

中国大陆汉族人群强直性脊柱炎患者骨保护素基因多态性研究

王鑫强 钱邦平 邱勇 蒋青 江华 蒋军 季明亮

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2011092);江苏省医学重点人才项目

作者单位:210008 江苏南京,南京大学医学院附属鼓楼医院骨科

作者简介:王鑫强(1987-),男,医学硕士生,研究方向:脊柱外科

通信作者:钱邦平, E-mail: qianbangping@163.com

【摘要】 目的:通过骨保护素(OPG)基因单核苷酸多态性(SNPs)位点的筛查,分析中国大陆汉族人群中OPG基因多态性与强直性脊柱炎(AS)易感性的相关性。**方法:**采集2008年1月至2012年1月在我院就诊的AS患者195例(AS组)及203例性别、年龄与之匹配的健康体检者(对照组)的外周血样本,并提取基因组DNA。所有样本采用TaqMan探针法对OPG基因SNP rs2073618、rs4355801位点进行基因型鉴定。比较AS组与对照组之间不同等位基因及基因型的分布差异,并分析其与AS易感性的相关性。**结果:**OPG基因SNP rs2073618、rs4355801位点的等位基因及基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡。AS组与对照组等位基因频率分别如下。rs2073618(G):71.0%、71.9%,(C):29.0%、28.1%;rs4355801(G):27.7%、26.4%,(A):72.3%、73.6%。两组在基因型频率的分布上显示,rs2073618(CC):9.2%、8.9%,(GC):39.5%、38.4%,(GG):51.3%、52.7%;rs4355801(AA):52.3%、52.7%,(AG):40.0%、41.9%,(GG):7.7%、5.4%。以上数据组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。经关联性分析,未发现AS发病的风险等位基因或基因型。**结论:**中国大陆汉族人群中OPG基因SNP rs2073618、rs4355801单核苷酸多态性与AS的易感性之间没有相关性。

【关键词】 强直性脊柱炎;骨保护素;基因多态性;易感性;TaqMan探针法

doi: 10.3969/j.issn.1671-7163.2013.01.010

【中图分类号】 R593.23 Q347 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7163(2013)01-0035-04

Genetic Polymorphisms of Osteoprotegerin Gene in Ankylosing Spondylitis in Chinese Han Population

WANG Xin-qiang, QIAN Bang-ping, QIU Yong, JIANG Qing, JIANG Hua, JIANG Jun, JI Ming-liang. Department of Orthopedics, the Affiliated Drum Tower Hospital of the Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China

【Abstract】 Objective: To investigate whether the genetic polymorphisms of osteoprotegerin (OPG) gene are associated with the susceptibility to ankylosing spondylitis (AS) in Chinese Han population. **Methods:** Between Jan. 2008 and Jan. 2012, a total of 195 AS patients and 203 cases of matched age and gender controls admitted in our hospital were enrolled in this study. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of each subject. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of OPG gene (rs2073618 and rs4355801) were genotyped with TaqMan probe method. The frequencies of different alleles and genotypes were compared between AS patients and controls. The associations of OPG genetic polymorphisms with the susceptibility to AS were also analyzed. **Results:** Both OPG gene SNP rs2073618 and rs4355801 were conformed to Hardy-Weinberg equilibrium. The allele frequencies in AS patients and controls were rs2073618 (G): 71.0% and 71.9%, (C): 29.0% and 28.1%; rs4355801 (G): 27.7% and 26.4%, (A): 72.3% and 73.6%, respectively. The genotype frequencies in those two groups were rs2073618 (CC): 9.2% and 8.9%, (GC): 39.5% and 38.4%, (GG): 51.3% and 52.7%; rs4355801 (AA): 52.3% and 52.7%, (AG): 40.0% and 41.9%, (GG): 7.7% and 5.4%, respectively. No significant difference was observed between the frequencies of different alleles and genotypes of OPG gene SNP rs2073618, rs4355801 in AS patients and controls ($P>0.05$). No significant risk allele or genotype of the susceptibility to AS was found either ($P>0.05$). **Conclusions:** The SNP rs2073618, rs4355801 of OPG gene may not be associated with the susceptibility to AS in Chinese Han population.

【Key words】 Ankylosing spondylitis; Osteoprotegerin; Single nucleotide polymorphism; Susceptibility; TaqMan probe method

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种炎症性疾病,属于血清阴性脊柱关节病的一种,以中轴骨及骶髂关节损害为主要表现。破骨细胞在炎症性骨关节病的骨质侵蚀破坏与骨量丢失中起重要作用^[1,2]。研究发现,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是调节破骨细胞分化、生成及活性的重要因子,能竞争性抑制由细胞核因子KB受体活化因子(receptor activator of nuclear factor-kappaB, RANK)及其配体(receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, RANKL)结合所介导的破骨细胞的成熟与分化^[3,4]。

全基因组相关性研究发现,OPG基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs) rs4355801位点的变异可能会增加骨量减少的风险^[5],提示该位点突变能导致OPG功能改变,从而使其对破骨细胞增殖与分化的抑制能力减弱。在台湾地区人群中,OPG基因SNP位点 rs2073618 GG基因型携带者AS的发病风险较高,该位点C等位基因携带者的症状出现年龄较早,CC基因型携带的AS患者外周关节炎的发生率较低^[6]。而中国大陆汉族人中OPG基因多态性与AS的相关性则未见报道。本研究拟通过分析OPG基因单核苷酸多态性与AS的相关性来探讨OPG基因在AS的发生与发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取2008年1月~2012年1月于南京大学医学院附属鼓楼医院就诊的AS患者共195例为AS组,均符合1984年修订的AS纽约诊断标准^[7]。其中男183例,女12例;年龄21~53岁,平均(32±12.6)岁。选取性别、年龄与AS组患者相匹配的健康体检者共203名作为对照组,男178例,女25例;年龄26~57岁,平均(37±15.2)岁。所有研究对象均为中国大陆汉族人。本研究获本院临床研究伦理委员会批准及所有受试者知情同意。

1.2 基因组DNA提取

采集两组共398位受试者外周静脉血并提取基因组DNA。通过2.5%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA的完整性和纯度。提取的基因组DNA于-20℃保存待用。

1.3 引物及探针设计

OPG基因 rs2073618、rs4355801位点基因序列

参考GeneBank,应用Primer Premier 5.0软件设计PCR引物,引物及探针均由南京骥骛生物技术有限公司合成,序列详见表1。

1.4 基因分型

通过TaqMan法(Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA)对各SNP位点进行基因分型。根据不同荧光值,结合各SNP位点探针对应的碱基对各位点进行分型。

1.5 统计学方法

对各位点在AS组及对照组中基因型及等位基因型分布是否符合Hardy-Weinberg平衡进行检测。使用SPSS 16.0(Chicago, IL)进行统计学分析。AS组及对照组间等位基因与基因型分布差异使用 χ^2 检验,采用单因素Logistic回归分析计算优势比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

OPG基因SNP rs2073618与rs4355801基因型及等位基因在AS组及对照组中的分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$),说明取样具有群体代表性。

2.1 基因型与等位基因在AS组与对照组的分布

多态性位点 rs207361 CC、GC与GG三种基因型在AS组与对照组中均有分布,分布频率分别为9.2%、39.5%、51.3%与8.9%、38.4%、52.7%;等位基因G、C则分别为71.0%、29.0%与71.9%、28.1%。两组之间的基因型频率与等位基因分布差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

多态性位点 rs4355801在AS组与对照组中均检测到GG、AG、AA三种基因型分布,在AS组中分布频率分别为7.7%、40.0%、52.3%;在对照组中为5.4%、41.9%、52.7%;等位基因G、A在AS组与对照组中的频率分别为27.7%、72.3%与26.4%、73.6%。两组之间的基因型频率与等位基因分布差异没有统计学意义($P > 0.05$),见表2。

2.2 基因型与等位基因与AS易感性的相关性分析

对rs2073618、rs4355801位点基因型与等位基因与AS易感性的相关性进行分析,结果表明两个位点等位基因频率与基因型分布与AS易感性无明显相关性($P > 0.05$),未发现AS发病的风险等位基因或基因型(表3)。

表1 骨保护素基因多态性位点引物及探针序列

Tab. 1 The sequences of primers and probe for two single nucleotide polymorphism loci in the osteoprotegerin gene

位点 (Loci)	试剂 (Products)	序列 (Sequences)
rs2073618	上游引物 F (Forward primer)	TCCAAGCCCCTGAGGTTTC
	下游引物 R (Reverse primer)	AGGGACTTACCACGAGCGC
	探针 FAM (Probe FAM) ^a	FAM - CCACAATGAACAACCTT - MGB
	探针 HEX (Probe HEX) ^b	HEX - CCACAATGAACAACCTT - MGB
rs4355801	上游引物 F (Forward primer)	CAAACACTGTGCCTAGTCTAAGCAGTA
	下游引物 R (Reverse primer)	AGCTTTAGCAGCTGACTTTCCCT
	探针 FAM (Probe FAM) ^c	FAM - AGGTCTCAATAAATG - MGB
	探针 HEX (Probe HEX) ^d	HEX - CAGGTCTCAATAAGTGG - MGB

注:a. 探针 FAM 对应碱基 C (Probe FAM indicates allele C), b. 探针 HEX 对应碱基 G (Probe HEX indicates allele G); c. 探针 FAM 对应碱基 A (Probe FAM indicates allele A), d. 探针 HEX 对应碱基 G (Probe HEX indicates allele G)

表2 AS组与对照组 OPG 基因 SNP 基因型与等位基因频率(例,%)

Tab. 2 The frequencies of allele and genotype of two single nucleotide polymorphisms in OPG gene in AS patients and controls (n, %)

项目 (Item)	AS 组 (AS Group)	对照组 (Control Group)	χ^2	P		
rs2073618	CC	18 (9.2)	18 (8.9)	0.082	0.960	
	GC	77 (39.5)	78 (38.4)			
	GG	100 (51.3)	107 (52.7)	0.078	0.780	
	等位基因 (Allele)	G	277 (71.0)			292 (71.9)
	C	113 (29.0)	114 (28.1)			
rs4355801	GG	15 (7.7)	11 (5.4)	0.875	0.646	
	基因型 (Genotype)	AG	78 (40.0)			85 (41.9)
	AA	102 (52.3)	107 (52.7)			
	等位基因 (Allele)	G	108 (27.7)	107 (26.4)	0.181	0.671
		A	282 (72.3)	299 (73.6)		

表3 中国汉族人群 OPG 基因 rs2073618 与 rs4355801 与 AS 的相关性

Tab. 3 The association of the OPG gene SNPs rs2073618 and rs4355801 with AS in Chinese Han population

位点 (SNP)	AS 组 vs. 对照组 (AS Group vs. Control Group)	OR	P	95% CI
rs2073618	CC vs. GC + GG	0.957	0.899	0.482 - 1.898
	CC + GC vs. GG	1.059	0.776	0.714 - 1.569
	C vs. G	0.957	0.779	0.704 - 1.302
rs4355801	CC vs. CG + GG	0.949	0.826	0.595 - 1.513
	CC + CG vs. GG	1.093	0.686	0.709 - 1.686
	C vs. G	0.946	0.695	0.716 - 1.250

3 讨论

人类 OPG 基因位于染色体 8q23 - q24, 其编码的 OPG 是一种可溶性分泌糖蛋白, 属于肿瘤坏死因子受体家族。在破骨细胞的成熟与分化中, RANKL/RANK/OPG 系统是一个关键的信号通路^[8], IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α 等炎症因子均可通过调节该信号通路刺激成骨细胞表达 OPG^[9]。在骨组织中, OPG 能与 RANKL 竞争性结合以阻断由 RANKL 与 RANK 结合所引起的破骨细胞的增殖与分化。实验表明, 高表达 OPG 的转基因小鼠可出现严重的骨质疏松症^[9], 而敲除 OPG 基因的小鼠则可出现明显的骨质疏松^[10]。而 AS 一个重要的病理变化就是广泛的骨质疏松同时伴韧带骨赘及新骨形

成^[11], 提示 OPG 基因可能在 AS 的病理改变中起一定作用。

rs2073618 是 OPG 基因第一个外显子区的 G/C 突变, 可使编码的氨基酸由天门冬氨酸变为赖氨酸^[12]。Huang 等^[6]报道, 在台湾地区人群中, OPG 基因 SNP 位点 rs2073618 GG 基因型携带者 AS 的发病风险较高, 且该位点等位基因分布与患者症状出现的年龄及外周关节损害的发生率有一定相关性。本研究中, 中国大陆汉族人群 OPG 基因 rs2073618 位点的等位基因与基因型分布在 AS 组与对照组之间无明显差异, 且未发现与 AS 易感性相关的风险等位基因或基因型, 与 Huang 等^[6]报道不一致, 可能因为 Huang 的研究中未限定入选患者的民族, 而

本研究中入选患者均为中国大陆的汉族人, 两人群的遗传背景可能存在差异。

rs4355801 是位于紧邻 OPG 基因羧基端非编码区的 A/G 突变。该位点的突变与 OPG 表达水平相关, 等位基因 G 携带者的 OPG 表达水平是等位基因 A 携带者的两倍左右^[5]。OPG 表达水平则与脊柱活动度及炎症活动程度相关^[13]。有研究发现, rs4355801 位点等位基因 A 预示着较低的腰椎骨密度及较高的骨质疏松性骨折发生率, 提示该位点突变会减弱 OPG 对于破骨细胞过增殖与活化的拮抗作用^[5,14]。本研究中, 中国大陆汉族人群 OPG 基因 rs2073618 位点的等位基因与基因型分布在 AS 组与对照组之间无明显差异, 且未发现与 AS 易感性相关的风险等位基因或基因型, 提示该位点功能的突变可能不参与 AS 的发生与发展。

本研究结果表明, 在中国大陆汉族人群中, OPG 基因 SNP rs2073618 与 rs4355801 单核苷酸多态性与 AS 的易感性无相关性, 且未发现上述位点与 AS 易感性相关的风险等位基因或基因型。提示 OPG 基因 rs2073618 与 rs4355801 位点突变可能并不参与中国大陆汉族人群 AS 的发生与发展。

参 考 文 献

- Durand M, Boire G, Komarova SV, et al. The increased in vitro osteoclastogenesis in patients with rheumatoid arthritis is due to increased percentage of precursors and decreased apoptosis - the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis (IODA) study. *Bone*, 2011, 48(3):588-596
- Herman S, Muller RB, Kronke G, et al. Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(10):3041-3050
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*, 2008, 29(2):155-192
- Miranda-Carus ME, Benito-Miguel M, Balsa A, et al. Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(4):1151-1164
- Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*, 2008, 371(9623):1505-1512
- Huang CH, Wei JC, Hung PS, et al. Osteoprotegerin genetic polymorphisms and age of symptom onset in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50(2):359-365
- 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 Rheum*, 1984, 27(4):361-368
- Pivonka P, Zimak J, Smith DW, et al. Theoretical investigation of the role of the RANK-RANKL-OPG system in bone remodeling. *J Theor Biol*, 2010, 262(2):306-316
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89(2):309-319
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12(9):1260-1268
- Korcowska I, Przepiera-Bedzak H, Brzosko M, et al. Bone tissue metabolism in men with ankylosing spondylitis. *Adv Med Sci*, 2011, 56(2):264-269
- Zhao HY, Liu JM, Ning G, et al. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 2005, 16(12):1519-1524
- Chen CH, Chen HA, Liao HT, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in ankylosing spondylitis: OPG is associated with poor physical mobility and reflects systemic inflammation. *Clin Rheumatol*, 2010, 29(10):1155-1161
- Paternoster L, Ohlsson C, Sayers A, et al. OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: findings from a metaanalysis of the Avon longitudinal study of parents and children and gothenburg osteoporosis and obesity determinants cohorts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(8):3940-3948

(收稿日期:2012-08-27)

(编辑:张萍)