

RANK 基因多态性与女性青少年 特发性脊柱侧凸的相关性

史本龙, 毛赛虎, 乔 军, 孙 旭, 刘 臻, 朱 锋, 朱泽章, 钱邦平, 邱 勇

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 南京市中山路 321 号)

【摘要】目的:探讨核因子 κ B 受体活化子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)基因多态性与女性青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)之间的相关性。**方法:**2009 年 2 月~2013 年 7 月在我院行支具或手术治疗的 450 例主弯 Cobb 角大于 20° 的女性 AIS 患儿为观察组(AIS 组), 年龄 14.8 ± 2.9 岁(10~18 岁)。对照组为例行健康体检的我院周围地区无血缘关系的健康青少年女性 400 名, 年龄 15.1 ± 2.3 岁(10~17 岁)。所有 AIS 患儿均有身高、体重及体重指数(body mass index, BMI)等资料。AIS 组和对照组每例取肘静脉血 2ml, 提取外周血白细胞基因组 DNA。rs1805034 和 rs35211496 作为 RANK 的目标位点, 应用 Taqman 探针技术行荧光定量 PCR, 全部反应结束后在荧光定量 PCR 仪上读取终点荧光, 确定各样本的基因分型结果。采用 $R \times C$ 表 χ^2 检验比较 AIS 组和对照组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点基因型及等位基因频率分布的差异。采用单因素方差分析比较 AIS 组患儿主弯 Cobb 角及 BMI 在不同基因型之间的差异。**结果:** rs1805034 和 rs35211496 的基因型在 AIS 组和对照组中的分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。rs1805034 和 rs35211496 的基因型及等位基因频率两组间无统计学差异($P > 0.05$)。单因素方差分析示 AIS 组内 rs1805034 和 rs35211496 的不同基因型患儿间的主弯 Cobb 角及 BMI 均无统计学差异($P > 0.05$)。**结论:** RANK 基因可能不是女性 AIS 的易感基因, 女性 AIS 组内 rs1805034 和 rs35211496 的不同基因型患儿间的主弯 Cobb 角及 BMI 均无统计学差异。

【关键词】 青少年特发性脊柱侧凸; 核因子 κ B 受体活化子; 体重指数; Cobb 角; 女性

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.12.08

中图分类号: R682.3, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-12-1095-05

Association between RANK gene polymorphism and the occurrence of female adolescent idiopathic scoliosis/SHI Benlong, MAO Saihu, QIAO Jun, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(12): 1095-1099

【Abstract】 Objectives: To study whether the receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis(AIS) girls. **Methods:** 450 AIS girls and 400 age-matched healthy girls from February 2009 to July 2013 were recruited in this study, the average age was 14.8 ± 2.9 years(range, 10-18 years) for AIS girls and 15.1 ± 2.3 years(range, 10-17 years) for healthy controls, respectively. Only AIS girls with Cobb angles larger than 20° were included in this study. The anthropometric parameters including height, weight and body mass index(BMI) were available for all AIS girls. 2ml blood were taken from the antecubital vein in both groups and the DNA of peripheral leukocyte was extracted for each individual. The rs1805034 and rs35211496 were selected as target single nucleotide polymorphism(SNP) to cover all of the polymorphisms on RANK. Genotyping was performed with fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). Comparison of genotyping results between 2 groups were performed by using the χ^2 while one-way ANOVA tests to compare the Cobb angle and BMI among AIS girls with different genotypes. **Results:** The rs1805034 and rs35211496 were successfully genotyped, of which no significant difference of genotype frequencies from the Hardy-Weinberg equilibrium test was noted for the AIS patients

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 81301603); 南京市科技发展计划项目(编号: 201402028)

第一作者简介: 男(1988-), 医学博士, 住院医师, 研究方向: 脊柱畸形

电话: (025)68182022 E-mail: shi-benlong@163.com

通讯作者: 朱泽章 E-mail: zhuzezhang@126.com

or the normal controls ($P>0.05$). There was no significant difference of genotype and allele frequencies of rs1805034 and rs35211496 between the AIS girls and normal controls ($P>0.05$). By one-way ANOVA test, the Cobb angle and BMI showed no significant difference among different genotypes in rs1805034 and rs35211496 ($P>0.05$). **Conclusions:** The RANK gene may be not the susceptibility gene of AIS girls. There is no significant difference among different genotypes in terms of Cobb angle and BMI in rs1805034 and rs35211496.

[Key words] Adolescent idiopathic scoliosis; Receptor activator of nuclear factor- κ B; Body mass index; Cobb angle; Female

[Author's address] Spine Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是一种发生于青春发育期的脊柱三维畸形,其病因及发病机制至今尚未明确^[1-3]。近年来, AIS 患儿的骨密度(bone mineral density, BMD)下降及低骨量等现象越来越引起学者们的注意^[4,5]。核因子 κ B 受体活化子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)-核因子 κ B 受体活化子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)-骨保护素(osteoprotegerin, OPG)信号系统是影响破骨细胞发育和成熟的关键性信号通路,并且是调节骨骼代谢的核心通路^[6-10]。其中 RANKL 为肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)配体超家族的成员,可见于成骨细胞、软骨细胞及骨膜间充质细胞等各种骨骼细胞;RANK 是 RANKL 的功能性受体,为一种由 616 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白,可见于破骨细胞及软骨细胞等;OPG 为 TNF 受体超家族成员,是一种可以抑制破骨细胞分化和骨吸收活性的肝素结合分泌型糖蛋白。我们的前期研究^[11]从骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的水平分析 RANKL 及 OPG 与 AIS 低骨量的相关性。结果发现 AIS 患儿 RANKL 的 mRNA 表达水平显著高于正常对照组,而 OPG 的 mRNA 表达水平显著低于对照组。因此,我们认为 RANKL 及 OPG 在 MSCs 水平上的表达强度异常可能与 AIS 低骨量的分子机制相关。然而,目前研究大多关注 RANKL 和 OPG 与 AIS 发病机制的相关性,有关 RANK 与 AIS 发病的相关性研究未见文献报道。而且, AIS 患儿有 BMD 降低和异常的生长模式,可能造成体重指数(body mass index, BMI)偏低。本研究旨在探讨 RANK 基因多态性与 AIS 之间的相关性,并分析 rs1805034 和 rs35211496 不同基因型的 AIS 患儿间主弯 Cobb 角及 BMI

有无差异。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 观察组 (AIS 组) 为 2009 年 2 月~2013 年 7 月在我院行支具或手术治疗的主弯 Cobb 角大于 20° 的女性 AIS 患儿 450 例,年龄 14.8 ± 2.9 岁 (10~18 岁)。AIS 患儿的诊断由临床表现和 X 线片共同决定,并且所有 AIS 患儿排除器质性内分泌性疾病、神经系统疾病、骨骼系统疾病和生长发育障碍等。所有 AIS 患儿均有身高、体重及 BMI 等参数。鉴于脊柱侧凸会影响患儿的身高,因此本研究采用的身高均应用 Bjure 公式^[12]进行矫正:身高丢失 $= 0.011 \times (\text{主弯 Cobb 角度数}) - 0.177$ 。BMI 的计算方法:体重(公斤)除以校正身高的平方 (kg/m^2)。

1.1.2 对照组 为例行健康体检的我院周围地区无血缘关系的健康青少年女性 400 名,年龄 15.1 ± 2.3 岁 (10~17 岁)。均行前屈试验检查,排除背部不高等者。经详细询问病史及体格检查排除任何影响骨代谢的疾病。经受试者家属及本人同意后收集静脉血标本。本研究获得本单位医学伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 用抗凝管抽取 AIS 组 and 对照组每例肘静脉血 2ml,使用全血基因组 DNA 快速提取试剂盒(premaga, USA)提取外周血白细胞基因组 DNA,并储存于 -80°C 深低温冰箱备用,待标本集齐后分批检测。

1.2.2 基因扩增及分型 选取 rs1805034 和 rs35211496 作为目标位点进行扩增。应用 Taqman 探针技术行荧光定量 PCR (polymerase chain reaction),每个反应体系的总体积为 $10\mu\text{l}$,包含浓

度为 20ng/ μ l 的 DNA 模板 1 μ l, 2 $\times$ Taqman @Universal Master Mix 5 μ l, 20 $\times$ Taqman-MGB 探针 0.5 μ l、去离子水 3.5 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 下 10min, 随后进行共 20 个循环的基因扩增 (92 $^{\circ}$ C 下 15s, 60 $^{\circ}$ C 下 1min), 最后再进行 30 个循环的扩增 (89 $^{\circ}$ C 下 15s, 60 $^{\circ}$ C 下 90s)。全部反应结束后在 ABI7900 型荧光定量 PCR 仪上读取终点荧光, 确定各样本的基因分型结果。

1.3 统计分析

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验等位基因的频率, 了解各基因频率是否符合遗传平衡并有群体代表性。AIS 组与对照组之间的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点基因型和等位基因频率分布差异用 R $\times$ C 表 χ^2 检验分析。采用单因素方差分析比较 AIS 组内主弯 Cobb 角及 BMI 在不同基因型患儿之间的差异。P<0.05 表示有统计学差异。

2 结果

AIS 组和对照组的 rs1805034 和 rs35211496 的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。rs1805034 和 rs35211496 的基因型及等位基因频率在 AIS 组和正常对照组之间无统计学差异 (P>0.05, 表 1)。单因素方差分析示 AIS 患儿 rs1805034 不同基因型之间主弯 Cobb 角 (P=0.287) 及 BMI (P=0.458) 均无统计学差异, rs35211496 不同基因型之间主弯 Cobb 角 (P=0.377) 及 BMI (P=0.146) 亦无统计学差异 (表 2)。

3 讨论

3.1 RANK 的分子生物学机制

分子生物学研究^[13-16]发现, 人类的 RANK 基因位于 18q22.1 上, 尽管 RANK 的 mRNA 广泛存在于人类的骨骼肌、胸腺、结肠、肝脏、小肠及肾上腺等组织细胞中, 但 RANK 蛋白却仅表达于破骨细胞、前体破骨细胞、活化的 T 细胞和 B 细胞、前体造血干细胞等。RANK 是 TNF 受体家族的成员, 也是 RANKL 信号的转导受体, 为一种 I 型跨膜蛋白。人的 RANK 蛋白是由 616 个氨基酸组成的多肽, 其膜外结构域为 N-末端, 有 208 个氨基酸残基, 分别为一段信号肽和一段富含半胱氨酸

表 1 AIS 组和对照组 RANK 基因单核苷酸多态性分布

Table 1 Comparison of RANK gene polymorphism between AIS patients and normal controls

		对照组 Control group <i>n</i> (%)	AIS组 AIS group <i>n</i> (%)	<i>P</i>
rs1805034				
基因型 Genotype	CC	45(11.25)	44(9.78)	0.253
	CT	175(43.75)	178(39.56)	
	TT	180(45.00)	228(50.67)	
等位基因 Allele	C	265(31.1)	266(29.6)	0.116
	T	535(68.9)	634(70.4)	
rs35211496				
基因型 Genotype	TT	39(9.75)	78(12.0)	0.092
	CT	283(19.5)	332(14.2)	
	CC	(70.75)	(73.8)	
等位基因 Allele	T	156(19.5)	172(19.1)	0.854
	C	644(80.5)	728(80.9)	

表 2 不同基因型患儿主弯 Cobb 角和 BMI

Table 2 Cobb angles and BMI in different Genotypes

SNP	基因型 Genotype	Cobb角($^{\circ}$) Cobb angle	BMI(Kg/m 2)
rs1805034	CC	35.6 $\pm$ 13.3	18.8 $\pm$ 1.2
	CT	33.4 $\pm$ 11.2	17.9 $\pm$ 0.9
	TT	34.8 $\pm$ 14.5	19.1 $\pm$ 1.4
rs35211496	TT	34.1 $\pm$ 5.6	18.0 $\pm$ 1.5
	CT	34.9 $\pm$ 10.1	18.6 $\pm$ 1.1
	CC	35.3 $\pm$ 14.9	18.9 $\pm$ 1.9

的重复序列。膜外结构域的主要功能是与 RANKL 结合并产生和传导信号。RANK 的膜内结构域有 383 个氨基酸残基, 组成三个结合位点, 可与 TNF 受体相关因子 (TNF receptor-associated factors, TRAFs) 家族中的 TRAF 1、2、3、5 和 6 结合, 进而激活核因子 κ B 和 c-Jun 氨基端激酶 (c-jun-N-terminal kinase, JNK), 从而促进破骨细胞增殖分化和成熟。RANK 膜内的 C-末端 93 个氨基酸残基组成序列为 TRAF 2、5 的结合区, 而 C-末端与靠近 C-末端的 N-末端氨基酸残基序列共同组成 TRAF 6 的结合区域。另外, RANKL-RANK-OPG 信号系统存在多种正负反馈调节通路, 如: 1α , 25-(OH) $_2$ D $_3$ 、甲状旁腺素 (PTH)、前列腺素 E2 (PGE2)、白介素 1 (IL-1)、IL-6 等分别通过维生素 D 受体介导通路、蛋白激酶 A 介导通路及 gp 130/信号传导及转录激活因子 (STAT) 介导通路等上调成骨细胞的 RANKL mRNA 表达; IL-1、

TNF- α 分别通过激活破骨细胞表面的 IL-1 受体和 TNF 受体加强 RANKL 表达; 肿瘤坏死因子 β (TGF- β) 则通过增加破骨细胞表面的 RANK 从而上调 RANKL 信号。

3.2 RANKL-RANK-OPG 信号系统与骨代谢的关系

近年来, 越来越多的有关 RANKL-RANK-OPG 信号系统的研究转向其在骨骼的生长、发育及构塑和重建中的作用, 因而三者已经成为骨代谢研究中的热点。目前, 大量文献研究已明确, RANKL-RANK-OPG 信号系统是偶联成骨细胞、破骨细胞和基质细胞分化、成熟、活化及发挥其生物活性的主要信号通路之一^[6~10]。RANKL 是 RANK 的配体, 二者结合后可以参与破骨细胞的分化过程, 促进骨质吸收; 相反的, OPG 是 RANKL 的受体, 二者结合后可以抑制破骨细胞发育, 抑制骨质的吸收。三者体内保持着一定的比例, 而三者比例的失衡可引起骨代谢的紊乱并将导致多种骨骼代谢性疾病。因此, RANKL-RANK-OPG 信号系统必然也参与 AIS 患儿的骨代谢中, 而既往有关其与 AIS 的相关性研究大多集中于 RANKL 和 OPG 上。刘臻等^[11]从破骨细胞分化的分子机制角度认为 RANKL 及 OPG 的表达异常可能与 AIS 骨量减低的分子机制间存在相关性。鉴于 RANKL-RANK-OPG 信号系统三者体内保持着一定的比例, 我们由此猜想 RANK 与 AIS 亦可能具有相关性。然而, 目前有关 RANK 与 AIS 发病的相关性研究未见文献报道。因此, 本研究探讨 RANK 基因多态性与 AIS 易感性之间的相关性, 并分析其与 AIS 患儿主弯 Cobb 角及 BMI 之间的关系。

3.3 RANK 在 AIS 发病机制中的作用

既往研究^[17]表明, rs1805034 (Ala192Val) 和 rs35211496 (Thr141His) 是 RANK 基因上两个重要的错义 SNP, 与 RANK 多肽的正常表达密切相关, 从而影响机体骨量的变化。另外, 文献研究^[18]表明部分 AIS 患儿存在着低骨量现象, 这与 AIS 的发生和发展有密切联系。然而本研究却未发现 RANK 上的 rs1805034 和 rs35211496 两个 SNP 位点多态性在 AIS 组和对照组有统计学差异 ($P>0.05$)。虽然 2 个目标 SNP 位点可以覆盖整个 RANK 基因, 但并不能完全排除其他潜在的 SNP 位点有阳性的可能。因此, 有关 AIS 是否与 RANK

基因的 SNP 突变有关可能需要更多潜在 SNP 位点的验证。本研究进一步探讨了 AIS 患儿主弯 Cobb 角及 BMI 在 rs1805034 和 rs35211496 不同基因型之间的差异性, 但结果仍未发现统计学差异 ($P>0.05$)。因此, 我们认为, 虽然 RANKL-RANK-OPG 信号系统与骨代谢具有显著相关性, 并且 RANKL-RANK-OPG 信号系统与 AIS 的发病机制具有密切联系, 但是 RANK 基因可能并不是 AIS 的易感基因, 其具体调节机制却仍需进一步探讨。

另外, 鉴于 RANKL-RANK-OPG 信号系统控制骨骼系统的发育、分化和成熟, 而我们的前期研究^[11, 18]亦发现 RANKL 和 OPG 与 AIS 患儿低骨量具有显著相关性, 因此我们认为 RANK 基因多态性和 AIS 患儿 BMD 亦可能具有相关性。然而, 由于 BMD 信息的缺失, 我们无法研究 RANK 基因和女性 AIS 患儿 BMD 的关系, 这是本研究的最大不足, 需要进一步的研究进行验证。

总之, 本研究发现 RANK 基因的两个 SNP 位点 rs1805034 和 rs35211496 的基因型及等位基因频率在女性 AIS 患儿和对照组之间无明显差异, 且 AIS 组患儿的主弯 Cobb 角及 BMI 在 rs1805034 和 rs35211496 的不同基因型之间无明显差异。因此, 本研究证实 RANK 基因可能不是女性 AIS 的易感基因。

4 参考文献

1. 邱勇, 朱丽华, 宋知非, 等. 脊柱侧凸的临床病因学分类研究[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(5): 265-268.
2. Bunnell WP. The natural history of idiopathic scoliosis before skeletal maturity[J]. Spine, 1986, 11(8): 773-776.
3. Ascani E, Bartolozzi P, Logroscino CA, et al. Natural history of untreated idiopathic scoliosis after skeletal maturity [J]. Spine, 1986, 11(8): 784-789.
4. Cheng JC, Guo X, Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a longitudinal follow up study [J]. Spine, 1999, 24(12): 1218-1222.
5. Wang WJ, Sun C, Liu Z, et al. Transcription factor Runx2 in the low bone mineral density of girls with adolescent idiopathic scoliosis[J]. Orthop Surg, 2014, 6(1): 8-14.
6. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234(1): 137-142.
7. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF) and osteoprotegerin(OPG): a

- mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1329–1337.
8. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, et al. Tumor necrosis factor- α stimulates osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 563–568.
9. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(7): 3597–3602.
10. Jones DH, Kong YY, Penninger JM, et al. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(Suppl 2): ii32–39.
11. 刘臻, 邱勇, 孙强, 等. RANKL/OPG 在青少年特发性脊柱侧凸患儿低骨量发生机制中的作用 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(7): 474–485.
12. Bjure J, Grimby G, Nachemson A. Correction of body height in predicting spirometric values in scoliotic patients[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 1968, 21(2): 191–192.
13. Darnay BG, Haridas V, Ni J, et al. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B(RANK) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(32): 20551–20555.
14. Brian RW, Negis J, Soo YL, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(43): 28355–28359.
15. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(2): 155–192.
16. Chiru M. Adolescent idiopathic scoliosis and osteopenia[J]. *Maedica(Buchar)*, 2011, 6(1): 17–22.
17. Assmann G, Koenig J, Pfreundschuh M, et al. Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study [J]. *J Rheumatol*, 2010, 37(5): 900–904.
18. 吴洁, 邱勇, 孙燕芳, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者骨密度变化的分析[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004, 14(10): 598–600.
- (收稿日期:2015-10-26 修回日期:2015-12-18)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 李伟霞)

消息

欢迎订阅 2016 年《中国脊柱脊髓杂志》

《中国脊柱脊髓杂志》是由国家卫生和计划生育委员会主管, 中国康复医学会与中日友好医院主办, 目前国内唯一以脊柱脊髓为内容的国家级医学核心期刊。及时反映国内外脊柱脊髓领域的科研动态、发展方向、技术水平, 为临床医疗、康复及基础研究工作提供学术交流场所。读者对象为从事脊柱外科、骨科、神经科、康复科、肿瘤科、泌尿科、放射科、基础研究及生物医学工程等及相关学科的专业人员。

本刊为中国科技信息中心“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”, 中科院中国科学计量评价研究中心“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”, “中国精品科技期刊”, 入选北京大学“中文核心期刊要目总览”, 已分别入编 Chinainfo(中国信息)网络资源系统(万方数据)及以中国学术期刊光盘版为基础的中国期刊网(中国知网), 影响因子名列前茅。

2016 年本刊仍为月刊, 大 16 开, 正文 96 页, 每月 25 日出版。全册铜版纸彩色印刷。每册定价 20 元, 全年 240 元。全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 82-457。国外读者订阅请与中国国际图书贸易总公司中文报刊科联系(100044, 北京市车公庄西路 35 号), 代号: BM6688。

本刊经理部可随时为国内外读者代办邮购(免邮寄费)。地址: 北京市朝阳区樱花园东街中日友好医院内, 邮编: 100029。经理部电话: (010)84205510。