

论著·临床研究

T 淋巴细胞毒相关抗原-4 基因 49 位点多态性 与儿童 1 型糖尿病相关性的 Meta 分析

罗淑颖¹ 谭利娜² 卫海燕¹ 张耀东¹ 陈永兴¹

(郑州市儿童医院 1. 内分泌科; 2. 心脏外科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 评价 T 淋巴细胞毒相关抗原-4 (CTLA-4) 基因 49 位点多态性与儿童 1 型糖尿病 (T1DM) 的相关性。方法 检索 PubMed、EBSCO、中国学术期刊全文数据库 (CNKI)、中国生物医学文献数据库 (CBM)、万方数据库, 收集 CTLA-4 基因 49 位点多态性与儿童 T1DM 相关性的文献。用 Meta 分析的方法检测 CTLA-4 基因 49 位点的基因型和等位基因在儿童 T1DM 组与对照组中是否有差异。结果 共纳入 10 篇文献, 共有 T1DM 1084 例, 对照组 1338 例。根据各项研究的异质性检验结果, 均利用固定效应模型对 CTLA-4 基因 49 位点的 AG、GG、GG + AG 基因型和 G 等位基因与 T1DM 相关性进行 Meta 分析, 各项研究的合并 OR 值 (95% CI) 分别为 1.13 (0.97 ~ 1.33)、1.42 (1.16 ~ 1.75)、1.20 (1.03 ~ 1.40)、1.21 (1.09 ~ 1.33), 提示 T1DM 组 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因和 GG、GG + AG 基因型表达与对照组比较均有显著差异。结论 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因和 GG、GG + AG 基因型均与儿童 T1DM 的发生相关。
[中国当代儿科杂志, 2012, 14(9): 683-688]

[关键词] Meta 分析; T 淋巴细胞毒相关抗原-4 基因; 1 型糖尿病; 基因多态性; 儿童

[中图分类号] R596.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)09-0683-06

Association of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 + 49A/G polymorphism with childhood type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis

LUO Shu-Ying, TAN Li-Na, WEI Hai-Yan, ZHANG Yao-Dong, CHEN Yong-Xing. Department of Endocrinology, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450052, China (Wei H-Y, Email: syek@163.com)

Abstract: Objective To evaluate the association of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) + 49A/G polymorphism with type 1 diabetes mellitus (T1DM) in children. **Methods** Papers about the association of CTLA-4 + 49A/G polymorphism with T1DM in children were collected by searching PubMed, EBSCO, CBM, CNKI, and Wanfang Data. A meta-analysis was performed to examine differences in the genotypes (AG, GG, and GG + AG) and G allele at position 49 of the CTLA-4 gene between a childhood T1DM group and a control group. **Results** A total of 10 papers involving 1084 T1DM children and 1338 healthy children were included. The Meta-analysis was performed to evaluate the association of the genotypes (AG, GG, and GG + AG) and the G allele at position 49 of the CTLA-4 gene with T1DM using a fixed effect model according to the heterogeneity test results of all studies. The pooled OR values (95% CI) were 1.13 (0.97-1.33), 1.42 (1.16-1.75), 1.20 (1.03-1.40), and 1.21 (1.09-1.33), suggesting a significant difference in genotypes (AG, GG, and GG + AG) and the G allele at position 49 of the CTLA-4 gene between the two groups. **Conclusions** CTLA-4 + 49A/G polymorphism is associated with T1DM in children. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(9): 683-688]

Key words: Meta-analysis; Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 gene; Type 1 diabetes mellitus; Genetic polymorphism; Child

1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是一种多基因引起的自身免疫性疾病, 属基因遗传^[1], 其发病依赖于基因和环境因素的共同作用。而细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4) 是淋巴细胞表面的一种与免疫信号传递有关的配体蛋白分子, 属

免疫球蛋白超家族成员, 可以特异性结合抗原呈递细胞 (APC) 表面的 B7 分子, 负调节 T 细胞的活化, 可减缓细胞周期的进程, 降低 IL-2 的产生, 使 T 细胞活化增殖受到抑制, 从而使免疫达到平衡状态, 保持外周的免疫平衡^[2]。已有研究证实, CTLA-4 基因 49 位点多态性与 1 型糖尿病的发生风险相关, 为重

[收稿日期] 2012-02-05; [修回日期] 2012-05-18

[作者简介] 罗淑颖, 女, 主治医师。

[通信作者] 卫海燕, 主任医师。

要的易感位点^[3,4],但也有研究得出不同的结果^[5]。为了进一步研究 CTLA-4 基因 49 位点多态性与儿童 T1DM 发生的相关性,本研究利用 Meta 分析对相关文献进行了分析,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 文献纳入与排除标准

纳入标准:(1)研究设计为公开发表的 CTLA-4 基因 49 位点多态性与儿童 T1DM 相关性的病例对照研究;(2)研究对象:病例组为符合儿童 T1DM 诊断标准^[6]的患儿,对照组为健康对照人群;(3)干预措施研究中含有等位基因或基因型数据;(4)其他:统计方法应用恰当,数据质量可靠,结果表达明确,有或可计算出 OR 值;(5)对源于同一人群、数据使用一致的重复发表文献,选择样本量最大的 1 篇。

排除标准:(1)研究对象为动物;(2)内容未涉及 CTLA-4 基因 49 位点多态性;(3)非儿童 T1DM 病例;(4)重复报道、数据描述不详细的研究;(5)会议摘要、病例报道、评论和综述类文章。

1.2 文献检索策略

以 CTLA-4、cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4、T1DM、type 1 diabetes mellitus、polymorphism 等为主题词,检索 PubMed 和 EBSCO 数据库;以 1 型糖尿病、T1DM、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原或 CTLA-4、多态性、儿童等为主题词,检索中国学术期刊全文数据库、中国生物医学文献数据库和万方数据库,并对检索到的相关参考文献进行手工搜索。检索时间为建库至 2010 年 9 月 20 日。

1.3 文献质量评价

参照英国 Cochrane 系统评价手册 5.0 版文献质量评价方法,对最后纳入的全文文献进行评价。

对随机分组方法、分配方案隐藏、盲法(研究对象、治疗方案实施者和研究结果测量者)、结果数据的完整性(失访和退出)以及选择性研究结果进行方法学质量评价。若纳入研究的失访率 > 20%,则要进一步分析造成失访的可能原因,并进行意向性处理。由 2 名研究者采用统一的数据提取表,独立提取资料,而后交叉核对,如遇意见不一致者通过讨论解决或由第 3 名研究者协助解决。

1.4 统计学分析

采用 RevMan 5.1 软件进行统计学分析。利用 Meta 分析对各文献进行异质性检验,并根据检验结果选取相应的数据合并方法,若各研究结果间无异质性,则采用固定效应模型进行数据合并;若各研究结果间有异质性,则采用随机效应模型进行数据合并,计算总 OR 值。计算各研究等位基因及基因型频率的 OR 值及 95% CI, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入文献的基本情况

通过计算机检索共检索到相关文献 42 篇,剔除不符合纳入标准的研究 32 篇,最终 10 篇文献纳入研究^[7-16]。其中智利 2 篇^[7,13],日本 2 篇^[11,14],中国 2 篇^[15-16],土耳其 1 篇^[9],突尼斯 1 篇^[10],爱沙尼亚 1 篇^[8],美国 1 篇^[12]。共有 T1DM 1084 例,对照组 1338 例。

质量评价结果显示该 10 篇研究诊断标准明确、病例、对照组间可比、基因检测方法合理、结果数据明确,对照组基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。纳入研究的 10 篇文献的基本特征及质量评价。见表 1~2。

表 1 纳入所有文献的基本资料

文献作者	文献发表时间	来源国家	对照组(基因型频率及等位基因)						T1DM 组(基因型频率及等位基因)					
			n	AA	AG	GG	A	G	n	AA	AG	GG	A	G
Balic ^[7]	2009	智利	310	138	131	41	407	213	300	125	136	39	386	214
Douroudis ^[8]	2009	爱沙尼亚	725	159	378	188	696	754	404	69	203	132	341	467
Genç ^[9]	2004	土耳其	80	43	34	3	120	40	48	24	20	4	68	28
Kamoun ^[10]	2001	突尼斯	49	10	28	11	48	50	74	4	38	32	46	102
Mochizuki ^[11]	2003	日本	60	12	27	21	51	69	97	17	36	44	70	124
Momin ^[12]	2009	美国	280	131	119	30	381	179	261	113	112	36	338	184
Pérez ^[13]	2009	智利	255	110	106	39	326	184	260	116	110	34	342	178
Takara ^[14]	2000	日本	107	34	43	30	111	103	51	10	17	24	37	65
巩纯秀 ^[15]	2007	中国	52	3	17	32	23	81	39	3	14	22	20	58
杨建军 ^[16]	2006	中国	71	11	28	32	50	92	34	3	8	23	14	54

表2 纳入文献的质量评价

文献作者	随机方法	分配隐藏	盲法	失访	意向性分析	基线比较
Balic ^[7]	是	否	否	无	采用	相似
Douroudis ^[8]	是	否	否	无	采用	相似
Gene ^[9]	是	否	否	无	采用	相似
Kamoun ^[10]	是	否	否	无	采用	相似
Mochizuki ^[11]	是	否	否	无	采用	相似
Momin ^[12]	是	否	否	无	采用	相似
Pérez ^[13]	是	否	否	无	采用	相似
Takara ^[14]	是	否	否	无	采用	相似
巩纯秀 ^[15]	否	否	否	无	采用	相似
杨建军 ^[16]	是	否	否	无	采用	相似

2.2 Meta 分析结果

2.2.1 CTLA-4 基因 49 位点 AG 基因型与儿童 T1DM 的关系 异质性检验结果显示各研究结果间无统计学异质性($\chi^2 = 4.34, P = 0.89$), T1DM 组 694 例, 对照组 911 例, 以 AG 基因型为暴露因素, AA 基因型为非暴露因素。结果显示, 具有 AG 基因型的儿童 T1DM 发病风险无明显增高($OR = 1.13, 95\% CI: 0.97 \sim 1.33$), 见图 1。

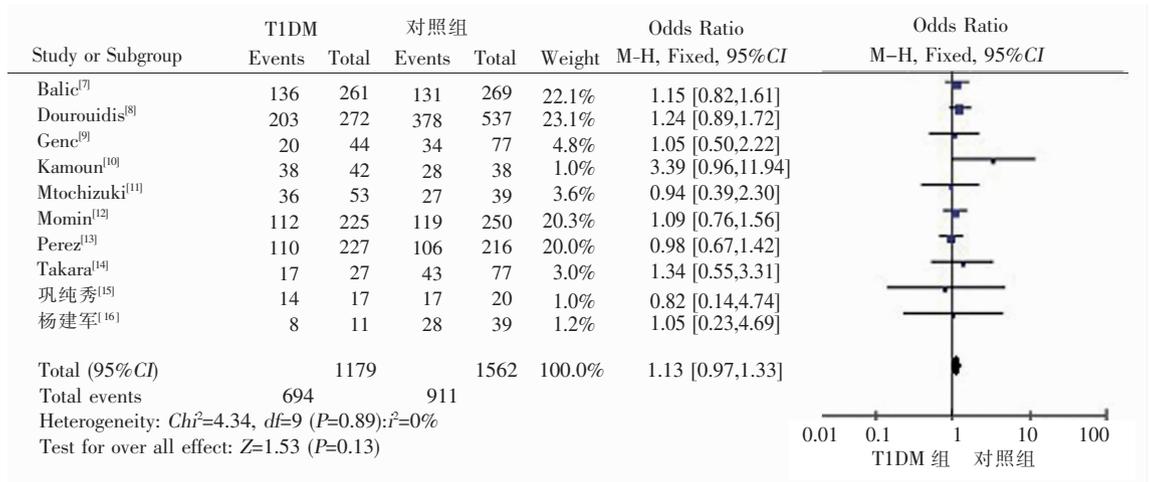


图1 CTLA-4 基因 49 位点 AG 基因型与儿童 T1DM 的关系

2.2.2 CTLA-4 基因 49 位点 GG 基因型与儿童 T1DM 的关系 异质性检验结果显示各研究结果间无统计学异质性($\chi^2 = 15.55, P = 0.08$), T1DM 组 390 例, 对照组 427 例, 以 GG 基因型为暴露因素,

AA 基因型为非暴露因素。结果显示, 具有 GG 基因型的儿童 T1DM 发病风险明显增高($OR = 1.42, 95\% CI: 1.16 \sim 1.75$), 见图 2。

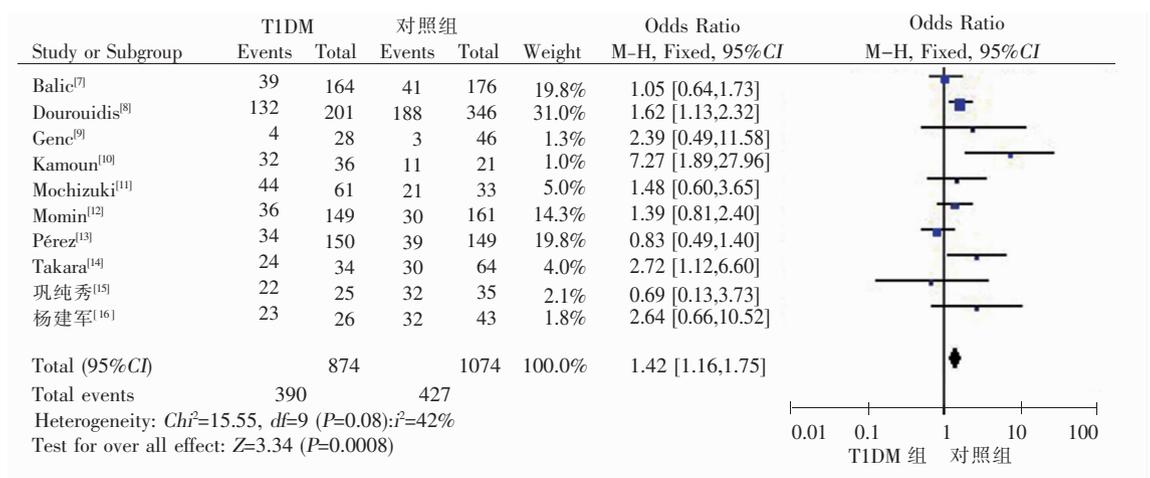


图2 CTLA-4 基因 49 位点 GG 基因型与儿童 T1DM 的关系

2.2.3 CTLA-4 基因 49 位点 AG + GG 基因型与 T1DM 的关系 异质性检验结果显示各研究结果间无统计学异质性($\chi^2 = 9.26, P = 0.41$), T1DM 组 1084 例, 对照组 1338 例, 以 AG + GG 基因型为暴露

因素, AA 基因型为非暴露因素。结果显示, 具有 AG + GG 基因型的儿童 T1DM 发病风险明显增高($OR = 1.20, 95\% CI: 1.03 \sim 1.40$), 见图 3。

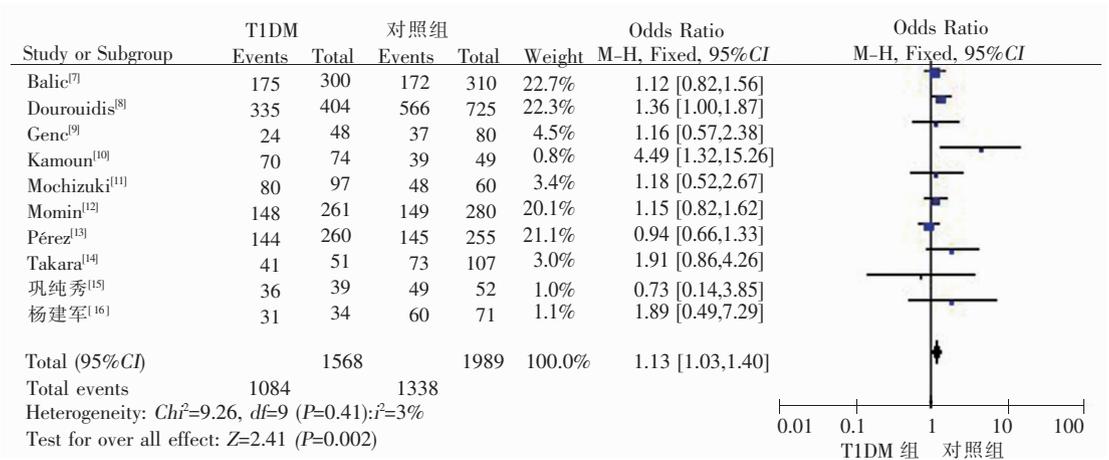


图3 CTLA-4 基因 49 位点 AG + GG 基因型与儿童 T1DM 的关系

2.2.4 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因与儿童 T1DM 的关系 异质性检验结果示各研究结果间无统计学异质性 ($\chi^2 = 17.10, P = 0.05$), T1DM 组 1474 例, 对照组 1765 例, 以 G 基因型

为暴露因素, A 基因型为非暴露因素。结果显示, 具有 G 等位基因的儿童 T1DM 发病风险明显增高 ($OR = 1.21, 95\% CI: 1.09 \sim 1.33$), 见图 4。

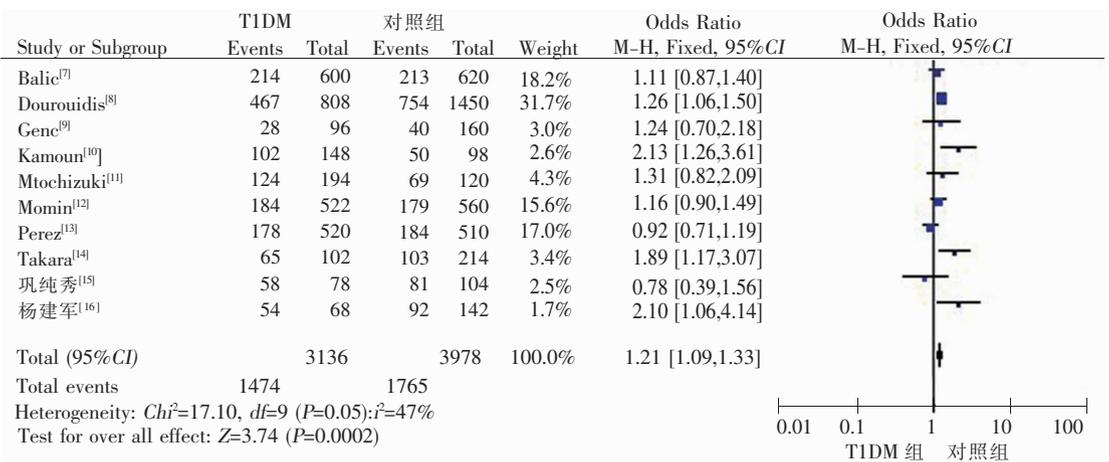


图4 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因与儿童 T1DM 的关系

2.3 敏感性分析

利用随机效应模型再次对 CTLA-4 基因 49 位点的 AG vs AA、GG vs AA、GG + AG vs AA 和 G vs A 基因型的 OR 值 (95% CI) 进行分析, 并与固定效应模型的结果进行比较, 提示两种效应模型的结果非常接近, 说明本研究的合并结果很可靠。见表 3。

表3 两种效应模型的 OR 值 (95% CI) 比较

基因型	固定效应模型	随机效应模型
AG vs AA	1.13 (0.97 ~ 1.33)	1.13 (0.96 ~ 1.33)
GG vs AA	1.42 (1.16 ~ 1.75)	1.49 (1.09 ~ 2.04)
GG + AG vs AA	1.20 (1.03 ~ 1.40)	1.21 (1.02 ~ 1.43)
G vs A	1.21 (1.09 ~ 1.33)	1.27 (1.08 ~ 1.49)

2.4 发表偏倚评估

通过漏斗图对 CTLA-4 基因 49 位点 AG vs AA、

GG vs AA、GG + AG vs AA 和 G vs A 的发表偏倚进行检验, 结果各基因型的漏斗图均显示各点分布相对均匀, 左右基本对称, 均集中在 95% CI 附近, 提示各研究的发表偏倚小, 结论较可靠。见图 5 ~ 8。

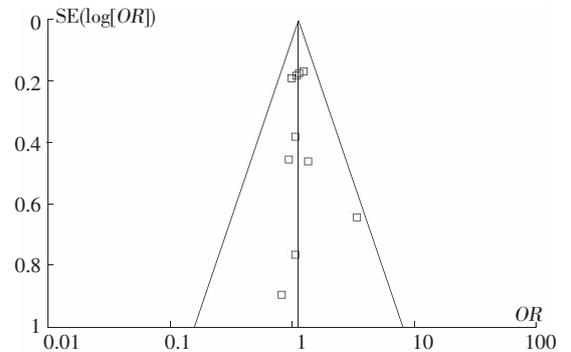


图5 CTLA-4 基因 49 位点 AG 基因型文献的漏斗图

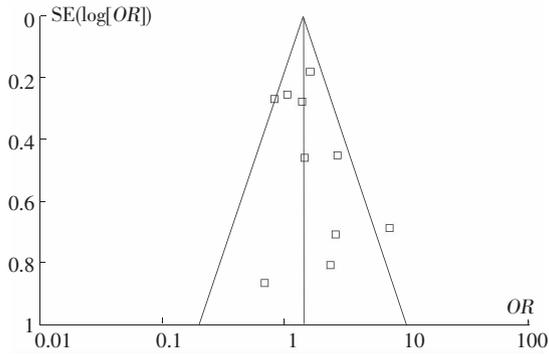


图6 CTLA-4 基因 49 位点 GG 基因型文献的漏斗图

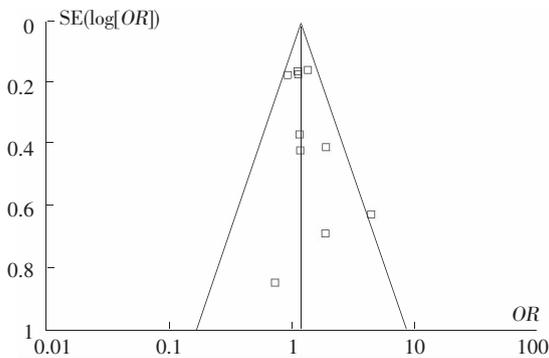


图7 CTLA-4 基因 49 位点 AG + GG 基因型文献的漏斗图

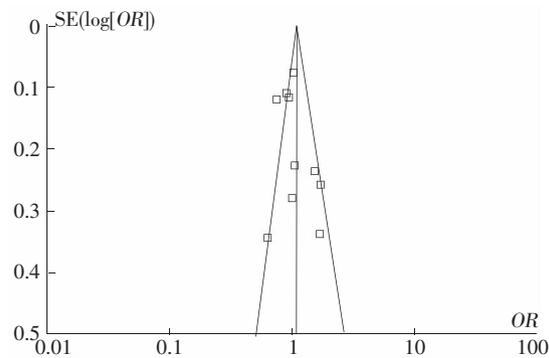


图8 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因文献的漏斗图

3 讨论

糖尿病是严重危害人类健康的一种代谢性疾病,发生在儿童期的糖尿病多为 T1DM。近年来该病的发病率呈现逐年上升的趋势,其死亡率也高于其他发生于青少年时期的慢性病^[17]。目前该病的病因尚不明了,认为环境因素和遗传因素在其发病过程中均有作用^[13]。CTLA-4 基因作为 T1DM 候选基因之一,最早由 Brunet 等^[18]在筛选小鼠杀伤性 T 淋巴细胞的 cDNA 文库时发现,其基因定位于 1 号染色体的 C 带,编码 233 个氨基酸组成的鼠免疫球蛋白超家族的蛋白分子。对于 CTLA-4 基因多态性

与 T1DM 的关系,研究较广泛的位点主要有:(1)位于外显子 1 第 17 密码子 49 位点 A/G 二态性,突变率为 53% ~ 63%^[19-20]; (2)位于启动子-318 位点 C/T 等位基因二态性,人群中突变率为 13.4%^[21]; 体外功能研究显示,外显子 1 的 49A/G 位点和启动子-318C/T 位点能显著影响 CTLA-4 的转录活性和 mRNA 的表达水平; (3)位于外显子 4 的 3'非翻译区(UTR) +642 位点的(AT)n 可变重复序列,可能控制 mRNA 的稳定性; (4)位于 3' UTR + 6230 位点的 A/G 二态性 (CT60)。其中 49 位点 A/G 位点研究较为广泛。Lee 等^[22]研究结果表明 CTLA-4 基因第 1 外显子 49 位点 A/G 多态性与中国汉族儿童 T1DM 相关,等位基因 G 增加了 T1DM 的易感性。在日本人群中 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因也与 T1DM 相关^[14]。而智利的 300 例 T1DM 病例研究中显示,CTLA-4 基因 49 位点 A/G 基因多态性与 T1DM 易感性无关,但 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因或 GG 型的 T1DM 患者具有较早发病的特性^[7]。Ahmedov 等^[5]对阿塞拜疆人的研究也显示 CTLA-4 基因 49 位点 A/G 与 T1DM 无关联。杨建军等^[16]在 T1DM 患儿的研究中得出 CTLA-4 基因 49 位点 AG 与 318 位点 CT 基因型的连锁与宁夏儿童 T1DM 发生有关,且携带 CTLA-4 基因 49 位点 GG 型的父母其子女患 T1DM 的风险性增高。为了解决上述研究结果的不一致,本研究采用了 Meta 分析。而 Meta 分析最大的优点是通过增大样本量提高结论的可信度,降低研究结果的不一致性。本研究对纳入分析的 10 篇文献的研究结果进行汇总并计算其合并效应量,根据异质性检验结果,提示 CTLA-4 基因 49 位点的 AG、GG、GG + AG 基因型与 G 等位基因各研究间均无异质性,利用固定效应模型对 CTLA-4 基因 49 位点的 AG、GG、GG + AG 基因型及 G 等位基因与儿童 T1DM 相关性进行 Meta 分析,结果提示 CTLA-4 基因 49 位点的多态性与儿童 T1DM 的发生相关。

总之,本研究通过 Meta 分析方法将 10 个同类研究结果进行定量综合,显示 CTLA-4 基因 49 位点 G 等位基因和 GG、GG + AG 基因型均与儿童 T1DM 的发生相关,为确定儿童 T1DM 易感人群及提出综合防治措施提供了客观有力的循证医学证据。

[参 考 文 献]

[1] 王秀敏,陈超,董芙蓉,黄轲,傅君芬,梁黎. 1 型糖尿病儿童甲状腺抗体的检测[J]. 中国当代儿科杂志,2012,14(1):38-41.
[2] 锁颖君,梁杏欢,罗佐杰. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原与 1 型糖尿病[J]. 内科,2009,4(3):407-411.

- [3] Jonson CO, Hedman M, Karlsson Faresjö M, Casas R, Ilonen J, Ludvigsson J, et al. The association of CTLA-4 and HLA class II autoimmune risk genotype with regulatory T cell marker expression in 5-year-old children[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 145(1): 48-55.
- [4] Jonson CO, Lernmark A, Ludvigsson J, Rutledge EA, Hinkkanen A, Faresjö M. The importance of CTLA-4 polymorphism and human leukocyte antigen genotype for the induction of diabetes-associated cytokine response in healthy school children[J]. *Pediatr Diabetes*, 2007, 8(4): 185-192.
- [5] Ahmedov G, Ahmedova L, Pavlina S, Cinek O. Genetic association of type 1 diabetes in an Azerbaijanian population: the HLA-DRB1*04, the insulin gene, and CTLA4[J]. *Pediatr Diabetes*, 2006, 7(2): 88-93.
- [6] 吴焕卿. 儿童1型糖尿病发病相关危险因素分析[J]. *中国儿童保健杂志*, 2006, 14(3): 250-252.
- [7] Balic I, Angel B, Codner E, Carrasco E, Pérez-Bravo F. Association of CTLA-4 polymorphisms and clinical-immunologic characteristics at onset of type 1 diabetes mellitus in children[J]. *Hum Immunol*, 2009, 70(2): 116-120.
- [8] Douroudis K, Laine AP, Heinonen M, Hermann R, Lipponen K, Veijola R, et al. Association of CTLA4 but not ICOS polymorphisms with type 1 diabetes in two populations with different disease rates[J]. *Hum Immunol*, 2009, 70(7): 536-539.
- [9] Genc S, Genc K, Sercan O, Kizildag S, Gulay Z, Atay T, et al. Analysis of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) exon 1 polymorphism in patients with type 1 diabetes mellitus in a Turkish population[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2004, 17(5): 731-735.
- [10] Kamoun Abid H, Hmida S, Smaoui N, Kaabi H, Abid A, Chaabouni H, et al. Association between type 1 diabetes and polymorphism of the CTLA-4 gene in a Tunisian population[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2001, 49(10): 794-798.
- [11] Mochizuki M, Amemiya S, Kobayashi K, Kobayashi K, Shimura Y, Ishihara T, et al. Association of the CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(3): 843-847.
- [12] Momin S, Flores S, Angel BB, Codner DE, Carrasco PE, Perez-Bravo F. Interactions between programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene polymorphisms in type 1 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009, 83(3): 289-294.
- [13] Pérez BF, Codner DE, Angel BB, Balic NI, Carrasco PE. +49 A/G genetic polymorphism of cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) in type 1 diabetes: association with autoantibodies and cytokines[J]. *Rev Med Chil*, 2009, 137(3): 321-328.
- [14] Takara M, Komiya I, Kinjo Y, Tomoyose T, Yamashiro S, Akamine H, et al. Association of CTLA-4 gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and autoimmune thyroid disease[J]. *Diabetes Care*, 2000, 23(7): 975-978.
- [15] 巩纯秀, 申昆玲, 吴迪, 颜纯. 自身免疫多腺体综合征Ⅲ型 CTLA-4 外显子 1 多态性研究[J]. *首都医科大学学报*, 2007, 28(1): 97-101.
- [16] 杨建军, 张毓洪, 霍正浩, 朱小泉, 宋亮, 杨泽. CTLA-4 基因的多态性与宁夏儿童 1 型糖尿病的相关性研究[J]. *宁夏医学院学报*, 2006, 28(5): 374-378.
- [17] 金萍, 向斌, 林健, 黄干, 周卫东, 郑超, 等. CTLA-4 + 49A/G 和 CT60 基因多态性与 1 型糖尿病合并甲状腺自身免疫的相关性[J]. *中华医学杂志*, 2009, 8(18): 1246-1249.
- [18] Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4[J]. *Nature*, 1987, 328(6127): 267-270.
- [19] Bjørnvold M, Undlien DE, Joner G, Dahl-Jørgensen K, Njølstad PR, Akselsen HE, et al. Joint effects of HLA, INS, PTPN22 and CTLA4 genes on the risk of type 1 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(4): 589-596.
- [20] Rodríguez MR, Núñez-Roldán A, Aguilar F, Valenzuela A, García A, González-Escribano MF. Association of the CTLA-4 3' untranslated region polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis[J]. *Hum Immunol*, 2002, 63(1): 76-81.
- [21] Deichmann K, Heinzmann A, Brüggelolte E, Forster J, Kuehr J. An Mse I RFLP in the human CTLA4 promoter[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225(3): 817-818.
- [22] Lee YJ, Huang FY, Lo FS, Wang WC, Hsu CH, Kao HA, et al. Association of CTLA-4 gene A/G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2000, 52(2): 153-157.

(本文编辑:王庆红)