

基础研究

汉族人群白介素 17 受体 C 基因单核苷酸多态性与青少年特发性脊柱侧凸的相关性

周 松, 朱泽章, 邱 勇, 邱旭升, 钱邦平, 毛赛虎, 王渭君, 刘 臻, 蒋 军, 伍伟飞

(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:探讨白介素 17 受体 C(IL-17RC)基因单核苷酸多态性与中国汉族人群青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)易感性之间的相关性。**方法:**收集 529 例 AIS 女性患者及 512 例正常同龄女性青少年的静脉血标本,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法鉴定和统计两组人群 IL-17RC 基因 rs708567 和 rs279545 多态性位点的基因型及等位基因分布频率;比较两组间不同多态性位点各基因型及等位基因分布频率的差异。**结果:**研究 Power 值(81%)大于 80%,AIS 患者组及正常对照组各多态性位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。AIS 组 rs708567 多态性位点 GG 基因型和 G 等位基因的分布频率显著高于对照组 GG 基因型(90.17% vs. 85.55%, $P=0.023$)和 G 等位基因(95.1% vs. 92.8%, $P=0.028$)的分布频率;携带 GG 基因型青少年中 AIS 的发病率约为携带 AG 基因型青少年的 1.5 倍(OR 值=1.55; 95% CI:1.45~3.11)。rs279545 多态性位点各基因型及等位基因的分布频率在两组间均无统计学差异。**结论:**中国汉族人群中 IL-17RC 基因单核苷酸多态性与 AIS 的发生相关。

【关键词】青少年特发性脊柱侧凸;白介素 17 受体 C 基因;单核苷酸多态性;基因型

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2013.02.13

中图分类号:R682.3, R363.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-02-0161-05

Interleukin-17 receptor C gene polymorphism associated with the susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese Han population/ZHOU Song, ZHU Zezhang, QIU Yong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(2): 161-165

【Abstract】Objectives: To investigate the association of interleukin-17 receptor C(IL-17RC) gene polymorphisms with the susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis(AIS) in Chinese Han population. **Methods:** A total of 529 Chinese girls with AIS and 512 healthy age-matched controls were recruited in this study. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) technique was used to detect the genotype and allele frequency distribution in single nucleotide polymorphism(SNP) rs708567 and rs279545 in both AIS group and control group. **Results:** The sample size had an 81% power to detect the AIS-relevant SNP within the IL-17RC gene. The genotype frequencies showed no significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium in either AIS group or control group. For SNP rs708567, both GG genotype and G allele frequencies in AIS patients were significantly higher than those of normal controls (GG: 90.17% vs. 85.55%, $P=0.023$; G: 95.1% vs. 92.8%, $P=0.028$). In addition, the study showed that GG genotype of IL-17RC gene was independently associated with the risk of scoliosis (odds ratio=1.55; 95% CI: 1.45-3.11). While, for SNP rs279545, no statistically significant differences were found either in genotype or allele frequencies between AIS patients and controls. **Conclusions:** IL-17RC gene rs708567 polymorphism is associated with the susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis in Chinese Han population.

【Key words】 Adolescent idiopathic scoliosis; Interleukin-17 receptor C gene; Single nucleotide polymorphism; Genotype

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

基金项目:国家自然科学基金资助课题(编号:81171767;81101335)

第一作者简介:男(1979-),医学博士,研究方向:脊柱畸形

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

通讯作者:朱泽章 E-mail:zhuzezhang@126.com

遗传因素在青少年特发性脊柱侧凸 (adolescent idiopathic scoliosis, AIS) 的发生与发展中所起的作用已被国内外学者所认可^[1]。利用遗传学相关性研究,褪黑激素受体 1B (MTNR1B) 基因^[2]、matrilin-1 基因^[3]以及雌激素受体 1 (ESR1) 基因^[4]单核苷酸多态性均被发现与中国汉族人群 AIS 的发生有关。最近, Dormans 等^[5]利用全基因组扫描技术对比分析了 137 例欧洲裔 AIS 患者及 2126 例对照组青少年基因组信息,发现白介素 17 受体 C (IL-17RC) 基因单核苷酸多态性与欧洲裔人群 AIS 的发病有关。但该研究 AIS 患者样本量偏小, AIS 患者例数与对照组青少年例数不匹配, 导致该研究入选人群遗传信息的选择性偏差。此外,不同种族人群间遗传基因可能存在差异。IL-17RC 基因单核苷酸多态性是否与中国汉族人群 AIS 的发生有关仍需进一步探讨。为此,本研究对 529 例 AIS 女性患者及 512 例正常同龄女性青少年的 IL-17RC 基因型进行对比分析,旨在验证 Dormans 等^[5]的研究结果,同时探讨 IL-17RC 基因多态性与中国汉族人群 AIS 发生的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

529 例女性 AIS 患者 (年龄 11~18 岁) 及 512 例年龄、性别匹配的正常对照者被纳入本次研究。所有入选对象均为中国汉族人。AIS 患者通过前屈试验及前后位 X 线平片确诊,排除神经肌源性脊柱侧凸、先天性脊柱侧凸、骨软骨发育不良脊柱侧凸、结缔组织与内分泌疾病所伴发的脊柱侧凸以及已接受治疗的脊柱侧凸。正常对照者全部进行前屈试验,如发现背部可疑不等高者,进行 X 线检查确认无脊柱畸形。采用 Cobb 法测量侧凸严重程度,所有入选的 AIS 患者 Cobb 角均大于 20°。研究开始前已获得所有参与本次研究的 AIS 患者及对照组青少年本人及其家长的书面同意,并获得医院临床研究伦理委员会批准。

1.2 单核苷酸多态性 (SNP) 位点的选择

依据 Dormans 等^[5]的研究,选取 SNP rs708567 作为验证位点;根据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> 数据库及 HapMap phase II 数据库所提供的北京汉族人群 SNP 位点基因型数据,将 IL-17RC 基因内最小等位基因分布频率大于 5% (MAF>5%)^[6],且毗邻 rs708567 的其他 SNP 位点

(SNP rs279545) 纳入此次研究。

1.3 基因型鉴定

试剂包括:DNA 抽提试剂盒 (Roche, USA), Taq DNA 聚合酶 (Takara), dNTP (Takara), HinfI、ApoI 内切酶 (Takara), Leptin 引物,琼脂糖 (Promega)。采集研究对象外周血 3ml,依据 DNA 抽提试剂盒说明书提供的操作步骤提取血样本中基因组 DNA,电泳检测并储存于 -80℃ 深低温冰箱备用。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 的方法对所选取的 SNPs 位点进行基因分型。PCR 反应体系 (10μl) 包括:2×BenchTop™ Taq Master Mix (5μl), 上/下游引物 (0.2μl×2, 1.0 μmol/L), ddH₂O (3.6μl) 以及标本 DNA (1.0μl, 1μg)。PCR 反应条件:预变性 95℃ 5min;变性 95℃ 30s;退火 55℃ 30s;延伸 72℃ 1min;40 个循环;72℃ 延伸 10min。扩增完毕,取 PCR 产物 5μl 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳后于紫外线灯下观察结果并摄像以鉴定 PCR 扩增是否成功。鉴定完毕,取 PCR 产物 5μl 与相应的限制性内切酶 (3U) 混合,室温下酶切 4h。酶切产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色,紫外灯下判断限制性片段长度,以确定基因型。10% 的样本进行了重复试验,以保证基因型鉴定的准确性。PCR 引物、PCR 反应产物的大小、所用限制性内切酶以及酶切片段大小见表 1。

1.4 统计学方法

利用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验各等位基因频率是否达到 Hardy-Weinberg 平衡。应用 PASS 软件计算本次研究的 Power 值。采用 χ^2 检验检测 AIS 组与对照组之间各 SNPs 位点基因型和等位基因频率分布差异是否具有统计学意义。所有数据均利用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

多态性位点 rs708567 酶切结果:rs708567 位点 PCR 产物大小为 210bp;当基因型为 GG 时,酶切产物电泳后可见单条条带,大小为 161bp (较小条带 49bp 未显影);当基因型为 AG 时,酶切产物电泳后可见两条条带,大小分别为 161bp 和 210bp;所有 PCR 产物均未见 AA 基因型 (图 1a)。

多态性位点 rs279545 酶切结果:rs279545 位点 PCR 产物大小为 126bp;当基因型为 AA 时,酶切产物电泳后可见单条条带,大小为 109bp(较小条带 17bp 未显影);当基因型为 AG 时,酶切产物电泳后可见两条条带,大小分别为 126bp 和 109bp;当基因型为 GG 时,酶切产物电泳后可见单条条带,大小为 126bp(图 1b)。

本研究 Power 值(81%)大于 80%。AIS 患者组及正常对照组各多态性位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,表示各基因频

率达到遗传平衡,具有群体代表性。统计结果显示,AIS 患者组 IL-17RC 基因 rs708567 多态性位点的 GG 基因型和 G 等位基因分布频率显著高于正常对照组 (GG:90.17% vs. 85.55%, $P=0.023$; G:95.1% vs. 92.8%, $P=0.028$);携带 GG 基因型的青少年 AIS 的发病率约为携带 AG 基因型青少年的 1.5 倍(OR 值=1.55;95% CI:1.45~3.11)。AIS 组 rs279545 多态性位点各基因型和等位基因的分布频率与正常对照组之间无显著性差异(表 2)。

表 1 PCR-RFLP 条件及产物

Table 1 Conditions and product of PCR-RFLP

SNP	引物 Primers	退火温度(°C) Annealing temperature	PCR产物(bp) PCR products	限制性内切酶 Restriction endonuclease	酶切产物(bp) Digestion products
rs708567	上游(Upstream) 5'-GTAGGCTAGGCCTGGAAGG-3' 下游(Downstream) 5'-CACTGGGAAGAGCCTGAAGA-3'	57	210	HinfI	161+49
rs279545	上游(Upstream) 5'-GGTGCCTGATCTCCAAAAT-3' 下游(Downstream) 5'-GCCAGATTGCTATGGAAGAA-3'	57	126	ApoI	109+17

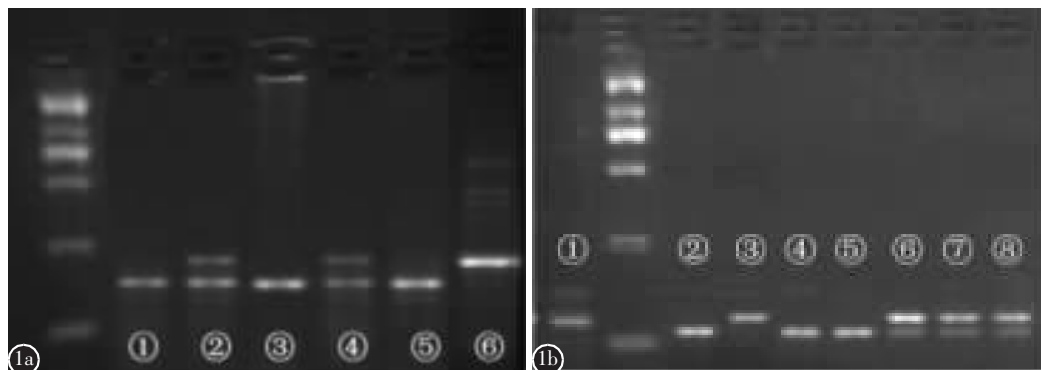


图 1 酶切产物电泳图 a SNP rs708567 PCR 产物酶切电泳图[①③⑤:GG 基因型(完全酶切),酶切产物电泳后可见单条条带,大小为 161bp(较小条带 49bp 未显影);②④:AG 基因型(部分酶切),酶切产物电泳后可见两条条带,大小分别为 161bp 和 210bp(较小条带 49bp 未显影);⑥:PCR 产物未经酶切电泳条带,大小为 210bp] b SNP rs279545 PCR 产物酶切电泳图[②④⑤:AA 基因型(完全酶切),酶切产物电泳后可见单条条带,大小为 109bp(较小条带 17bp 未显影);⑥⑦⑧:AG 基因型(部分酶切),酶切产物电泳后可见两条条带,大小分别为 126bp 和 109bp(较小条带 17bp 未显影);③:GG 基因型(完全不被酶切),酶切产物电泳后可见单条条带,大小为 126bp;①:PCR 产物未经酶切电泳条带,大小为 126bp]

Figure 1 Electropherogram results of digestion products **a** Digestion products of SNP rs708567 PCR products, ①③⑤: GG genotype(complete digestion), a single bright band sized 161bp was observed(a smaller strip sized 49bp was not able to be observed); ②④: AG genotype(partial digestion), two bright bands sized respectively 161bp and 210bp was observed (a smaller strip sized 17bp was not able to be observed); ⑥: PCR products sized 210bp without digestion **b** Digestion products of SNP rs279545 PCR products, ②④⑤: AA genotype (complete digestion), a single bright band sized 109bp was observed(a smaller strip sized 49bp was not able to be observed); ⑥⑦⑧: AG genotype(partial digestion), two bright bands sized respectively 126bp and 109bp was observed.(a smaller strip sized 17bp was not able to be observed); ③: GG genotype (could not be digested), a single bright band sized 126bp was observed; ①: PCR products sized 126bp without digestion

表 2 两组白介素 17 受体单核苷酸基因型及等位基因分布频率

Table 2 Frequency distribution of genotypes and alleles

SNP	基因型/等位基因 Genotypes/alleles	AIS 组 group(Cases/%)	对照组(例数/%) Control group(Cases/%)	P 值	OR 值(95% 可信区间) OR (95% confidence interval)
rs708567	GG	477(90.17%)	438(85.55%)	0.023	1.550(1.062~2.261)
	AG	52(9.83%)	74(14.45%)		0.645(0.442~0.941)
	AA	—	—		—
	G	1006 (95.1%)	950 (92.8%)	0.028	1.507 (1.046~2.172)
	A	52 (4.9%)	74 (7.2%)		
rs279545	GG	21 (3.97%)	33 (6.45%)	0.197	—
	AG	160 (30.25%)	150 (29.30%)		—
	AA	348 (65.78%)	329 (64.25%)		—
	G	202 (19.1%)	216 (21.1%)	0.254	—
	A	856 (80.9%)	808 (78.9%)		

3 讨论

流行病学研究发现,AIS 在有 AIS 家族史的青少年人群中的发病率显著高于一般人群的发病率^[1]。此外,既往研究还发现,与 AIS 患者为同卵双胞胎者其 AIS 的患病率约为 73%,而与 AIS 患者为异卵双胞胎者其 AIS 的患病率约为 36%^[7]。可见,遗传因素在 AIS 的发病中起着十分重要的作用。Qiu 等^[2]利用遗传学 SNP 相关性研究发现,MTNR1B 基因单核苷酸多态性与中国汉族人群 AIS 的发生相关;Chen 等^[3]发现 matrilin1 (MATN1) 基因单核苷酸多态性也与中国汉族人群 AIS 的发生相关;此外,色氨酸羟化酶 1 (TPH1) 基因单核苷酸多态性、胰岛素样生长因子 1 (IGF1) 基因单核苷酸多态性亦被证实与中国汉族人群 AIS 的发生相关^[8]。

在近期的一项遗传学 SNP 相关性研究中,Dormans 等^[9]发现 IL-17RC 基因单核苷酸多态性 (SNP rs708567) 与欧洲裔青少年人群 AIS 的发生相关;该研究结果再次证实遗传因素是导致 AIS 发生的重要因素之一。然而,诸多因素可导致遗传学相关性研究得出假阳性结果,包括实验人群样本量过小、实验人群分层、实验组和对照组人群的选择差异以及实验人群种族间的差异等^[9]。在一项基于 53 例 AIS 患者和 206 例健康对照人群的遗传学 SNP 相关性研究中,Aulisa 等^[10]首次报道基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 与白细胞介素-6 (IL-6) 基因单核苷酸多态性与意大利裔人群中 AIS 的发生有关。然而,Liu 等^[11]在随后的一项包括 487 例女性 AIS 患者和 494 例女性正常青少年的复制研究中发现 MMP-3 与 IL-6 基因单核苷酸多态

性与中国汉族人群 AIS 的发生无显著相关性,他认为 Aulisa 等^[10] 所得研究结果可能为假阳性结果,其主要原因可归结为 Aulisa 等所纳入的 AIS 组样本量过小。因此,Neale 等^[12]建议所有遗传学相关性研究的阳性结果都必须在不同种族人群及更大的样本量中作进一步验证,以确保该阳性研究结果的可靠性。

与 Aulisa 等^[10]的研究相似,Dormans 等^[9]的研究也存在 AIS 组人群样本量偏小 (137 例 AIS 患者) 的缺陷;因此,Dormans 等^[9]所得研究结果的可靠性仍有待进一步验证。基于以上研究背景,本研究对比分析了 529 例中国汉族女性 AIS 患者与 512 例健康同龄女性 IL-17RC 基因多态性位点 rs708567 和 rs279545 中各等位基因及基因型的分布频率,以验证 Dormans 等^[9]的研究结果,并探讨 IL-17RC 基因多态性与中国汉族人群 AIS 发生的相关性。本研究结果显示,AIS 组患者 IL-17RC 基因多态性位点 rs708567 的 GG 基因型分布频率显著高于对照组正常青少年 rs708567 位点 GG 基因型分布频率 (90.17% vs. 85.55%, $P=0.023$);此外,AIS 组患者多态性位点 rs708567 的 G 等位基因分布频率也显著高于对照组青少年 (95.1% vs. 92.8%, $P=0.028$)。然而,AIS 组患者多态性位点 rs279545 各基因型与等位基因的分布频率与对照组青少年之间无显著性差异。本研究结果与 Dormans 等^[9]的研究结果相符,证实 IL-17RC 基因位点 rs708567 多态性与 AIS 的发生存在显著相关性。

rs708567 位点位于染色体 3p25.3 区 IL-17 受体 C (IL-17RC) 基因的外显子区域。IL-17RC

基因所编码的蛋白质为白介素受体 (IL-17R) 复合体的亚基之一^[13]。通过 IL-17 细胞因子/受体复合体信号轴, IL-17 受体可促进多种前炎症细胞因子的释放, 如肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6 等。既往文献报道椎间盘内过量释放的 TNF- α 和 IL-1 β 可以促进椎间盘内基质金属蛋白酶的活化, 从而导致椎间盘代谢异常^[14], 而椎间盘代谢异常及楔形变被认为是导致 AIS 发生的重要病理机制之一^[15,16]。因此, 我们推测多态性位点 rs708567 多态性可能会导致椎间盘内异常炎症反应的发生, 并影响椎间盘的正常代谢, 从而导致 AIS 的发生, 但是该推测仍需从组织学角度作进一步验证。

本研究显示, 中国汉族人群 AIS 患者 IL-17RC 基因多态性位点 rs708567 各基因型与等位基因分布频率与对照组间存在显著性差异, 证实 IL-17RC 基因可能为 AIS 的潜在易感基因之一。然而, 由于不同种族人群间存在较大的遗传背景差异, 因此本研究结果仍需在不同人群中进行持续性的、可重复的验证。此外, 本研究也存在一定的缺陷, 如 SNP rs708567 多态性为 IL-17RC 基因内无义突变所致, 暗示 SNP rs708567 可能与其他多态性位点间的协同作用在损害 IL-17RC 基因功能的过程中发挥着重要作用, 而本研究中并未针对 SNP rs708567 与其他多态性位点间的协同作用作进一步探讨; 另外, 既往研究认为 AIS 是一种多基因相关疾病。因此, 进一步研究 IL-17RC 基因多态性与其他易感基因多态性在 AIS 发生过程中的协同作用有助于我们充分认识 IL-17RC 基因多态性在 AIS 发生中所起的作用。

4 参考文献

1. Lowe TG, Edgar M, Margulies JY, et al. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research[J]. J Bone Joint Surg Am, 2000, 82(8): 1157-1168.
2. 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.
3. Chen Z, Tang NL, Cao X, et al. Promoter polymorphism of matrilin-1 gene predisposes to adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese population[J]. Eur J Hum Genet, 2009, 17(4): 525-532.
4. 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.
5. Dormans JP, Grant SFA, Rendon N, et al. A genome wide association study identifies an IL17RC missense mutation (S111L) as an adolescent idiopathic scoliosis locus [C]. The 60th American Society of Human Genetics Meeting. Washington DC: November 2, 2010.
6. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(5): 391-397.
7. Kesling KL, Reinker KA. Scoliosis in twins: a meta-analysis of the literature and report of six cases[J]. Spine, 1997, 22(17): 2009-2014.
8. Yeung HY, Tang NL, Lee KM, et al. Genetic association study of insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene with curve severity and osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis [J]. Stud Health Technol Inform, 2006, 123: 18-24.
9. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, et al. Replication validity of genetic association studies[J]. Nat Genet, 2001, 29(3): 306-309.
10. Aulisa L, Papaleo P, Pola E, et al. Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study[J]. Spine, 2007, 32(24): 2700-2702.
11. Liu Z, Tang NL, Cao XB, et al. Lack of association between the promoter polymorphisms of MMP-3 and IL-6 genes and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study in a Chinese Han population[J]. Spine, 2010, 35(18): 1701-1705.
12. Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication [J]. Am J Hum Genet, 2004, 75(3): 353-362.
13. Allen WH, Sarah L. IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond[J]. Gaffen Semin Immunopathol, 2010, 32(1): 33-42.
14. Deborah AS, Donny LFC, Wilson SC. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro[J]. Circ Res, 2000, 86(12): 1259-1265.
15. Bushell GR, Ghosh P, Taylor TK, et al. The collagen of the intervertebral disc in adolescent idiopathic scoliosis [J]. J Bone Joint Surg Br, 1979, 61(4): 501-508.
16. 丁旗, 邱勇, 孙旭, 等. 青少年特发性脊柱侧凸不同弯型患者椎体和椎间盘楔形变的差异及临床意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(5): 708-713.

(收稿日期: 2012-08-05 修回日期: 2012-10-14)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)