

• 临床检验研究论著 •

IL12B 基因多态性与宁夏人群强直性脊柱炎患病风险的新关联*

周 林¹, 张建侠², 刘 英³, 朱小泉⁴, 张毓洪⁵, 杨芝红⁶, 杨宝珍⁶, 霍正浩⁷, 杨 泽^{4△}

(1. 广西壮族自治区妇幼保健院遗传代谢中心实验室, 广西南宁 530003; 2. 北京回龙观医院内科, 北京 102208; 3. 上海市浦东医院老年科, 上海 201300; 4. 卫生部北京医院, 北京 100730; 5. 宁夏医科大学公共卫生学院, 宁夏银川 750004; 6. 宁夏医科大学附属医院检验科, 宁夏银川 750004; 7. 宁夏医科大学医学遗传与细胞生物学系, 宁夏银川 750004)

摘 要:目的 探讨 IL12B 基因多态性与宁夏人群强直性脊柱炎(AS)患病风险的关系。方法 选用病例-对照方法, 以 297 例 AS 患者以及性别、地域匹配的 370 例健康者为研究对象, 采用 PCR-HRM 技术和 PCR-RFLP 法结合测序技术检测 IL12B 基因 4 个 SNP 的基因型, 分析 4 个 SNP 基因型频率、单体型以及危险基因型累积效应。结果 在 AS 患者中, rs3213094 的基因型 AA($P=0.032$, $OR=1.534$)以及含有 rs3213094 等位基因 A 的单体型 AAC($P=0.018$, $OR=1.352$)显著增多; 4 个 SNPs 的危险基因型间存在着一定的累积效应, 在病例组中同时存在 3 个或 4 个危险基因型的个体显著增加($P<0.05$), 并且 OR 值逐渐增大(1.731→4.957)。结论 IL12B 基因 SNP rs3213094 可能是与宁夏人群 AS 患病风险相关联的新位点。

关键词: 基因多态性, IL12B; 强直性脊柱炎; 宁夏

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)11-1372-04

Novel association between IL12B gene polymorphism and risk of ankylosing spondylitis in Ningxia population*

Zhou Lin¹, Zhang Jianxia², Liu Ying³, Zhu Xiaoquan⁴, Zhang Yuhong⁵, Yang Zhihong⁶,
Yang Baozhen⁶, Huo Zhenghao⁷, Yang Ze^{4△}

(1. Genetic and Metabolic Center Laboratory, Maternity and Child Health Hospital in Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530003, China; 2. Department of Internal Medicine, Beijing Hui Long Guan Hospital, Beijing 102208, China; 3. Department of Geriatrics, Shanghai Pudong Hospital, Pudong, Shanghai 201300, China; 4. The Key Laboratory of Geriatrics, Ministry of Health Beijing Hospital, Beijing 100730, China; 5. School of Public Health, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 6. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 7. Department of Cell Biology and Medical Genetics, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation of IL12B gene polymorphism with the risk of ankylosing spondylitis(AS) in Ningxia population. **Methods** Using the case-control design method, 297 AS patients and 370 healthy subjects were collected. The genotype of 4 SNPs on IL12B gene were detected with the polymerase chain reaction-high resolution melting curve(PCR-HRM) and PCR-restricted fragment length polymorphism(RFLP) combined with gene sequencing, in order to analyze the genotype frequencies, the haplotype and the cumulative effect of risk genotype. **Results** Significant differences were found in the distribution of the genotype AA of rs3213094($P=0.032$, $OR=1.534$) and the haplotype AAC that contained the allele A of rs3213094($P=0.018$, $OR=1.352$) between the AS and control groups. Cumulative effect may existed among the risk genotypes of the 4 SNPs on IL12B gene. There were more subjects that contain 3 or 4 risk genotypes in the AS group than that in the control group. And the OR value increased from 1.731 to 4.957. **Conclusion** A novel SNP rs3213094 on IL12B gene may be associated with the risk of AS in Ningxia population.

Key words: gene polymorphism, IL12B; ankylosing spondylitis; Ningxia

强直性脊柱炎(AS)是一种临床分类诊断明确的多基因遗传病^[1], 是一种慢性全身性炎性疾病, 后期可引起骨性强直及脊柱畸形。在国内, AS 的发病率为 0.20%~0.54%^[2], 大多数患者发病年龄低于 30 岁, 只有低于 5% 的患者是 45 岁以上发病的^[3]。虽然 AS 的病因迄今未明, 但已确证遗传因素在 AS 的发生中起着非常重要的作用^[4-5]。

通过研究基因多态性来发现 AS 的易感基因, 进而探讨 AS 的发病机制已经成为近年来普遍认可的最有前景的分子

遗传学研究方法。研究发现, IL12B 基因多态性与银屑病、儿童变异性及非变异性哮喘等多种自身免疫性疾病相关联。因此, 笔者猜测 IL12B 基因多态性可能也与自身免疫性疾病 AS 的患病风险之间存在相关性。为探讨 IL12B 基因与中国群体 AS 患病风险的关联, 笔者选取 IL12B 基因上的 4 个 SNP rs3213094、rs2082412、rs17728338 与 rs3212227, 在宁夏地区部分 AS 患者和健康对照者中对其基因型进行检测分析, 具体研究如下。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972709)。作者简介: 周林, 女, 实习研究员, 主要从事遗传代谢病研究。△ 通讯作者, E-mail: yangze0126@126.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 来自宁夏医科大学附属医院的汉族人群,病例组为 2008 年 3 月前确诊的 297 例 AS 患者(年龄:10~71 岁,平均 29 岁);对照组由在本医院进行体检且无既往病史或每项检查结果均正常的无血缘关系的 370 例个体组成(年龄 25~70 岁,平均 46 岁)。AS 患者的诊断符合美国风湿病学会制订的风湿病分类标准(修订的纽约标准)^[6]。所有研究对象均对该检测项目知情同意,并且提供外周血样本。该研究得到卫生部北京医院,卫生部北京老年医学研究所伦理审核委员会的认可,符合世界医学会赫尔辛基宣言及人体医学研究的伦理原则。

1.2 仪器与试剂 DNA 定量分析仪为德国 Eppendorf 公司的 Biophotometer 蛋白/核酸比色仪;PCR 扩增仪为美国 MJ 公司的 PTC-225 型 PCR 仪;高分辨溶解曲线(HRM)基因突变/基因分型检测系统为美国 Idaho 公司 Lightscanner TMHR-I 96;凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司的 Gel Doc-2000 成像系统。全基因组 DNA 提取试剂盒购自 Bio Chain 公司;Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自北京鼎国生物技术有限公司;LC-green PLUS 饱和荧光染料购自美国 Idaho 公司。

1.3 方法^[7]

1.3.1 基因组 DNA 的制备 用全基因组 DNA 提取试剂盒从 EDTA 抗凝血中抽提 DNA,使用 Biophotometer 蛋白/核酸比色仪鉴定提取的基因组 DNA 浓度及纯度。将样本 DNA 稀释成 20 ng/ μ L 的工作液,置于 4℃冰箱备用。

1.3.2 基因型检测 使用软件 Oligo6.0 完成引物设计,由上海生工生物技术开发有限公司合成,4 SNPs 的引物序列、退火温度及扩增片段长度见表 1。使用 PCR-HRM 法对 rs3213094、rs2082412 与 rs17728338 进行基因分型检测,PCR-HRM 反应总体系为 10 μ L,其反应体系及反应条件见参考文献^[7]。使用限制性内切酶 TaqI 对 rs3212227 的 PCR 产物进行分析(515 bp $\rightarrow$ 283 bp+232 bp)。TaqI 的反应温度为 65℃,时间为 8 h。酶切反应总体系 10 μ L:10 $\times$ 缓冲液 1 μ L, TaqI(10 U/ μ L)0.2 μ L,PCR 扩增产物 3 μ L,H₂O 5.8 μ L。酶切产物经 8%聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,Gel Doc-2000 凝胶成像分析系统成像后分析电泳图,判读基因型。

1.3.3 测序验证 从所得的不同基因型的个体中分别随机抽取 5 例样本进行测序验证。测序样本重新进行 PCR 扩增,引物序列及相关信息见表 2。PCR 反应体系 30 μ L,其反应体系及反应条件见参考文献^[7],退火温度见表 2。PCR 产物经 8% PAGE 电泳检测,合格者送华大基因测序部进行测序验证。

表 1 基因分型-PCR 反应基本信息

SNPs	5 号染色体上的位置	引物序列(5'-3')	基因分型方法	退火温度(℃)	退火时间(s)	片段长度(bp)
5rs3213094A/G	158683347	F:CTGGTTAGTGAGACAGGAT	HRM	63	20	54
		R:CTCAGGGTGTGAGAACAA	—	—	—	—
rs2082412A/G	158650367	F:TTCACACATGGACAACCAAG	HRM	63	20	82
		R:TACTGGGGGAGAAATAACGAG	—	—	—	—
rs17728338A/G	146559675	F:ATGTGGTTTGTTCAGCTGG	HRM	60	15	74
		R:GAAGGCAGGGTGCCATTC	—	—	—	—
rs3212227C/A	158675528	F:TATGTTGTGAGAAATAAGAAGAGAC	RFLP	64	30	515
		R:TGATTGTCATAAACTGATGTACTT	—	—	—	—

—:无数据。

表 2 测序-PCR 反应基本信息

SNPs	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	退火时间(s)	延伸时间(s)	片段长度(bp)
rs3213094	F:TGGGAAGACTAAGCTCTACTGGAC	62	30	45	618
	R:GGAAGGCTGCCTTTAATAGTAACC				
rs2082412	F:CACAGCAGAGGTCTGCACACATAG	62	30	20	180
	R:GTACTGGGGGAGAAATAACGAGTG				
rs17728338	F:ACGTGGCATGGAACATAGGAG	58	30	30	343
	R:GGTGAGGTAGACAAGATGAGAAGT				
rs3212227	F:TATGTTGTGAGAAATAAGAAGAGAC	64	30	30	515
	R:TGATTGTCATAAACTGATGTACTT				

1.4 统计学处理 运用 Hardy-Weinberg 平衡检测研究样本的群体代表性。基因型频率比较分析与危险基因型累积效应分析采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异显著性标准,用比值比(OR)值及其 95%可信区间(95%CI)对相对风险进行评价,在 SPSS 17.0 软件下完成数据的统计分析。采用 SHEsis 在线软件^[8-9]进行单体型分析,定义最低频率阈值为 0.03,即频率小于 0.03 的单体型不纳入分析。

2 结果

2.1 基因型分析 SNP rs3213094、rs2082412、rs17728338 和

rs3212227 的基因分型图见图 1。为检测各 SNP 分型结果的准确率,在所有 SNPs 的每个基因型中随机挑选 5 例进行测序验证,结果证实:各 SNP 分型结果与测序结果完全吻合(rs3213094 测序图见图 2),测序结果进行网上 BLAST 比对,序列完全一致。

2.2 基因型频率关联分析 为检测本研究群体的代表性,笔者对每个 SNP 在对照组中的基因型分布频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验分析,结果发现:所有 SNP 的基因型在对照组中的分布情况均符合 HWE 规律($P>0.05$),见表 3。分

析 IL12B 的 4 个 SNPs 基因型在 AS 患者与对照者间分布频率的
差异性,结果发现:在 IL12B 基因的 4 个 SNPs 中,只有
rs3213094 的基因型 AA 在 AS 组 and 对照组之间的分布具有显
著性差异($P=0.032, OR=1.534, 95\%CI:1.035, 2.727$),见
表 4。

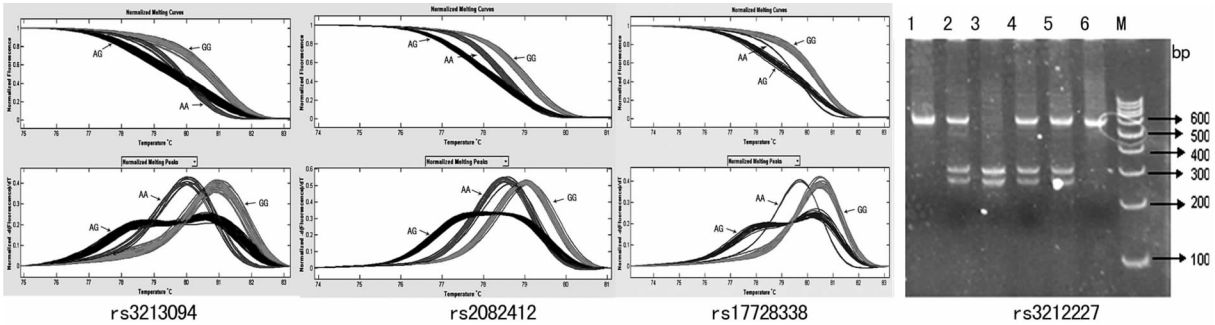
2.3 单体型关联分析 在 4 个 SNPs 中,rs17728338 与
rs2082412 相距超过 12 000 kb,减数分裂时易发生交换,做单
体型分析意义不大。因此笔者仅分析 rs3213094-rs2082412-
rs3212227 组成的单体型,结果发现:含有 rs3213094 等位基因
A 的单体型 AAC 在病例组中显著增多($P=0.018$),并且 OR
值大于 1($95\%CI:1.050, 1.671$),而含有等位基因 G 的单体型
GAA 在病例组与对照组中的分布频率之比 OR 值为 0.158,见
表 5。

2.4 危险基因型累积效应分析 笔者对 rs3213094(AA)、
rs2082412(AA),rs17728338(AG)与 rs3212227(CC)的危险基
因型进行累积效应分析,结果发现:同时存在 3 个或 4 个危险
基因型的个体,在病例组中的分布频率显著高于其在对照组中
的分布频率($P<0.05$),并且 OR 值逐渐增大(1.731→4.957),

见表 6。

表 3 Hardy-Weinberg 平衡检测结果					
SNPs	组别	基因频率[n(%)]			HWE
rs3213094	病例组	65(22.2) ^a	141(48.1) ^b	87(29.7) ^c	—
	对照组	58(15.7) ^a	199(53.8) ^b	113(30.5) ^c	
rs17728338	病例组	57(19.2) ^a	149(50.2) ^b	91(30.6) ^c	—
	对照组	57(15.6) ^a	210(57.4) ^b	99(27.0) ^c	
rs2082412	病例组	66(22.4) ^a	139(47.3) ^b	89(30.3) ^c	—
	对照组	63(17.0) ^a	196(53.0) ^b	111(30.0) ^c	
rs3212227	病例组	60(20.4) ^d	143(48.6) ^e	91(31.0) ^a	—
	对照组	54(14.7) ^d	196(53.2) ^e	118(32.1) ^a	

^a:AA 基因型的基因频率;^b:AG 基因型的基因频率;^c:GG 基因型
的基因频率;^d:CC 基因型的基因频率;^e:AC 基因型的基因频率;—:无
数据。



酶切产物 1,6:AA(515 bp);2,4,5:AC(515,283,232 bp);3:CC(283,232 bp)。

图 1 IL12B 基因 4 SNPs 的基因型分型图

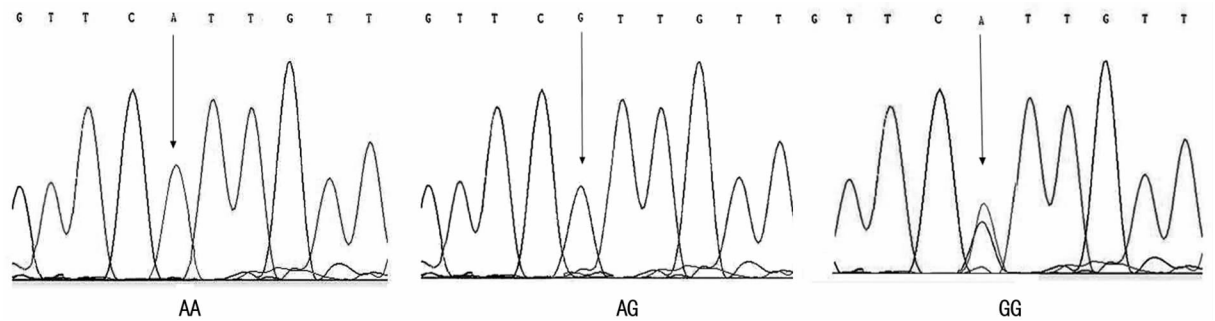


图 2 rs3213094 测序结果图

表 4 IL12B SNPs 基因型分布情况分析

SNPs	组别	基因型比例[n(%)]		P	OR(95%CI)	基因型比例[n(%)]		P	OR(95%CI)
rs3213094	病例组	65(22.2) ^a	228(77.8) ^b	0.032	1.534(1.035,2.272)	206(70.3) ^b	87(29.7) ^c	0.813	1.041(0.745,1.454)
	对照组	58(15.7) ^a	312(84.3) ^b	—	—	257(69.5) ^b	113(30.5) ^c	—	—
rs2082412	病例组	66(22.4) ^a	228(77.6) ^b	0.079	1.411(0.959,2.074)	205(69.7) ^b	89(30.3) ^c	0.939	0.987(0.707,1.378)
	对照组	63(17.0) ^a	307(83.0) ^b	—	—	259(70.0) ^b	111(30.0) ^c	—	—
rs17728338	病例组	1(0.4) ^a	296(99.6) ^b	0.696	0.622(0.056,6.889)	40(13.5) ^b	257(86.5) ^c	0.202	1.360(0.847,2.182)
	对照组	2(0.6) ^a	368(99.4) ^b	—	—	38(10.3) ^b	332(89.7) ^c	—	—
rs3212227	病例组	60(20.4) ^d	234(79.6) ^e	0.052	1.491(0.995,2.235)	203(69.0) ^f	91(31.0) ^a	0.760	1.053(0.757,1.465)
	对照组	54(14.7) ^d	314(85.3) ^e	—	—	250(67.9) ^f	118(32.1) ^a	—	—

^a:AA 基因型的比例;^b:AA+AG 基因型的比例;^c:GG 基因型的比例;^d:CC 基因型的比例;^e:AC+AA 基因型的比例;^f:CC+AC 基因型的比
例;—:无数据。

表 5 SNP rs3213094-rs2082412-rs3212227 单体型分析

单体型	病例组[n(%)]	对照组[n(%)]	χ^2	P	OR	95%CI
AAC	242.5(0.421)	244.29(0.332)	5.641	0.018	1.352	1.050,1.671
GAA	6.99(0.012)	49.13(0.067)	26.245	3.12×10^{-7}	0.158	0.071,0.352
GGA	292.63(0.508)	350.76(0.477)	0.026	0.871	0.981	0.780,1.234

表 6 rs3213094、rs2082412、rs17728338 与 rs3212227 危险基因型累积效应分析

危险基因型	病例组 [n(%)]	对照组 [n(%)]	OR(95%CI)	P
0	187(63.0)	206(55.7)	1.00(Ref)	—
1	36(12.1)	59(15.9)	0.672(0.425,1.064)	0.089
2	10(3.4)	20(5.4)	0.551(0.251,1.207)	0.132
3	55(18.5)	35(9.5)	1.731(1.084,2.764)	0.021
4	9(3.0)	2(0.5)	4.957(1.058,23.237)	0.025

—:无数据。

3 讨 论

IL-12 又称自然杀伤细胞刺激因子(NKSF)或细胞毒性淋巴细胞成熟因子(CLMF),是一种异源二聚体型细胞因子,主要由活化的巨噬细胞和 T 淋巴细胞合成,可调节自然杀伤(NK)细胞与 T 淋巴细胞的活性。IL-12 参与 Th1 细胞的生长与分化,使 Th1 细胞维持在一定的数量以抑制胞内病原体的感染。Th1 细胞为 CD4⁺ T 细胞,主要分泌白细胞介素 2(IL-2)、干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子 TNF-β(TNF-β)等,参与调节细胞免疫,辅助细胞毒性 T 细胞分化,介导细胞免疫应答,参与迟发型超敏反应等。

IL12B 基因位于 5q31.1~q33.1,全长 15 kb,含 8 个外显子,可编码一种相对分子质量为 40×10³ 的细胞因子受体样亚基 P40,并与 IL12A 编码的相对分子质量为 35×10³ 的细胞因子受体样亚基 P35 通过二硫键连接而形成 IL-12。据报道,IL12B 基因多态性与多种自身免疫性疾病相关联。Nair 等^[10]研究发现,IL-12B 基因 3'非翻译区 rs3212227 与高加索人银屑病的发生具有相关性。IL-12B 基因启动子多态性与儿童变异性及非变异性哮喘的严重性相关联。据报道,IL-12B 基因的超表达与中枢神经性疾病多发性硬化病(MS)的发生相关联。

为探讨 IL12B 基因与 AS 的患病风险之间的相关性,本研究采用病例-对照设计,应用 PCR-HRM 和 PCR-RFLP 技术检测 IL12B 基因上的 4 个 SNPs (rs3213094、rs2082412、rs17728338 与 rs3212227)的基因型与等位基因在宁夏 AS 患者组与正常对照组之间的分布情况。结果发现:在 AS 患者组中,rs3213094 的基因型 AA 以及含有 rs3213094 等位基因 A 的单体型 AAC 的分布频率显著高于其在对照组中的分布频率($P<0.05$, $OR>1$),提示 rs3213094 可能与 AS 的患病风险具有相关性,AA 可能是其危险基因型。研究还发现:IL12B 基因上的 4 个 SNPs 的危险基因型间存在着一定的累积效应,同时存在 3 个或 4 个危险基因型的个体,在病例组中的分布频率显著高于其在对照组中的分布频率($P<0.05$),并且 OR 值逐渐增大,提示 IL12B 基因可能与 AS 的易感性具有一定关联。

SNP rs3213094 位于 IL12B 基因内含子区,近年来,已有研究发现 rs3213094 与自身免疫性疾病的发生相关联。Zhang 等^[11]为探讨银屑病关联基因的一项全基因组关联分析发现

rs3213094 与银屑病显著关联($P=2.58\times10^{-26}$)。李敏等^[12]研究发现:IL-12B 基因多态位点 rs3213094 基因型和等位基因在寻常型银屑病患者和健康对照者间的分布有显著性差异(P 分别为 1.30×10^{-5} 与 4.2×10^{-6})。然而目前还未有关于 IL-12B 基因 rs3213094 与 AS 的关联研究。

本研究首次发现 IL-12B 基因 rs3213094 与 AS 的关联性,但由于样本量较小、研究群体单一的局限性,研究结果仅供参考。至于 IL12B 基因多态性与 AS 患病风险间是否存在相关性,关联强度如何,还有待进一步的多中心、大样本研究,从而为 AS 的病因学研究提供理论依据。

参考文献

[1] 陈蕊雯,段世伟,蔡青,等. 肿瘤坏死因子 α 的单核苷酸多态性与中国汉族人强直性脊柱炎的关联分析[J]. 第二军医大学学报, 2004,25(2):120-124.

[2] Zeng QY,Chen R,Darmawan J,et al. Rheumatic diseases in China [J]. Arthritis Res Ther,2008,10(1):R17.

[3] Braun J,Sieper J. Ankylosing spondylitis[J]. Lancet,2007,369 (9570):1379-1390.

[4] Brown MA,Laval SH,Brophy S,et al. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis[J]. Ann Rheum Dis,2000,59(11):883-886.

[5] Brown MA,Kennedy LG,MacGregor AJ,et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes,HLA,and the environment[J]. Arthritis Rheum,1997,40(10):1823-1828.

[6] Goie The HS,Steven MM,van der Linden SM,et al. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis;a comparison of the Rome,New York and modified New York criteria in patients with a positive clinical history screening test for ankylosing spondylitis [J]. Br J Rheumatol,1985,24(3):242-249.

[7] 周林,刘铭,黄金,等. 3 号染色体两单核苷酸多态性与中国前列腺癌风险的相关性研究[J]. 中华男科学杂志,2011,17(8):682-687.

[8] Li Z,Zhang Z,He Z,et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with m_uLtiallelic markers:update of the SHEsis(<http://analysis.bio-x.cn>) [J]. Cell Res,2009,19(4):519-523.

[9] Shi YY,He L. SHEsis,a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium,haplotype construction,and genetic association at polymorphism loci[J]. Cell Res,2005,15(2):97-98.

[10] Nair RP,Ruether A,Stuart PE,et al. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis[J]. J Invest Dermatol,2008,128(7):1653-1661.

[11] Zhang XJ,Huang W,Yang S,et al. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21[J]. Nat Genet,2009,41(2):205-210.

[12] 李敏,唐先发,朱诚垚,等. IL-12B 基因多态性与汉族人寻常型银屑病表型的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报,2009,44(3):314-317.