

基础研究

ERAP1 基因单核苷酸多态性与中国汉族人群
强直性脊柱炎的易感性关联分析曲 哲¹, 钱邦平¹, 邱 勇¹, 季明亮¹, 江 华², 王 斌¹, 俞 杨¹, 朱泽章¹, 蒋 军¹, 毛赛虎¹

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 南京市; 2 广西医科大学附属第一医院脊柱外科 530022 南宁市)

【摘要】目的:探讨内质网氨基肽酶 1 基因(endoplasmic reticulum aminopeptidase 1, ERAP1)单核苷酸多态性(SNP)(rs27434、rs27044、rs30187)与中国汉族人群强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)的关系。**方法:**收集 2008 年 1 月~2012 年 1 月在我院病房及门诊就诊的 AS 患者 195 例, 203 例健康体检者作为正常对照组。采集 AS、正常对照组的血液样本, 提取基因组 DNA, 设计针对 ERAP1 基因 rs27434、rs27044、rs30187 位点的 PCR 引物、TaqMan 探针, 利用 TaqMan 探针技术对 rs27434、rs27044、rs30187 位点进行 PCR 荧光分型。采用 SPSS 16.0 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡、等位基因频率、基因型频率及其与 AS 患病风险分析。**结果:**所有 SNP 位点的基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P>0.05$); 各位点的基因型分布在病例组和对照组间无显著统计学差异(rs27434 位点, $P=0.439$; rs27044 位点, $P=0.76$; rs30187 位点, $P=0.48$); 此外, 两组间的等位基因频率差异亦无统计学意义(rs27434 位点, G: 病例组为 50.8%, 对照组为 48.3%; A: 病例组为 49.2%, 对照组为 51.7%。rs27044 位点, C: 病例组为 52.8%, 对照组为 55.0%; G: 病例组为 47.2%, 对照组为 45.0%。rs30187 位点, C: 病例组为 57.4%, 对照组为 52.0%; T: 病例组为 42.6%, 对照组为 48.0%)($P>0.05$)。**结论:**ERAP1 基因单核苷酸多态性 rs27434、rs27044、rs30187 与中国汉族人群 AS 的易感性无关。

【关键词】ERAP1 基因; 强直性脊柱炎; 单核苷酸多态性; 等位基因

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.09.12

中图分类号: R593.23, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-09-0832-05

The association between endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 gene polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis in Chinese Han population/QU Zhe, QIAN Bangping, QIU Yong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(9): 832-836

【Abstract】 Objectives: To investigate the association between endoplasmic reticulum aminopeptidase 1(ERAP1) gene polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis(AS) in Chinese Han population. **Methods:** 195 AS patients and 203 normal controls for healthy check from January 2008 to January 2012 were recruited in this study. Peripheral blood samples were collected from all the subjects and genomic DNA was then extracted. PCR primers and TaqMan probes were designed; and three SNPs, rs27434, rs27044 and rs30187 in ERAP1 gene were genotyped in both AS patients and controls by TaqMan probe method. The Hardy-Weinberg equilibrium test was performed, and the differences of the distributions of genotype and allele were compared between AS patients and healthy controls by software SPSS 16.0. **Results:** Hardy-Weinberg equilibrium was evident for the genotype distributions of all the 3 SNPs ($P>0.05$). There was no significant difference of the genotype distributions in 3 SNPs between AS and healthy control(for rs27434, $P=0.439$; for rs27044, $P=0.76$; for rs30187, $P=0.48$); similarly, no remarkable difference of the allele distributions was detected(for rs27434, G: 50.8% in cases vs. 48.3% in controls, C: 49.2% in cases vs. 51.7% in controls; for rs27044, C: 52.8% in cases vs. 55.0% in controls, G: 47.2% in cases vs. 45.0% in controls; for rs30187, C: 57.4% in cases vs. 52.0% in controls, T: 42.6% in cases vs. 48.0% in controls($P>0.05$)). **Conclusions:** The

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81372009);江苏省第四期“333 高层次人才培养工程”科研项目资助;江苏省卫生厅妇幼保健项目(编号:F201353)

第一作者简介:男(1989-), 硕士在读, 研究方向:脊柱畸形

电话:(025)68182202 E-mail:123quz@sina.com

通讯作者:钱邦平 E-mail:qianbangping@163.com

ERAP1 gene polymorphisms (rs27434, rs27044 and rs30187) may not be associated with the susceptibility to AS in Chinese Han population.

【Key words】 Ankylosing spondylitis, Single nucleotide polymorphism, Genetics, Endoplasmic reticulum aminopeptidase

【Author's address】 Department of Spine Surgery, Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种风湿因子阴性、累及中轴关节和肌腱韧带附着点的慢性进行性自身免疫性疾病^[1,2]。遗传因素被认为是其发病的主要因素之一,目前已证实人类白细胞抗原(HLA-B27)与 AS 的发病有密切关系,但研究发现 HLA-B27 对 AS 发病的遗传学贡献值只有 20%~40%,提示还有多个非 HLA 基因参与其发病^[3,4]。内质网氨基肽酶 1(endoplasmic reticulum aminopeptidase 1, ERAP1)基因是内质网中负责加工抗原肽的一种非 HLA 基因,其在内质网内表达量的增加可能导致 MHC I 类分子合成量增高,诱发免疫细胞的识别和自我攻击,从而发挥促炎作用^[5]。Wellcome Trust 病例控制协会(WTCCC)和澳-英-美脊柱炎协会(TASC)两大工作组通过全基因组扫描发现 ERAP1 基因多态性(rs27434、rs27044、rs30187)与 AS 的发病存在强相关性^[6]。为探讨我国汉族人群 ERAP1 基因多态性与 AS 的关系,我们采用 Taqman 技术对 225 例 AS 患者和 230 名健康人进行 ERAP1 基因 rs27434、rs27044、rs30187 三个位点的多态性分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2008 年 1 月~2012 年 1 月 225 例 AS 患者均来自南京大学附属鼓楼医院门诊和住院患者,符合 1984 年修订的 AS 纽约诊断标准^[7],由专科负责医师进行详细记录人口学资料及各项临床参数,排除资料不全及 RT-PCR 分型过程中基因型无法确定患者,最后被纳入本研究的共 195 例,其中男性 183 例,女性 12 例,年龄 21~53 岁,平均 32±12.6 岁;病程 2~33 年。230 名正常对照为健康体检者,排除 RT-PCR 分型过程中基因型无法确定的正常者,最后被纳入本研究的共 203 例,其中男性 178 例,女性 25 例,年龄 26~57 岁,平均 37±15.2 岁。所有 AS 患者均经人类白细胞抗原(HLA-B27)检测,其中 192 例为阳性,阳性率为

98.5%。正常对照组 HLA-B27 均为阴性。所有受试对象均为中国汉族人且为南方人群,均知情同意并自愿参加,且本研究获南京大学医学院附属鼓楼医院临床研究伦理道德委员会批准。

1.2 方法及步骤

1.2.1 基因组 DNA 提取 AS 患者与健康志愿者于无菌条件下用乙二胺四乙酸(EDTA)-K2 抗凝管采集外周静脉血 4ml。利用“树脂型™基因组 DNA 提取试剂盒”(上海赛百基因技术有限公司)提取 AS 患者和对照组基因组 DNA。2.5%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性和纯度。-20℃储存待用。

1.2.2 引物和探针设计 ERAP1 基因(rs27434、rs27044、rs30187)序列来自 Gen-bank。运用 Primer Premier 5.0 软件自行设计引物并应用 Oligo 6.0 软件评价,引物序列见表 1~3。

1.2.3 荧光定量 PCR 反应体系 聚合酶链反应(PCR)体系为 10μl,包括包括 2×TaqMan Master 5μl Mix 混合液,2μl 基因组 DNA,引物(10nmol/L)各 0.5μl,探针(10nmol/L)各 0.25μl,水 1.5μl。PCR 条件(rs27434):预变性 94℃ 5min;扩增反应变性 94℃ 30s,退火温度 60℃ 30s,延伸 72℃ 1min,共 35 个循环;最后延伸 72℃ 7min,在 ABI7300 上运行。rs27044、rs30187 的退火温度各为 58℃、60℃,余参数及步骤同 rs27434。

1.3 结果检测

分别检测病例组及对照组间 rs27434、rs27044 和 rs30187 的基因多态性 PCR 分型,并比较两组间的各等位基因型频率分布差异。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。对 rs27434、rs27044、rs30187 的等位基因频率、基因型频率、Hardy-Weinberg 平衡均进行 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

用于病例-对照研究的 ERAP1 基因 SNP 位

点(rs27434、rs27044、rs30187)的基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,具有群体代表性($P>0.05$)。rs27434 基因多态性 PCR 分型:两组都检出 G/G、A/A、A/G 三种基因型。rs27044 基因多态性 PCR 分型:两组都检出 C/C、C/G、G/G3 种基因型。rs30187 基因多态性 PCR 分型:两组都检出 C/C、C/T、T/T 三种基因型。

rs27434 在 AS 及对照组中的各基因型频率见表 4,其分布差异无统计学意义($\chi^2=1.64, P=0.439$);G 和 A 等位基因频率在 AS 中分别为 50.8%、49.2%,在对照组中分别为 48.3%、51.7%,两组之间无统计学差异($\chi^2=0.495, P=0.482$)。

rs27044 在两组间的各基因型频率见表 5,其分布差异无统计学意义($\chi^2=0.549, P=0.760$);C 和 G 等位基因频率在 AS 中分别为 52.8%、47.2%,在对照组中分别为 55%、45%,两组之间无统计学差异($\chi^2=0.36, P=0.56$)。

rs30187 在两组间的各基因型频率见表 6,其分布差异无统计学意义($\chi^2=1.47, P=0.48$);C 和 T 等位基因频率在 AS 中分别为 57.4%、42.6%,在对照组中分别为 52%、48%,两组之间无统计学差异($\chi^2=2.33, P=0.13$)。

表 1 ERAP1 基因 rs27434 位点引物和探针序列

Table 1 Primers and probe sequence of ERAP1 (rs27434)

引物及探针 Primer and probe	序列 Sequence
引物头 Top primer	5-CATCAAGTAAGCTTGGCATCACA-3
引物尾 Bottom primer	5-ATAGCCTTATATGTCCCATAGAAGCAA-3
探针 1-FAM(C) Probe 1-FAM(C)	FAM-TGAACTGGCCACCAG-MGB
探针 2-HEX(T) Probe 2-HEX(T)	HEX-TGAACTGGCTCACCAG-MGB

表 2 ERAP1 基因 rs27044 位点引物和探针序列

Table 2 Primers and probe sequence of ERAP1 (rs27044)

引物及探针 Primer and probe	序列 Sequence
引物头 Top primer	5-CGGCTGATAGTTGTCACACA-3
引物尾 Bottom primer	5-GCTCAGTCTCAGAGCGAATGC-3
探针 1-FAM(C) Probe 1-FAM(C)	FAM-AGGACTAGTAGTTCACCT-MGB
探针 2-HEX(T) Probe 2-HEX(T)	HEX-AGTAGTAGTTGACTCCGC-MGB

3 讨论

AS 是一种遗传因素为主的多基因复杂性疾

表 3 ERAP1 基因 rs30187 位点引物和探针序列

Table 3 Primers and probe sequence of ERAP1 (rs30187)

引物及探针 Primer and probe	序列 Sequence
引物头 Top primer	5-GGATGTGAAAACCATGATGAACAC-3
引物尾 Bottom primer	5-CCCCTCACTGTGATGGTTATTAGG-3
探针 1-FAM(C) Probe 1-FAM(C)	FAM-CTGCAGAGGGGTT-MGB
探针 2-HEX(T) Probe 2-HEX(T)	HEX-ACTGCAGAAGGGTT-MGB

表 4 AS 组与正常组 ERAP1 基因 rs27434 基因型、等位基因频率分布

Table 4 Allele and Genotype Frequencies of rs27434 in Ankylosing Spondylitis in a Chinese Han Population

基因型及等位基因 Genotype and allele	AS 组 (%) AS group	对照组 (%) Control group
G/G	42(21.5%)	44(21.7%)
A/G	114(58.5%)	108(53.2%)
A/A	39(20%)	51(25.1%)
G	198(50.8%)	196(48.3%)
A	192(49.2%)	210(51.7%)

表 5 AS 组与正常组 ERAP1 基因 rs27044 基因型、等位基因频率分布

Table 5 Allele and genotype frequencies of rs27044 in ankylosing spondylitis in a Chinese Han population

基因型及等位基因 Genotype and allele	AS 组 (%) AS group	对照组 (%) Control group
C/C	53(27.2%)	62(30.5%)
C/G	100(51.3%)	99(48.8%)
G/G	42(21.5%)	42(20.7%)
C	206(52.8%)	223(55%)
G	184(47.2%)	183(45%)

表 6 AS 组与正常组 ERAP1 基因 rs30187 基因型、等位基因频率分布

Table 6 Allele and genotype frequencies of rs30187 in ankylosing spondylitis in a Chinese Han population

基因型及等位基因 Genotype and allele	AS 组 (%) AS group	对照组 (%) Control group
C/C	66(33.8%)	58(28.6%)
C/T	92(47.2%)	100(49.3%)
T/T	37(19%)	45(22.1%)
C	224(57.4%)	206(52%)
T	166(42.6%)	190(48%)

病,遗传因素对 AS 易感性的贡献超过 90%^[3]。MHC I 编码的 HLA-B27 抗原仍是迄今所知的、与该疾病相关性中最强的 HLA 抗原。然而,仅有 HLA-B27 抗原存在并不能完全解释 AS 的发生发展机制。近年来全基因组扫描和候选基因相关性研究证实,非 MHC 基因在 AS 发病中起着重要作用^[3,8]。

内质网氨肽酶(ERAP1)基因是一种非 MHC 基因,位于 5q15,表达一类定位于内质网中的氨肽酶,此蛋白能修剪运往内质网的肽^[5]。ERAP1 基因有两个主要功能,抗原肽“分子标尺”和脱落酶作用。首先,ERAP1 基因通过酶活性修饰来自 LMP7 的抗原肽,将其剪切成 9 个氨基酸长度,这样的长度适合 HLA-I 类分子对抗原肽的提呈,且体内实验证实 ERAP1 基因在 HLA-I 类分子介导的免疫反应机制中起重要作用^[9]。其次,ERAP1 基因可通过降解细胞膜上的前炎症细胞因子受体,包括肿瘤坏死因子受体 1(TNFR-1),白细胞介素 1 受体 2(IL-1R2)和白细胞介素 6 受体(IL-6R),使其游离而阻断 TNF,IL-1 和 IL-6 与靶细胞结合来发挥作用,从而下调它们的信号强度;ERAP1 基因变异后丧失功能可引起细胞膜表面的炎症细胞因子受体数量增加,从而导致炎症反应^[10]。上述提示 ERAP1 基因可能在慢性炎症疾病的发病机制中发挥着重要作用。

rs27434 位于 ERAP1 基因的上游,编号为 6 的外显子区域^[5]。rs27434 位点基因多态性对 AS 发病的影响报道较少。英国的 Harvey 等^[5]证实 rs27434 与 AS 存在高度关联($P=4.7\times 10^{-7}$),加拿大的 Reveille 等^[11]也证实 rs27434 与 AS 存在高度关联($P=5.3\times 10^{-12}$),而韩国的 Bang 等^[12]研究发现,该点与 AS 未存在关系。本实验中 AS 患者经检测 HLA-B27 阳性率为 98.5%,而健康体检者 HLA-B27 均阴性。是否 HLA-B27 基因频率分布不同对研究结果具一定影响,仍有待进一步研究。本研究结果显示,AS 和健康人之间 ERAP1 基因 rs27434 位点的基因型频率分布和等位基因频率差异均无统计学意义,提示 rs27434 位点的基因多态性与中国汉族人群 AS 患者的发病无关,我们认为这主要是因为不同人种的遗传学背景不同造成的;另外,由于 rs27434 为同义多态性,它似乎极不可能对 ERAP1 基因的活性有任何影响^[5]。WTCCC 在 1011 例溃疡性结肠炎、755 例克罗恩病和 633 例

健康对照的大规模关联研究中发现与 AS 关联的 rs27434 与上述两种疾病均无关联^[11]。溃疡性结肠炎和克罗恩病都不是 HLA-I 类分子介导的疾病,它们的特征是致炎因子 IL1、IL6 和 TNF 的上调。这提示 ERAP1 基因的肽链修饰功能才能解释其与 AS 关联的机制^[3]。我们认为,此机制可以解释 rs27434 的阴性结果。

除 rs27434 位点外,本研究还对 rs30187、rs27044 这两个位点进行检测。rs30187、rs27044 分别位于 ERAP1 基因编号为 11、15 的外显子区域,这两个位点可使氨肽酶对合成肽底物的活性大幅度下降,增加 AS 的易感性^[5,13]。本研究结果显示这两个位点的基因型频率分布和等位基因频率差异均无统计学意义,提示 rs30187、rs27044 位点的基因多态性与中国汉族人群 AS 患者的发病无关,这与国外的研究结果不一致^[5,6,10,11]。我们认为这主要是因为不同人种的遗传学背景不同造成的。另外,本研究中 AS 患者经检测 HLA-B27 阳性率为 98.5%,而健康体检者 HLA-B27 均阴性。HLA-B27 基因频率分布对这两个位点的功能是否有影响,尚需进一步研究。

4 参考文献

1. Calin A, Fries JF. Striking prevalence of ankylosing spondylitis in “healthy” W27 positive males and females [J]. N Engl J Med, 1975, 293(17): 835-839.
2. 宋凯, 张永刚, 郑国权. 强直性脊柱炎后凸畸形矫形前后生活质量与影像学参数分析 [J]. 中华骨科杂志, 2012, 32(5): 404-408.
3. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(10): 1823-1828.
4. Zhang G, Luo J, Bruekel J, et al. Genetic studies in familial ankylosing spondylitis susceptibility[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(7): 2246-2254.
5. Harvey D, Pointon JJ, Evans DM, et al. Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis [J]. Human Molecular Genetics, 2009, 18(21): 4204-4212.
6. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, et al. Association scan of 14500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants [J]. Nat Genet, 2007, 39(11): 1329-1337.
7. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria [J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4): 361-368.

8. Brown MA, Lavai SH, Brophy S, et al. Recurrence risk modeling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis [J]. Ann Rheum Dis, 2000, 59(12): 883-886.
 9. Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility [J]. Nature Genetics, 2011, 43(8): 761-767.
 10. Maksymowych WP, Inman RD, Gladman DD, et al. Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(5): 1317-1323.
 11. Reveille JD, Sims AM, Danoy P, et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci [J]. Nature Genetics, 2010, 42(2): 123-127.
 12. Bang SY, Kim TH, Lee B, et al. Genetic studies of ankylosing spondylitis in Koreans confirm associations with ERAP1 and 2p15 reported in white patients [J]. J Rheumatol, 2011, 38(2): 322-324.
 13. Goto Y, Hara A, Ishii Y, et al. Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER aminopeptidase-1 [J]. FEBS Lett, 2006, 580(7): 1883-1888.
- (收稿日期: 2015-05-24 修回日期: 2015-08-25)
(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)

消息

腰椎微创手术并发症及其预防策略研讨会通知

随着医学技术的不断进步,腰椎内镜(后路镜、侧路镜)手术、腰椎髓核消融术(PLDD、射频消融术)、腰椎经皮减压内固定手术以及椎体成形术(PVP/PKP)等腰椎微创手术以其创伤小、恢复快等优点,被越来越多的患者所青睐,已成为当前脊柱外科的热门话题。随着腰椎微创手术的不断发展和其适应证不断被扩大,手术并发症特别是比较严重的手术并发症时有发生,甚至带来一些灾难性的后果。如何正确认识疾病,掌握各类手术的适应证,提高手术成功率、减少并发症的发生是亟待解决的问题。由中日友好医院、《中国脊柱脊髓杂志》编辑部共同主办的腰椎微创手术并发症及其预防策略研讨会,将于2015年11月13-15日在北京召开,本次大会邀请国内最著名的教授、一线专家围绕腰椎微创手术的适应证、手术技巧、并发症预防策略等方面结合病例进行深入细致的研讨,会议还安排有各类微创手术讲座,届时将带给我们精彩的腰椎微创医学盛宴。本次会议可授予国家级继续教育Ⅰ类学分6分[项目编号:2015-04-07-442(国)]。我们衷心期待着您的参与与光临。

会议时间:2015年11月13-15日;会议地点:中日友好医院临研所五楼讲学厅;报名方式:网上报名:2015年11月10日前,注册费800元;网上报名邮箱:xyxh118@sina.com;现场报名:2015年11月13日10:00-22:00,注册费:1000元;注册费:包含资料费、学分证书,交通食宿自理;会务组联系人:陈栋(13810998463)、聂智青(13501029976)。

第七届全国脊髓脊柱外科高级学习班通知

北京大学第三医院(北医三院)神经外科主办的国家级继续教育项目[2015-04-04-102(国)]“全国脊髓脊柱外科新进展高级学习班”拟于2015年10月18-21日在北京召开。学习班将邀请国内脊髓脊柱领域知名专家王振宇教授、刘忠军教授、王超教授、孙宇教授等共同领衔授课。授课内容紧密结合临床实际,通过专题讲座、交流讨论、手术演示互动等全面介绍复杂脊髓肿瘤、脊髓空洞、脊髓栓系综合征、脊髓血管性疾病的显微外科治疗;脊髓手术术中电生理监测、脊髓手术后脊柱稳定性问题及相关的内固定技术、脊柱肿瘤的手术治疗、寰枢椎疾病外科治疗以及与神经外科相关的椎管狭窄、颈椎病等脊髓脊柱外科疾病的新进展、新技术与新方法。诚挚邀请神经外科和脊柱外科医生参加此次学习班,为了保证授课质量,每期限招学员30名,录取以报名先后排序,学习班结束授予国家级继续医学教育项目Ⅰ类8学分。

1、会议时间及地点:2015年10月18日-21日。北京大学第三医院科研楼。

2、报到时间及地点:2015年10月18日。北京赢家商务酒店(北京大学医学部内)。

3、参会者请于2015年10月1日前回复到liubin301@163.com,联系电话:15611908096,15611908272,010-82267350。

4、学习班费用:现场注册1200元,2015年10月1日前注册1000元(以汇款时间为准),邮局汇款:北京大学第三医院神经外科 殷淑珍(收),邮编:100191。