

中国南方地区人群 FCGR2A 基因多态性与强直性脊柱炎的相关性

张萍萍, 李秋霞, 吕青, 吴鑫雨, 黄正平, 郑栩琪, 古洁若*
(中山大学附属第三医院风湿免疫科, 广东广州 510630)

摘要:【目的】验证中国南方地区人群的 FCGR2A 基因多态性与强直性脊柱炎(AS)易感性是否相关。【方法】共纳入 350 例 AS 患者及 295 例健康志愿者,采用盐析法全血中抽提样本基因组 DNA,分别在患者及健康志愿者中随机抽取 58 例病人和 90 例对照者,采用外显子测序法筛选 FCGR2A 基因单核苷酸多态性(SNP),然后针对筛选出来的 SNP 在剩余的 292 例患者及 205 例健康志愿者中采用飞行质谱方法进行验证。【结果】通过外显子测序,一共在 FCGR2A 基因外显子区域筛选出了 7 个 SNP 位点,其中有 5 个 SNP(rs1801274、rs150991486、rs12046367、rs143182858、rs1542042)在其他文献中已有报道,另外 2 个是本研究新发现的 SNP(1:161488855 和 1:161481042),但质谱验证有 1 个 SNP(1:161481042)不符合 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.001$),其他 SNP 位点在关联分析中显示,在病例和健康对照者之间没有显著性差异($P > 0.05$)。连锁不平衡分析结果发现 rs150991486 和 rs12046367 之间存在连锁,但是关联分析结果亦显示两组无明显差异性(P 值分别为 0.9171、0.8611、0.9723)。【结论】FCGR2A 基因多态性与中国南方地区强直性脊柱炎易感性无关联。

关键词: FCGR2A 基因;单核苷酸多态性;强直性脊柱炎

中图分类号:R593.23 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2015)01-028-05

Correlation of FCGR2A Gene Polymorphism with Ankylosing Spondylitis in Chinese People

ZHANG Ping-Ping, LI Qiu-Xia, LYU Qing, WU Xin-Yu, HUANG Zheng-Ping, GU Jie-Ruo*

(Department of Rheumatology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Corresponding author: GU Jie-Ruo, E-mail: gujieruo@163.com

Abstract:【Objective】To analyze the association of polymorphism loci in FCGR2A gene exon region with ankylosing spondylitis (AS) in southern China.【Methods】350 AS patients and 295 healthy volunteers were included in this study. Genomic DNA of each sample was separated by salting out method. Among which 58 patients and 90 controls were selected randomly and respectively. Exome sequencing were used to find and analyze the single nucleotide polymorphisms (SNP) in FCGR2A according to the protocol of TruSeq (Illumina). Then these SNP with significant differences were validated on the other 292 AS cases and 205 matched healthy controls through mass spectrometry method.【Results】In exome sequencing results, we found 7 SNP loci in FCGR2A gene, including 5 SNP which were already reported by other studies (rs1801274, rs150991486, rs12046367, rs143182858, rs1542042), and 2 new SNP (1:161488855 and 1:161481042), through mass spectrometry method, unfortunately, there was 1 SNP(1:161481042) which can't meet Hardy-Weinberg equilibrium ($P \leq 0.001$), and cases/controls association analysis showed no difference between AS patients and matched healthy controls on the other SNP ($P > 0.05$). Besides, we also performed linkage disequilibrium analysis, we found there was linkage between rs150991486 and rs12046367, But there was also no obvious difference between the two groups in the correlation analysis(P values were 0.9171, 0.8611, and 0.9723, respectively).【Conclusion】SNP loci in FCGR2A gene might not be a susceptibility gene of ankylosing spondylitis in southern China.

Key words: FCGR2A gene; single nucleotide polymorphisms; ankylosing spondylitis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(1):28-32]

收稿日期:2014-10-06

基金项目:中山大学临床医学研究 5010 计划项目(2007023)

作者简介:张萍萍,博士生,主治医师,研究方向:风湿免疫病,E-mail:zhangpingping82@163.com; *通信作者:古洁若,教授,主任医师,博士生导师,E-mail:gujieruo@163.com

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种常见的慢性炎症性风湿性疾病,它主要侵犯人体中轴骨关节系统以及外周大关节,其特征性病理改变是肌腱和韧带附着点的慢性炎症,部分患者还伴有不同程度的眼、肺、心血管和肾等其他病变。多见于10~40岁的青壮年,20~30岁为发病高峰。一般男性发病较早,病情较重,是导致青壮年致残和丧失劳动力的重要病因之一。尽管AS的发病机制到目前为止还不是完全清楚,同胞及家系研究发现遗传因素在AS患者的发病中起了重要的作用,到目前为止,已经有大量的有关AS疾病易感基因的研究,既往研究已经证实MHC区是最强的遗传决定区域(约50%)^[1],其中人类白细胞抗原HLA-B27是与AS相关的主要基因位点(16%~40%)^[2]。但是HLA-B27只占AS易感遗传因素的20%~30%^[3],因为HLA-B27阳性的人群中仅有5%的人患病,这提示除此之外还有很多其他的基因参与了AS的发病^[4]。研究发现有些非MHC基因也与AS相关^[5],值得注意的是,既往研究确定的AS风险基因也大多数与免疫反应有关,而且目前认为AS风险基因在不同种族之间也存在差异。FCGR2A基因定位于人类染色体1q22-23,编码免疫球蛋白Fc段受体家族的一个成员,而FCGR2A编码的这种Fc段受体主要表达于免疫细胞膜上,其多态性可以改变Fc γ R II a与IgG的结合力。Fc γ R II a是人唯一有效结合IgG2的受体,是保障机体内有效清除免疫复合物的免疫球蛋白受体亚型。FCGR2A基因的多态性使不同个体对Fc γ R II a介导的免疫反应出现差异,进而影响一系列感染性和自身免疫性疾病的发生。作为自身免疫相关性基因,最近有研究显示与欧洲血统AS的遗传易感性相关(rs1801274),但在亚洲人群则未发现这种相关性^[6]。本研究的目的在于探讨中国人群FCGR2A基因多态性与强直性脊柱炎的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究共纳入了350例2012年7月至2013年4月期间在中山大学附属第三医院风湿科就诊的AS病人,这些病人来自于中国南方地区九个省份,全部病人均符合1984年修订的AS纽约诊断

标准。295例对照者为同期在我院体检的性别及年龄匹配的健康志愿者。

1.2 位点筛选方法

对其中58例病人和90例对照者采用外显子测序法分析FCGR2A基因单核苷酸多态性(SNP)。选取覆盖FCGR2A基因的SNP分型数据后,用Plink 1.9软件进行统计学处理,满足下列条件的7个SNP位点被筛选出来:①关联分析显著的SNP($P \leq 0.05$),②非同义突变或utr-3'端的突变,③新的突变。在292例患者及205例健康对照者中利用盐析法提取基因组DNA,然后以飞行质谱方法对筛选出来的SNP进行验证。

1.3 外显子测序分析

外显子测序法分析FCGR2A基因单核苷酸多态性(SNP),具体操作参照流程TruSeq(Illumina)。

1.4 质谱分析法

采用384孔在MassARRAY®平台(Sequenom®, CA, USA)进行,确定SNP位点及其上下游各100 bp片段,利用Sequenom MassARRAY Assay软件4.0(Sequenom, CA, USA)设计PCR引物。PCR扩增出含有SNP位点的一段DNA: PCR体系(5 μ L): 20~50 ng, DNA(浓度:10~20 ng/ μ L); 10 mmol/L MgCl₂; 1 U PCR酶; 2.5 mmol/L dNTP; 0.5 μ mol/L引物。PCR扩增步骤:①变性,95 $^{\circ}$ C, 2 min;②循环,95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min,以上循环45次;③延伸,72 $^{\circ}$ C 5 min。SAP酶去除掉PCR体系中剩余的脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)和引物。等位基因单碱基延伸反应:延伸体系(共9 μ L): 0.200X iPLEX buffer, 0.200 μ L iPLEX termination mix, 0.041 μ L iPLEX enzyme(iPLEX Gold Reaction Kit; Sequenom), 0.940 μ L extension primers.反应步骤:变性,94 $^{\circ}$ C, 30 s;循环B: 94 $^{\circ}$ C 5 s, 退火52 $^{\circ}$ C 5 s, 延伸80 $^{\circ}$ C 5 s,以上循环40次。基质辅助激光解吸电离飞行质谱(MALDI-TOF MS, SpectroREADER, Sequenom)对多态位点进行分析,采用MassArray Typer软件4.0(Sequenom, CA, USA)对输出数据进行分析。

1.5 统计学分析

采用Plink 1.9软件对外显子测序中覆盖FCGR2A基因的SNP分型数据进行统计学处理,采用SPSS 20.0统计软件进行如下统计学分析:Hardy-Weinberg平衡、基因型和等位基因频率分布采用 χ^2 检验;连锁不平衡分析采用Haploview

软件,单倍型分析采用 SHEsis 软件分析。

2 结果

2.1 外显子测序结果

收集到的患者与病例组的一般临床资料如表 1。对其中 58 例病人和 90 例对照者采用外显子测序法分析 FCGR2A 基因单核苷酸多态性(SNP)。根据外显子测序的结果,我们在 FCGR2A 基因的外显子及其启动子区域共发现了 7 个 SNP 位点,其中有 5 个 SNP 在其他文献中已有报道,另外 2 个是我们新发现的 SNP (1:161488855 和 1:161481042),然后我们在 292 例病人及 205 例健康对照人群中进行了质谱验证,所有位点的最小等位基因频率均大于 0.01,但有 1 个 SNP 位点(1:161481042)不符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.2 FCGR2A 基因各 SNP 位点等位基因频率分布

健康志愿者组 205 例各 SNP 位点(除外 1:161481042)的基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,具有群体代表性。AS 组与健康志愿者组该 SNP 位点的等位基因频率分布见表 2。各等位基因频率分布在 AS 组和健康志愿者组差异无显著统计学意义($P > 0.05$),考虑 FCGR2A 基因各 SNP 位点等位基因频率与 AS 无关。

2.3 连锁不平衡分析

对位点 rs143182858、rs150991486、rs12046367、

1:161488855、rs1542042 进行连锁不平衡分析,考虑 rs150991486 和 rs12046367 之间存在连锁(图 1)。

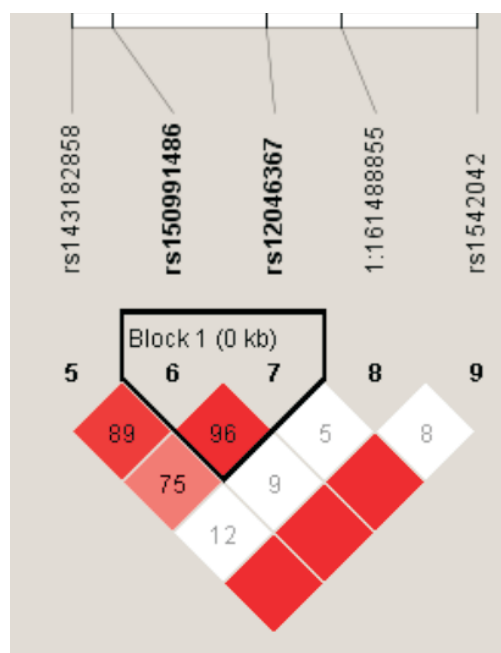


图 1 FCGR2A 基因 SNP 位点的连锁不平衡分析
Fig.1 Linkage disequilibrium(LD) of SNP locus in FCGR2A gene

Each square between SNP loci on behalf of LD (range from 0 to 100), brunet color means strong LD, light color represents high LD, white represents low LD, the higher the LD values the stronger chain relationship.

表 1 AS 患者和健康志愿者一般临床资料

Table 1 Clinical information in AS and Control

Group	n	Male	Female	Minimum age / year	Maximum age / year	Average age / year
AS	350	308	42	18	60	30.3 ± 9.2
Control	295	169	126	18	76	32.5 ± 10.1

表 2 FCGR2A 基因 SNP 位点在 AS 患者及健康对照者等位基因频率分布

Table 2 Allele frequency distribution of FCGR2A gene SNP loci in the AS and controls

rsID	position	Alleles(A1/A2)	A1Freq(case/control)	control Hardy-Weinberg test	P	OR(95%CI)
rs1801274 ¹⁾	161479745	C/T	0.3188/0.3762	0.8253	0.0589	0.7759(0.5962-1.01)
1:161481042	161481042	A/G	0.06746/0.2853	6.297e-09	< 0.001	0.1812(0.1199-0.2738)
rs143182858	161487863	T/C	0.2013/0.2246	0.114	0.3721	0.8702(0.6411-1.181)
rs150991486	161488017	C/T	0.2104/0.2293	0.096	0.4776	0.896(0.6616-1.213)
rs12046367	161488585	A/T	0.1417/0.1477	0.05242	0.8446	0.9528(0.5873-1.546)
1:161488855	161488855	G/A	0.03535/0.02927	0.5763	0.595	1.216(0.5913-2.499)
rs1542042	161489353	A/G	0.08562/0.09737	0.845	0.5338	0.868(0.5556-1.356)

Chi-square test was used for genotype and allele frequency distribution. 1) has been reported.

表 3 AS 患者和健康志愿者 FCGR2A 基因外显子区 SNP 的单倍型分析

Table 3 Haplotype analysis of SNP in the FCGR2A gene exon region between AS and controls

HAPLOTYPE	Case (freq)	Control (freq)	CHISQ	DF	P	SNP
CA	0.1441	0.1409	0.01083	1	0.9171	rs150991486 rs12046367
CT	0.0917	0.09622	0.03063	1	0.8611	rs150991486 rs12046367
TT	0.7642	0.7629	0.00121	1	0.9723	rs150991486 rs12046367

2.4 AS 患者 FCGR2A 基因外显子区 SNP 单倍型分析

对 292 例 AS 患者和 205 例健康志愿者 rs150991486 及 rs12046367 位点进行 SNP 的单倍型分析 (Haplotype analysis), AS 和健康志愿者之间差异无统计学意义 (表 3)。

3 讨 论

3.1 强直性脊柱炎与 FCGR2A 基因的相关性存在种族特异性

强直性脊柱炎 (AS) 是一种常见的慢性炎症性风湿性疾病, 以脊柱和骶髂关节炎症为临床特征, 造成病变部位疼痛、僵硬感, 逐渐出现新骨形成及进行性的关节硬化, 从而最终导致病人丧失独立生活和工作的能力。其发病率在不同地区也存在差异, 在欧洲为 0.55%^[7], 中国则为 0.23%^[8]。尽管 AS 的发病机制到目前还不是非常明确, 但众所周知, 遗传因素在其中起到了关键的作用, 除了 HLA-B * 27 外, 很多其他的位点也陆续被证实与 AS 的发病相关, 而且 AS 的相关基因在不同种族也不尽相同。

大量证据及 meta 分析结果显示滑膜上 FCGRs 的表达可能促进了抗体触发的关节炎^[9], 且 FCGR2A 基因上的 SNP 位点 (如 rs7551957 和 rs1801274) 与 RA、SLE 及 AS 等自身免疫性疾病相关^[6, 10-12]。然而, 研究显示 FCGR2A 基因多态性与 AS 相关性研究在不同种族中结果不一致。如 Adrian Cortes 报道 rs1801274、rs2039415 与欧洲血统强直性脊柱炎显著相关, 而与东亚人群 AS 则无相关性。我们的研究在中国南方地区 AS 病人 FCGR2A 基因外显子及启动子区域发现了 5 个已知 SNP 位点, 其中就包括 rs1801274 位点, 另外 2 个是新发现的 SNP 位点 (1:161488855 和 1:161481042), 但是我们均未发现这些 SNP 位点与 AS 的相关性, 和既往的研究结果是一致的^[6], 这说

明可能 FCGR2A 基因并不是中国人群甚至亚洲人群 AS 的易感基因。Adrian Cortes 还报道了 rs1801274 (T/C) 的最小等位基因频率, 为 0.487/0.476 (case/control), 相比之下在中国该位点等位基因频率更低, 为 0.3188/0.3762。就我们所知, 这是第一篇关于 FCGR2A 和中国人群 AS 相关性的研究。

3.2 FCGR2A 基因功能及研究方法

FCGR2A 基因定位于人类染色体 1q22-23, 其编码的免疫球蛋白 Fc 段主要表达于免疫细胞膜表面, 包括自然杀伤细胞、巨噬细胞以及中性粒细胞, 参与吞噬作用和免疫复合物的清除过程, 并具有调节 B 细胞抗体生成等多种功能^[10], 在免疫反应中发挥了重要作用。既往的研究证明, FCGR2A 基因多态性与多种自身免疫性疾病有关^[13-14], 因此本研究选择对 FCGR2A 基因序列进行研究。

此外, 本研究对 AS 易感基因的初步筛选采取了外显子测序方法, 这是利用序列捕获技术将全基因组外显子区域 DNA 捕捉并富集后进行高通量测序的基因组分析方法。这是一种选择基因组的编码序列的高效策略, 相对于基因组重测序成本较低, 对研究已知基因的 SNP、Indel 等具有较大的优势, 而且, 强直性脊柱炎存在多基因遗传模式, 这种方法也有利于发现新的 SNP 位点, 1:161488855 和 1:161481042 就是本研究新发现的 SNP 位点, 这 2 个位点既往还没有被报道过, 尽管这两个位点的相关性分析未见显著性差异, 但对于我们将来 FCGR2A 基因的遗传研究提供新的依据, 对疾病遗传学研究起到了建设性的作用。

FCGR2A 基因多态性与 AS 相关性研究在不同种族中结果不一致, 中国南方地区人群 FCGR2A 基因多态性与强直性脊柱炎无关。

参考文献

- [1] Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing

- spondylitis [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(4): 588–595.
- [2] Peloso PM, Gammaitoni A, Smugar SS, et al. Longitudinal numbers-needed-to-treat (NNT) for achieving various levels of analgesic response and improvement with etoricoxib, naproxen, and placebo in ankylosing spondylitis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2011, 12: 165.
- [3] Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis [J]. *Lancet*, 2007, 369(9570): 1379–1390.
- [4] Jin GX, Duan JZ, Guo WL, et al. Association between IL-1RN gene polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis: a large Human Genome Epidemiology review and meta-analysis [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(2): 1720–1730.
- [5] Reveille JD. Genetics of spondyloarthritis—beyond the MHC [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(5): 296–304.
- [6] International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7): 730–738.
- [7] Braun J, Listing J, Sieper J. Overestimation of the prevalence of ankylosing spondylitis in the Berlin study: comment on the article by Braun et al—Reply [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(12): 4049–4050.
- [8] Ng SC, Liao Z, Yu DT, et al. Epidemiology of spondyloarthritis in the People's Republic of China: review of the literature and commentary [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2007, 37(1): 39–47.
- [9] Magnusson SE, Engstrom M, Jacob U, et al. High synovial expression of the inhibitory FcγRIIb in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(3): R51.
- [10] Meziani R, Yamada R, Takahashi M, et al. A trans-ethnic genetic study of rheumatoid arthritis identified FCGR2A as a candidate common risk factor in Japanese and European populations [J]. *Mod Rheumatol*, 2012, 22(1): 52–58.
- [11] Criswell LA. The Genetic contribution to Systemic Lupus Erythematosus [J]. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2008, 66(3): 176–183.
- [12] Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(6): 508–514.
- [13] Dijstelbloem HM, Scheepers RH, Oost WW, et al. Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse [J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(9): 1823–1827.
- [14] Myhr KM, Raknes G, Nyland H, et al. Immunoglobulin G Fc-receptor (FcγR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS [J]. *Neurology*, 1999, 52(9): 1771–1776.

(编辑 刘清海)