

文章编号 1006-8147(2016)02-0111-04

论 著

## 候选基因单核苷酸多态性与天津汉族人群甲状腺功能减退症相关性研究

王文强<sup>1</sup>, 张琪<sup>1</sup>, 谭龙<sup>1</sup>, 唐彩云<sup>1</sup>, 刘圣美<sup>1</sup>, 陈雯<sup>1</sup>, 沈钧<sup>2</sup>, 张万起<sup>1</sup>

(天津医科大学公共卫生学院 1.营养与食品卫生学系;2. 卫生化学教研室,天津 300070)

**摘要** 目的:探索候选 SNP 位点与天津汉族人群甲状腺功能减退症(甲减)易感性的关系,寻找影响甲状腺功能的 SNP 位点。方法:采用病例对照研究,在天津地区共收集 336 例甲减病例和 328 例体检健康的对照人群,收集静脉血 5 mL,采用 Sequenom MassARRAY 技术对 *PTC*、*VAV3*、*FOXO1*、*KIT*、*CCBE1* 基因及其附近区域上的 8 个位点进行基因分型。结果:基于等位基因的性别分层分析显示,在男性中,仅 *VAV3* 基因的位点 rs4915077 与甲减的易感性显著相关, $P=0.027$ 。而在女性中,*VAV3* 基因的 rs1472565、*KIT* 基因附近的 rs17827152 和 *CCBE1* 基因上的 rs4940904 位点与甲减的易感关联性极为显著, $P$  分别为 0.001、0.012 和 0.023。基于基因型性别分层分析显示,仅在女性中发现 *KIT* 基因的 rs17827152 与甲减有显著关联性, $P=0.034$ 。多因素 Logistic 回归分析显示,在男性中,rs4915077 位点具有统计学意义( $P=0.04$ ),其回归模型的偏回归系数  $\beta=-0.544$ 。在女性中,仅 rs17827152 位点具有统计学意义( $P=0.011$ ),偏回归系数  $\beta=-0.723$ 。结论:在天津汉族男性中,*VAV3* 基因的 rs4915077 位点多态性与甲减的易感性相关,而在女性中,*VAV3* 基因的 rs1472565、*KIT* 基因的 rs17827152 和 *CCBE1* 基因的 rs4940904 位点多态性均与甲减的易感性相关。

**关键词** 甲状腺功能减退症;基因多态性;单核苷酸;关联分析

中图分类号 R581.2

文献标志码 A

### Association between single nucleotide polymorphism loci of candidate gene and hypothyroidism in Tianjin Han population

WANG Wen-qiang<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>, TAN Long<sup>1</sup>, TANG Cai-yun<sup>1</sup>, LIU Sheng-mei<sup>1</sup>, CHEN Wen<sup>1</sup>, SHEN Jun<sup>2</sup>, ZHANG Wan-qi<sup>1</sup>

(1.Department of Nutrition and Food Hygiene;2.Department of Health and Chemistry, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To explore the relationship between the candidate single nucleotide polymorphism (SNPs) regulating thyroid function and the hypothyroidism (HT) susceptibility of Tianjin Han population, and to search the SNP loci which affecting the thyroid function. **Methods:** A case-control study was used and a total of 336 HT patients and 328 normal individuals were interviewed with 5 mL venous blood in Tianjin. The 8 SNP loci located in *PTC*, *VAV3*, *FOXO1*, *KIT*, *CCBE1* genes were genotyped with Sequenom MassARRAY Technology. **Results:** Results of the alleles of gender stratification analysis showed that only rs4915077 in *VAV3* gene was associated with HT,  $P=0.027$  in male. However, among female the rs1472565 in *VAV3* gene, rs17827152 in *KIT* gene and rs4940904 in *CCBE1* were associated with HT susceptibility, and  $P$  values were 0.001, 0.012 and 0.023, respectively. Results of the genotypes of gender stratification analysis showed that only rs17827152 in *KIT* gene was associated with HT susceptibility, and  $P$  value was 0.034 in female. The logistic regression analysis showed that rs4915077 in *VAV3* gene was statistically significant ( $P=0.04$ ), and the partial regression coefficient was  $-0.544$  in male population. In female, only rs17827152 in *KIT* gene was statistically significant ( $P=0.011$ ), and the partial regression coefficient was  $-0.723$ . **Conclusion:** Rs4915077 in *VAV3* gene is associated with HT susceptibility in Tianjin Han male and rs1472565 in *VAV3* gene, rs17827152 in *KIT* gene and rs4940904 in *CCBE1* are associated with HT susceptibility in female population.

**Key words** hypothyroidism; polymorphism; single nucleotide; association analysis

原发性甲状腺功能减退症(甲减)是由甲状腺本身病变引起的甲状腺疾病,是一种常见的激素缺

乏性内分泌疾病,患者的下丘脑、垂体无病变,以血清游离三碘甲状腺原氨酸( $FT_3$ )、游离甲状腺素( $FT_4$ )水平减低,促甲状腺素(TSH)水平增高为特征,临床表现多样,包括有畏寒、体质量增加、皮肤干燥、便秘、心动过缓、声音嘶哑、反应迟缓等<sup>[1-2]</sup>。此类疾病可以由很多原因引起,主要原因有甲状腺

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81330064, 81273057),天津市科委科技支撑项目(14ZCZDSY00022)

作者简介 王文强(1987-),男,硕士在读,研究方向:营养与食品卫生学;通信作者:张万起, E-mail: wqzhang126@126.com。

不发育或发育不全、甲状腺激素合成酶缺陷、长期缺碘、甲状腺手术、放射性碘<sup>131</sup>治疗、甲状腺炎、抑制甲状腺激素生成的药物以及调控功能的基因突变等<sup>[3-5]</sup>。其中,基因突变因素所导致的甲减越来越受到学者们的关注。自从2005年以来,全基因组关联研究(GWAS)确立了900多类基因变异与200多个疾病之间的相关研究<sup>[6-9]</sup>,其中包括关于甲减的全基因组关联性研究,Joshua等<sup>[10]</sup>的GWAS研究发表于2011年,首次揭示了*FOXE1*基因附近遗传区域与甲减的关联性。由于不同地域、不同环境下的甲减的患病率和病因差异很大,加之上述GWAS研究均是针对西方高加索人种进行的,发现的阳性突变位点是否适用于天津汉族黄色人种尚不可知。因此,为了解天津汉族人群甲减患者的遗传病因,本研究对GWAS报道出来的8个SNP位点在天津汉族人群中进行验证,探讨这些位点多态性与天津汉族人群甲状腺功能减退症之间的关联性。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 本研究所选对象为2013年2月-2014年2月由天津医科大学总医院确诊的336例甲减患者作为病例组,体检健康的328例人群作为对照组。

1.2 血液标本的收集与储存 收集病例组和对照组人群的外周促凝血5 mL,弃血清,收集1~2 g血凝块于Eppendorf管中,保存在-80℃冰箱。获得天津医科大学伦理委员会批准,被调查者均对本研究知情同意并签署知情同意书。

1.3 SNP位点的选择 根据阅读中外相关文献,内容主要涉及基因与甲状腺功能减退症的关联性研究,从国外已报道过的*PTC*、*VAV3*、*FOXE1*、*KIT*、*CCBE1*基因中筛选出8个候选SNP位点,探讨其与中国汉族人群甲状腺功能减退症的关联性。

1.4 统计学方法 采用SPSS 19.0进行数据分析,正态分布资料(年龄、 $FT_3$ 、 $FT_4$ )采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数比较采用 $t$ 检验。非正态分布资料(TSH)采用中位数( $M$ )和四分位间距( $P_{25}\sim P_{75}$ )表示,非正态分布资料的比较采用秩和检验。分类变量(性别)的两组率的比较采用 $\chi^2$ 检验,分析时还使用了多因素Logistic回归分析。

## 2 结果

2.1 调查对象的一般情况 病例组与对照组人群年龄因素经 $t$ 检验后差异无统计学意义,但 $\chi^2$ 检验后性别上有统计学意义( $P<0.001$ ),后续将使用性别分层分析排除混杂因素影响。调查对象的血清 $FT_3$ 、 $FT_4$ 和TSH水平见表1。

表1 研究对象的一般特征及甲状腺激素水平对比

Tab 1 General characteristics and thyroid hormone levels of the subjects

组别	$n$	年龄/岁 $\bar{x}\pm s$	性别 (男/女)	$FT_3$ /(pmol/L) $\bar{x}\pm s$	$FT_4$ /(pmol/L) $\bar{x}\pm s$	TSH/(mIU/L) ( $M, P_{25}\sim P_{75}$ )
病例	336	43.01 $\pm$ 14.2	46/290	3.52 $\pm$ 1.37	10.18 $\pm$ 5.81	31.28(9.58~79.05)
对照	328	41.37 $\pm$ 17.1	127/201	5.29 $\pm$ 0.64	15.85 $\pm$ 1.92	2.00(1.45~2.95)
统计值		1.358	55.85	-21.458	-17.038	-20.504
$P$		0.175	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.2 单个SNP位点的病例对照分析

2.2.1 基于单个SNP位点等位基因的性别分层分析 以性别作为分层因素,将8个SNP的等位基因与甲减的患病风险进行关联分析。结果显示,在男性中,仅位点rs4915077与甲减患病风险之间存在显著的关联性, $P$ 为0.027。在此位点中,等位基因T和C在病例组和对照组中的分布为61/31和198/56, $P<0.05$ ,表明野生型等位基因T的存在可能减少患甲减的风险,而突变的等位基因C可增加甲减的易感性, $OR$ 为0.56(0.33~0.94)。然而在女性患者中,位点rs1472565,rs17827152和rs4940904与甲减的易感关联性均极为显著, $P$ 分别为0.001,0.012和0.023。对于位点rs1472565来说,等位基因T和C

在病例组和对照组中的分布为320/260和156/246, $P<0.05$ 。表明等位基因T的存在增加了女性患甲减的风险, $OR$ 为1.94(1.49~2.51)。对于rs17827152来说,等位基因G和A在病例组和对照组中的分布为528/52和383/19, $P<0.05$ 。表明野生型等位基因G的存在可减少患甲减的风险,是保护因素, $OR$ 为0.51(0.29~0.87)。在位点rs4940904中,等位基因T和C在病例组和对照组中的分布为211/369和118/284, $P<0.05$ 。表明突变型等位基因T的存在增加了女性患甲减的风险, $OR$ 值1.38(1.05~1.81)(表2)。

2.2.2 基于SNP位点基因型的性别分层分析 每个SNPs位点均有2~3种基因型,将研究对象中3种

基因型的分布进行列联表 $\chi^2$ 检验,根据  $P$  值判断基因型与甲减的易感性之间是否存在关联。结果显示, 仅在女性中, *KIT* 基因附近的 rs17827152 位点与甲减的易感性存在显著关联性,此位点的 GG、GA 和 AA 3 种基因型在病例组 and 对照组中的分布为

239/50/1 和 182/19/0,  $P=0.034$ 。表明该位点处的基因型多态性与女性甲减的易感性密切相关,而杂合基因型 GA 和突变基因型 AA 可能是女性甲减患病率高的危险因素。而男性的候选位点的基因型均未发现与甲减症相关联(表 3)。

表 2 基于单个 SNP 位点等位基因的性别分层分析

Tab 2 Gender stratification analysis based on single SNP

基因	SNP	等位基因	男性				女性			
			病例	对照	OR(95%CI)	P	病例	对照	OR(95%CI)	P
<i>FOXE1</i>	rs7850258	G/A	86/6	238/16	0.96(0.37~2.54)	0.941	539/41	386/26	0.89(0.53~1.47)	0.220
<i>KIT</i>	rs17827152	G/A	86/6	232/22	0.78(0.35~1.71)	0.533	528/52	383/19	0.51(0.29~0.87)	0.012 <sup>a</sup>
<i>PTC</i>	rs965513	G/A	86/6	238/16	0.96(0.37~2.54)	0.942	539/41	386/26	0.89(0.53~1.47)	0.220
<i>VAV3</i>	rs4915077	T/C	61/31	198/56	0.56(0.33~0.94)	0.027 <sup>a</sup>	398/182	293/109	0.81(0.61~1.08)	0.150
<i>VAV3</i>	rs1472565	T/C	51/41	134/120	1.05(0.85~1.31)	0.663	320/260	156/246	1.94(1.49~2.51)	0.001 <sup>a</sup>
<i>FOXE1</i>	rs925489	T/C	86/6	238/16	0.96(0.37~2.54)	0.941	539/41	386/26	0.89(0.53~1.47)	0.220
<i>PTC</i>	rs10759944	G/A	86/6	238/16	0.96(0.37~2.54)	0.941	539/41	386/26	0.89(0.53~1.47)	0.220
<i>CCBE1</i>	rs4940904	T/C	28/64	103/151	0.64(0.39~1.07)	0.090	211/369	118/284	1.38(1.05~1.81)	0.023 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$

表 3 基于 SNP 位点基因型的性别分层分析

Tab 3 Gender stratification analysis based on SNP genotypes

基因	SNP	基因型	男性				女性			
			病例	对照	$\chi^2$	P	病例	对照	$\chi^2$	P
<i>FOXE1</i>	rs7850258	GG/GA/AA	41/4/1	113/12/2	0.091	0.956	250/39/1	175/26/0	0.727	0.695
<i>KIT</i>	rs17827152	GG/GA/AA	37/8/1	107/18/2	0.362	0.835	239/50/1	182/19/0	6.732	0.034 <sup>a</sup>
<i>PTC</i>	rs965513	GG/GA/AA	41/4/1	113/12/2	0.091	0.956	250/39/1	175/26/0	0.727	0.695
<i>VAV3</i>	rs4915077	TT/TC/CC	22/17/7	79/40/8	2.944	0.229	139/120/31	106/81/14	2.38	0.304
<i>VAV3</i>	rs1472565	TT/TC/CC	17/17/12	33/68/26	3.782	0.151	87/146/57	60/105/36	0.275	0.842
<i>FOXE1</i>	rs925489	TT/TC/CC	41/4/1	113/12/2	0.091	0.956	250/39/1	175/26/0	0.727	0.695
<i>PTC</i>	rs10759944	GG/GA/AA	41/4/1	113/12/2	0.091	0.956	250/39/1	175/26/0	0.727	0.695
<i>CCBE1</i>	rs4940904	TT/TC/CC	6/16/24	23/57/47	3.266	0.119	39/133/118	28/82/91	1.302	0.522

<sup>a</sup> $P<0.05$

2.2.3 基于性别分层的多因素 Logistic 回归分析 运用非条件多因素 Logistic 回归分析的方法,在男性和女性中分析年龄和 8 个 SNP 位点共 9 个因素与甲减罹患风险的关系。采用向前逐步分析法,共筛选出两个有统计学意义的变量。在男性中,位点 rs4915077 的 OR 为 0.581 (0.345~0.976),  $P=0.04$ ,表明野生基因型 TT 携带者患甲减的风险低于突变型 TC 的人群,偏回归系数  $\beta$  为-0.544,野生基因型 TT 是保护因素。而在女性中,位点 rs17827152 的 OR 为 0.485(0.278~0.848),  $P=0.011$ ,表明野生基因型 GG 携带者患甲减的风险低于突变基因型 GA 的人群,偏回归系数  $\beta$  为-0.723,野生基因型 TT 也是保护因素(表 4)。

表 4 基于性别分层的多因素 Logistic 回归分析

Tab 4 The multi-factor Logistic regression analysis based on gender stratification

性别	协变量	$\beta$	P	OR(95%CI)
男性	rs4915077	-0.544	0.040	0.581(0.345~0.976)
女性	rs17827152	-0.723	0.011	0.485(0.278~0.848)

3 讨论

甲状腺功能减退症是由于甲状腺激素合成及分泌减少,或其生理效应不足所致机体代谢降低的一种疾病。近年来,随着生活节奏的加快、饮食结构的改变以及诊断技术的提高,甲状腺功能减退症的检出率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。目前对于该病因的研究多集中在先天性甲状腺发育不全、手术或药物、碘的摄入不足或过量所致、甲状腺激素合成酶缺陷等几个



方面,其中对于此病症遗传因素的研究越来越受到重视。有研究证明,人群血清甲状腺激素和促甲状腺激素的个体间的变异大约有 40%~65% 归因于遗传变异<sup>[12]</sup>。由此提示我们,对于甲减遗传易感因素的研究将有助于该病复杂病因的深入挖掘和探讨,为其病因的研究提供新的思路和线索。随着 GWAS 技术的流行,每个疾病领域都在做基因组的 SNP 分析。在不同种族、不同的地域上甲减的患病率存在明显的差异,这可能是由于不同人群的致病遗传和环境因素分布差异造成的,因此,在非高加索人种的天津汉族人群中进行该病的遗传探索势在必行。Joshua 等<sup>[10]</sup>的研究从 5 个电子病历数据库中纳入了 1 317 名甲减患者和 5 053 名甲状腺功能正常的对照为研究对象,揭示了 *FOXE1* 基因附近遗传区域与甲减病症的关联性,并发现 rs7850258 位点与甲减的易感性最为显著<sup>[10]</sup>,但我们的研究并未验证出此二者间的关联性,*FOXE1* 基因附近的 rs7850258 位点在东亚人群中的频率明显较高加索人种低,而且关联研究本就是基于位点间存在的连锁不平衡原理而来,未发现关联性也说明由于该位点在中国汉族人群中出现的频率低所致连锁不平衡现象不显著。Jyt 等<sup>[13]</sup>以网络问卷调查为临床资料收集方法,研究对象为 3 736 名甲减患者和 35 546 名甲状腺功能正常对照,该研究定位了 5 个与甲减病症相关的遗传位点:*PTPN22* 基因附近的 rs6679677、*SH2B3*-rs3184504、*HLA -1*-rs2517532、*VAV3* 基因附近的 rs4915077、rs1472565 和 *FOXE1* 基因附近的 rs925489。其中,位点 rs4915077 在天津汉族男性人群中得到了验证,*VAV3* 基因上的位点 rs1472565 在女性人群中得到验证,此二者与甲减的易感性存在显著性的相关。遗憾的是 rs925489 并未在此研究中得到证实,这可能也是由于其基因频率在中国汉族人群和高加索人种之间存在差异所致。候选基因关联研究也发现 *PTPN22* 基因、*HLA* 基因、*CTLA4* 基因和 8q23-24 区域与自身免疫性甲状腺功能减退的关联性。此外,国外学者关于与血清 TSH 水平相关的 GWAS 也定位了多个遗传位点,包括 *PDE8B* 基因、*FOXE1* 基因、*PDE8B* 基因、*CAPZB* 基因、*CCBE1* 基因和 *NKX2-1* 基因以及 4p12-*KIT* 基因附近遗传区域<sup>[14-16]</sup>,而且此次 *KIT* 附近的 rs17827152 位点和 *CCBE1* 基因上 rs4940904 位点在天津汉族女性人群中与甲减的关联性得以证实。

综上所述,本研究发现,在天津男性人群中,*VAV3* 基因附近的位点 rs4915077 多态性与甲减的易感性显著相关,可能是男性易患甲减的危险因素。

而在天津女性人群中,我们验证出 *VAV3* 基因上 rs1472565、*KIT* 附近基因上 rs17827152 和 *CCBE1* 基因上 rs4940904 位点的多态性与甲减的易感性显著相关,可能拥有此基因位点的女性更易感甲减。

#### 参考文献:

- [1] Connor S E, Penney C C. MRI in the differential diagnosis of a sellar mass[J]. Clin Radiol, 2003, 58(1):20
- [2] 张文礼, 马建华. 66 例甲状腺功能减退症患者的特殊临床表现及误诊漏诊分析[J]. 重庆医学, 2010, 24(24):3380
- [3] Almandoz J P, Gharib H. Hypothyroidism: etiology, diagnosis, and management[J]. Med Clin North Am, 2012, 96(2):203
- [4] Burch H B, Burman K D, Cooper D S. A 2013 survey of clinical practice patterns in the management of primary hypothyroidism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(6):2077
- [5] 翟彪, 郭海. 原发性甲状腺功能减退症的病因分析[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(8):85
- [6] Hindorf L A, Sethupathy P, Junkins H A, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(23):9362
- [7] Malinowski J R, Denny J C, Bielinski S J, et al. Genetic variants associated with serum thyroid stimulating hormone (TSH) levels in European americans and African americans from the eMERGE network[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e111301
- [8] Mccarty C A, Chisholm R L, Chute C G, et al. The eMERGE network: a consortium of biorepositories linked to electronic medical records data for conducting genomic studies[J]. BMC Med Genomics, 2011, 4(1):13
- [9] Pathak J, Kiefer R C, Bielinski S J. Applying semantic web technologies for phenome-wide scan using an electronic health record linked Biobank[J]. J Biomed Semantics, 2012, 3(1):10
- [10] Joshua C. Variants near *FOXE1* are associated with hypothyroidism and other thyroid conditions:using Electronic Medical Records for Genome-and Phenome-wide studies[J]. Clin Genet, 2011, 63(6):529
- [11] Korzeniewski S J, Kleyn M, Young W I, et al. Screening for congenital hypothyroidism in newborns transferred to neonatal intensive care[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2013, 98(4):F310
- [12] Frost M, Petersen I, Hegedüs L, et al. Regulation of the Pituitary-Thyroid axis in adulthood is not related to birth weight:evidence from extremely birth weight discordant monozygotic Danish twin pairs[J]. Thyroid, 2013, 23(7):785
- [13] Jyt N E, Kiefer A K, David A H, et al. Novel associations for hypothyroidism include KnownAutoimmune risk loci[J]. PLoS One, 2012, 23(7):785
- [14] Criswell L A, Pfeiffer K A, Lum R F, et al. Analysis of families in the multipleautoimmunediseasegeneticsconsortium(MADGC)collection: the *PTPN22* 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes[J]. Am J Hum Genet, 2005, 76(4):561
- [15] Simmonds M J, Gough S C L. The search for the genetic contribution to autoimmune thyroid disease:the never ending story[J]. Brief Funct Genomics, 2011, 10(2):77
- [16] Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future[J]. Thyroid, 2010, 20(7):715

(2015-11-05 收稿)