

رابطه پلی مورفیسم ژن رمز کننده آنتی ژن 4 وابسته به لئوسیت T سیتوتوکسیک با بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک

مهديه شجاع^{1,2}؛ پاتريشيا خشايار²؛ مهسا آملی³؛ مهرداد آقايی^{4*}؛ مصطفی قربانی⁵؛ محمود اکبريان⁶؛ ندا رنجبرپور⁷؛ ارغوان کورش نیا³

چکیده

زمینه: آنتی ژن 4 وابسته به لئوسیت T سیتوتوکسیک (CTLA-4) نقش مهمی در تنظیم فعالیت سلولهای T ایفا می کند. پلی مورفیسم های این ژن با اختلالات خودایمنی مختلفی نظیر لوپوس اریتماتوی سیستمیک مرتبط هستند. هدف از این مطالعه، بررسی رابطه پلی مورفیسم T:C 1722 با بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک می باشد. روش ها: 180 فرد بیمار و 304 فرد سالم وارد مطالعه شدند. دو گروه از لحاظ سن و قومیت همسان بودند، جهت تعیین فراوانی آلل ها و ژنوتیپ ها از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد و داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یافته ها: هیچ گونه ارتباط معناداری بین بیماری، آلل ها و ژنوتیپ های مختلف یافت نشد. نتایج نشان داد بین ژنوتیپ TT و سنین 45-15 سال ارتباط معناداری وجود دارد ($P < 0/0001$). اما رابطه سایر ریسک فاکتورها با ژنوتیپ های مختلف معنادار نبود. نتیجه گیری: پلی مورفیسم T:C 1722 ارتباطی با ابتلا به بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک ندارد.

کلیدواژه ها: لوپوس اریتماتوی سیستمیک، پلی مورفیسم، پروموتور، CTLA-4 1722 T:C

«دریافت: 1392/4/9 پذیرش: 1392/8/7»

1. معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان
 2. مرکز تحقیقات استئوپوروز، پژوهشکده غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 3. پژوهشکده غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 4. گروه روماتولوژی، مرکز تحقیقات بافت همبند، استخوان و مفاصل، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان
 5. گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز و عضو مرکز تحقیقات بیمای های غیرواگیر، پژوهشکده علوم جمعیتی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 6. مرکز تحقیقات روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 7. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران
- * عهده دار مکاتبات: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه روماتولوژی، مرکز تحقیقات بافت همبند، استخوان و مفاصل، تلفن: 01714421654 Email: shojaamahdieh@yahoo.com
- مقاله حاصل طرح پژوهشی با عنوان: بررسی پلی مورفیسم های ژن CTLA-4 در بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتوی سیستمیک می باشد که در سال 88 در دانشگاه علوم پزشکی گلستان رایج گردید.

مقدمه

نفر می باشد (2 و 3). شیوع بیماری در ایران 40 مورد به ازای هر صد هزار نفر گزارش شده است (4). علت بیماری ناشناخته است اما به نظر می رسد دو فاکتور ژنتیک و محیط روی ابتلا به آن تأثیرگذار هستند (5). ژن CTLA-4 بر روی سلول های T بیان می شود و فعالیت این

لوپوس اریتماتوسیستمیک (SLE) یک بیماری التهابی مولتی سیستم مزمن با علت ناشناخته می باشد (1). بیش از یک میلیون نفر در امریکا به این بیماری مبتلا می باشند و شیوع آن در اروپا 3/2-14/1 مورد به ازای هر صد هزار

از پیش تعیین شده ثبت گردید. از همه بیماران نمونه خون محیطی جهت آزمایشات گرفته شد. DNA بیماران و گروه شاهد از گلوبول‌های سفید خون محیطی با استفاده از پروتکل استاندارد کیت (Roche Applied Science) استخراج گردید. DNA استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی و با استفاده از تکنیک PCR تکثیر شد. برنامه واکنش PCR شامل 5 دقیقه در دمای 94 درجه، 30 چرخش، جهت دناتوراسیون در 94 درجه به مدت 15 ثانیه، دمای هیبرید شدن پرایمر 30 ثانیه در 58 درجه و دمای طولی سازی 45 ثانیه در 72 درجه سانتیگراد بود. در مرحله بعد، محصولات PCR با روش RFLP و با استفاده از آنزیم محدودکننده Bbv1 (New England BioLabs) مورد بررسی قرار گرفتند (18). نتیجه واکنش‌ها توسط ژل آگارز 2 درصد و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده گردید. طول قطعات به دست آمده برای آلل T، 486 جفت باز و برای آلل C، 270 و 216 جفت باز بودند. اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آنالیز داده‌ها از آزمون کای دو استفاده شد. نسبت شانس ابتلا به بیماری برای هر الل و ژنوتیپ به طور جداگانه محاسبه گردید.

یافته‌ها

180 بیمار مبتلا به لوپوس اریتماتوی سیستمیک وارد مطالعه شدند. 91/7 درصد بیماران (165 نفر) را زنان تشکیل می دادند. میانگین سنی بیماران $32/99 \pm 10/45$ با محدوده سنی 70-13 سال بود. 304 نفر (181 زن و 23 نفر مرد) که سابقه هیچ گونه بیماری خودایمنی نداشتند و از نظر قومیت و سن با افراد بیمار همسان بودند به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. نتایج نشان داد که رابطه معناداری بین سن و پلی مورفیسم T:C 1722 وجود دارد به طوری که ژنوتیپ TT در فاصله سنی 45-15 سال به طور معناداری ($P < 0/0001$) از فراوانی بیشتری به نسبت سایر ژنوتیپ‌ها برخوردار می باشد. نتایج نشان داد رابطه معناداری بین سابقه بیماری در خانواده، وجود

سلول‌ها را مهار می کند (6 و 7). در موارد التهاب‌های خودایمنی، ژن CTLA-4 گیرنده‌های سلول‌های T را تضعیف می کند تا از پاسخ‌های واکنشی جلوگیری کند (8 و 9). اختلال ایمنولوژیک اتوآنتی‌بادی‌ها علیه اجزای سلولی منجر به فعال شدن سلسله‌ای از واکنش‌های ایمنولوژیک و التهابی شده و در نهایت موجب بروز تخریب سلولی و بافتی می گردد (10). این اتوآنتی‌بادی‌ها در ظهور بسیاری از بیماری‌ها در ارگان‌های مختلفی از قبیل کلیه‌ها، قلب، ریه، مفاصل و سیستم ایمنی نقش دارند (11). مکان ژن CTLA-4 در 2q33 می باشد (12). پلی مورفیسم‌های این ژن با بیماری‌های اتوایمیون مختلفی از قبیل دیابت تیپ 1، بیماری گریوز، بیماری تیروئید، آرتریت روماتوئید و لوپوس اریتماتوی سیستمیک در ارتباط است (13). یکی از این پلی مورفیسم‌ها T:C 1722 است که در ناحیه پروموتور ژن واقع شده و رابطه آن با بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک در مطالعات مختلف، متناقض گزارش شده است (9 و 14-16). بنابراین مطالعه حاضر با هدف نقش پلی مورفیسم T:C 1722 در بروز بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک و ارتباط این پلی مورفیسم با تظاهرات بیماری انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه مورد-شاهدی حاضر به صورت مقطعی بر روی تمامی بیماران مبتلا به لوپوس که در سال 1388 به درمانگاه تخصصی بیمارستان 5 آذر شهرستان گرگان مراجعه کرده بودند، انجام شد. پس از تأیید بیماری با استفاده از معیارهای ACR (17) و نظر پزشک فوق تخصص، 180 بیمار وارد مطالعه شدند. 304 فرد سالم نیز که از لحاظ سن و جنسیت با گروه بیمار همخوانی داشتند به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. از کلیه افراد شرکت کننده در مطالعه رضایت نامه کتبی دریافت شد. اطلاعات فردی مورد نیاز و علایم بالینی بیماران مورد بررسی قرار گرفت و در چک لیست

بحث

گرچه علت بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک تاکنون ناشناخته باقی مانده است اما شواهد نشان می‌دهد پلی‌مورفیسم‌های ژن CTLA-4 نقش مهمی در ابتلا به لوپوس ایفا می‌کنند. برخی مطالعات ارتباط معناداری بین بیماری و پلی‌مورفیسم‌های ژن CTLA-4 عنوان کرده‌اند (7، 14-17، 19 و 20). از طرف دیگر برخی مطالعات هیچ‌گونه ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌های ژن و بیماری لوپوس نیافتند (9، 15، 21 و 22). در بررسی حاضر ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم 1722 T:C و بیماری لوپوس یافت نشد و فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های

رابطه خویشاوندی پدر-مادر و قومیت‌های مختلف با ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم مورد بررسی وجود ندارد (جدول 1). در ادامه به فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها و رابطه آن‌ها با بیماری پرداخته شد. در بررسی فراوانی ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ غالب در هر دو گروه TT بود. گرچه فراوانی ژنوتیپ TC در گروه کنترل بیشتر از افراد بیمار بود اما این افزایش به لحاظ آماری معنادار نبود. در مجموع، فراوانی بیشتر آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها در دو گروه بسیار نزدیک به یکدیگر بود. تفاوت معناداری در فراوانی هیچ‌یک از آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها بین بیماران و گروه شاهد مشاهده نگردید (جدول 2).

جدول 1- ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم 1722 T:C و ریسک فاکتورهای بیماری

P-Value	کل (%)	CC(%)	TC(%)	TT(%)	ریسک فاکتور
<0/0001	4	0	0	4	کم تر از 15
	155	4	11	140	سن (سال) 15-45
	21	2	2	17	بیش از 45
0/97	27	1	2	24	سابقه بیماری
	153	5	11	137	در خانواده خیر
0/59	67	2	3	62	بله پدر و مادر
	113	4	10	99	خیر خویشاوند
0/45	97	2	8	87	فارس قومیت
	52	1	3	48	ترکمن
	31	3	2	26	سایر

جدول 2- توزیع فراوانی آلل و ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم 1722 T:C در بیماران و گروه کنترل

OR(95% CI)	P-Value	کنترل تعداد (%)	بیماران تعداد (%)	پلی مورفیسم 1722
1(0/56-1/81)	0/55	(88/8) 270	(88/9) 160	TT
0/9(0/45-1/83)	0/46	(6/9) 21	(7/2) 13	TC
0/9(0/35-2/31)	0/51	(4/3) 13	(3/9) 7	CC
1/01(0/39-2/62)	0/59	(92/3) 561	(92/5) 333	T
0/96(0/53-1/76)	0/52	(7/7) 47	(7/5) 27	C

خانواده و وجود رابطه خویشاوندی پدر-مادر مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید فراوانی ژنوتیپ TT در سنین 15-45 سال به طور معناداری از سایر ژنوتیپها بیشتر است. گرچه مطالعات متعددی به بررسی ارتباط پلی مورفیسم T:C 1722 و بیماری لوپوس پرداخته اند اما ما نتوانستیم مطالعه ای بیابیم که به بررسی رابطه ریسک فاکتورها با پلی مورفیسم مورد نظر پرداخته باشد و تمامی مطالعات تنها بر نحوه ارتباط پلی مورفیسم با بیماری اشاره کرده اند. از نتایج متناقض مطالعات مختلف چنین برداشت می گردد که علاوه بر حجم نمونه، نژاد و قومیت، نقش به سزایی در بروز و شدت بیماری و ارتباط آن با پلی مورفیسم ایفا می کنند. بنابراین با توجه به این که مطالعه حاضر اولین بررسی است که در ایران و منطقه خاورمیانه در این خصوص به انجام رسیده است و بیشتر بررسی های انجام شده در جمعیت آسیایی می باشد، پیشنهاد می گردد مطالعات دیگری با حجم نمونه بالاتر در سایر مناطق کشور انجام پذیرد تا بتوان نتیجه گیری کامل تری در مورد تأثیر پلی مورفیسم مورد بررسی بر بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک در منطقه به دست آورد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه کنونی نشان می دهد که ارتباطی میان پلی مورفیسم T:C 1722 در ژن رمزکننده آنتی ژن 4 وابسته به لنوفسیت T سیتوتوکسیک با بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک در جمعیت گرگان وجود ندارد.

پلی مورفیسم مورد بررسی در دو گروه بیمار و کنترل بسیار نزدیک به یکدیگر بود. این در حالیست که نتایج در مطالعات مختلف، متناقض می باشد به طور مثال مطالعاتی که در امریکا (9)، ژاپن (15)، مالزی (21) و اسپانیا (22) انجام شده است نتایجی مشابه بررسی حاضر گزارش کرده اند. بدین معنی که اگرچه هیچ گونه ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم مورد بررسی و بیماری لوپوس پیدا نکردند اما به طور کلی فراوانی آلل C در افراد سالم بیش از گروه بیماران گزارش شده است. از طرف دیگر، مطالعاتی که در چین و کره به انجام رسیده است، ارتباط قوی بین این پلی مورفیسم و بیماری لوپوس گزارش کردند به طوری که نقش بیماری زایی آلل T در پلی مورفیسم مورد بررسی قابل توجه بود (14 و 23). در مطالعه حاضر افزایش غیرمعنادار ژنوتیپ TC در گروه کنترل نسبت به بیماران مشاهده شد. Hudson و همکاران نیز مشابه مطالعه حاضر، عنوان کردند ژنوتیپ TC در افراد سالم از فراوانی بیشتری نسبت به بیماران برخوردار می باشد و این ارتباط به لحاظ آماری نیز معنادار است (18). این در حالیست که بر خلاف بررسی حاضر، مطالعه ای که توسط An-ping و همکاران در چین انجام شد، نشان داد ژنوتیپ TC به طور معناداری در بیماران مبتلا به لوپوس بیشتر از افراد سالم است (14). دلیل این تناقض در نتایج می تواند مواردی نظیر تفاوت در گروه های نژادی، جنسیت، مدت بیماری، سن شروع بیماری و حجم نمونه باشد. در مطالعه حاضر همچنین تأثیر برخی فاکتورها نظیر سن، قومیت، سابقه بیماری در

References

- Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor familials. *N Engl J Med.* 1996;334(26):1717-25
- Marshall E. Lupus: mysterious disease holds its secrets tight. *Science.* 2002;296(5568):689-91.
- Stahl-Hallengren C, Jonsen A, Nived O, Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol.* 2000;27(3):685-91.
- Davatchi F, Jamshidi AR, Banihashemi AT, Gholami J, Forouzanfar MH, Akhlaghi M, et al. WHO-ILAR Copcord Study (Stage 1, Urban Study) in Iran. *J Rheumatol.* 2008;35(7):1384.
- Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. *J Genes Immun.* 2007;8(6):445-55.

6. Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative coreceptors on lymphocytes. *J Curr Opin Immunol*. 2002;14(3):391-6.
7. Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *J Rheumatology*. 2001;40(6):662-7.
8. Eagar TN, Karandikar NJ, Bluestone JA, Miller SD. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol*. 2002;32(4):972-81.
9. Parks CG, Hudson LL, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, et al. CTLA-4 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a population-based study of whites and African-Americans in the southeastern United States. *J Lupus*. 2004;13(10):784-91.
10. Utz PJ. Multiplexed assays for identification of biomarkers and surrogate markers in systemic lupus erythematosus. *J Lupus*. 2004;13(5):304-11.
11. Ariyan C, Salvalaggio P, Fecteau S, Deng S, Rogozinski L, Mandelbrot D, et al. Cutting edge: transplantation tolerance through enhanced CTLA-4 expression. *J Immunol*. 2003;171(11):5673-7.
12. Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, Simonetti J, Mannoni P, Mawas C, et al. Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. *Immunogenetics*. 1990;31(3):198-201.
13. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity? *J Genes Immun*. 2000;1(3):170-84.
14. Xu AP, Yin PD, Su XY. [Association of CTLA-4 promoter -1722 polymorphism with systemic lupus erythematosus in Chinese [Chinese]]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2004;24(10):1107-12.
15. Takeuchi F, Nakae N, Kawasugi K, Mori M, Kuwata S, Tanimoto K. The CTLA-4 ϵ , 1661A/G and δ , 1772T/C dimorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol Int*. 2007;27(8):785-7.
16. Fernandez-Blanco L, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. A CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(1):328-9.
17. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1725.
18. Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet*. 2002;111(4-5):452-5.
19. Lee YH, Harley JB, Nath SK. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet*. 2005;116(5):361-7.
20. Pullmann R Jr, Luk J, Skerenov M, Rovensky J, Hybenov J, Melus V, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) dimorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 1999;17(6):725-9.
21. Chua KH, Puah SM, Chew CH, Tan SN, Lian LH. Study of the CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus (SLE) samples from Malaysia. *J Annals of Human Biology*. 2010;37(2):274-80.
22. Aguilar F, Torres B, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF. CTLA4 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *J Hum Immunol*. 2003; 64(10):936-40.
23. Taha Khalaf A, Song JQ, Gao TT, Yu XP, Lei TC. CTLA-4 gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:167395.