

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 第四類細胞毒殺性 T 淋巴抗原 (cytotoxic T \*  
\* : lymphocyte-associated antigen - 4) 基因多形性與 \*  
\* 名稱 台灣人僵直性脊椎炎之相關性 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 邱思萍  
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-026-B  
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月  
指導教授： 翁瑞宏

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 99年03月30日

# 大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\*\*\*\*\*  
\*  
\* 計畫 第四類細胞毒殺性 T 淋巴抗原 (cytotoxic T lymphocyte  
\* : -associated antigen-4) 基因多形性與台灣人僵直性脊椎  
\* 名稱 炎之相關性  
\*  
\*\*\*\*\*

執行計畫學生：邱思萍

學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040-026-B

研究期間：2009 年 7 月 1 日至 2010 年 2 月底止，計 8 個月

指導教授：翁瑞宏

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後  
可公開查詢

執行單位：中山醫學大學公共衛生學系(所)

中華民國 99 年 3 月 30 日

## 第四類細胞毒殺性T淋巴抗原 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4) 基因多形性與台灣人僵直性脊椎炎之相關性

### 摘要

僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis) 是屬於血清陰性脊椎關節病變 (seronegative spondyloarthropathy)，成因至今仍不清楚；而周邊耐受性的失衡可能會造成自體免疫疾病的發生。第四類細胞毒殺性T淋巴抗原 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4；CTLA-4) 在維持周邊耐受性平衡扮演著關鍵的角色，當CTLA-4與B7-1 (CD80) 及B7-2 (CD86) 結合，可對於CD28作用於活化T細胞所產生之共刺激訊號進行負調節，以避免過度活化。因此，我們設計一項病例對照研究來評估CTLA-4 A+49G基因多形性與僵直性脊椎炎的發生之相關。以聚合酶鏈鎖反應-限制酵素片段長度多形性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 來執行332名僵直性脊椎炎病患與332名健康對照之CTLA-4 A+49G基因多形性判定。結果觀察到，攜帶CTLA-4 A+49G A對偶基因型者相較於攜帶G對偶基因型者具有較低的幼年型僵直性脊椎炎發生危險 (RR = 0.37；95% C.I. = 0.12-1.20)；相反地，攜帶CTLA-4 A+49G A對偶基因型者相較於攜帶G對偶基因型者則具有顯著較高的成年型僵直性脊椎炎發生危險 (RR = 1.32；95% C.I. = 1.02-1.72)。因此，我們的結果建議著CTLA-4 A+49G基因型可能為僵直性脊椎炎發生之易感受性因子。

關鍵字：僵直性脊椎炎、第四類細胞毒殺性T淋巴抗原、基因多形性

## 前言

僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis) 是屬於血清陰性脊椎關節病變 (seronegative spondyloarthritis) 之自體免疫疾病 (1)，好發於 16 至 40 歲的成年人，多數病患為人類白血球抗原 (human leukocyte antigen ; HLA) -B27 基因陽性 (2)，估計台灣的僵直性脊椎炎盛行率為 0.2% (3)。僵直性脊椎炎的典型症狀為下背痛、脊椎活動範圍受限、以及晨間僵硬 (stiffness) (4)，主要侵犯的部位包括脊椎與周邊關節，肌腱、韌帶、關節膜與骨骼交界點發炎 (enthesitis)；已被侵犯的關節起初為發炎，進而漸漸呈現不等的骨質破壞、鈣化、或者是纖維化 (5)。在僵直性脊椎炎病患中，有 90% 以上的病患為 HLA-B27 陽性 (2)；然而，HLA-B27 陽性者並未全然地發展成僵直性脊椎炎。

人體的免疫反應在抗原入侵時會迅速地被活化，而過度的免疫反應可能造成組織的傷害。人體的免疫系統透過 T 細胞與 B 細胞接受器上不同區域基因序列之重組，而發展出預防自體反應淋巴球產生功能的機制，稱為自體免疫耐受性 (immunological self-tolerance)；包含了中央耐受性 (central tolerance) 與周邊耐受性。中央耐受性是指自體抗原 T 細胞與 B 細胞在胸腺及骨髓中會自然淘汰，而周邊耐受性則是透過複製缺失 (clonal deletion) 及複製無能 (clonal anergy) 來對於胸腺及骨髓中自體反應複製物 (autoreactive clones) 進行負調節 (6)。因此，刺激與抑制訊息的平衡對於周邊耐受性扮演著重要的角色；並且周邊耐受性之失衡也被證明與自體免疫疾病的發生具有相關性 (7)。

第四類細胞毒殺性 T 淋巴抗原 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4 ; CTLA-4) 是免疫球蛋白超級家族 (immunoglobulin superfamily) 的成員，CD28 是 CTLA-4 的同源物 (homologue)。CTLA-4 與 CD28 皆表現於活化 T 細胞，並且會互相競

爭與抗原呈現細胞 (antigen presenting cell ; APC) 上的 B7-2 分子結合，當 CD28 與 B7-2 作用時會增加 T 細胞的活化與維持活化的 T 細胞表現 (8, 9)。相反地，當 CTLA-4 與 APC 上的 B7-2 分子結合後，會抑制介白質-2 (interleukin 2 ; IL-2)、干擾素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$  ; IFN- $\gamma$ )、IL-2 接收器 (IL-2 receptor) 的表現量與細胞週期，以傳遞活化 CD4<sup>+</sup> T 細胞與 CD8<sup>+</sup> T 細胞的抑制訊息，此時 CTLA-4 蛋白的效應會大於 CD28 的作用 (10, 11)。同樣地，經由 CTLA-4 的訊息傳遞也會調節 CD4<sup>+</sup> T 細胞的產物，TGF- $\beta$ ；而 TGF- $\beta$  可平衡 CD28 與 B7-2 作用 (12)，並且抑制 TNF- $\alpha$  與 IL-1 $\beta$  蛋白表現 (13)。由此推論，CTLA-4 扮演著抑制的角色，並且向下調節免疫反應。

在 CTLA-4 基因缺失的小鼠中，也被發現迅速地表現出多重器官淋巴細胞滲入 (multiorgan lymphocytic infiltration) 與組織破壞 (tissue destruction) 的淋巴增生疾病 (lymphoproliferative disease)，嚴重時表現出心肌炎 (myocarditis) 與胰臟炎 (pancreatitis)，並且在出生後 3 至 4 星期內死亡 (14, 15)。因此，CTLA-4 與 B7-2 的交互作用在活化 T 細胞的抑制機制上可能扮演著關鍵的角色。CTLA-4 位於染色體 2q33 位置，藉由活化的 T 細胞與 APC 表面的 B-7 細胞共同作用，以抑制 T 細胞的活化與表現 (16)。CTLA-4 基因包含四個 exon，在 exon 1 上有前導胺基酸序列 (leader peptide sequence)，exon 2 上有配位體結合區域 (ligand-binding site)，exon 3 上有穿膜區域 (transmembrane region)，exon 4 上有細胞質尾端 (cytoplasmic tail) (17)。在核苷酸+49 的位置上有一個 A 至 G 的鹼基置換 (rs231775)，密碼子由 ACC 轉變成 GCC，結果導致胺基酸密碼子在+17 的位置發生胺基酸變異，由息寧胺酸 (threonine ; Thr) 變異成胺基丙酸 (alanine ; Ala)，而此變異 (T17A) 是 CTLA-4 基因上目前唯一已知的單一核苷酸變異

(18)，此置換會影響 CTLA-4 在細胞內粒線體的表現，並且 Ala 對偶基因表現的 CTLA-4 蛋白相較於 Thr 對偶基因會降低 66.7%的抑制活化 T 細胞能力；重要的是，當 CTLA-4 抑制表現降低時，可能會增加自體免疫疾病發生的易感受性 (19)。

然而，CTLA-4 A+49G 基因多形性是否為台灣人之僵直性脊椎炎的易感受性因子仍不清楚；因此，我們探討僵直性脊椎炎的發生是否相關於 CTLA-4 A+49G 基因多形性。

## 材料與方法

### 研究對象與流行病學資訊

本研究於中山醫學大學附設醫院免疫風濕科收集332名僵直性脊椎炎病患為病例組，病例經由免疫風濕專科醫師確診及X光評估；並且進行指尖離地試驗 (finger to floor test)、腰椎彎曲試驗 (Schober test)、以及評估關節疼痛程度及數目。若病患具有下列特徵：(1) 下背痛併晨間僵硬超過三個月，(2) 腰椎運動範圍受限 (Schober試驗小於5公分)，(3) 擴胸運動範圍受限 (擴胸試驗小於5公分)，(4) X光顯示有關節炎 (雙側皆第二級以上，或單側第三級以上)；而符合以上1至3點之任一點加上第4點 (1984年New York標準)，即確定為僵直性脊椎炎病例 (20)。本研究之病例與對照的配對比例為1:1，健康對照是以病例之年齡 (±5歲) 與性別所配對；健康對照共計為332名。而對照是選取於同一教學醫學中心執行健康檢查且無脊椎關節炎相關疾病之健康成人，對照若在健康檢查期間一週內具有懷孕、三個月內具有服藥情形、具有骨質疏鬆症、骨折、牛皮癬、萊特氏症候群 (Reiter's syndrome)、心血管疾病、發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease；IBD) 及甲狀腺疾病者，則被排除於研究樣本外。

參與者的同意書皆被獲取。問卷所涵蓋的問題包括：人口學特質、生活型態如抽菸習慣及運動習慣、詳細的個人及家族疾病史。研究對象的抽菸史包括每天抽菸的支數和抽菸年數；而個人疾病史包括個人發病年齡、發病年數、藥物使用狀況以及現今治療情形也被詢問，疾病家族史定義則為研究對象之一等親親屬具有關節炎病變疾病者。

### 臨床評估

本研究使用中文版巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (Bath Akylosing Spondylitis Disease Activity Index ; BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (Bath Akylosing Spondylitis Functional Index ; BASFI)、巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (Bath Akylosing Spondylitis Global ; BAS-G)，來評估僵直性脊椎炎病患的疾病活性與日常生活機能；這些中文版評估工具已被證實具有良好的信度 (0.87-0.94) 及效度 (0.92-0.94) (21)。生化指標的測量包括紅血球沉降速率 (erythrocyte sedimentation rate ; ESR)、C-反應蛋白 (C-reactive protein ; CRP) 以及A型免疫球蛋白 (immunoglobulin A ; IgA)。

### HLA-B27與CTLA-4基因檢測

所有研究對象之靜脈血被收集在含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管中，並且被分離成為血漿、buffy coat和紅血球。這些樣本在同一天內被處理，並且儲存於-70°C下。對於HLA-B27之基因檢測，是以50 µl的血液和30 µl FITC-labeled anti-HLA- B27 [clone GS 145.2 (IgG1, Kappa)] 混合並以慢速震盪離心3秒，靜置於室溫15分鐘，再加入2 ml的溶解液，隨後慢速震盪離心3秒，再度靜置桌上10

分鐘，以離心5分鐘200轉。以PBS沖洗兩次並除去上清液，再震盪離心讓細胞回溶。最後加入0.25 ml的1% paraformaldehyde以流式細胞儀測定之。樣本加入 median fluorescence 1 channel，若結果亮度大於或相等於標準標記 (decision marker)，即為B27陽性 (22)。此部分之HLA-B27之基因檢測，是委由中山醫學大學附設醫院檢驗醫學部進行。

CTLA-4 A+49G基因型的測定是從buffy coat萃取出DNA來進行，根據 Marron等人 (23) 在1997年所描述對於CTLA-4之A+49G基因多形性分析方法，執行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 增幅後，以限制片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) 分析辨識。用以增幅 CTLA-4 A+49G基因的引發子 (primers) 序列為 5'-AAG GCT CAG CTG AAC CTG GT-3' 和 5'-CTG CTG AAA CAA ATG AAA CCC-3'，PCR循環參數組成為 94°C下三分鐘之先前培養，接續於94°C下二分鐘之變性步驟、56°C下二分鐘之重鍊、以及72°C下三分鐘之延展，並重複30次的循環後，反應於最後的72°C五分鐘之延展後終止。該PCR產物的長度為153 bp，PCR產物也在37°C以*BstEII*消化16小時，消化產物於 3.5%瓊膠中以ethidium bromide染色後判讀。同型的CTLA-4 A+49G GG基因型個體表現出153 bp一段產物片段，同型的AA基因型個體顯現出135 bp和18 bp 兩段產物片段；而異型的CTLA-4 A+49G AG基因型個體則有全部三段產物片段。

### 統計分析

病例與對照的年齡及性別之比較，連續性變項以Student's *t*-test檢定；類別性變項則以 $\chi^2$ -test檢定。 $\chi^2$ -test也被執行來檢定在病例組與對照組中CTLA-4 A+49G



基因型的盛行率差異。隨後，使用多變項條件對數模式 (multiple conditional logistic model) 求取每個變項的相對危險性 (relative risk; RR) 以及95%信賴區間 (95% confidence interval; 95% CI)。ESR、CRP、IgA、BASDAI、BASFI及BAS-G及初始症狀發病年齡在CTLA-4 A+49G基因型間之分佈差異是以ANOVA (analysis of variance) 或一般直線模式 (General Linear Model; GLM) 檢定。進一步地，根據幼年型及成年型僵直性脊椎炎初始症狀發病年齡的差異 (21)，我們將初始症狀發病年齡以小於16歲 (幼年型) 者以及大於16歲 (成年型) 者分為兩組，並且使用多變項條件對數模式求取CTLA-4 A+49G基因型分別對於幼年型或成年型僵直性脊椎炎發生的相對危險性以及95%信賴區間。所有的P值皆以雙尾檢定來計算。

## 結果

本研究中，分別有 332 名經由性別及年齡配對之僵直性脊椎炎患者與健康對照被納入分析。病例與對照之基本特質及臨床指標呈現於表一，病例及對照的平均年齡分別是  $43.7 \pm 0.5$  (標準誤) 歲與  $44.5 \pm 0.6$  歲；病例與對照之男性比例皆為 69.0%。病例組發病年齡是  $32.0 \pm 0.7$  歲，疾病持續時間是  $11.6 \pm 0.6$  年，疾病的延遲診斷時間是  $64.0 \pm 5.1$  個月。此外，在僵直性脊椎炎病患中，154 名 (46.4%) 患者有周邊關節炎、91 名 (27.4%) 患者有虹彩炎以及 16 名 (4.8%) 患者有發炎性腸道疾病的症狀。在臨床生化指標中，91.6%病患攜帶 HLA-B27 陽性，ESR、CRP 與 IgA 分別為  $25.4 \pm 1.1$  mm/h、 $1.2 \pm 0.1$  mg/l 及  $326.9 \pm 9.9$  mg/dl；並且僵直性脊椎炎病患的巴斯僵直性脊椎炎活性指數 (BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI) 以及巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G) 分別為  $4.1 \pm$

0.1、 $2.3 \pm 0.1$  以及  $4.5 \pm 0.2$  分。

CTLA-4 A+49G 基因型與對偶基因在病例及對照組間之分佈情形，呈現於表二。在我們的研究對象中，健康對照組之 CTLA-4 A+49G 基因型分佈符合哈溫平衡定律 ( $\chi^2 = 2.34$  ;  $P = 0.125$ )。CTLA-4 A+49G A 對偶基因及 G 對偶基因頻率在病例中分別為 36.0%及 64.0%；在對照中分別為 32.5%及 67.5%。進一步地，我們以條件式對數迴歸模式進行分析，發現攜帶 AA 基因型者相較於 GG 基因型者具有 1.29 倍的僵直性脊椎炎發生危險 (95% C.I. = 0.73-2.29)。在對偶基因型的分析中，攜帶 A 對偶基因者相較於 G 對偶基因者也有較高的疾病發生危險 (RR = 1.11 ; 95% CI = 0.87-1.41)；但並未達到統計顯著性。

分析 ESR、CRP、IgA、巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI)、巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G) 以及初始症狀發病年齡於攜帶不同 CTLA-4 A+49G 基因型的僵直性脊椎炎病人間之差異 (表三)，因為 GG 基因型的人數較少，所以 GG 與 GA 基因型被合併於後續的分析中；結果發現相較於攜帶 CTLA-4 A+49G GG/GA 基因型者，攜帶 AA 基因型者具有較高的 ESR (27.9 vs. 24.9)、CRP (1.7 vs. 1.1)、IgA (348.9 vs. 323.4)、巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (4.6 vs. 4.0)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (2.6 vs. 2.3) 以及巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (5.2 vs. 4.4)。並且，攜帶 AA 基因型者相較於 GG/GA 基因型者也有較早的初始症狀發病年齡 (30.9 vs. 32.4)。進一步地調整年齡、性別及病程之效應後，CRP ( $P = 0.075$ ) 與 BAS-G ( $P = 0.079$ ) 在 AA 基因型及 GG/GA 基因型間之差異達到邊緣顯著性。

進一步地，以條件式對數迴歸模式分析不同 CTLA-4 A+49G 基因型與對偶基因分別對於幼年型與成年型之僵直性脊椎炎之發生危險之差異 (表四)。攜帶

CTLA-4 A+49G AA 基因型者相較於攜帶 GG 基因型者，具有較低的幼年型僵直性脊椎炎發生危險 (RR = 0.13 ; 95% C.I. = 0.01-1.58) ; 攜帶 CTLA-4 A+49G A 對偶基因型者相較於攜帶 G 對偶基因型者也具有較低的幼年型僵直性脊椎炎發生之危險 (RR = 0.37 ; 95% C.I. = 0.12-1.20) 。相對地，攜帶 CTLA-4 A+49G AA 基因型者相較於攜帶 GG 基因型者則具有較高的成年型僵直性脊椎炎之發生危險 (RR = 1.80 ; 95% C.I. = 0.97-3.33) ; 在對偶基因的頻率分布上，攜帶 CTLA-4 A+49G A 對偶基因型者相較於攜帶 G 對偶基因型者也有顯著較高的成年型僵直性脊椎炎之發生危險 (RR = 1.32 ; 95% C.I. = 1.02-1.72) 。

## 討論

周邊耐受性之失衡已經被建議與自體免疫疾病的發生具有相關性 (7)，但是周邊耐受性之失衡與僵直性脊椎炎之相關性仍是不清楚的。CTLA-4 與 CD28 皆表現於活化 T 細胞，並且會互相競爭與抗原呈現細胞上的 B7-2 分子結合。當 CTLA-4 與 B7-1 (CD80) 及 B7-2 (CD86) 結合，可對於 CD28 作用於活化 T 細胞所產生之共刺激訊號進行負調節，以避免自體免疫反應及維持周邊耐受性 (24, 25)。因此，僵直性脊椎炎的發生可能與 CTLA-4 的表現及其分子的功能有關。CTLA-4 基因 exon 1 核苷酸+49 位置包含一個 A 至 G 的鹼基置換 (18)，此置換會影響 CTLA-4 在細胞內粒線體的表現，並且當 CTLA-4 抑制表現降低時，可能會增加自體免疫疾病發生的易感受性 (19)。然而，先前 Lee 等人 (26) 於台灣人中並未發現到 CTLA-4 A+49G 基因多形性與僵直性脊椎炎之相關性，這可能與較少的研究樣本數有關。我們現今的研究依然並未觀察到，CTLA-4 A+49G 基因多形性與僵直性脊椎炎之相關性。Azizi 等人 (27) 則在伊朗人中發現攜帶

CTLA-4 A+49G G 對偶基因型者相較於攜帶 A 對偶基因型者有較高的僵直性脊椎炎發生危險；這樣分歧的結果可能是因為種族上的基因頻率差異所導致。Azizi 等人 (27) 所執行的伊朗人僵直性脊椎炎之研究中，健康對照的 CTLA-4 A+49G A 及 G 對偶基因頻率分別為 77.2%與 22.8%；相對地，在我們的研究中，健康對照 CTLA-4 A+49G A 及 G 對偶基因頻率分別為 32.5%與 67.5%。而在先前的研究中，此單一核苷酸多形性在華人的 A 對偶基因頻率被報告是 40.6%-60.8% (28-30)，在日本人中是 37.9% (31)，在韓國人中則是 26.2% (32)；並且在我們健康對照中，CTLA-4 A+49G 對偶基因頻率分布是符合哈溫平衡定律，這些結果確認了我們基因型分析的技術。

僵直性脊椎炎好發於 16 至 40 歲的成年人 (2)。許多研究已經顯示，僵直性脊椎炎患者之初始症狀發病年齡的早晚會有不同疾病的臨床型態；幼年型僵直性脊椎炎 (初始症狀年齡小於 16 歲) 患者罹患周邊關節炎與關節外症狀比例較高 (33)；成年型僵直性脊椎炎 (初始症狀年齡大於 16 歲) 患者則具有較為嚴重的頸椎疼痛、前胸壁 (anterior chest wall) 病變、無菌性骨炎 (aseptic osteitis) (34)、以及肩關節病變 (35)。因此，幼年型僵直性脊椎炎與成年型僵直性脊椎炎之致病機轉可能不同。Lei 等人 (28) 探討 CTLA-4 基因與華人類風濕性關節炎之相關性，結果發現攜帶 G 對偶基因者具有較高的類風濕性關節炎發生危險；進一步地，統合分析 (meta-analysis) 12 篇 CTLA-4 A+49G 與類風濕性關節炎的病例對照研究，結果發現 CTLA-4 A+49G G 對偶基因是亞洲與歐洲族群之類風濕性關節炎的危險因子。在現今的研究中，我們也觀察到攜帶 CTLA-4 A+49G A 對偶基因者相較於攜帶 G 對偶基因者有較低的幼年型僵直性脊椎炎發生危險；雖然，如此的結果並未達到統計上的顯著差異，有可能與本研究較小的樣本數有關。Ligers 等

人 (36) 也指出攜帶 CTLA-4 A+49G AA 基因型者相較於攜帶 AG 與 GG 基因型者具有較高的 CTLA-4 mRNA 與細胞表面的蛋白之表現；因此，CTLA-4 A+49G AA 基因型分泌之蛋白在 T 細胞的增生及活化上具有較好的抑制能力。而在我們的研究對象中，攜帶 CTLA-4 A+49G A 對偶基因型者可能因為具有較好的 T 細胞抑制能力，因此，較不易產生幼年型的僵直性脊椎炎；未來研究應該特別針對 CTLA-4 A+49G 基因型、T 細胞的增生與活化、以及幼年型僵直性脊椎炎發生危險的關係進行釐清。此外，在我們的研究對象中，攜帶 CTLA-4 A+49G A 對偶基因者相較於攜帶 G 對偶基因者反而具有顯著較高的成年型僵直性脊椎炎之發生危險；這可能也反應了幼年型與成年型僵直性脊椎炎之致病機轉的不同。成年型的僵直性脊椎炎之發生可能較不相關於 T 細胞的抑制；但 T 細胞的增生卻有可能在成年型的僵直性脊椎炎之發展中有所影響。由這些結果推論，CTLA-4 基因在周邊耐受性訊息分子與僵直性脊椎炎發展之關係中，扮演一個很重要的角色；然而，未來的研究仍需加以釐清我們的結果。

病患個體內的急性期反應物 CRP 值已經被報告，對於發炎性的疾病具有較佳的偵測能力和敏感度 (37)。Lee 等人 (26) 於台灣人的研究中，發現攜帶 CTLA-4 A+49G A 對偶基因者較有可能具有異常高濃度的 CRP ( $> 0.8$  mg/dl)。於現今的研究中，我們也觀察到攜帶 CTLA-4 A+49G A 對偶基因的僵直性脊椎炎患者相較於攜帶 G 對偶基因的僵直性脊椎炎患者具有較高的 CRP 濃度，雖然僅達到統計上的邊緣顯著性。這些結果可能建議著 CTLA-4 A+49G 基因型可能與僵直性脊椎炎患者症狀的嚴重程度具有相關性；並且攜帶 A 對偶基因者有較低的 CTLA-4 表現量，可能會限制免疫反應的調節，因而造成發炎反應的發生。

部分有效的工具已經被發展來評估僵直性脊椎炎患者的身心機能及殘疾，如

巴斯僵直性脊椎炎疾病活動指標 (BASDAI) (38) 及巴斯僵直性脊椎炎功能指標 (BASFI) (39); 此外, 巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G) 也被建立來評估僵直性脊椎炎患者整體的身心舒適狀態 (40)。這些問卷均可以由患者快速且容易地完成, 並且在評估臨床症狀的變化上具有很好的再現性 (reproducibility)、效度 (validity) 及敏感度 (sensitivity), 問卷內容也涵蓋了僵直性脊椎炎病患的整體症狀, 如疲累、疼痛、腫脹、晨間僵硬的現象。BASDAI、BASFI 及 BAS-G 問卷的中譯版在先前的研究中已被翻譯出, 且此三份問卷具有良好的信度 (Cronbach's  $\alpha$ ) 及效度 (intraclass correlation coefficient; ICC) (21)。基因表現對於僵直性脊椎炎患者之疾病嚴重程度可能有很大的貢獻性 (41)。我們也觀察到攜帶 CTLA-4 A+49G AA 基因型者具有較高的 BASDAI、BASFI 以及 BAS-G 數值; 且 BAS-G 達到統計上的邊緣顯著性, 我們的結果可能建議著僵直性脊椎炎之周邊耐受性的失衡可能與其症狀的嚴重程度具有相關性。

我們現今的研究仍然有一些限制, 我們的研究資料是收集自單一醫學中心, 可能會有引介偏差 (referral bias) 存在。雖然回憶偏差可能是一項潛在的問題, 但是同時施則三項不同的評估量表, 因此較不可能產生。而我們的中文版 BASDAI、BASFI 及 BAS-G 顯示出具有足夠的信度及效度 (21), 因此, 評估僵直性脊椎炎之華人患者的疾病活性及日常生活機能, 使用原始量表修飾後的中文版本是足以加以評估。

我們的結果顯示, CTLA-4 A+49G 基因型可能為僵直性脊椎炎發生之易感受性因子, 並且與患者的 CRP 濃度具有相關。而未來的研究應該加以探討 CTLA-4 A+49G 相關的周邊耐受性訊息分子與僵直性脊椎炎發展之關係, 以更進一步地釐清僵直性脊椎炎發生的機制。

## 致謝

本研究感謝國家科學委員會的贊助 (NSC 98-2815-C-040-026-B)，感謝翁瑞宏老師的指導，也感謝魏正宗醫師、黃駿煌同學、涂怡君同學以及實驗室全體實驗室伙伴的協助。

## 參考文獻

1. Masi AT. Walsh EG. Ankylosing spondylitis: integrated clinical and physiological perspectives. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 21(1):1-8, 2003.
2. Reveille JD. Ball EJ. Khan MA. HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. *Current Opinion in Rheumatology*. 13(4):265-72, 2001.
3. Chou CT. Chen JM. Hsu CM. Chen SJ. HLA-B27 and its subtypes in 4 Taiwanese Aborigine tribes: a comparison to Han Chinese patients with ankylosing spondylitis. *Journal of Rheumatology*. 30(2):321-5, 2003.
4. Sieper J. Braun J. Rudwaleit M. Boonen A. Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 61 Suppl 3:iii8-18, 2002.
5. Braun J. Bollow M. Sieper J. Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*. 24(4):697-735, 1998.
6. Nishimura H. Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends in Immunology*. 22(5):265-8, 2001.
7. Tarner IH. Fathman CG. Does our current understanding of the molecular basis of immune tolerance predict new therapies for autoimmune disease?. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2(9):491-9, 2006.
8. Keir ME. Butte MJ. Freeman GJ. Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance

- and immunity. *Annual Review of Immunology*. 26:677-704, 2008.
9. Sharpe AH. Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature Reviews. Immunology*. 2(2):116-26, 2002.
  10. Butte MJ. Keir ME. Phamduy TB. Sharpe AH. Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 27(1):111-22, 2007.
  11. Berg M. Zavazava N. Regulation of CD28 expression on CD8+ T cells by CTLA-4. *Journal of Leukocyte Biology*. 83(4):853-63, 2008.
  12. van der Merwe PA. Bodian DL. Daenke S. Linslev P. Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *The Journal of Experimental Medicine*. 185(3):393-403, 1997.
  13. Fife BT. Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews*. 224:166-82, 2008.
  14. Duftner C. Goldberger C. Falkenbach A. Wurzner R. Falkensammer B. Pfeiffer KP. Maerker-Hermann E. Schirmer M. Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4+CD28- T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Research and Therapy*. 5(5):R292-300, 2003.
  15. Schirmer M. Goldberger C. Wurzner R. Duftner C. Pfeiffer KP. Clausen J. Neumayr G. Falkenbach A. Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Research*. 4(1):71-6, 2002.
  16. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews. Immunology*. 4(5):336-47, 2004.
  17. Ling V. Wu PW. Finnerty HF. Sharpe AH. Gray GS. Collins M. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics*. 60(3):341-55, 1999.



18. Ueda H. Howson JM. Esposito L. Heward J. Snook H. Chamberlain G. Rainbow DB. Hunter KM. Smith AN. Di Genova G. Herr MH. Dahlman I. Payne F. Smyth D. Lowe C. Twells RC. Howlett S. Healy B. Nutland S. Rance HE. Everett V. Smink LJ. Lam AC. Cordell HJ. Walker NM. Bordin C. Hulme J. Motzo C. Cucca F. Hess JF. Metzker ML. Rogers J. Gregory S. Allahabadia A. Nithiyananthan R. Tuomilehto-Wolf E. Tuomilehto J. Bingley P. Gillespie KM. Undlien DE. Ronningen KS. Guja C. Ionescu-Tirgoviste C. Savage DA. Maxwell AP. Carson DJ. Patterson CC. Franklyn JA. Clayton DG. Peterson LB. Wicker LS. Todd JA. Gough SC. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 423(6939):506-11, 2003.
19. Anjos S. Nguyen A. Ounissi-Benkalha H. Tessier MC. Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *Journal of Biological Chemistry*. 277(48):46478-86, 2002.
20. van der Linden S. Valkenburg HA. Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis and Rheumatism*. 27(4):361-8, 1984.
21. Wei JC. Wong RH. Huang JH. Yu CT. Chou CT. Jan MS. Tsay GJ. Chou MC. Lee HS. Evaluation of internal consistency and re-test reliability of Bath ankylosing spondylitis indices in a large cohort of adult and juvenile spondylitis patients in Taiwan. *Clinical Rheumatology*. 26(10):1685-91, 2007.
22. Chou CT. Tsai YF. Liu J. Wei JC. Liao TS. Chen ML. Liu LY. The detection of the HLA-B27 antigen by immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay-comparison with a flow cytometric procedure. *Journal of*

- Immunological Methods. 255(1-2):15-22, 2001.
23. Marron MP. Raffel LJ. Garchon HJ. Jacob CO. Serrano-Rios M. Martinez Larrad MT. Teng WP. Park Y. Zhang ZX. Goldstein DR. Tao YW. Beaurain G. Bach JF. Huang HS. Luo DF. Zeidler A. Rotter JI. Yang MC. Modilevsky T. Maclaren NK. She JX. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Human Molecular Genetics*. 6(8):1275-82, 1997.
  24. Thompson CB. Allison JP. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity*. 7(4):445-50, 1997.
  25. Tivol EA. Schweitzer AN. Sharpe AH. Costimulation and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 8(6):822-30, 1996.
  26. Lee WY. Chang YH. Lo MK. Chang CP. Yang SC. Yang TP. Ho KT. Juan CW. Shiao MY. Polymorphisms of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and cytokine genes in Taiwanese patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens*. 75(2):119-26, 2010.
  27. Azizi E. Massoud A. Amirzargar AA. Mahmoudi M. Soleimanifar N. Rezaei N. Jamshidi AR. Nikbin B. Nicknam MH. Association of CTLA4 Gene Polymorphism in Iranian Patients with Ankylosing Spondylitis. *Journal of Clinical Immunology*. 30(2):268-71, 2010.
  28. Lei C. Dongqing Z. Yeqing S. Oaks MK. Lishan C. Jianzhong J. Jie Q. Fang D. Ningli L. Xinghai H. Daming R. Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *European Journal of Human Genetics*. 13(7):823-8, 2005.
  29. Wang L. Li D. Fu Z. Li H. Jiang W. Li D. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han population. *BMC*

- Cancer. 7:173, 2007.
30. Liu MF. Wang CR. Lin LC. Wu CR. CTLA-4 gene polymorphism in promoter and exon-1 regions in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 10(9):647-9, 2001.
  31. Tsukahara S. Iwamoto T. Ikari K. Inoue E. Tomatsu T. Hara M. Yamanaka H. Kamatani N. Momohara S. CTLA-4 CT60 polymorphism is not an independent genetic risk marker of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 67(3):428-9, 2008.
  32. Lee YH. Kim YR. Ji JD. Sohn J. Song GG. Polymorphisms of the CTLA-4 exon 1 and promoter gene in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 10(9):601-5, 2001.
  33. Porcher R. Said-Nahal R. D'Agostino MA. Miceli-Richard C. Dougados M. Breban M. Two major spondylarthropathy phenotypes are distinguished by pattern analysis in multiplex families. *Arthritis & Rheumatism*. 53(2):263-71, 2005.
  34. Caplanne D. Tubach F. Le Parc JM. Late onset spondylarthropathy: clinical and biological comparison with early onset patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 56(3):176-9, 1997.
  35. Calin A. Elswood J. Edmunds L. Late onset ankylosing spondylitis--a distinct disorder?. *British Journal of Rheumatology*. 30(1):69-70, 1991.
  36. Ligers A. Teleshova N. Masterman T. Huang WX. Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes and Immunity*. 2(3):145-52, 2001.
  37. van Leeuwen MA. van Rijswijk MH. Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillieres Clinical Rheumatology*. 8(3):531-52, 1994.
  38. Garrett S. Jenkinson T. Kennedy LG. Whitelock H. Gaisford P. Calin A. A new

approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *Journal of Rheumatology*. 21(12):2286-91, 1994.

39. Calin A. Edmunds L. Kennedy LG. Fatigue in ankylosing spondylitis--why is it ignored? *Journal of Rheumatology*. 20(6):991-5, 1993.
40. Jones SD. Steiner A. Garrett SL. Calin A. The Bath Ankylosing Spondylitis Patient Global Score (BAS-G). *British Journal of Rheumatology*. 35(1):66-71, 1996.
41. Hamersma J. Cardon LR. Bradbury L. Brophy S. van der Horst-Bruinsma I. Calin A. Brown MA. Is disease severity in ankylosing spondylitis genetically determined?. *Arthritis and Rheumatism*. 44(6):1396-400, 2001.

表一：僵直性脊椎炎病例及對照之基本特徵與臨床指標

	病例	對照
個數	332	332
性別：男	229 (69.0%)	229 (69.0%)
年齡：歲	43.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	44.5 ± 0.6
臨床特徵		
發病年齡 (歲) <sup>b</sup>	32.0 ± 0.7	
疾病持續時間 (年)	11.6 ± 0.6	
延遲診斷時間 (月)	64.0 ± 5.1	
併發症		
周邊關節炎	154 (46.4%)	
虹彩炎	91 (27.4%)	
發炎性腸道疾病	16 (4.8%)	
生化指標		
HLA- B27 <sup>+</sup>	304 (91.6%)	
紅血球沉降速率 (ESR, mm/h)	25.4 ± 1.1	
C反應蛋白 (CRP, mg/l)	1.2 ± 0.1	
A型免疫球蛋白 (IgA, mg/dl)	326.9 ± 9.9	
巴斯僵直性脊椎炎活性指數 (BASDAI)	4.1 ± 0.1	
巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI)	2.3 ± 0.1	
巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G)	4.5 ± 0.2	

<sup>a</sup> 平均值 ± 標準誤。

<sup>b</sup> 五名病患之初始症狀發病年齡未知。

表二：CTLA-4 A+49G 基因型與對偶基因在僵直性脊椎炎病例及對照間之分佈  
與相對危險性

		病例 n (%)	對照 n (%)	相對危險性 (95% C.I.)
個數		332	332	
基因型	AA	38 (11.4%)	29 (8.7%)	1.29 (0.73-2.29)
	GA	163 (49.1%)	158 (47.6%)	1.09 (0.77-1.53)
	GG	131 (39.5%)	145 (43.7%)	1.00
對偶基因	A	239 (36.0%)	216 (32.5%)	1.11 (0.87-1.41)
	G	425 (64.0%)	448 (67.5%)	1.00

表三：攜帶不同的 CTLA-4 A+49G 基因型之僵直性脊椎炎病患的 ESR、CRP、IgA、BASDAI、BASFI、BAS-G 及初始症狀發病年齡之差異

基因型	個數	ESR	CRP	IgA	BASDAI	BASFI	BAS-G	初始症狀 <sup>d</sup> 發病年齡
CTLA-4 AA	38	27.9 ± 16.8 <sup>a</sup>	1.7 ± 2.9	348.9 ± 177.0	4.6 ± 2.6	2.6 ± 2.2	5.2 ± 3.0	30.9 ± 10.4
GG/GA	289	24.9 ± 19.3	1.1 ± 1.7	323.4 ± 178.4	4.0 ± 2.2	2.3 ± 2.3	4.4 ± 2.8	32.4 ± 12.4
<i>P</i> 值		0.376	0.085	0.420	0.110	0.394	0.086	0.479
<i>P</i> 值 (調整後) <sup>b</sup>		0.374	0.075	0.416	0.105	0.371	0.079	0.360 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 平均值 ± 標準差。

<sup>b</sup> 調整年齡、性別及病程之效應。

<sup>c</sup> 調整年齡、性別之效應。

<sup>d</sup> 五名病患之初始症狀發病年齡未知。

表四：不同的 CTLA-4 A+49G 基因型與對偶基因分別對於幼年型與成年型僵直性脊椎炎之發生危險

變項	初始症狀發病年齡 < 16 歲 (幼年型)			初始症狀發病年齡 ≥ 16 歲 (成年型)		
	病例 n (%)	對照 n (%)	RR (95% C.I.)	病例 n (%)	對照 n (%)	RR (95% C.I.)
基因型						
AA	1 (5.6%)	5 (27.8%)	0.13 (0.01-1.58)	37 (12.0%)	24 (7.8%)	1.80 (0.97-3.33) <sup>†</sup>
GA	8 (44.4%)	8 (44.4%)	0.63 (0.11-3.29)	154 (49.8%)	147 (47.6%)	1.18 (0.83-1.68)
GG	9 (50.0%)	5 (27.8%)	1.00	118 (38.2%)	138 (44.7%)	1.00
對偶基因						
A	10 (27.8%)	18 (50.0%)	0.37 (0.12-1.20)	228 (36.9%)	196 (31.7%)	1.32 (1.02-1.72) <sup>*</sup>
G	26 (72.2%)	18 (50.0%)	1.00	390 (63.1%)	422 (68.3%)	1.00

<sup>a</sup> 五名病患之初始症狀發病年齡未知。

<sup>†</sup>  $P = 0.06$ ,  $\chi^2$  test。

<sup>\*</sup>  $P = 0.03$ ,  $\chi^2$  test。