

# 广西壮族及汉族人群 CD40L 基因 rs1126535C/T 遗传多态性的研究<sup>①</sup>

陈健明<sup>1</sup>, 吴成将<sup>1</sup>, 蓝艳<sup>2</sup>, 向阳<sup>3</sup>, 罗宏成<sup>3</sup>, 韦叶生<sup>3②</sup>

- (1. 右江民族医学院 2011 级检验本科, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院附属医院皮肤科, 广西 百色 533000;
3. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西 百色 533000)

**摘要:** **目的** 研究 CD40L 基因 rs1126535C/T 多态性各基因型及等位基因在广西汉族及壮族人群中的分布频率, 比较其在不同种族间分布的异同。**方法** 采用单碱基延伸的 DNA 测序法和 PCR 技术检测 199 例壮族人和 199 例汉族人的 CD40L 基因 rs1126535C/T 多态性, 比较两组 CD40L 基因型及等位基因的分布频率; 并结合文献资料进行不同种族间的比较和分析。**结果** 在壮族人中 CC 基因型占 5.53%、CT 基因型占 6.03%、TT 基因型占 88.44%; 在汉族人中 CC 基因型占 1.51%、CT 基因型占 4.02%、TT 基因型占 94.47%。在广西壮族人群和广西汉族人群中, CD40L 等位基因的分布频率差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而它们的基因型分布频率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 广西汉族人 CD40L 基因多态性的分布频率同欧洲、日本和非洲人群进行比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与北京人基因型分布频率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而等位基因分布频率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 在广西壮族及汉族人群中存在 CD40L 基因多态性, 其等位基因的分布频率差异都具有统计学意义, 而它们的基因型分布频率差异无统计学意义, 但与其他种族人群比较差异有统计学意义, 这种差异对于人类学及群体遗传学的研究可能起非常重要的作用。

**关键词:** CD40 配体; 基因多态性; 人种群

**中图分类号:** R394 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)06-0811-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.06.001

## Genetic polymorphism of CD40L gene rs1126535C/T in Guangxi Zhuang and Han populations

Chen Jianming<sup>1</sup>, Wu Chengjiang<sup>1</sup>, Lan Yan<sup>2</sup>, Xiang Yang<sup>3</sup>, Luo Hongcheng<sup>3</sup>, Wei Yesheng<sup>3</sup>

- (1. Undergraduate at Grade 2011, Department of Laboratory Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
3. Department of Clinical Laboratory Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To study the distribution frequencies of genotype and allele of CD40L gene rs1126535 C/T polymorphism in Guangxi Zhuang and Han populations, and to analyze the distributions of CD40L polymorphism among different races. **Methods** The CD40L gene rs1126535 C/T polymorphisms in 199 Zhuang and 199 Han populations were examined by the DNA sequencing and polymerase chain reaction—single base extension (PCR—SBE) technique. The distribution frequencies of CD40L alleles and genotypes in Zhuangs were compared with those in Hans, and compared with other ethnics reported in cited literature. **Results** The frequencies of CC, CT and TT genotypes were 5.53%, 6.03% and 88.44% in the Zhuangs; and 1.51%, 4.02% and 94.47% in the Hans, respectively. Compared the frequencies of allele distribution of CD40L gene in Zhuangs with the Hans showed that there were statistically significant differences ( $P < 0.05$ ), while compared the frequencies of genotype distribution of CD40L gene between the Zhuangs and the Hans revealed that there were no significant differences ( $P > 0.05$ ). The CD40L gene polymorphism distribution frequency in Guangxi Han population were compared with those in Japanese and Europeans and Africans, results showed that there were statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). And compared the frequency of genotype distribution in Hans of Guangxi with Beijing subjects, results showed that there were not significant differences ( $P > 0.05$ ), but there were significant differences in allele frequency distribution ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** There are CD40L gene polymorphism in Guangxi Zhuang and Han populations, the allele distribution frequencies of CD40L gene were different between the Zhuangs and the Hans, but the frequencies of genotype distribution of CD40L gene were similar in the Zhuangs and the Hans, and compared with other ethnic groups there is a significant difference, this difference might play an important role in the study of Anthropology.

① **基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81260234);广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFA018198);广西卫生厅重点科研课题(重 2012086)

② **通讯作者,** E-mail: 18777615132@163.com

gy and anthropological research .

**Key words:** CD40 ligand; gene polymorphism; ethnic groups

CD40L 是一种 II 型跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员,表达于免疫细胞、平滑肌细胞、内皮细胞、血小板等多种细胞上,参与免疫、炎症、高凝等多种病理生理状态的调控,与其配体 CD40 分子相互作用,在肿瘤细胞的抗原呈递、免疫应答反应和细胞的分裂增殖调控等方面发挥着日益重要作用<sup>[1-3]</sup>。编码 CD40L 的基因位于染色体 Xq26 上。CD40L 基因存在着基因变异及基因多态性,这种基因的变异和多态性与人类动脉粥样硬化性疾病、X-连锁高 IgM 综合征(XHIM)、阿尔茨海默氏病及格雷夫斯病(GD)的联系,已经逐步成为国内外学者研究的热点<sup>[4-8]</sup>。为此,我们采用 DNA 序列测定法和单碱基延伸 PCR 技术,对 CD40L 基因进行多态性研究,对认识遗传因素的发病作用具有重大意义;同时,确定其在正常人群中的分布,将为人类遗传学的研究提供基础性的资料。

1 对象与方法

1.1 研究对象 随机选取在右江民族医学院附属医院体检健康者,且相互间无血缘关系。广西地区壮族人 199 例,其中男 116 例,女 83 例,年龄 25~83 岁;汉族 199 例,其中男 108 例,女 91 例,年龄 22~86 岁。血常规、空腹血糖及其他生化指标均在参考值范围内,心电图检查正常,排除肾脏、肝脏、内分泌及心脑血管等疾病。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集体检健康者静脉血 3 ml,用乙二胺四乙酸二钾抗凝;采用已建立的 PaxGene 血液 DNA 提取试剂盒<sup>[9]</sup>进行白细胞的基因组 DNA 的提取,在-70℃条件下保存备用。

1.2.2 引物的设计与合成 根据 CD40L 基因位点 rs1126535C/T 多态性及已知的 DNA 序列设计 PCR 引物,引

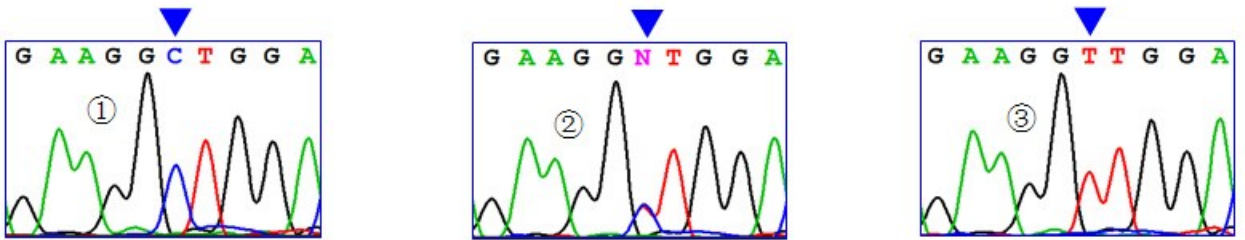
物的合成由上海天昊生物科技有限责任公司完成。采用特异性扩增 CD40L 基因位点 rs1126535C/T 碱基的 DNA 片段的引物,上游引物序列为:5'-GGACTGCCCATCAGCATGAAA-3';下游引物序列为:5'-TCCATCATTGGGTAGAACCAACCT-3';延伸引物序列为:5'-TTTTTTTTTTT-TACTTTTTGCTGTGTATCTTCATAGAAGG-3'。

1.2.3 PCR 扩增 CD40 的 PCR 扩增反应体系为 20 μl,其中含 10×PCR 缓冲液 2.0 μl,0.3 mmol/L dNTPs 2.0 μl,上、下游引物各 1.0 μl,模板 DNA 1.0 μl,TaqDNA 聚合酶 1.0 u,不足体积用经过两次标准程序高压灭菌的双蒸水补足至 20 μl。PCR 产物用 Qiagen 公司的 HotStarTaq 进行多重 PCR 获得,PCR 产物经虾碱酶(SAP)(from Promega)和外切酶 I (EXO I)(from Epicentre)纯化后用 ABI 公司的 SNaPshot Multiplex kit 进行延伸反应。延伸产物用虾碱酶(SAP)(from Promega)纯化后在 ABI3130XL 上样。单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms,SNP)分型用 GeneMapper4.0(Appliedbiosystems)来分析。

1.3 统计分析 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析,以率来表示计数资料。等位基因和基因型的频率采用基因直接计数法来计算,采用 χ<sup>2</sup> 检验或 Fisher 确切概率法对各组间等位基因和基因型的频率进行对比,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD40L 基因型检测结果 CD40L 基因 rs1126535C/T 多态性,PCR 扩增产物片段大小为 190bp。经 ABI3130XL 基因检测仪 SNP 分型结果显示 rs1126535C/T 位点检测到 CC、CT 和 TT 三种基因型。经过基因测序后得到的数据进一步证实我们所检测到的结果,见图 1。



注:①、②、③分别表示 CC、CT 和 TT 基因型;箭头所示为基因突变位点

图 1 CD40L 基因 rs1126535C/T 测序图

2.2 CD40L 基因多态性在壮、汉两民族人群中分布频率的比较 计算广西壮、汉两民族健康人群中 CD40L 等位基因和基因型的频率,采用 χ<sup>2</sup> 检验进行计算,CD40L 基因 rs1126535C/T 位点的等位基因和基因型频率均符合哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)遗传平衡定律,说明我们所选取的研究样本具有群体代表性。其中 rs1126535C/T 位点的基因型在广西壮族和广西汉族中均以 TT 型最为多见,分别占 88.44%和 94.47%。其等位基因和基因型频率分布在男女性别之间比较差异无统计学意义(P>0.05);广西壮族及汉族人群中 CD40L 基因型频率差异无统计学意义(P>0.05),见表 1。

2.3 CD40L 基因多态性在不同种族人群间的比较 广西汉族人群 CD40L 基因型和等位基因频率分别与欧洲人、日本人、非洲人比较差异均有统计学意义(P<0.05);而与北京人及广西壮族人比较基因型频率差异无统计学意义(P>0.05),等位基因频率差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 1 广西壮族和汉族人群 CD40L 基因 rs1126535C/T 基因型和等位基因分布频率的比较 (n,%)

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
壮族人						
男性	116	5 (4.31)	8 (6.90)	103 (88.79)	18 (7.76)	214 (92.24)
女性	83	6 (7.23)	4 (4.82)	73 (87.95)	16 (9.64)	150 (90.36)
合计	199	11 (5.53)	12 (6.03)	176 (88.44)	34 (8.54)	364 (91.46)
汉族人						
男性	108	3 (2.78)	4 (3.70)	101 (93.52)	10 (4.63)	206 (95.37)
女性	91	0 (0.00)	4 (4.40)	87 (95.60)	4 (2.20)	178 (97.80)
合计	199	3 (1.51)	8 (4.02)	188 (94.47)	14 (3.52)	384 (96.48)

注:CD40L 基因型及等位基因频率在壮族与汉族人之间比较、同组男女组间比较差异均无统计学意义(P>0.05)

表 2 不同种族及地区人群 CD40L 基因 rs1126535C/T 多态性分布频率 (n, %)

种族	n	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
欧洲人 <sup>a</sup>	22632	(14.16)	28 (12.39)	166 (73.45)	92 (20.35)	360 (79.65)
北京人 <sup>b</sup>	86	4 (4.65)	8 (9.30)	74 (86.05)	16 (9.30)	156 (90.70)
日本人 <sup>a</sup>	172	16 (9.30)	14 (8.14)	142 (82.56)	46 (13.37)	298 (86.63)
非洲人 <sup>a</sup>	226	14 (6.19)	26 (11.50)	186 (82.30)	54 (11.95)	398 (88.05)
广西壮族人	199	11 (5.53)	12 (6.03)	176 (88.44)	34 (8.54)	364 (91.46)
广西汉族人	199	3 (1.51)	8 (4.02)	188 (94.47)	14 (3.52)	384 (96.48)

注: CD40L 基因型及等位基因频率与广西汉族人比较, a:  $P < 0.05$ ; CD40L 等位基因频率与广西汉族人比较, b:  $P < 0.05$

### 3 讨论

生物群体基因多态性现象十分普遍,其中,对人类基因的结构、表达和功能,研究比较深入。基因多态性研究为探索疾病的产生和发展机制以及表型多样化产生的本质开辟了一个全新的领域。在人类基因结构和功能的研究成果日新月异的形势下,对多基因参与的一些常见病,通过候选基因来综合分析疾病的发病机制,从而有效预防疾病发生是未来预防医学一个重要的研究方向,也是目前将人类基因结构性研究成果应用于预防医学的一个较为现实的途径。广西是壮族的聚集地,通过对壮族和汉族两个不同民族 CD40L 基因多态性的研究,有助于发现基因多态性在不同种族人群中的分布规律,从而为探索一些疾病在不同种族间的遗传规律,提供前瞻性的基础资料。

CD40L 又称 CD154 即 CD40 的配体,属于肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员,与 CD40 分子相互作用,在肿瘤细胞的抗原呈递、免疫应答反应和细胞的增殖调控方面发挥着重要作用。在上皮细胞、单核细胞、B 细胞、NK 细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等都有 CD40L 的表达,但主要表达于活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞和血小板。CD40L 与高亲和力的 CD40 结合,对 T/B 细胞活化和细胞因子的产生起诱导作用,可激活血管内皮细胞表达细胞间黏附分子-1、E 选择素上调,吸引血中的白细胞向血管壁聚集<sup>[10]</sup>。CD40L 还能促进  $\alpha\beta$ -42 诱导的小胶质细胞表面表达 CD40 和 MHC II 分子显著增加。促进其向抗原提呈功能的转化,促进适应性免疫应答反应,继而加剧对神经元的损伤<sup>[11]</sup>,参与多种疾病的发生和发展。了解相关疾病的发病机制与 CD40L 多态性的关系,将为疾病的预防和临床实践提供理论依据。编码 CD40L 基因位于 X 染色体 q26.3-q27.1 上,包含 5 个外显子和 4 个内含子,其编码蛋白产物含有 266 个氨基酸。CD40L 基因存在 rs1126535C/T 的单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNP),此种基因多态性的存在可能影响着 CD40L 基因的某些功能,进而影响着同 CD40L 有关疾病的产生和进展,因而,对 CD40L 基因多态性在不同种族和不同地域人群中分布规律的研究和分析,为持续研究 CD40L 基因多态性在不同种族人群中同某些疾病的产生以及进展之间的相关性提供了一些分子遗传学的基础性资料。

本文通过采取了单碱基延伸 PCR 技术(PCR-SBE)对来自广西壮族自治区的壮族和汉族健康人群 CD40L 基因 rs1126535C/T 位点多态性的分布情况进行检测,从我们检测的结果可以看出,在壮族人中 CC 基因型 5.53%、CT 基因型占 6.03%、TT 基因型占 88.44%;在汉族人中 CC 基因型占 1.51%、CT 基因型占 4.02%、TT 基因型占 94.47%。在广西壮族及汉族人群中 CD40L 基因型频率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),其等位基因和基因型频率分布在男女性别间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。我们将来自中国广西壮族自治区的壮族和汉族人同来自欧洲、非洲、日本、北京等人群基因多态性研究结果进行比较和分析后可以看出,在我国广西壮族自治区的健康人群中,我们发现 CD40L 基因 rs1126535C/T 位点

壮族的 T 等位基因频率(91.46%)和汉族 T 等位基因的频率(96.48%),均明显高于欧洲人(79.65%),高于北京人(90.70%),高于非洲人(88.05%),高于日本人(86.63%),其中欧洲人、日本人和非洲人与汉族人比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),广西汉族人基因型分布频率同北京人比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而等位基因分布频率差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。出现这种情况的原因可能与所处的环境不同,饮食生活习惯等各有所致;从本文统计结果可以明显看出,在不同种族中,CD40L 等位基因的频率和基因型的分布频率存在着明显的差异。

总之,探索我国壮族与汉族人群中 CD40L 基因多态性的分布及其与相关疾病发病机制的关系,有助于发现基因多态性在不同种族人群中的分布规律,为与 CD40L 相关疾病的预防及临床实践提供可靠理论依据;同时,确定其在正常人群中的分布,将为人类遗传学的研究提供基础性的资料。

### 参考文献:

- [1] Liljenfeldt L, Yu D, Chen L, et al. A hexon and fiber-modified adenovirus expressing CD40L improves the antigen presentation capacity of dendritic cells[J]. J Immunother, 2014, 37(3): 155-162.
- [2] Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, et al. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling[J]. Leukemia, 2012, 26(1): 139-148.
- [3] Garcia-Marquez MA, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S. A multimerized form of recombinant human CD40 ligand supports long-term activation and proliferation of B cells[J]. Cytotherapy, 2014, 16(11): 1537-1544.
- [4] 吴甜,郭韧,张毕奎. CD40/CD40L 基因及其多态性与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中南大学学报:医学版, 2012, 37(4): 413-418.
- [5] Zhang B, Wu T, Chen M, et al. The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease[J]. Immunol Lett, 2013, 153(1-2): 58-61.
- [6] Liu PN, Li H, Li Q, et al. A novel mutation in the CD40 ligand gene in a Chinese boy with X-linked hyper-IgM syndrome[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2014, 32(3): 270-274.
- [7] Giunta B, Rezai-Zadeh K, Tan J. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2010, 9(2): 149-155.
- [8] Yamamoto K, Itoh M, Okamura T, et al. Relative levels of the inflammatory cytokine TNF $\alpha$  and the soluble CD40 ligand profile in serum correlate with the thyrotoxic activity of Graves' disease[J]. Thyroid, 2012, 22(5): 516-521.
- [9] Murray JR, Rajeevan MS. Evaluation of DNA extraction from granulocytes discarded in the separation medium after isolation of peripheral blood mononuclear cells and plasma from whole blood[J]. BMC Res Notes, 2013, 6: 440.
- [10] Urban D, Thanabalasingam U, Stibenz D, et al. CD40/CD40L interaction induces E-selectin dependent leukocyte adhesion to human endothelial cells and inhibits endothelial cell migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(1): 448-52.
- [11] 王宝萍,李东风,胡方方. CD40L 在阿尔茨海默病中的免疫调节作用[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2012, 38(5): 310-313.

收稿日期: 2014-10-21; 修回日期: 2014-11-07