

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00006

汉族人群后纵韧带骨化症的单核苷酸多态性分析

刘 洋, 石长贵, 史国栋, 王 策, 陈元元, 曹 鹏, 陈德玉, 袁 文*

第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

[摘要] **目的** 寻找汉族人群中后纵韧带骨化(OPLL)患者4个候选基因的多态性位点, 对与疾病相关的位点进行研究。**方法** 应用 Sequenom 系统对180例汉族人群4个候选基因(*COL6A1*、*BMP-2*、*VDR* 和 *Runx2*)共19个SNP进行分析, 病例组78例, 对照组102例, 对比两组中每个SNP的基因型分布频率与等位基因分布频率, 分析研究与OPLL发病相关的多态性位点及其相互关系。**结果** 在筛选的4个候选基因共19个SNP位点中, 等位基因分析未发现与疾病相关的位点。基因分型差异位点发现 *Runx2* 基因的2个位点(rs1321075 与 rs12333172)在疾病组与对照组差异有统计学意义($P=0.0339$, $P=0.0428$), 且两个位点均位于6号染色体上, 连锁不平衡分析(LD分析)发现位点与疾病之间存在连锁不平衡; 6号染色体上的11个SNP位点形成了2个分别长达51 kb和21 kb的单倍体域, 其中由rs967588、rs16873379、rs3749863、rs6908650形成的单倍体域CTCG在病例组与对照组发生比值为1.75, 风险比0.81, 表明有可能增加疾病发生比率($P=0.259$)。 *COL6A1*、*BMP-2*、*VDR* 基因未发现与疾病显著相关的多态性位点。**结论** 本研究首次报道汉族人群中OPLL患者 *Runx2* 基因中SNP的变化可能导致OPLL, 而 *COL6A1*、*BMP-2*、*VDR* 基因中的多态性位点未显现出与疾病显著相关。

[关键词] 单核苷酸多态性; 后纵韧带骨化; *Runx2*

[中图分类号] R 686.5

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2015)01-0006-08

Single nucleotide polymorphism analysis on ossification of posterior longitudinal ligament in Han population in China

LIU Yang, SHI Chang-gui, SHI Guo-dong, WANG Ce, CHEN Yuan-yuan, CAO Peng, CHEN De-yu, YUAN Wen*

Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the polymorphic loci of four candidate genes of ossification of posterior longitudinal ligament (OPLL) patients in the Han population in China, so as to study the loci associated with diseases. **Methods** The Sequenom system was adopted to analyze the 19 SNP of the four candidate genes (namely, *COL6A1*, *BMP-2*, *VDR* and *Runx2*) in 180 Han individuals, with 78 in the pathological group and 102 in the control group. The genotype distributions and allele frequencies of each SNP were compared between the two groups, and the polymorphic loci related to OPLL and their relationship were analyzed. **Results** Allelic analysis found no disease related locus in the 19 SNP loci of the four candidate genes. However, the genotyping analysis found that rs1321075 and rs12333172 of *Runx2* were significantly different between the two groups ($P=0.0339$, $P=0.0428$), both loci were on the No. 6 chromosome and Linkage Disequilibrium (LD) analysis showed linkage disequilibrium between them. The 11 SNP loci on the No. 6 chromosome formed two blocks, with the range being 51 kb and 21 kb, respectively. One of the two blocks was a haploid (CTCG) made up of rs967588, rs16873379, rs3749863 and rs6908650, with a patient/control ratio of 1.75 and a risk rate of 0.81, indicating the possibility of increased incidence rate, but with no significant difference ($P=0.259$). No polymorphic loci were found associated with diseases for *COL6A1*, *BMP-2* and *VDR* genes. **Conclusion** This is the first report that SNP variation of *Runx2* gene may be a reason for OPLL in the Han population in China, and there was no notable connection between the polymorphic loci of *COLA1*, *BMP-2* and *VDR* and OPLL.

[Key words] single nucleotide polymorphism; ossification of posterior longitudinal ligament; *Runx2*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(1): 6-13]

[收稿日期] 2014-06-12 **[接受日期]** 2014-10-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81371916). Supported by National Natural Science Foundation of China(81371916).

[作者简介] 刘 洋, 副主任医师, E-mail: liuyangspine@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886999, E-mail: smmuyuanwen@163.com

后纵韧带骨化症(ossification of posterior longitudinal ligament, OPLL)是由于颈椎或胸腰椎韧带发生异位骨化从而压迫脊髓和神经根,产生肢体感觉和运动障碍及内脏植物神经功能紊乱的疾病,多见于亚洲人群^[1-2],发病率高达2%~4%^[3]。韧带骨化进展缓慢,临床表现为从没有症状的单纯影像学改变到严重的脊髓压迫导致不可逆的四肢瘫,患者症状的严重程度与骨化物的大小及范围密切相关。由于易与普通颈椎病相混淆及其本身外科治疗的复杂程度,韧带骨化仍是临床上难以处理的问题。

目前研究表明韧带骨化是一种与遗传及环境等多种因素相关的疾病,其中遗传背景被认为是最主要的致病因素。近年来单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)研究逐渐成为探索OPLL相关易感基因位点的主要方法。在日本人群中, COL6A1 基因已被证实是OPLL发生发展的易感基因^[4-5],并且 BMP-2、VDR、Runx2 等基因也相继被报道与韧带骨化相关^[6-8]。由于在不同的种族人群中候选基因及其多态性位点可能存在不同,本研究对汉族人群中上述4个候选基因的19个SNP位点进行分析,旨在寻找汉族人群中OPLL患者的易感基因及与疾病相关的SNP位点。

1 资料和方法

1.1 病例选择 本研究由第二军医大学伦理委员会审查批准。选取2011年1月至2012年12月间我科收治的脊柱疾患患者,所有病例入院时均签署知情同意书。实验组病例为同一组医生通过临床症状及影像学检查诊断为OPLL的患者,并通过CT及MRI判断脊髓受压、椎管形态、骨化物大小及其范围。对照组为同期入院的非OPLL患者。两组患者中,非汉族人群、强直性脊柱炎、弥漫性特发性骨肥大(diffuse idiopathic skeletal hyperostosis, DISH)、脊柱感染及肿瘤、长期服用影响骨代谢药物的患者排除在外。本研究共纳入180例患者,实验组78例,其中男性60例、女性18例,平均年龄(53.31±9.73)岁;对照组102例,男性75例、女性27例,平均年龄(53.79±10.06)岁。

1.2 基因组DNA准备 获取所有患者的外周血,EDTA抗凝保存。通过标准程序应用TIANamp Blood DNA试剂盒(天根科技生化有限公司,

DP318-03)抽提血液标本中的白细胞DNA, -80℃保存以待后续分析。

1.3 基因组分型 使用基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱技术对SNP分型进行分析,参照MassArray系统(Sequenom, San Diego, USA)标准操作程序。根据前人的研究结果,选择COL6A1、BMP-2、VDR、Runx2基因为SNP分型的研究对象。先对含有目的SNP位点的基因片段进行多重PCR扩增,多重PCR反应体系使用Assay Design software 3.1(Sequenom Inc., San Diego, CA)设计。反应体系包含10 ng/μL基因组DNA, 12.5 nmol/L引物, 25 mmol/L MgCl₂, 25 mmol/L dNTPs和0.15 U HotStar Taq DNA polymerase(Qiagen, Hilden, Germany),反应体系共10 μL。PCR反应条件:94℃ 15 min,然后扩增45个循环(94℃变性20 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸1 min),最后72℃延伸3 min。扩增产物以北极虾碱性磷酸酶(SAP)处理(85℃ 5 min, 37℃ 40 min),将残余核苷酸去磷酸化,即去除反应体系中剩余的dNTPs。在单碱基延伸反应中,将PCR反应产物与0.625~1.25 μmol/L的hME引物组合混合(延伸引物序列及未延伸和延伸后引物的相对分子质量见表1),反应体系含有1×iPLEX terminator、1×iPLEX enzyme和1×iPLEX缓冲液。

1.4 统计学处理 用Hardy-Weinberg(HW)平衡定律描述人群中基因位点稳定情况^[9],各等位基因的分布频率和等位基因的基因分型分布频率通过直接计数方法计算。等位基因位点与疾病之间的关系通过 χ^2 检验计算获得(以OR及其95%可信区间描述)。用Haploview软件(Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA)计算基因位点之间的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD),以LD系数(D')和 r^2 描述位点与疾病的关系。采取可信区间方法设定单体型域(haplotype block),每一个对比组定义为“强相关”、“不相关”、“再结合”。如果D'的95%可信值上界大于0.98且下界大于0.7,则认为这对SNP为“强连锁不平衡”;反之,如果D'的95%可信值上界小于0.9,则认为SNP为“强复合”(参考Gabriel等^[10]的方法进行计算)。若95%的对比组为“强连锁不平衡”,则建立一个域,在每一个域中,单体型发生的频率用EM方法估计。对于

单元型在两个域中的频率均大于1%的病例,将利用 χ^2 检验及风险估计预测单体型与疾病的关系。检验水准(α)为0.05。统计分析利用 Haploview、SHEsis

(上海 Bio-X 生命科学研究中心)和 Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA)完成。

表 1 延伸引物序列及未延伸和延伸后引物的相对分子质量

Tab 1 Sequence of extented primers, molecular weight of non-extended primers and extended primers

Gene	SNP ID	Forward	Molecular weight of non-extended primers	Variation sites	Molecular weight of extended primers
COL6A1	rs9978314	CTGGGTGCTTGCACAGT	5 217.4	C/T	5 464.6/5 544.5
	rs2276255	cttCGTGAGGGGAGCAGGCT	6 214	G/A	6 461.2/6541.1
BMP-2	rs1005464	gaatGTCAGAGAAAGATCTTCGTATC	8 018.2	A/G	8 289.4/8 305.4
Runx2	rs3749863	CCTCTCGACTCCTCCCT	4 993.2	C/A	5 280.5/5 320.3
	rs6908650	TTCAGGCCGTCTTCCTT	5 103.3	A/G	5 374.5/5 390.5
	rs7771889	CTTCTTTGGGCTCAGCAG	5 770.7	G/C	6 017.9/6 058.0
	rs16873379	TGCTTCCATTGTGGTTTGGC	6 121	T/C	6 392.2/6 408.2
	rs16873437	GGCTTCCCTTCTCATGATTCT	6 314.1	G/T	6 601.3/6 641.2
	rs2677108	ATTCTTCTGGTTAGTCTTAACG	6 706.4	C/T	6 953.6/7 033.5
	rs1321075	ggtggGAGGCTCCAGATCCTAAA	7 113.6	C/A	7 360.8/7 384.8
	rs967588	TTAGCATAATCTCATGCATACTTG	7 301.8	T/C	7 573.0/7 589.0
	rs1406846	gaTGACATGTTGTTTAAAATAAAA	7 438.9	T/A	7 710.1/7 766.0
	rs9296459	gTTTGCTATTTATTGGAAATTTTTC	7 658	A/G	7 929.2/7 945.2
VDR	rs12333172	ttccCTGCAGTAATAATTACAATTCC	7 864.1	T/C	8 135.3/8 151.4
	rs2189480	GTGGGGTCAGTGTTTCAGG	5 626.6	C/A	5 913.9/5 953.7
	rs11168287	TTGTTCTAATCTCTCTCTAACA	6 899.5	A/G	7 170.7/7 186.7
	rs3847987	ccggTGGGGTGGGAGCTGTGGG	7 248.7	C/A	7 495.9/7 519.9
	rs12721370	ctgtGTGATGAGGGTTGTACAGCAG	8 082.2	G/T	8 369.5/8 409.3
	rs11574079	tcttGAAGCACCATCTCTTGCAGTAGC	8 210.3	A/G	8 481.5/8 497.6

2 结果

筛选的4个候选基因共19个SNP位点全部满足HW平衡($P > 0.001$),次要等位基因频率(MAF) > 0.001 。等位基因分析未发现与疾病相关的位点,但等位基因的基因分型分析发现rs1321075与rs12333172在实验组与对照组之间差异有统计

学意义($P = 0.0339, P = 0.0428$),两个基因位点均分布在6号染色体Runx2基因中(图1)。COL6A1、BMP-2、VDR基因未发现与疾病发生显著相关的多态性位点(表2)。

位于12号染色体上的5个SNP位点之间的D'值范围在0.043~1之间, r^2 值为0~0.185,这5个SNP位点并不能形成一个域(表3)。

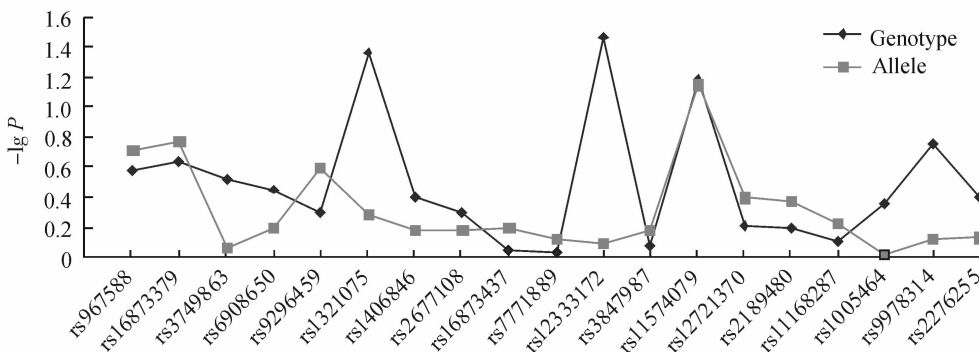


图 1 19个SNP位点统计分布图

Fig 1 Statistical distribution of 19 SNP loci

Two SNP loci on chromosome 6 (rs1321075 and rs12333172) showed disease correlation in genotyping. No disease correlations were identified in allelic genes

表2 位点与疾病相关性

Tab 2 Correlation of locus and disease

Gene	SNP ID	Genotype and allele	Experimental N=82	Control N=118	χ^2	P	OR(95%CI)
<i>BMP2</i>	rs1005464	AA	8	17	1.66	0.435 4	
		AG	46	57			
		GG	27	44			
<i>Runx2</i>	rs12333172	A : G	62 : 100	91 : 145	0.003	0.953 8	0.99(0.65,1.49)
		CC	53	85	6.77	0.033 9	
		CT	28	25			
	TT	1	8				
	rs1321075	C : T	134 : 30	195 : 41	0.06	0.812 8	0.94(0.55,1.58)
		AA	5	2	6.31	0.042 8	
		AC	19	43			
	CC	50	60				
	rs1406846	A : C	29 : 119	47 : 163	0.4	0.525 5	0.84(0.5,1.42)
		AA	14	17	1.85	0.396	
		AT	40	69			
	TT	28	32				
	rs16873379	A : T	68 : 96	103 : 133	0.188	0.664 6	0.91(0.61,1.37)
		CC	5	8	2.92	0.232 8	
		CT	33	61			
TT	44	49					
rs16873437	C : T	43 : 121	77 : 159	1.89	0.169	0.73(0.47,1.14)	
	GG	6	7	0.23	0.890 6		
	GT	31	43				
TT	45	68					
rs2677108	G : T	43 : 121	57 : 179	0.22	0.638 7	1.12(0.71,1.76)	
	CC	10	12	1.33	0.515 5		
	CT	37	63				
TT	35	43					
rs3749863	C : T	57 : 107	87 : 149	0.19	0.665 7	0.91(0.60,1.38)	
	AA	28	33	2.36	0.306 8		
	AC	42	73				
CC	12	12					
rs6908650	A : C	98 : 66	139 : 97	0.03	0.863 7	1.04(0.69,1.55)	
	AA	13	22	2.1	0.350 6		
	AG	46	54				
GG	23	42					
rs7771889	A : G	72 : 92	98 : 138	0.22	0.636 2	1.10(0.73,1.64)	
	CC	39	59	0.12	0.944		
	CG	35	48				
GG	8	11					
rs9296459	C : G	113 : 51	166 : 70	0.09	0.758 4	0.93(0.61,1.44)	
	AA	1	1	1.34	0.513		
	AG	15	15				
GG	64	100					
rs967588	A : G	17 : 143	17 : 215	1.3	0.254 2	1.50(0.74,3.04)	
	CC	43	49	2.64	0.267 8		
	CG	33	61				
GG	5	8					
VDR	rs11168287	C : G	119 : 43	159 : 77	1.69	0.193 9	1.34(0.86,2.09)
		AA	13	19	0.5	0.779 6	
		AG	30	48			
GG	39	50					
rs11574079	A : G	56 : 108	86 : 148	0.29	0.593 3	0.89(0.59,1.36)	
	AA	0	0	3.37	0.066 3		
	AG	9	5				
GG	73	113					

续表

Gene	SNP ID	Genotype and allele	Experimental N=82	Control N=118	χ^2	P	OR(95%CI)
COL6A1	rs2189480	A : G	9 : 155	5 : 231	3.25	0.071 4	2.68(0.88,8.15)
		AA	39	64	0.89	0.641 7	
		AC	34	42			
		CC	9	12			
	rs12721370	A : C	112 : 52	170 : 66	0.65	0.419 7	0.84(0.54,1.29)
		GG	45	73	0.94	0.623 8	
		GT	33	40			
		TT	3	4			
	rs3847987	G : T	123 : 39	186 : 48	0.71	0.4	0.81(0.50,1.32)
		AA	10	17	0.36	0.834 5	
		AC	44	58			
		CC	20	26			
rs9978314	A : C	64 : 84	92 : 110	0.18	0.668 7	0.91(0.59,1.4)	
	CC	58	81	3.46	0.177		
	CT	19	35				
	TT	5	2				
	rs2276255	C : T	135 : 29	197 : 39	0.09	0.761 8	0.92(0.54,1.56)
		AA	66	90	1.8	0.405 8	
		AG	13	26			
		GG	3	2			
		A : G	145 : 19	206 : 30	0.11	0.735 4	1.11(0.6,2.05)

表 3 12号染色体各位点的相互 LD 分析

Tab 3 Mutual linkage disequilibrium (LD) of loci on chromosome 12

SNP ID	rs3847987	rs11574079	rs12721370	rs2189480	rs11168287
rs3847987	-	$r^2=0.024$	$r^2=0.185$	$r^2=0.034$	$r^2=0.005$
rs11574079	D'=1	-	$r^2=0.01$	$r^2=0.087$	$r^2=0.004$
rs12721370	D'=0.725	D'=1	-	$r^2=0.056$	$r^2=0.003$
rs2189480	D'=0.316	D'=1	D'=0.69	-	$r^2=0$
rs11168287	D'=0.104	D'=0.424	D'=0.078	D'=0.043	-

位于 21 号染色体上的 2 个 SNP 位点之间 $D'=0.92, r^2=0.57$, 21 号染色体上未发现单体型域。6 号染色体上的 11 个 SNP 位点之间形成了 2 个单体型域(图 2), 单体型域 1 由 rs967588、rs16873379、rs3749863、rs6908650 组成, 范围达 51 kb, 4 个位点之间的 D' 值为 $0.964\sim 1, r^2$ 值为 $0.299\sim 1$ (表 4), 4 个位点形成了 4 个频率 >0.01 的单体型, 单体型 CTGG 分别在 14% 的实验组患者和 8% 的对照组患者中出现, 实验组/对照组比值为 1.75 (RR 值 $0.807\ 35, P=0.259$), 表明该单体型有可能增加疾病发生比率(表 5); 单体型域 2 由 rs1321075、rs1406846、rs2677108 组成, 范围 11 kb, 3 个位点之间的 D' 值为 $0.951\sim 1, r^2$ 值为 $0.348\sim 0.753$ (表 6), 3 个位点形成了 4 个频率 >0.01 的单体型, 从每个单型型的 RR 值可以得出它们与疾病无关。

3 讨论

OPLL 已被许多研究证明为多基因、多因素导致的遗传学疾病, 近年来对其遗传学的研究将其致病病归结于候选基因 SNP 位点的变化增加了个体在特定环境下的患病概率。近 10 年来, 不同的候选基

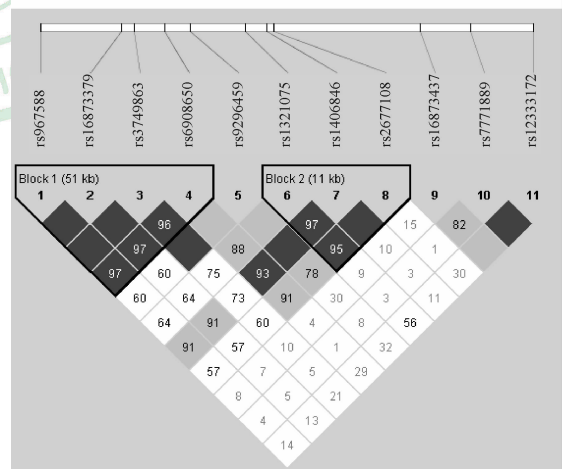


图 2 6号染色体上 11 个 SNP 位点 LD 分析

Fig 2 Linkage disequilibrium (LD) of 11 SNP loci on chromosome 6

The values in box stand for D' of loci in the upper left and right. The blank in box means $D'=1$. SNP locus would be excluded before LD analysis when MAF is less than 0.05 and HW is less than 0.001. The dark squares represent the linkage disequilibrium between the two loci; the darker the color, the greater the linkage disequilibrium. The white squares indicate no linkage disequilibrium between two loci. Bold wireframe is the haplotype block

表 4 6 号染色体上单体型域 1 中各位点的相互 LD 分析

Tab 4 Mutual linkage disequilibrium(LD) of loci on haplotype block 1 of chromosome 6

SNP ID	rs967588	rs16873379	rs3749863	rs6908650
rs967588	-	$r^2=1$	$r^2=0.629$	$r^2=0.304$
rs16873379	$D'=1$	-	$r^2=0.623$	$r^2=0.299$
rs3749863	$D'=1$	$D'=1$	-	$r^2=0.472$
rs6908650	$D'=0.971$	$D'=0.971$	$D'=0.964$	-

表 5 6 号染色体单体型域 1 在病例组和对对照组的风险分析

Tab 5 Linkage disequilibrium (LD) analysis, risk and significance analysis of individual locus on haplotype block 1 of chromosome 6

rs967588	rs16873379	rs3749863	rs6908650	Experimental	Control	RR	χ^2	P
C	T	A	A	0.432	0.41	0.075 41	0.027	0.869
T	C	C	G	0.255	0.326	-0.354 37	0.853	0.356
C	T	A	G	0.166	0.179	-0.108 77	0.002	0.961
C	T	C	G	0.14	0.08	0.807 35	1.274	0.259

表 6 6 号染色体单体型域 2 中各位点的相互 LD 分析

Tab 6 Mutual linkage disequilibrium(LD) of loci on block 2 of chromosome 6

SNP ID	rs1321075	rs1406846	rs2677108
rs1321075	-	$r^2=0.348$	$r^2=0.444$
rs1406846	$D'=0.97$	-	$r^2=0.753$
rs2677108	$D'=0.951$	$D'=1$	-

单倍型频率研究发现,患者兄弟姐妹中有全部 HLA 单倍型的 56% 表现出 OPLL,而仅有单个 HLA 抗原的并未表现出 OPLL。Matsunaga 等^[13] 研究发现, OPLL 患者的家庭成员中,若 HLA 单倍型为双线性, OPLL 发生率为 53%;若为单线性单倍体,发生 OPLL 的比例为 24%。上述研究提示导致 OPLL 的异常基因可能存在于 6 号染色体上 HLA 基因附近。

近年来 OPLL 在分子遗传学方面的研究进展深入到其候选基因的筛选及 SNP 位点的确定。双胞胎 6 号染色体 HLA 区域的配对研究确定了编码胶原 XI α 的基因 COL11A2^[14] 与韧带骨化发病相关。直立鼠的 OPLL 动物模型研究发现 NPPS 基因与疾病发生及其严重程度相关^[15]。Kawaguchi 等^[16] 研究发现 TGF- β 1 基因与骨化形成的范围有关。Tanaka 等^[4] 对日本人群 OPLL 患者的基因组应用 GENEHUNTER-PLUS 进行多点连锁分析,确认了 21 号染色体上的 7 个基因与疾病相关,进一步 LD 分析发现 COL6A1 基因上的 SNP 与 OPLL 密切相关,单点(single-point) P 值为 0.000 000 7。Wang 等^[6] 研究发现 BMP-2 基因中的 Ser37Ala 和

因先后被发现与 OPLL 的发病相关,多数研究来自日本,新的基因、新的多态性位点被一一发现。

Terayama^[11] 通过遗传学研究调查了 347 个 OPLL 患者家庭,发现在 1 030 个家庭成员中,单纯影像学表现有 OPLL 的患者父母达 26.5%,兄弟姐妹中发现 OPLL 的占 28.89%。Sakou 等^[12] 于 1991 年对 33 个 OPLL 家庭进行人类白细胞抗原(HLA)

Ser87Ser SNP 与中国人 OPLL 遗传易感及严重程度相关。

Kamiya 等^[17] 2001 年对日本 319 例非相关个体进行 TGF- β 的基因型分型研究,其中 OPLL 患者 46 例,对照组 273 例。结果发现, TGF- β 基因的 T869 位点上 C 等位基因是 OPLL 遗传易感性的危险因素,多元回归分析显示 OPLL 患者该位点是 C 等位基因的比例远远高于对照组。

Tsukahara 等^[5] 2005 年对候选基因 COL6A1 做了进一步研究,他们采用直接测序的方法对 COL6A1 基因上的 7 个 SNP 进行了基因分型。OPLL 患者的等位基因频率与 97 例日本 DISH 患者及 298 例对照组人群进行了比较,同时再与 96 例捷克 DISH 患者及 96 名捷克对照人群比较,结果发现, COL6A1 的内含子 32(-29) SNP 与日本 DISH 患者显著相关,而与捷克 DISH 患者没有明显关系,从而提示该基因与日本人群的 OPLL 和 DISH 发病相关,是导致脊柱韧带异位骨化的重要基因。

Horikoshi 等^[18] 2006 年对日本 OPLL 患者进行了大样本病例对照研究,针对文献已报道过的 35 个候选基因共 109 个 SNP 位点进行了基因分型,结果发现, TGF2 基因上的 SNP 的一个内含子与疾病密切相关,而以前报道的相关基因 COL11A2、NPPS 及 TGF- β 1 基因都未能重复,另外,进一步基于性别、年龄与骨化椎体的分层研究亦未显示出有明显关联。

国内学者 Kong 等^[19] 2007 年针对中国汉族人

群 OPLL 与 OLF 患者的 COL6A1 SNP 研究发现,在该基因的 4 个已知 SNP 位点中,启动子(-572T)的等位基因频率在 OPLL 组及 OLF 组要明显高于对照组,在启动子(-572)、内含子 32(-29)及内含子 33(+20)上的总单体型频率,OPLL 与 OLF 组均与对照组显著不同,提示 COL6A1 基因可能是中国汉族人群脊柱韧带钙化致病的易感基因。

Kishiya 等^[7]2008 年报道,他们通过 DNA 微阵列(microarray)检测 *Runx2* 基因表达,结果发现韧带骨化症患者的 *Runx2* 基因表达增强。*Runx* 蛋白是一组转录因子蛋白家族,研究表明 *Runx2* 与骨分化和代谢过程中起重要作用的细胞及细胞因子关系密切,如成骨细胞、破骨细胞、骨基质蛋白、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)、TGF- β 、血管内皮生长因子(VEGF)等^[8,20-21]。体内外实验表明 *Runx2* 是骨髓间充质干细胞(MSCs)成骨分化和骨发育所必需的关键因子,对 MSCs 具有明显的促成骨效应^[20-21]。有实验证明 *Runx2* 表达下调会抑制成骨细胞的分化及骨质的矿化^[22-23]。近年,Iwasaki 等^[24]通过突变 OPLL 小鼠模型的 *Runx2* 的一个等位基因使 *Runx2* 的表达发生明显下调后,发现模型小鼠后纵韧带的骨化形成范围得到显著改善。本研究中,6 号染色体 *Runx2* 基因中两个位点 rs12333172、rs1321075 基因分型与疾病有显著相关;由 rs967588、rs16873379、rs3749863、rs6908650 形成的单倍体 CTCG 实验组与对照组比率为 1.75,实验结果与 Kishiya 等^[7]结果有一定的关联性,提示 *Runx2* 基因与 OPLL 发病有密切关系。

本研究通过大样本 OPLL SNP 分析,首次报道汉族人群中 OPLL 患者 *Runx2* 基因中 SNP 的变化导致 OPLL 发病可能性增加。6 号染色体 *Runx2* 基因中两个位点 rs12333172、rs1321075 基因分型与疾病相关。而以往文献报道的 COL6A1、BMP-2、VDR 基因中的多态性位点未显现出与疾病显著相关。今后仍需进行更大范围的基因分型及更多样本的深入研究,以明确 OPLL 患者 *Runx2* 基因的 SNP 位点变化规律,并通过功能学研究加以验证。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Inamasu J, Guiot B H, Sachs D C. Ossification of the

posterior longitudinal ligament: an update on its biology, epidemiology, and natural history[J]. *Neurosurgery*, 2006, 58:1027-1039.

- [2] Kobashi G, Washio M, Okamoto K, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, et al. High body mass index after age 20 and diabetes mellitus are independent risk factors for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine in Japanese subjects: a case-control study in multiple hospitals[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29:1006-1010.
- [3] Matsunaga S, Sakou T. Ossification of the posterior longitudinal ligament[M]. Berlin: Springer, 1997:3-7.
- [4] Tanaka T, Ikari K, Furushima K, Okada A, Tanaka H, Furukawa K, et al. Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses identify COL6A1, on chromosome 21, as the locus for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 73:812-822.
- [5] Tsukahara S, Miyazawa N, Akagawa H, Forejtova S, Pavelka K, Tanaka T, et al. COL6A1, the candidate gene for ossification of the posterior longitudinal ligament, is associated with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in Japanese [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30:2321-2324.
- [6] Wang H, Liu D, Yang Z, Tian B, Li J, Meng X, et al. Association of bone morphogenetic protein-2 gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity in Chinese patients[J]. *Eur Spine J*, 2008, 17: 956-964.
- [7] Kishiya M, Sawada T, Kanemaru K, Kudo H, Numasawa T, Yokoyama T, et al. A functional RNAi screen for *Runx2*-regulated genes associated with ectopic bone formation in human spinal ligaments[J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 106:404-414.
- [8] Stein G S, Lian J B, van Wijnen A J, Stein J L, Montecino M, Javed A, et al. *Runx2* control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 4315-4329.
- [9] Salanti G, Amountza G, Ntzani E E, Ioannidis J P. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power[J]. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13:840-848.
- [10] Gabriel S B, Schaffner S F, Nguyen H, Moore J M,

- Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome[J]. *Science*, 2002, 296: 2225-2229.
- [11] Terayama K. Genetic studies on ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1989, 14:1184-1191.
- [12] Sakou T, Taketomi E, Matsunaga S, Yamaguchi M, Sonoda S, Yashiki S. Genetic study of ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine with human leukocyte antigen haplotype[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991, 16:1249-1252.
- [13] Matsunaga S, Yamaguchi M, Hayashi K, Sakou T. Genetic analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1999, 24: 937-939.
- [14] Koga H, Sakou T, Taketomi E, Hayashi K, Numasawa T, Harata S, et al. Genetic mapping of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62:1460-1467.
- [15] Koshizuka Y, Kawaguchi H, Ogata N, Ikeda T, Mabuchi A, Seichi A, et al. Nucleotide pyrophosphatase gene polymorphism associated with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17:138-144.
- [16] Kawaguchi Y, Furushima K, Sugimori K, Inoue I, Kimura T. Association between polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with the radiologic characteristic and ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003, 28:1424-1426.
- [17] Kamiya M, Harada A, Mizuno M, Iwata H, Yamada Y. Association between a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene and genetic susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament in Japanese patients[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001, 26: 1264-1267.
- [18] Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, et al. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. *Hum Genet*, 2006, 119:611-616.
- [19] Kong Q, Ma X, Li F, Guo Z, Qi Q, Li W, et al. COL6A1 polymorphisms associated with ossification of the ligamentum flavum and ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32:2834-2838.
- [20] Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts[J]. *J Endod*, 2004, 30: 205-208.
- [21] Zhang X, Aubin J E, Inman R D. Molecular and cellular biology of new bone formation: insights into the ankylosis of ankylosing spondylitis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15: 387-393.
- [22] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. *Nature*, 2003, 425: 577-584.
- [23] Xue T, Mao Z, Lin L, Hou Y, Wei X, Fu X, et al. Non-virus-mediated transfer of siRNAs against Runx2 and Smad4 inhibit heterotopic ossification in rats[J]. *Gene Ther*, 2010, 17: 370-379.
- [24] Iwasaki M, Piao J, Kimura A, Sato S, Inose H, Ochi H, et al. Runx2 haploinsufficiency ameliorates the development of ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e43372.

[本文编辑] 周燕娟