

青少年特发性脊柱侧凸女性患者瘦素基因启动子区-2548G/A 基因多态性研究

刘臻,邱勇,曹兴兵,王玉,张俊杰,孙光权,陈文俊,陈志明

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 南京市)

【摘要】目的:探讨瘦素基因启动子区-2548G/A(rs7799039)基因多态性与女性青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)发生发展、异常生长模式及侧凸类型之间的相关性。**方法:**收集 451 例 AIS 女性患者及 335 例正常同龄女性青少年的静脉血标本,采用 PCR-RFLP 方法对两组的瘦素基因启动子区-2548G/A(rs7799039)多态性位点进行基因分型,比较两组间基因分型的差异,分析 AIS 组中基因分型与患者 Cobb 角和人体测量学指标的关系。**结果:**AIS 组 rs7799039 位点基因型和等位基因频率与正常对照组之间无明显差异;在 AIS 组内,rs7799039 位点不同基因型所对应的初诊 Cobb 角、校正身高、BMI、月经初潮年龄及 Risser 征均没有显著性差异;rs7799039 位点等位基因多态性分布情况在不同侧凸类型 AIS 患者和对照组之间无统计学差异。**结论:**瘦素基因启动子区-2548G/A(rs7799039)基因多态性与女性 AIS 的发生发展、异常生长模式及不同侧凸类型之间都没有明显的相关性。

【关键词】 青少年特发性脊柱侧凸;瘦素基因;基因多态性;基因型;女性

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.01.13

中图分类号:R682.3,Q346 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-01-0057-05

Studies on the -2548 G/A polymorphism of the leptin gene in female adolescent idiopathic scoliosis/
LIU Zhen, QIU Yong, CAO Xingbing, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(1):57~61

【Abstract】 Objective: To investigate the association of -2548G/A(rs7799039) functional polymorphism in the promoter region of leptin gene with abnormal growth pattern in girls with adolescent idiopathic scoliosis(AIS). **Method:** Blood samples were obtained from 451 female AIS patients and 335 female healthy adolescents. Anthropometric parameters of AIS group including age, body height, weight, Cobb angle, time of menarche and Risser sign were recorded. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to detect and analyze leptin gene distribution in AIS group and control group. The anthropometric data (body height, BMI, time of menarche and Risser sign), Cobb angle and genotypes of leptin gene polymorphism for AIS patients and normal subjects were also compared. **Result:** The genotype and allele frequency distribution were comparable between AIS and normal control. There was no association with curve severity, body height, time of menarche, Risser sign and BMI in AIS patients. Between the AIS patients grouped according to the curve pattern and the controls, there was no difference on the distribution of rs7799039 site polymorphism. **Conclusion:** -2548G/A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene is neither associated with the occurrence or the curve severity of AIS girls nor different curve pattern groups of the AIS.

【Key words】 Adolescent idiopathic scoliosis; Leptin gene; Gene polymorphism; Genotype; Female

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

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic

ic scoliosis, AIS)是脊柱侧凸的最常见类型,约占所有脊柱侧凸的 65%~75%^[1]。关于 AIS 的发病机理目前尚不明确,多数学者认为其可能与多种致病因素相关^[2,3],其中遗传学假说一直是 AIS 病因

基金项目:南京市 2007 年省科技发展项目(BK2007003)

第一作者简介:男(1981-),医师,医学博士,研究方向:脊柱畸形

电话:(025)83105121 E-mail:drliuzhen@163.com

学研究中的热点^[4,5]。瘦素(leptin)是肥胖基因编码的表达产物,是由脂肪细胞合成和分泌的肽类激素,它能调节体重和能量代谢^[6]。邱勇等^[7]的研究表明,女性 AIS 患者的血浆瘦素浓度明显低于同龄对照组,且与生长发育相关指标显著相关,这种低瘦素水平可能在 AIS 患者低体重和低体重指数(body mass index,BMI)方面起着重要作用。Mammes 等^[8]的研究发现,在瘦素基因编码区上游启动子区 2548 位存在 G→A 多态性,此多态性可影响血浆瘦素分泌水平。本研究对瘦素基因启动子区-2548G/A 基因多态性(rs7799039)进行研究,旨在探讨其与 AIS 发生发展、异常生长模式以及侧凸类型之间的联系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

包括 451 例女性 AIS 患者(实验组)和 335 例同年龄段女性青少年(对照组)。实验组为 2005 年 7 月至 2007 年 9 月在我院诊治的 AIS 患者,年龄 10~18 岁(14.8 ± 2.2 岁);主弯 Cobb 角 $12^\circ \sim 103^\circ$ ($32.4^\circ \pm 13.7^\circ$)。通过临床检查和站立位全脊柱 X 线片初诊,经全脊髓 MRI 排除可能存在的大脑、脊髓中枢系统病变。记录所有患者的年龄、身高、体重、月经初潮日期、Cobb 角及 Risser 征等指标。按照公式 $BMI = \text{体重(kg)} / \text{身高(m)}^2$ 计算 BMI。通过 Bjure 公式^[9]($\text{Log}y = 0.011x + 0.177$; y 为身高丢失, x 为最大 Cobb 角) 计算 AIS 患者的校正身高。同时按照侧凸类型将 AIS 组分为单胸弯、胸腰弯、腰弯及胸腰双弯 4 组。

对照组均为江苏地区无血缘关系的青少年,年龄 14~18 岁(15.2 ± 1.1 岁),全部由一名脊柱外科医师行前屈试验,如发现背部可疑不等高者,行站立位全脊柱 X 线片检查以排除。经详细询问病史及体检排除影响骨代谢的疾病。

所有研究对象或其父母均签署知情同意书,并获得南京大学医学院伦理委员会批准。

1.2 检测方法

1.2.1 试剂与仪器 DNA 抽提试剂盒(Promega 公司 USA),Taq DNA 聚合酶(Takara 公司),dNTP(Takara 公司),HhaI 内切酶(Takara 公司),leptin 引物(上海生物工程技术有限公司),琼脂糖(Promega 公司),PCR 扩增仪(MJ research),DYY-8C 型电泳仪(北京六一仪器厂),紫外线电

泳图像分析仪(UVP 公司)。

1.2.2 DNA 提取 采集所有研究对象外周静脉血 2ml,采用商业化基因组 DNA 提取试剂(premaga,USA)提取基因组 DNA,电泳检测并储存于 -80°C 深低温冰箱备用。

1.2.3 引物合成 根据文献^[10]设计 rs7799039 位点所在序列引物:上游引物为 5'-TTTCCTGTAA TTTTCCCGTGAG-3';下游引物为 5'-AAAG-CAAAGACAGGCATAAA-3'。

1.2.4 基因扩增 PCR 反应总体积 25 μl ,含基因组 DNA 1 μl ,10 $\times$ 缓冲液 2.5 μl ,dNTP 2 μl (2.5mmol/l),MgCl₂ 1.5 μl (2.5mmol/l),Taq 聚合酶 0.625U,上下游引物各 0.5 μl ,双蒸水 16.875 μl 。在 MJ research 热循环仪上进行 PCR 反应,反应条件为预变性:95 $^\circ\text{C}$ 5min;变性:95 $^\circ\text{C}$ 30s;退火:55 $^\circ\text{C}$ 30s;延伸:72 $^\circ\text{C}$ 1min,35 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10min。

1.2.5 产物验证 取 PCR 产物 5 μl 经 2% 琼脂糖凝胶电泳后在紫外线灯下观察结果并照像,以检验 PCR 是否成功。

1.2.6 酶切反应 酶切反应体系为 10 μl ,PCR 产物取 5 μl ,在 5U 的内切酶 HhaI 作用下 37 $^\circ\text{C}$ 酶切过夜。

1.2.7 基因分型 取 10 μl 酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶在 120V 下电泳 25min,然后将凝胶置于紫外线灯下观察酶切结果并照像。

1.3 统计方法

AIS 患者根据初诊 Cobb 角、矫正身高、BMI、月经初潮年龄分成各个亚组,AIS 组与对照组间及 AIS 组内各亚组间基因型频率和等位基因频率比较采用 χ^2 检验 (SPSS for Windows,13.0;SPSS Inc,Chicago,IL);AIS 组内最大 Cobb 角及人体测量学指标与基因型之间采用 χ^2 检验分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 瘦素启动子区 rs7799039 位点酶切结果

当基因型为 G/G 时,酶切产物电泳后有 181bp 和 61bp 两条带;A/A 基因型时,酶切产物电泳后为 242bp 一条带;A/G 基因型时,酶切产物电泳后为 242bp,181bp 和 61bp 三条带(图 1)。

2.2 瘦素启动子区 rs7799039 位点基因型及等位基因组间比较

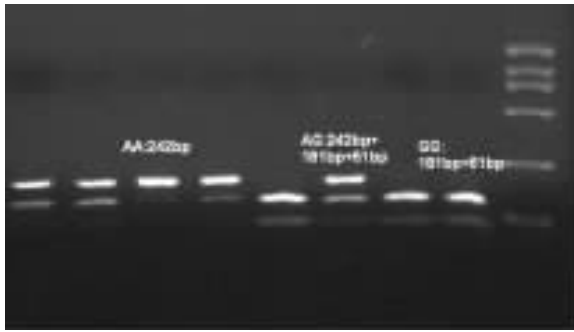


图 1 rs7799039 位点酶切产物电泳图

AIS组及对照组 rs7799039 位点基因型分布经检验均符合 Hardy-Weinberg 定律,表示各基因频率达到遗传平衡,具有群体代表性。AIS 组 rs7799039 位点基因型和等位基因频率与正常对照组之间无明显差异(表 1)。

2.3 不同侧凸类型与瘦素启动子区 rs7799039 位点等位基因频率的关系

根据侧凸类型分组后 AIS 患者与对照组比较 rs7799039 位点等位基因频率见表 2(4 例双胸弯、

表 1 AIS 组与对照组 rs7799039 位点基因多态性分布的比较

基因型	AIS		对照组		χ^2 值	P 值	等位基因	AIS		对照组		χ^2 值	P 值
	n	%	n	%				n	%	n	%		
AA	258	57.2	193	57.6	0.078	0.962	A	685	75.9	509	76.0	0.069	0.973
AG	169	37.5	123	36.7				217	24.1	161	24.0		
GG	24	5.3	19	5.7									

2 例 3 弯患者由于例数少被剔除)。不同类型 AIS 患者与对照组之间 rs7799039 位点等位基因频率分布无统计学差异。

2.4 瘦素启动子区 rs7799039 位点基因多态性与 AIS 患者异常生长模式之间的关系

按照最大 Cobb 角、校正身高、BMI、月经初潮年龄及 Risser 征等将 AIS 组各分为两个亚组^[5,11],比较两组间瘦素启动子区 rs7799039 位点基因多态性分布,有相应完整资料 AIS 患者的结果见表 3。两亚组之间 rs7799039 位点的基因型分布均没

有显著性差异。

表 2 不同侧凸类型与瘦素启动子区 rs7799039 位点等位基因频率的关系

	n	等位基因		χ^2	P 值
		A	G		
对照组	335	509	161	—	—
AIS 组					
胸弯	110	162	58	0.524	0.475
胸腰弯	50	78	22	0.665	0.709
腰弯	35	51	19	0.554	0.560
胸腰双弯	250	378	122	0.862	0.892

表 3 瘦素启动子区 rs7799039 位点基因多态性与 AIS 患者严重程度及异常生长模式的关系

项目	基因型 (%)			P 值	等位基因频率 (%)		P 值
	AA	AG	GG		A	G	
初诊 Cobb 角				0.205			0.224
<30°	115(59.6)	71(36.8)	7(3.6)		301(78.0)	85(22.0)	
≥30°	123(54.6)	88(39.1)	14(6.3)		334(74.2)	116(25.8)	
校正身高				0.845			0.873
<160cm	112(56.6)	79(39.9)	7(3.5)		303(76.5)	93(23.5)	
≥160cm	138(58.2)	84(35.4)	15(6.4)		360(76.0)	114(24.0)	
BMI				0.128			0.133
<18kg/m ²	109(54.5)	78(39.0)	13(6.5)		296(74.0)	104(26.0)	
≥18kg/m ²	117(60.3)	71(36.6)	6(3.1)		305(78.6)	83(21.4)	
月经初潮年龄				0.585			0.583
<12 岁	63(52.9)	51(42.9)	5(4.2)		177(74.4)	61(25.6)	
≥12 岁	143(58.1)	89(36.2)	14(5.7)		375(76.2)	117(23.8)	
Risser 征				0.741			0.876
0-1 级	65(57.0)	44(38.6)	5(4.4)		174(76.3)	54(23.7)	
2-5 级	140(55.8)	99(39.4)	12(4.8)		379(75.5)	123(24.5)	

3 讨论

瘦素的作用已成为近年来国内外学者研究的热点之一。1994 年, Zhang 等^[12]采用定位克隆技术首次克隆出小鼠的瘦素基因, 即肥胖基因 (ob 基因), 瘦素即是由该基因编码的一种由 167 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量约为 15.87ku。主要由白色脂肪组织合成分泌, 棕色脂肪、骨骼肌、胃黏膜、胎盘、胎儿组织也可合成分泌。人血清中瘦素水平与体脂含量呈显著正相关^[13], 禁食或营养缺乏时瘦素分泌减少, 而肥胖或过食则增加瘦素分泌。近年来的研究证明, 瘦素可通过中枢性的间接作用或外周性的直接作用参与调节青春期生长发育、免疫功能、造血功能、胰岛素分泌、血管生成以及骨代谢等过程^[14]。

有研究表明, AIS 的发生发展与青春期前后的生长发育存在着必然的联系^[15]。AIS 女性患者在整个青春发育期存在着异常的躯体生长发育特征, 即与同龄正常女孩相比, 女性 AIS 患者有较低的体重、BMI 和较高的校正身高^[16, 17]。瘦素是调控女性患者青春期生长发育最重要的激素之一^[6, 12]。本课题组之前的研究也发现 AIS 女性患儿的血浆瘦素浓度明显低于对照组女孩, 而且与 AIS 女孩的低体重和低 BMI 呈显著相关^[7]。这表明, AIS 女性患儿不仅有较低的瘦素浓度, 而且这种低瘦素状态可能在引起患者低体重和低 BMI 方面起着重要作用。Mammes 等^[8]的研究发现在瘦素基因编码区上游启动子 2548 位存在 G→A 多态性, 认为含瘦素基因 -2548G/A 等位基因 G 的血清瘦素水平比含等位基因 A 的明显增高。综合以上资料, 我们通过对 AIS 女性患者与健康同龄女孩的瘦素基因启动子区 -2548G/A 基因多态性 (rs7799039) 进行研究, 以探讨其与 AIS 发生发展、异常生长模式以及侧凸类型之间的联系。

本研究结果表明, AIS 组患者瘦素基因启动子区多态性位点 rs7799039 基因型及等位基因分布与正常对照组比较没有明显差异, 提示瘦素基因启动子区多态性与 AIS 没有明显的相关性。初诊 Cobb 角 $\geq 30^\circ$ 、月经初潮年龄 ≥ 12 岁及初诊时 Risser 征 0~1 被认为是 AIS 进展的预测因素^[18, 19], 在 AIS 组内, 我们进一步通过侧凸严重程度、校正身高、BMI、月经初潮年龄及初诊 Risser 征进行分组后发现, rs7799039 位点与以上 AIS 进展预测因素及生长发育指数之间均无明显的相关性。

赵栋等^[20, 21]首次将侧凸表型描述方式应用于 AIS 的遗传病因学研究, 其假设不同的基因多态性位点可能决定单弯、双弯或三弯的发生, 而其他多种因素决定侧凸最终严重程度。我们按照侧凸类型将 AIS 组分为单胸弯、胸腰弯、腰弯及胸腰双弯 4 组, 以探讨其与瘦素基因启动子区多态性位点 rs7799039 的关系。结果显示上述 4 组 AIS 女孩 rs7799039 位点基因型及等位基因分布与正常对照组比较均没有明显差异。

通过对瘦素基因启动子区多态性位点 rs7799039 的研究, 我们发现该多态性位点与 AIS 女性患者的发生发展、异常生长模式及不同侧凸类型之间都没有明显的相关性。说明 rs7799039 位点虽然引起了基因表达和功能的改变, 却对 AIS 的易感性及严重程度无明显影响。同时我们注意到瘦素作为一种蛋白类内在分泌因子, 其作用必然是通过靶细胞膜上的受体及相应的信号转导体来实现的, 瘦素受体基因多态性可能影响瘦素的生物学功能, 从而导致瘦素抵抗。Yiannakouris^[22]及 Koh^[23]的研究表明, 瘦素受体基因 Gln223Arg 多态性与血清瘦素水平、体重及骨密度具有相关性。本研究只探讨了瘦素基因启动子区功能位点 (-2548G/A) 与 AIS 发生发展、异常生长模式以及侧凸类型之间的联系, 没有对瘦素基因外显子上其余多态性位点进行研究, 进一步探究瘦素基因其他多态性位点以及瘦素受体基因多态性与 AIS 患者易感性及异常生长模式之间的关系, 对 AIS 疾病的病因学诊断以及进展预测具有重要意义。

4 参考文献

1. 邱勇, 朱丽华, 宋知非. 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. 邱贵兴. 特发性脊柱侧凸病因学研究进展[J]. 国外医学骨科学分册, 2002, 23(2): 67-69.
3. Burwell RG. A etiology of idiopathic scoliosis: current concepts [J]. Pediatr Rehabil, 2003, 6(3-4): 137-170.
4. Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, et al. Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis [J]. Spine, 2007, 32(16): 1748-1753.
5. Wu J, Qiu Y, Zhang L, et al. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis [J]. Spine, 2006, 31(10): 1131-1136.
6. 孙旭, 邱勇. 瘦素对骨及软组织的作用研究进展[J]. 中国矫形

- 外科杂志, 2006, 14(1): 59-62.
7. Qiu Y, Sun X, Qiu XS, et al. Decreased circulating leptin level and its association with body and bone mass in girls with adolescent idiopathic scoliosis [J]. Spine, 2007, 32 (24): 2703-2710.
 8. Mammes O, Betoulle D, Aubert R, et al. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight [J]. Ann Hum Genet, 2000, 64(5): 391-394.
 9. 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.
 10. Ribeiro R, Araújo AP, Coelho A, et al. A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene increases susceptibility for non-small cell lung cancer [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(8): 1188-1193.
 11. Inoue M, Minami S, Nakata Y, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis [J]. Spine, 2002, 27(21): 2357-2362.
 12. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372(6505): 425-432.
 13. Friedman J. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight [J]. Nutr Rev, 1998, 56(2): 38-46.
 14. Thomas T. The complex effects of leptin on bone metabolism through multiple pathways [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(3): 295-300.
 15. Dickson RA. The etiology and pathogenesis of idiopathic scoliosis [J]. Acta Orthop Scand, 1992, 58(Suppl 1): 21-25.
 16. Hagglund G, Karlberg J, Willner S. Growth in girls with adolescent idiopathic scoliosis [J]. Spine, 1992, 17(1): 108-111.
 17. 王斌, 孙强, 邱勇, 等. 青少年特发性脊柱侧凸青春期中生长发育形态学特征 [J]. 中华骨科杂志, 2006, 26(9): 577-581.
 18. Soucacos PN, Zacharis K, Gelalis J, et al. Assessment of curve progression in idiopathic scoliosis [J]. Eur Spine J, 1998, 7(4): 270-277.
 19. Song KM, Little DG. Peak height velocity as a maturity indicator for males with idiopathic scoliosis [J]. J Pediatr Orthop, 2000, 20(3): 286-288.
 20. 赵栋, 邱贵兴, 王以朋, 等. 钙调蛋白 1 基因、雌激素受体 1 基因多态性与特发性脊柱侧凸双弯的关联性 [J]. 中华医学杂志, 2008, 88(35): 2452-2456.
 21. 赵栋, 邱贵兴, 王以朋, 等. 钙调蛋白 1 基因多态性与青少年特发性脊柱侧凸不同亚型的关系 [J]. 中华骨科杂志, 2008, 28(6): 475-479.
 22. Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, et al. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(9): 4434-4439.
 23. Koh JM, Kim DJ, Hong JS, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms Pvu II and Xba I influence association between leptin receptor gene polymorphism (Gln223Arg) and bone mineral density in young men [J]. Eur J Endocrinol, 2002, 147(6): 777-783.

(收稿日期: 2008-12-10 修回日期: 2009-10-09)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

《脊柱脊髓畸形—影像学及临床》征订启事

由南京大学医学院附属鼓楼医院邱勇教授和北京协和医院王以朋教授共同主编、邱贵兴院士主审、香港中文大学副校长郑振耀教授作序的《脊柱脊髓畸形—影像学及临床》已由人民军医出版社正式出版发行, 定价 235 元, 欢迎大家征订。

本书共分两大部分 22 个章, 涉及 100 余种脊柱脊髓畸形病变, 如脊柱先天性畸形、发育性畸形、各类综合征性疾病导致的脊柱畸形(结缔组织疾病、代谢性疾病或神经肌肉源性疾病), 以及罕见疾病合并的脊柱脊髓畸形和脊柱脊髓肿瘤及肿瘤样病变导致的畸形病变等。作者以大量病例系统阐述了相关脊柱脊髓畸形的各种影像学检查表现与病理学、临床表现、流行病学特点、自然史与预后及治疗等, 配备了近千张影像图片, 重点突出了影像学的评估和诊断, 可方便读者在短时间内即可对相关脊柱脊髓畸形病变有一个全面系统的认识。各病例资料完善、珍贵, 有些病例病史甚至跨越了患者的幼年、青少年、成人及老年全部人生阶段。本书既可作为临床医师选择诊断和治疗手段及评估临床疗效的参考书, 也可作为影像科医师全面分析和提高诊断水平的指导用书。

全国新华书店及医药卫生专业书店均可购买, 邮购者可与人民军医出版社王兰联系, 电话: 010-51927252, 地址: 北京市复兴路 22 甲 3 号人民军医出版社, 邮编: 100842。九折优惠, 免邮寄费。