according to the arthritis, butterfly rash, kidney damage, oral ulcers, anti-dsDNA, ANA, hematological and serositis, the G-allele frequencies of SNP rs10181656 was significant differences between SLE patients and controls ($P < 0.01$). **Conclusion** It suggested that polymorphism of STAT4 gene may be related to susceptibility of SLE in Chinese Han population of Yunnan. The G-allele of rs10181656 increased the risk of SLE patients with arthritis, butterfly rash, kidney damage, oronasal ulcers, anti-dsDNA, ANA, hematological and serositis.

[Key words] Systemic lupus erythematosus; STAT4; SNP

[基金项目] 云南省科技厅联合专项基金资助项目 (2008CD025)

[作者简介] 杨小蕾 (1982~), 女, 云南保山市人, 医学硕士, 助教, 主要从事教学管理工作。

[通讯作者] 邓丹琪. E-mail: danqid@hotmail.com

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是自身免疫介导的, 以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病. 近年研究表明, SLE 具有很强的遗传倾向. 目前有一系列的证据表明遗传因子在发病中起主导作用^[1,2]: (1) 同卵双生子发病的一致率 (24%~65%) 明显高于异卵双生子 (2%~9%), 发病有家族聚集倾向; (2) 一级亲属的发病率明显高于正常人群; (3) 迄今尚未发现某一特定外源性感染源与疾病发病明确关联; (4) 在多种自发性动物模型的研究中已明确多种自身免疫表型与特定基因位点相关联. 近年来, 随着分子遗传学的发展, 基因多态性分析是研究复杂疾病发病机制的重要方法之一^[3]. 基于笔者前期研究发现信号传导和转录激活子 4 (signal transducer and activator of transcription, STAT4) 基因的 rs7574865 与云南汉族人系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 易感性相关, 以及近几年国内外文献报道的与 SLE 相关的 rs10181656 同样位于第三内含子上, 所以选取了其附近区域内的 10 个 SNP 点. 同时也选取了国内外文献报道的 STAT4 基因上与 SLE, 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 等自身免疫性疾病相关的 10 个 SNP 点作为参照. 进一步分析云南地区汉族人群 STAT4 基因单核苷酸多态性 (SNP), 研究其与 SLE 疾病的易感性, 现将结果报告如下.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 根据知情同意原则, 所有研究对象来自昆明医科大学第二附属医院皮肤性病 / 风湿免疫科 2008 年 1 月至 2010 年 12 月住院及门诊根据 1997 年美国风湿病协会 (ACR) 修订的 SLE 分类标准诊断的 SLE 患者 (389 例), 对照者为正常体检者或者在皮肤科门诊就诊的无 SLE 和自身免疫性疾病的患者. 同时要求其一二三级亲属中也均无 SLE 患者. 其中病人 378 例, 男 41 例, 女 337 例, 男女比为 1:8.2, 平均年龄 (32.10 ± 10.04) 岁. 正常对照组 389 人, 男 46 例, 女 343 例, 男女比为 1:7.5, 平均年龄 (27.41 ± 13.90) 岁, 与病例组在性别和年龄构成等方面均无显著差异 ($P > 0.05$). 临床资料的采集: (1) 采血前, 详细询问所有患者病史, 记录就诊时存在的有关的症状、体征及进行体格检查. (2) 进行相关实验室检查: 拍摄胸部正位 X 光片、心脏彩超、血常规检查、小便常规检查、ANA 和抗 ds-DNA

抗体的检测、ENA 抗体谱检测、补体检测、根据系统性红斑狼疮疾病活动指数 (SLEDAI) 判断疾病的活动情况.

1.1.2 主要试剂 DNA 提取按实验室常规酚-氯仿法抽提血液基因组 DNA: (1) 异丙醇; (2) 75%乙醇. 电泳试剂: (1) 超纯水; (2) Tris 碱 (上海生工生物工程公司); (3) 硼酸 (上海生工生物工程公司); (4) Tris-硼酸电泳缓冲液 (TBE): 浓贮存液 (每升), $5 \times$: 54 g Tris 碱, 27.5 g 硼酸, 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH=8.0) 使用液, $0.5 \times$: 0.045 mol/L Tris 硼酸, 0.001 mol/L EDTA; (5) 琼脂糖 (Promega 公司, USA); (6) 溴化乙锭, 10 mg/mL 贮存液 (上海生工生物工程公司). DNA 标准化试剂: (1) FG3 (DNA 溶解缓冲液); (2) 超纯水; Sequenom 基因分型系统 (北京博奥生物有限公司).

1.2 方法

1.2.1 血浆标本采集和人白细胞基因组 DNA 的提取 (1) 受试者常规禁食 12 h, 于次日清晨 6 时至 8 时采静脉血两管 5 mL, 其中 5 mL 用 EDTA 抗凝, 5 mL 放于普通清洁干燥试管中自凝; (2) 取 150 μ L 全血置于 1.5 mL 的离心管中; (3) 加入 500 μ L STE 缓冲液 (30 mM Tris-HCl, 200 Mmedta, 50 mM NaCl, pH8.0) 和终浓度为分别为 10% 的 SDS50 μ L 和 200 μ g/mL 的蛋白酶 K30 μ L; (4) 充分混匀后置 56 $^{\circ}$ C 温箱中消化 8~12 h 至澄清; (5) 加入 700 μ L 的水饱和酚, 缓慢混匀 20 min 至澄清, 6 000 r/min 10 min, (离心机: 低速冷冻离心机 TDL5000) 在正常室温中. 上清液转至另一个干净的离心管中; (6) 加入 700 μ L 的苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 混合液缓慢混匀抽提 20 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液转至另一个 Eppendorf 管中; (7) 再加入 700 μ L 的氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提 10 min, 6 000 r/min 10 min 后, 上清液转至另一个干净的 Eppendorf 管中; (8) 加入 600 μ L 的异丙醇沉淀 DNA, -20 $^{\circ}$ C 过夜放置, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清; (9) 加入 800 μ L 的 70% 的乙醇洗涤, 10 000 r/min 10 min 后, 弃上清, 重复 1 次; (10) 将 DNA 样品置于 26 $^{\circ}$ C 温箱干燥 2 h 左右 (根据管中乙醇残留量多少适当调整干燥时间). 加入 50 μ L 的 TE 液 (pH = 8.0) 缓冲液溶解 4~12 h, 电泳及测浓度后, 置 4 $^{\circ}$ C 的冰箱待用, 或保存于 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中保存.

dsDNA 浓度的测定: (1) 准确测定每份待标准化样本 DNA 的浓度; (2) 建立电子表格, 在每个 96 孔板上留有 A1, H12 的空白对照、A6 的

板内对照和 H6 的板间对照；(3) 按照电子表格的顺序，加入已经测定浓度的 DNA，如 DNA 浓度高于 15 ~ 25 ng/ μ L 则加入适量 FG3；如 DNA 浓度低于 15 ~ 25 ng/ μ L，则使用真空浓缩仪浓缩样本 DNA，最终使得每一孔浓度均在 15 ~ 25ng/ μ L 之间，且 OD 值在 1.8 ~ 2.0 之间；(4) 离心后贴上粘性锡箔纸，并用标记笔标上样本板标号、样本类型、来源地等信息；(5) 在平板离心机上，3 000 g 离心 3 min，存放于 -20 $^{\circ}$ C 冰柜中备用。

1.2.2 SNP 点选择 取了结合目前研究已知的北美、欧洲、韩国、日本等其他人群中与 SLE、类风湿关节炎等自身免疫疾病相关的 STAT4 的 20 个 SNP (rs10168266、rs10181656、rs11889341、rs13017460、rs1551443、rs16833249、rs2459611、rs3024879、rs3024886、rs3024894、rs3024895、rs3024933、rs3821236、rs4555370、rs6712821、rs7568275、rs7574865、rs7599504、rs8179673、rs932169)。

1.2.3 引物设计及合成 根据引物设计原则和文献报道，确定 STAT4 的引物序列为：Forward:5-T-GTGGAACCTTTGTTGCTGCTCT-3 Reverse:5-GCC-AAACTTACCAAATGTCGAAAT-3。

通过 Premier5.0 软件验证引物的合理性，结果应该证明该引物无明显的二聚、发夹结构等，符合要求。

1.2.4 基因分型 用 Sequenom 对所有 tagSNPs 进行基因分型（此项基因分型实验在北京博奥生物公司完成）。

MassEXTEND 反应：MassEXTEND 可以在单个核苷酸水平上发现序列差别，在 iPLEX GOLD 实验中，所有 SNP 均使用同一终止反应配方和通用的反应条件，延伸的产物具有位点特异的分子量，分析软件能根据此分子量的差异决定其基因型。

实验流程：基因组 DNA 样品处理；SNP 位点的选择和评估；多重反应确定；引物的合成和质量控制；Sequenom SNP 基因分型实验；SNP 基因分型数据的分析。

1.3 统计学处理

(1) Hardy-Weinberg 平衡检验:根据 Hardy - Weinberg 平衡定律，计算各多态位点在正常人以及系统性红斑狼疮患者的预期基因型频率，利用

χ^2 检验比较观察到的基因型频率与预期基因型频率间的差异，以 $P > 0.05$ 表明差异无统计学意义，以确定各多态位点处于遗传平衡状态；(2) STAT4 基因各多态性位点出现的基因频率 (Genotype frequency) = 基因型阳性数 / 该观察人群人数。系统性红斑狼疮患者与对照组基因频率及等位基因频率的差异分析运用 χ^2 检验及 Fisher 精确概率法。所有实验数据采用 SPSS 软件分析。

2 结果

2.1 STAT4 基因多态性

以上 20 个 SNPs，以得率 $\geq 90\%$ 为分型成功标准，有 3 个 SNP 点分型失败（得率 $< 90\%$ ），另外 15 个 SNP 点 (rs10181656、rs7568275、rs7574865、rs11889341、rs8179673、rs10168266、rs16833249、rs13017460、rs3821236、rs4555370、rs3024886、rs1551443、rs3024879、rs7599504、rs932169) 分型成功。7 个 SNPs 的最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 偏低小于 1%；没有不符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$) 的 SNP 位点，所有位点分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律，表明其基因频率已达到遗传平衡，具有遗传代表性。其中 rs2459611 既分型失败又无信息量，在统计中有重叠，所以可用的位点为 15 个，见表 1。

2.2 SNP 分型结果

为了验证 STAT4 基因的多态性与云南汉族人群 SLE 这一疾病的相关性，研究共验证了 15 个 SNP。针对所有 2 等位基因位点，采用不同模式进行关联计算，针对每一个 SNP 位点的等位基因进行关联计算的结果见表 2，通过表 2 中数据可得，12 个 SNP 遗传平衡 (Hardy-Weinberg, $P > 0.05$)，在所测试的群体中符合遗传规律，并且其中有 11 个 SNP 等位基因频率在云南人群 SLE 患者和正常对照组之间的差异具有统计学意义，并以 rs10181656 最为显著 [rs10181656: $P = 5.41E - 09$, OR (95% CI) = 0.54 (0.439-0.664); rs7568275: $P = 1.51E - 08$, OR (95% CI) = 0.549 (0.446 ~ 0.676); rs7574865: $P = 1.79E - 08$, OR (95% CI)

表 1 SNP 位点统计 (%)

Tab. 1 The statistics of SNP loci (%)

常染色体 SNP 可用 位点总数 20 (个数)	分型失败 SNP 位点 3 (个)	无信息量 SNP 位点 3 (个)	MAF 偏低 7 (个)	违反 HWE 的 SNP 位点 0 (个)	可用的 SNP 位点 15 (个)
比例	15.00	15.00	35.00	0	75.00

= 0.553 (0.450 ~ 0.680); rs11889341: $P = 1.79E \sim 08$, OR(95% CI) = 0.553 (0.450 ~ 0.680); rs8179673: $P = 2.19E \sim 08$, OR (95% CI) = 1.802 (1.465 ~ 2.217); rs10168266: $P = 3.09E \sim 08$, OR (95% CI) = 0.583 (0.474 ~ 0.717); rs16833249: $P = 0.002$, OR (95% CI) = 1.361 (1.112 ~ 1.665); rs13017460: $P = 0.007$, OR (95% CI) = 1.315 (1.075 ~ 1.608); rs3821236: $P = 0.006$, OR (95% CI) = 1.334 (1.087 ~ 1.638); rs3024886: $P = 0.031$, OR (95% CI) = 0.031 (0.655 ~ 0.980)]. STAT4 的 6 个 SNP 等位基因频率在云南人群 SLE 患者和正常对照组之间的差异有统计学意义, 并以 rs10181656 最为显著 ($P = 5.41E-09$), 且相关程度较欧洲人群高; 国内尚无人报道. 15 个 SNP 中有 5 个位点 (rs4555370, rs1551443, rs3024879, rs7599504, rs932169) 的等位基因频率在云南人群 SLE 患者和正常对照组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$).

2.3 人口差异比较

查询 HapMap 数据库 (<http://www.hapmap.org/>) 中欧洲人和汉族人 15 个 SNPs 的等位基因频率, 两人群存在较大差异 ($P < 0.05$), 见表 3.

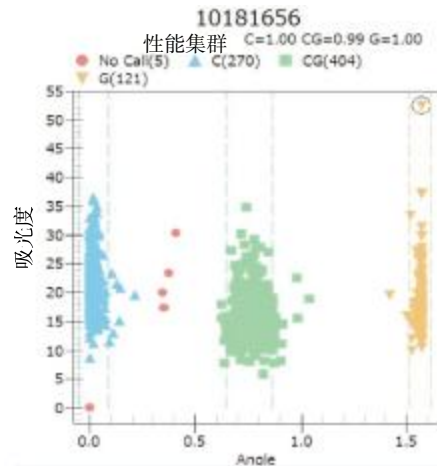
2.4 男女性别及年龄比

考虑到本实验病例组和对照组中男女性别比例以及病例组和对照组的年龄有差异, 可能对结果有一定影响, 因而比较了 6 个 SNP 点在对照组男性女性中的等位基因频率以及对对照组和病例组的年龄构成, 结果显示 rs10181656 位点性别间等位基因频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 对照组和病例组的年龄构成差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4、表 5.

2.5 单个 SNP 的疾病遗传模型研究

为了寻找系统性红斑狼疮疾病中 STAT4 基因的 6 个 SNP 可能的遗传模型, 进行了以模型研究为基础的显隐性模型的分析, 见表 6. 从表 6 可以看出, 对于 rs10181656, rs7568275, rs7574865, rs11889341, rs10168266, 虽然两种模型皆可以, 但是其中隐性模型更为合适而对于 rs8179673 而言, 则显然是运用隐性模型来分析最为合适.

病例分层分析, 比较病例组与对照组间 rs10181656 位点 G 等位基因频率的相关性, 经卡方检验, 关节炎 / 对照 ($P = 4.36E-08$, OR = 0.534); 蝶形红斑 / 对照 ($P = 1.78E-07$, OR = 0.525); 粘膜溃疡 / 对照 ($P =$



该聚类图表示将样本分为三种基因型, CG 型、CC 型、GG 型

图 1 rs10181656 聚类图

Fig. 1 rs10181656 clustering figure

7.63E-08, OR = 0.551); 浆膜炎 / 对照 ($P = 1.02E-07$, OR = 0.354); 肾损害 / 对照 ($P = 1.67E-05$, OR = 0.559); 血液改变 / 对照 ($P = 1.06E-09$, OR = 0.434); ds-DNA / 对照 ($P = 3.98E-05$, OR = 0.423); ANA / 对照 ($P = 41.386$, OR = 0.436). STAT4 基因 rs10181656G 等位基因增加了关节炎、蝶形红斑、肾损害、抗 DS-DNA、ANA、血液改变、浆膜炎患病风险, 见表 7.

3 讨论

SLE 是一种常见的自身免疫性疾病, 好发于育龄期妇女, SLE 作为一种临床表现多样, 有多系统、多器官损害的自身免疫病, 到目前为止该疾病的确切病因和发病机制尚未完全明确, 大量的研究证明主要与遗传因素、环境因素、内分泌因素、药物因素、免疫因素、感染因素等有关^[4-5]. 近年来, 随着人类基因组计划 (human genome project, HGP) 和国际人类基因组单体型图计划 (human heliotype map, Hap Map) 的实施, 使人类遗传学研究进入了一个新的时期. 尤其近年来随着高通量基因分型技术的发展, 如 SNP 芯片的出现, 使基因分型成本逐渐下降而效率不断提高, 在全基因组范围内筛选与疾病有关的序列变异成为可能, 全基因组关联 (genome wide association, GWA) 研究方法也就应运而生. 目前 GWA 研究已成为寻找复杂疾病易感基因的主要方法. 数项有关 SLE 易感基因 GWA 研究发现多个疾病相关的易感基因. 如 ITGAM PDK, KIAA1542, FCGR2A, SATA4, BLK TNFAIP3, HLA-DQA1 NTNG2 IRF5 和 BANKI

表 2 各 SNP 位点等位基因与疾病的相关性
Tab. 2 The correlation of SNPs alleles and disease

SNP	等位基因	P	L95	U95	HWE-p	OR	OR-p
rs10181656	G	5.41E-09	0.439	0.664	0.334	0.54	5.04E-09
rs7568275	G	1.51E-08	0.446	0.676	0.332	0.549	1.57E-08
rs7574865	T	1.79E-08	0.45	0.68	0.332	0.553	2.05E-08
rs11889341	T	1.79E-08	0.45	0.68	0.339	0.553	1.95E-08
rs8179673	C	2.19E-08	1.465	2.217	0.335	1.802	2.48E-08
rs10168266	T	3.09E-07	0.474	0.717	0.338	0.583	3.10E-07
rs16833249	C	0.002	1.112	1.665	0.484	1.361	0.002
rs13017460	A	0.007	1.075	1.608	0.475	1.315	0.007
rs3821236	A	0.006	1.087	1.638	0.435	1.334	0.005
rs4555370	T	0.113	0.958	1.52	0.273	1.207	0.108
rs3024886	A	0.031	0.655	0.98	0.433	0.031	0.031
rs1551443	T	0.203	0.927	1.46	0.294	1.163	0.191
rs3024879	T	0.209	0.026	2.147	0.001	0.239	0.202
rs7599504	C	0.239	1	1	0	1	0
rs932169	C	0.616	0.189	23,134	0.001	2.093	0.546

表 3 15 个 SNPs 在对照组和 HapMap 数据库的等位基因频率分布情况

Tab. 3 The distribution of allele frequencies of 15 SNPs in control group and HapMap database

SNP	等位基因	实验室等位基因频率	HapMap 等位基因频率	
			汉族人	欧洲人
rs10181656	G	0.334	0.344*	0.217
rs7568275	G	0.332	0.33*	0.231
rs7574865	T	0.332	0.333*	0.208
rs11889341	T	0.339	0.344*	0.208
rs8179673	C	0.335	0.321*	0.213
rs10168266	T	0.338	0.333*	0.225
rs16833249	C	0.484	0.489*	0.425
rs13017460	A	0.475	0.5*	0.385
rs3821236	A	0.435	0.4*	0.242
rs4555370	T	0.273	0.267*	0.325
rs3024886	A	0.198	0.389*	0.242
rs1551443	T	0.428	0.311*	0.331
rs3024879	T	0.979	0.011*	0.026
rs7599504	C	1	1	0.125
rs932169	C	0.979	1	0.067

与欧洲人比较, * $P < 0.05$.

表 4 对照组男女等位基因比较结果

Tab. 4 The comparison of alleles between male and female in control group

SNP	等位基因	等位基因频率	
		男性	女性
rs10181656	G	0.338	0.330
rs7568275	G	0.356	0.318
rs7574865	T	0.362	0.305
rs11889341	T	0.358	0.320
rs8179673	C	0.341	0.329
rs10168266	T	0.356	0.320

表 5 病例组和对照组年龄比较结果 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 5 The comparison of age between SLE group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	平均年龄 (岁)
对照组	389	27.41 ± 13.90
病例组	378	32.10 ± 10.04

表 6 各 SNP 位点的模型分析
Tab. 6 Model analysis of SNPs loci

SNP	模型	基因型	OR(95%IC)	P
rs10181656	显性	CC/CG	0.455(0.301–0.688)	0.000 1
		GG	1	
	隐性	CC	0.406(0.298–0.554)	1.32E–08
rs7568275	显性	CC/CG	0.491(0.324–0.746)	0.000 8
		GG	1	
	隐性	CC	0.402 (0.294–0.549)	1.03E–08
rs7574865	显性	GG/GT	0.497(0.327–0.753)	0.001
		TT	1	
	隐性	GG	0.406 (0.298–0.554)	1.21E–08
rs11889341	显性	CC/CT	0.477(0.316–0.72)	0.000 4
		TT	1	
	隐性	CC	0.413 (0.302–0.564)	2.91E–08
rs8179673	显性	CC/CT	2.391(1.752–3.261)	3.73E–08
		TT	1	
	隐性	CC	2.084 (1.376–3.158)	0.000 5
rs10168266	显性	CC/CT	0.470(0.309–0.715)	0.000 4
		TT	1	
	隐性	CC	0.471 (0.347–0.641)	1.55E–06
		CT/TT	1	

表 7 病例组及各型病例和对照组等位基因频率的比较 (rs10181656)
Tab. 7 The comparison of allele frequency between SLE group and control group

组 别	n	等位基因(%)		病例 / 对照 χ^2	P	OR	95%CI	
		G	C					
对照	389	264(33.40)	532(66.60)					
病例	378	364(49.15)	392(51.85)	36.129	5.41E–09	0.534	0.435	0.656
关节炎	245	238(48.39)	252(51.61)	30.247	4.36E–08	0.525	0.417	0.662
蝶形红斑	268	254(47.71)	282(52.29)	27.262	1.78E–07	0.551	0.440	0.690
粘膜溃疡	196	194(49.87)	198(50.13)	29.545	7.63E–08	0.506	0.396	0.648
肾损害	151	142(46.67)	160(53.33)	18.032	1.67E–05	0.559	0.427	0.732
血液改变	343	366(53.28)	320(46.72)	41.439	1.06E–09	0.434	0.352	0.535
抗 ds-DNA	50	54(53.22)	46(46.78)	16.843	3.98E–05	0.423	0.278	0.643
浆膜炎	60	70(57.14)	50(42.86)	28.510	1.02E–07	0.354	0.240	0.524
高血压	48	42(45.38)	54(54.62)	4.258	0.073	0.638	0.415	0.980
家族史	31	26(44.35)	36(55.65)	1.977	0.162	0.687	0.406	1.162
ANA	355	378(53.22)	332(46.78)	41.386	1.28E–09	0.436	0.354	0.537

等^[6,7]. STAT4 是信号转导和转录活化因子家族成员之一, 迄今为止, 在哺乳动物中已克隆出 7 个家族成员: STAT1~4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6. 该基因位于人类染色体 2q32.2-32.3, 表达主要分布于淋巴细胞、巨噬细胞及树突状细胞中, 可以被 IL-12、IL-23 以及 I 型干扰素等一些重要细胞因子所诱导. STAT4 在自身免疫模型中起到至关重要的作用. 对于 STAT4 基因多态性的研究已发现, 该基因的 rs7574865T 在高加索人群中与 SLE 相关, 这一相关性也在韩国、日本等人群中得到证实; Snaevvar Sigurdsson 等还发现 rs10181656 和 rs7582694 也与 SLE 有显著的相关性, 此外还有研究探索了该基因多态性与疾病表型 (如抗双链 DNA 抗体、肾损害以及发病年龄等) 间的相关性^[7,8].

本研究针对 STAT4 基因, 首次以云南汉族人群为研究对象, 通过探索在本种族中 STAT4 基因多态性与系统性红斑狼疮间的相关性, 实验结果显示了各 SATA4 基因 SNP 位点与 SLE 的相关性, 根据实验的结果, 12 个 SNP 遗传平衡 ($P > 0.05$), 在所测试的群体中符合遗传规律, 并且其中有 6 个 SNP 等位基因频率在云南人群 SLE 患者和正常对照组之间的差异具有统计学意义, 并以 rs10181656 最为显著且其相关程度较欧洲以及北美人群高, 关于 rs10181656 在国内尚无报道. 结果显示 STAT4 基因多态性与云南汉族人系统性红斑狼疮易感性相关, 说明它们可能与狼疮的发病有密切关系, 是狼疮的危险因素. 相关结果为进一步研究此人群 SA-TA4 基因 SNP 与某些疾病 (如病毒感染性疾病或自身免疫性疾病) 的相关性提供了依据, 通过与患病人群 SNP 比对, 有利于我们寻找疾病易感性的遗传标记, 以进一步探讨病毒感染性疾病及自身免疫性疾病的发病机制.

通过对 15 个 SNP 进行分型及统计学分析, 其等位基因频率与 HapMap 数据库中 STAT4 基因 SNP 位点进行比较, 实验所得 SNP 等位基因频率大多与汉族人群的等位基因频率接近, 而与欧洲人群的等位基因之间存在差异. 所以可以推测 STAT4 基因多态性与 SLE 易感性的关联可能存在遗传异质性, 而本研究能够更为准确地反映出中国汉族人群 STAT4 基因中单核苷酸多态性的实际情况.

通过运用单个 SNP 的疾病遗传模型研究, 可以寻找得到系统性红斑狼疮中基于这些 SNP 的可能的遗传模型. 通过比较得到的各个 SNP 显隐性模型的 P 值, 可以做出判断, 然后选择出最为理想的疾病遗传模型, 在显示各个 SNP 与系统性红斑狼疮相关性的同时, 也为疾病的发生提供了又一

辅助验证标准. 本实验通过了单个 SNP 的疾病遗传模型研究寻找到了各个 SNP 的理想疾病遗传模型. 也有研究对 3 个 SNPrs11889341、rs7574865、rs8179673 进行过遗传模型的研究, 结果发现 rs11889341、rs7574865 和 rs8179673 均是隐性模型更为合适^[6], 本研究结果是则是 rs8179673 是显性模型更为适合, 其结果可能与样本例数、地域、种族差异等有关. 将病例分层分析, 比较病例组与对照组间 rs10181656 位点 G 等位基因频率的相关性, 经卡方检验, 关节炎、蝶形红斑、粘膜溃疡、浆膜炎、肾损害、血液改变、ds-DNA、ANA 与对照组间 G 等位基因分布均有统计学意义. STAT4 基因 rs10181656 位点 G 等位基因增加了关节炎、蝶形红斑、肾损害、抗 DS-DNA、ANA、血液改变、浆膜炎患病风险.

关于 STAT4 基因在系统性红斑狼疮发病作用中的确切机制今后将进行更深入的研究.

[参考文献]

- [1] HARLEY J B, ALARCON-RIQUELME M E, CRISWELL L A, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXK, KIAA1542 and other loci[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2):204 - 210.
- [2] CRISWELL L A. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus [J]. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2008, 66(3):176 - 183.
- [3] KOIZUMI K, OKAMOTO H, IIKUNI N, et al. Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding the major histocompatibility complex class II transactivator (CIITA) in systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(6):947 - 950.
- [4] 陈顺乐, 陈嘉何. 系统性红斑狼疮[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 5, 14 - 17, 20, 43 - 45, 514, 522 - 525.
- [5] 田伟, 李立新, 郭实土, 等. 湖南汉族群体 HLA-DR2 等位基因多态性与系统性红斑狼疮的相关性研究[J]. *湖南医科大学学报*, 2000, 25(1):15 - 17.
- [6] 缪倩. IRF7、STAT4 基因与系统性红斑狼疮的关联研究[D]. 上海: 华东师范大学生命科学学院, 2009.
- [7] KARIUKI S N, KIROU K A, MACDERMOTT E J, et al. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN- α in lupus patients in vivo[J]. *J Immunol*, 2009, 182(1):34 - 38.
- [8] 柏素云, 张立民, 王翠香, 等. SATT4 基因单核苷酸多态性与系统性红斑狼疮的研究[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(2):183 - 185.

(2013-02-04 收稿)