

基础研究

特发性脊柱侧凸患者二肽基肽酶 9 基因多态性研究

邱旭升¹, 邓亮生², 杨晓恩³, 邱 勇^{1,4}, 郑振耀^{3,4}

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院骨科 210008 江苏省南京市; 2 香港中文大学医学院化学病理学系;

3 香港中文大学医学院矫形外科及创伤学系; 4 南京大学香港中文大学脊柱侧弯联合研究中心)

【摘要】目的:探讨二肽基肽酶 9(dipeptidyl-peptidase 9, DPP9)基因多态性与青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)发生发展的关系。**方法:**选择 571 例 AIS 患者及 236 例正常对照, AIS 患者的 Cobb 角均大于 20°。结合汉族人单倍体型资料, 选取 rs10406145、rs11670570、rs2286367、rs2277733 及 rs732631 5 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点, 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)的方法对这 5 个 SNPs 位点进行基因分型。**结果:**AIS 患者组 DPP9 基因 5 个 SNPs 位点的基因型及等位基因分布与正常对照比较没有明显差异。在已经达到骨骼成熟或者已经接受手术治疗的患者中, 这 5 个 SNPs 位点不同基因型所对应的最大 Cobb 角没有明显差异。**结论:**DPP9 基因多态性与 AIS 的发生发展没有明显关系。

【关键词】DPP9; 基因多态性; 特发性脊柱侧凸

中图分类号: R682.3, R363.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-06-0469-04

Genetic polymorphisms of dipeptidyl-peptidase 9 gene in adolescent idiopathic scoliosis/QIU Xusheng, DENG Liangsheng, YANG Xiaoen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(6): 469-472

【Abstract】Objective:To investigate whether the dipeptidyl-peptidase 9(DPP9) gene polymorphisms was associated with the occurrence or curve severity of adolescent idiopathic scoliosis (AIS). **Method:** 571 AIS patients and 236 normal controls were recruited. The Cobb angles were larger than 20° in all AIS patients. Using the haplotype data of Han population from the Hapmap Project, five tagSNPs (rs10406145, rs11670570, rs2286367, rs2277733, rs732631) were defined for DPP9 gene. PCR-RFLP was used for the genotyping. **Result:** The genotype and allele frequency distribution were similar between AIS and normal control. The mean maximum Cobb angle of different genotypes of the five SNPs in DPP9 gene were similar with each other among AIS patients who reached skeletal maturity or received surgery treatment. **Conclusion:** The DPP9 gene was neither associated with the occurrence nor the curve severity of AIS.

【Key words】 Dipeptidyl-peptidase 9; Polymorphism; Idiopathic scoliosis

【Author's address】 Department of Orthopaedics, 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)是一种复杂的三维脊柱畸形, 多发生在青春期(10~16岁)的女孩, 其发病率大约为 3%~4%^[1,2]。特发性脊柱侧凸的病因尚不清楚。近年来, 随着人类基因组遗传图的进一步完善及基因技术的进步, 人们开始采用全基因组扫描的连锁分析方法以寻找易感基因或相关基因。Chan 等^[3]对 7 个中国南方 AIS 疾病家系进行全基因组扫描, 将疾病的致病基因定位于 19p13.3。二肽基

肽酶 9(dipeptidyl-peptidase 9, DPP9)属于丝氨酸蛋白酶 SC 类 S9B 家族, 它正好位于 19p13.3^[4]。同时 DPP9 在骨骼和肌肉中高表达, 在脑中也有少量表达。本研究选择 DPP9 作为 AIS 的致病候选基因, 对其基因多态性进行研究, 了解其在 AIS 的发生和发展中的作用。

1 资料和方法

1.1 研究对象

571 例 AIS 患者及 236 例正常对照者, 年龄在 10~18 岁, 全部为汉族女性。AIS 患者通过前屈试验及前后位 X 线平片确诊, 排除先天性脊柱侧

第一作者简介: 男(1980-), 医学博士, 研究方向: 骨科遗传学研究
电话: (025)83304616-12101 E-mail: qiu xusheng@gmail.com

通讯作者: 郑振耀, 邱勇

凸,神经肌源性脊柱侧凸,结缔组织病、骨软骨发育不良或者内分泌疾病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。

侧凸大小采用 Cobb 法进行测量,所有 AIS 患者的 Cobb 角均大于 20°。在进行不同基因型患者最大 Cobb 角比较时,选取已经随访到骨骼成熟或者接受手术治疗的患者,在 571 例 AIS 患者中共有 310 例进行了不同基因型最大 Cobb 角的比较。

本研究开始前均由患者和正常对照者本人及其家长签署同意书,同时本课题获得香港中文大学临床研究伦理委员会批准通过。

1.2 基因型鉴定

采集研究对象外周血 3ml,基因组 DNA 采用试剂盒(Roche,USA)提取,具体操作步骤参照说明书。

结合汉族人单倍体型资料,选取 5 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点进行研究,这 5 个 SNPs 位点覆盖了整个 DPP9 基因,它们分别是 rs10406145、rs11670570、rs2286367、rs2277733 及 rs732631。

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 反应扩增包含这些 SNPs 位点片段时所用的引物(有 * 标记的为错配引物)、PCR 反应产物的大小以及所用的内切酶和酶切后限制性片段大小。每个 PCR 反应包括 MBI Taq 酶 0.3U,引物 1.0ml,20mM Tris-

HCl (pH 值 8.4),50mM KCl 以及 2.0mM MgCl₂,最终反应物总体积 12.5ml,总共进行 35 个循环,每个循环包括 96°C 30s、60°C 45s、72°C 30s 三步,最后在 72°C 延伸 10min。取 7μl PCR 反应产物,加入 3U 相应的限制性内切酶及缓冲溶液(表 1),并加水使最终体积为 14μl,在每一个限制性内切酶相对应的最佳反应温度下,酶切过夜。酶切产物经 2%或者 4%琼脂糖(根据片段大小决定采用哪种浓度的琼脂糖)电泳分离,溴化乙锭染色,紫外灯下判断限制性片段长度多态性,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。

1.3 统计学方法

等位基因的频率采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律进行检验,了解各基因频率是否为遗传平衡,即具有群体代表性。在患者组与正常对照组之间,比较各个 SNPs 位点基因型和等位基因频率分布差异采用 R×C 表 χ^2 检验;对于患者组内不同基因型患者最大 Cobb 角大小的比较采用成组 t 检验方法。 $P<0.05$ 为差异有显著性。所有数据统计均应用 SPSS 13.0 进行分析。

2 结果

DPP9 基因 5 个多态性位点基因型分布情况见表 2。在正常对照组及患者组,DPP9 基因 5 个多态性位点的基因型分布都符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。AIS 患者组 DPP9 基因 5 个多态性位点的基因型分布与正常对照比较没有显著性差异。同样,AIS 患者组 DPP9 基因 5 个多态性位点的等位基因分布与正常对照比较也没有明显差异。

表 1 PCR-RFLP 反应所用引物、产物大小及所用限制性内切酶及限制性片段大小

SNPs	引物序列 5'-3'	PCR产物大小(bp)	限制性内切酶	酶切后限制性片段大小(bp)
rs10406145	正向*:TCCTAACCTTTT [*] AGGTCTAAACAAGGTAC	139	Ban I	G:139
	反向:GTGGGAACCGCTCTCCTC			C:114+25
rs11670570	正向*:CCACATGCCCGCACGT [*] CGC	128	BstU I	A:128
	反向:CAGCCAACACCTCCTTTTCT			G:109+19
rs2286367	正向:TCTCCTTTTCCTGGGACCTT	297	Nsi I	G:297
	反向:AAGACCACCAGCACTTCACC			A:163+134
rs2277733	正向*:GGCGGGACAGCATCTG [*] GACC	113	BsiE I	A:113
	反向:CAGAGCTGTCTGTGGCTGAG			G:92+21
rs732631	正向:GGAATTCCTACCGCCTTTTC	135	Ban I	G:135
	反向*:GGAGGATCCCAGA [*] ACTGAAGAGGT			C:108+27

注:* 标记的引物为错配引物,有下划线的碱基为错配碱基

在已经达到骨骼成熟或者已经接受手术治疗的患者中,DPP9 基因 5 个多态性位点不同基因型所对应的平均最大 Cobb 角都没有显著性差异(表 3, $P>0.05$)。

表 2 571 例 AIS 患者与 236 例正常对照者 DPP9 基因多态性情况

基因型	正常对照组		AIS 组		χ^2	P 值
	n	%	n	%		
rs10406145						
GG	180	76.3	396	75.7	0.072	0.965
CG	52	22.0	119	22.8		
GG	4	1.7	8	1.5		
rs11670570						
AA	168	75.7	394	76.4	0.107	0.948
GA	48	21.6	110	21.3		
GG	6	2.7	12	2.3		
rs2286367						
GG	160	77.3	374	77.1	0.017	0.992
GA	43	20.8	102	21.0		
AA	4	1.9	10	2.1		
rs2277733						
AA	112	52.3	295	51.7	0.735	0.692
GA	82	38.3	232	40.6		
GG	20	9.3	44	7.7		
rs732631						
GG	3	1.4	4	1.4	0.320	0.852
GC	64	29.2	137	26.6		
CC	152	69.4	371	72.0		

表 3 310 例骨骼成熟或接受手术的 AIS 患者 DPP9 基因 5 个多态性位点不同基因型所对应的最大 Cobb 角

多态性位点	基因型	n	最大 Cobb 角 ($\bar{x} \pm s, ^\circ$)	t	P 值
rs10406145	GG	212	36.8 $\pm$ 12.8	0.276	0.783
	GC+CC	74	36.3 $\pm$ 13.0		
rs11670570	AA	211	36.9 $\pm$ 12.5	0.148	0.882
	GA+GG	66	36.6 $\pm$ 14.4		
rs2286367	GG	208	36.6 $\pm$ 11.5	0.821	0.412
	GA+AA	64	35.2 $\pm$ 13.8		
rs2277733	AA	170	35.7 $\pm$ 12.0	1.49	0.138
	GA+GG	140	37.8 $\pm$ 13.4		
rs732631	CC	196	36.2 $\pm$ 10.6	0.78	0.36
	GC+GG	86	37.3 $\pm$ 15.3		

3 讨论

早在 20 世纪 30 年代就有特发性脊柱侧凸具有家族聚集现象的临床报道。随着人类基因组遗传图的进一步完善及基因技术的进步,人们试

图用连锁分析的方法来进行疾病的基因定位。Wise^[5]扫描了一个大家族(7 例受累者),报道了特发性脊柱侧凸和 6p、10q、18q 染色体可能连锁,这些候选区域在第二个家系中同样发现了 10q 的连锁,而在另一个家系显示可能与 2 号染色体有连锁。Salehi 等^[6]对一个有三代患者的大家系进行了全基因组扫描,结果提示在 17p11 位点有连锁,这个位点在 D17S947 和 D17S798 之间,大约 20 厘米摩。Chan 等^[3]对中国南方 7 个受累家系(25 例受累者)的全基因组扫描,结果提示在 19p13.3 位点有连锁,这个位点以 D19S216 为中心,在 D19S894 和 D19S1034 之间,大约 2.0Mb。Justice 等^[7]的研究发现 X 染色体上某一区域与家族性脊柱侧凸的发病有关。最近 Miller^[8]对 202 个 AIS 家系、1198 位家族成员进行了大规模的连锁分析,确定了 AIS 易感基因的一些染色体区域。长期以来,对于 AIS 遗传模式争议不断,连锁分析的结果使人们认识到 AIS 不是一个简单的蒙德尔遗传病,而是一个多基因遗传的复杂疾病。因此,有学者采用相关分析的方法进行致病基因鉴定。Inoue 等^[9]研究了雌激素受体(ER)及维生素 D 受体(VDR)、CYP17 基因多态性和特发性脊柱侧凸严重程度之间的相关性。结果表明,雌激素受体 XX 和 Xx 基因型的患者平均 Cobb 角比 xx 基因型患者大,并且手术风险更大。另外,Xx 基因型比 xx 基因型更容易进展。而 VDR、CYP17 基因多态性和 Cobb 角及疾病进展无关。吴洁等^[10]也发现雌激素受体多态性与 AIS 的发病风险有关。

作为一个多基因遗传的复杂疾病,其发病具有遗传异质性,也就是说临床表现相同,可能其遗传基础不同。少部分患者,某个基因的异常在疾病的发病中起了主导作用,携带有此异常基因的个体都发病,从而表现为家族聚集现象;而大部分的患者,都是多个基因与环境因素共同起作用才发病,从而表现为散发病例。在家系中,我们可以采用连锁分析的方法进行致病基因定位;而在散发病例中,我们可以采用相关分析的方法进行致病基因定位。通过连锁分析,将致病基因定位于染色体上某一区域,然后在此区域内寻找与疾病发生可能有关的候选基因,可以增加候选基因选择的准确性。由于 Chan 等^[3]所研究的是汉族人,并给出了 AIS 相关的染色体连锁区域,因此我们希望在此区域内寻找候选基因。本研究所选的 DPP9

在骨骼和肌肉中高表达,在脑中也有少量表达,同时位于连锁分析所定位的 19p13.3 上,靠近连锁最强的遗传标志 D19S216。因此我们选择它作为 AIS 的一个候选基因。

本研究结果表明,AIS 患者的 DPP9 基因型分布及等位基因分布与正常对照都没有明显差异。同时在 AIS 组内,不同基因型的患者平均最大 Cobb 角也没有明显差异。这表明 DPP9 基因不是 AIS 的致病基因,同时也不是 AIS 疾病进展的修饰基因,DPP9 与 AIS 的发生与发展都没有明显关系。这可能是由于 Chan 等^[3]所研究的是家族性脊柱侧凸的致病基因,在散发性病例中并不起作用或者作用很少,很难检测到。另外一个原因是 Chan 等^[3]所定位的 19p13.3 位点,在 D19S894 和 D19S1034 之间,除 DPP9 靠近连锁最强的遗传标志 D19S216 之外,大约还有 40 个已知功能或者未知功能的基因,有可能这些基因与 AIS 的发生发展相关。因此有必要在这些基因中,选取在骨骼肌肉及中枢神经系统中表达的基因,或者与目前疾病假说有关联的基因进行进一步研究,以期发现与疾病发生发展相关的基因。

4 参考文献

1. Rogala EJ, Drummond DS, Gurr J. Scoliosis incidence and natural history: a prospective epidemiological study[J]. J Bone Joint Surg Am, 1978, 60(2): 173-176.

2. 刘尚礼,李卫平,李远景,等.广东省青少年脊柱侧凸患病率调查报告[J].中国脊柱脊髓杂志,2002,12(1):41-43.
3. Chan V, Fong GC, Luk KD, et al. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(2): 401-406.
4. Ajami K, Abbott CA, McCaughan GW, et al. Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPIP-like peptidase activity [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1679(1): 18-28.
5. Wise CA, Barnes R, Gillum J, et al. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis[J]. Spine, 2000, 25(18): 2372-2380.
6. Salehi LB, Mangino M, De Serio S, et al. Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11[J]. Hum Genet, 2002, 111(4-5): 401-404.
7. Justice CM, Miller NH, Marosy B, et al. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus [J]. Spine, 2003, 28(6): 589-594.
8. Miller NH, Justice CM, Marosy B, et al. Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis[J]. Spine, 2005, 30(10): 1181-1187.
9. Inoue M, Minami S, Nakata Y, et al. Prediction of curve progression in idiopathic scoliosis from gene polymorphic analysis [J]. Stud Health Technol Inform, 2002, 91(1): 90-96.
10. 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.

(收稿日期:2007-10-19 修回日期:2007-11-07)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

(上接第 468 页)

合脑脊液成分,囊壁组织检查示脑脊膜组织。术后第 3 天患者双下肢疼痛症状消失,查体:腰背部压痛(-),叩痛(-),股四头肌肌力 4 级,复查胸腰椎正侧位 X 线片示内固定位置良好(图 5,后插页 II)。术后 4 个月随访时,患者双下肢感觉正常,行走超过 1km 后腰背部偶有轻微疼痛,休息后缓解。

讨论 神经纤维瘤病(neurofibromatosis, NF),又称 Von Recklinghausen 病,为家族性常染色体显性遗传病,可发生于身体任何部位,以多发性神经纤维瘤、皮肤牛奶咖啡斑、血管系统及其他脏器改变为特征。其不仅有特征性的皮肤损害表现,也可有中枢神经系统的表现,例如椎管内肿瘤压迫脊髓而导致相应症状^[2]。脊髓脊膜膨出(spinal meningocele)是一种由于胚胎期神经管闭合时中胚层发育障碍而导致的先天性畸形^[3],分为脊膜后膨出和脊膜前膨出。本例患者因其术前影像学检查见 L3 椎管内囊性低密度影,有神经纤维瘤病史,在诊治过程中注意力集中在神经纤维瘤病上,加上对脊膜前膨出相关知识缺

乏,忽视了脊膜膨出的存在,将腰部脊膜前膨出误诊为神经纤维瘤病。因此今后在遇到此类患者时,应综合各方面因素考虑疾病,不能局限在原有疾病上;另外缺乏必要的相关检查也是导致误诊的原因之一。

手术是治疗脊膜膨出的唯一方法,目前主要行脊膜膨出切除+椎管扩大神经松解+脊膜修补术。手术目的在于切除病灶,解除压迫,减少神经症状的发生或阻止症状加重^[4]。本例患者经手术治疗取得良好效果。

参考文献

1. 徐国鸿,王耀程,梁国民,等.胸内脊膜膨出的 X 线平片及 CT 表现[J].实用放射学杂志,2003,19(7):599-602.
2. 徐刚,王新玉,马千红.6 例神经纤维瘤病的 X 线平片与 CT 诊断[J].重庆医学,2006,35(6):550-551.
3. 蒋小惠.小儿神经外科学[M].北京:人民卫生出版社,1994.80-85.
4. 樊福东,董青竹,王昀,等.小儿腰骶部脊膜膨出治疗方法回顾分析[J].中国实用儿科杂志,2006,21(8):625-626.

(收稿日期:2007-12-29 修回日期:2008-05-09)

(本文编辑 朱琳)