

寻常型银屑病患者 17 号染色体上两个等位基因频率的检测

王红 刘维达 李辉 金力

【摘要】 目的 初步探讨 2 个微卫星标记 D17S784 及 D17S928 与寻常型银屑病的相关性。方法 用多重 PCR 和微卫星荧光标记 - 半自动基因扫描法以及 Genotype™ 软件进行基因分型。结果 银屑病病患者与 D17S784、D17S928 具有显著相关性 ($P < 0.001$)，这两个微卫星位点的等位基因片段频率分布在银屑病组与健康对照组中差异具有显著性。结论 D17S784 与 D17S928 这 2 个连续标记可能是寻常型银屑病易感性的候选区域之一。

【关键词】 银屑病; 染色体, 人, 17 对

Identification of Two Microsatellite DNA Markers (Shot Tandem Repeats) on Chromosome 17 in Patients with Psoriasis Vulgaris WANG Hong, LIU Weida, LI Hui, et al. Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China

【Abstract】 Objective To investigate the association of two microsatellite markers, D17S784 and D17S928, with psoriasis vulgaris. **Methods** Fluorescent multiplex PCR, genescanning and Genotype™ software were employed to amplify the microsatellite DNA markers and conduct genotyping. **Results** The significant association was found between D17S784, D17S928 and psoriasis vulgaris ($P < 0.001$). The frequencies of their gene fragments were significantly different between patients and healthy controls. **Conclusion** D17S784 and D17S928 may be the very attractive candidate gene regions for further studies in psoriasis patients.

【Key words】 Psoriasis; Chromosomes, human, pair 17

在银屑病易感性基因的研究中, 通过全基因组扫描和定位克隆技术, 已经提出了几个可能的候选基因和候选区域。Nair 等^[1] 用基因组扫描技术揭示了在 HLA 上存在与银屑病连锁的区域。近期研究较多的几个候选区域集中在 17、6、4、1、3 号染色体上, 目前 D17S784、D4S1535 已被收入 OMIM 数据库, 分别被称为 PSORS2 和 PSORS3 基因。1994 年 Tomfohrde 等研究家系材料发现 D17S784 与银屑病的相关性极大 ($Lod = 5.33$) , 而以后其他各国的研究人员对各自的材料分析却未得到有意义的结果, 其中对 17q 远端的两个微卫星标记 D17S784 与 D17S928 的研究结果也不一致, 说明该病具有遗传异质性^[2-6]。我们选取 D17S784 和 D17S928 两个相近的微卫星标记, 初步分析了它们与寻常型银屑病的相关性, 以及携带此两位点某些等位基因片段的相对患病危险率。

材料与方法

一、研究对象

寻常型银屑病患者 191 例, 均为到本院就诊的南

京及其周边地区无血缘关系的门诊患者。其中男 121 例, 女 70 例, 年龄 8 ~ 72 岁, 其中 I 型 (< 40 岁发病者) 167 例, II 型 (> 40 岁发病者) 24 例。对照组为相同地区随机健康人群, 样本为 192 例。

二、实验方法

1. 基因组 DNA 的提取: 常规酚/氯仿抽提, 参见《分子克隆实验指南》^[7]。

2. 聚合酶链反应 (PCR) 方法: (1) PCR 引物: D17S784 与 D17S928 位点引物由美国德州大学人类遗传学中心金力教授提供。序列为: D17S784: 5' GAGTCTCCTAAATGCTGGGG 和 5' AGCTCCTGCACAG TTCTTAAAT, 其退火温度分别为 62 °C 和 64 °C, 扩增产物大小为 226 ~ 238 bp; D17S928 5' TAAAACGGCTA CAACACATACA 和 5' ATTTCCCCTACTGGCTG, 其退火温度分别为 60 °C 和 54 °C, 扩增产物大小为 135 ~ 165 bp。引物序列及其片段大小、PCR 参数等从 GENE BANK 中获得。(2) PCR 反应条件: 2 对引物在 5 μL 的总反应体系中共同扩增, 10 × PCR 缓冲液 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 0.6 μL, 2 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 2 U/μL Taq 聚合酶 0.125 μL, Taq Start™ 抗体 0.05 μL, 8 μmol/L 引物 0.025 μL, 50 ng/μL 基因组

DNA 1.0 μL 。其中 Taq Start™ 抗体先与 Taq 聚合酶在室温下孵育 15 min, PCR 反应体系在 Perkin Elmer 9600 热循环仪上进行 PCR。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 起始 14 个循环中退火温度为 63 ~ 56 $^{\circ}\text{C}$, 每个循环下降 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 持续时间 1 min。在后 20 个循环中, 退火温度固定为 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

3. 微卫星荧光标记 PCR 产物在 ABI373A 测序仪上进行半自动基因组扫描: ① 0.5 μL PCR 产物与 0.2 μL ABI GS-350 TAMRA 分子量标准和 1.8 μL 甲酰胺上样液混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性 2 min, 冰中骤冷, 在 ABI373A 测序仪上 6% 聚丙烯酰胺和 7 mol/L 尿素中电泳 3 ~ 4 h。② 应用 GENESCAN™672 软件进行数据收集、泳道线校正、迁移片段大小测量和校正内在分子量标准, 用 Genotype™ 软件进行基因分型。

4. 统计学方法: 计算机软件进行病例与正常人对照的 χ^2 检验。

结 果

1. D17S784 位点在寻常型银屑病患者组与健康人组中等位基因的频率分布差异具有显著性 ($\chi^2 = 181.60, P < 0.01$)。银屑病患者组中 D17S784 的 228 bp、230 bp、232 bp 等位基因频率分别为 27.5%、18.3%、34.7%, 与对照组比较, 差异也具有显著性。各等位基因的频率分布及 OR 值见表 1。

2. D17S928 位点在寻常型银屑病患者组与健康人组中等位基因的频率分布差异具有显著性 ($\chi^2 = 135.8, P < 0.01$)。各等位基因的频率分布及 OR 值见表 2。

讨 论

本研究的初步结果显示 D17S784 与 D17S928 两位点基因型频率的分布在患者组与对照组中差异具有显著性, 由假阳性引起的可能性不大, 提示 D17S784 与 D17S928 或其所在的附近区域可能与银屑病的易

表 2 D17S928 等位基因片段在银屑病患者与健康对照人群中的分布及比较

等位基因片段 (bp)	银屑病患者组 (n=189) 染色体条数 (%)	对照组 (n=185) 染色体条数 (%)	OR 值 (95% 可信区间)	P 值
135	18(4.8)	14(3.8)	1.26(0.59~2.73)	> 0.05
139	4(1.1)	5(1.4)	0.78(0.17~3.35)	> 0.05
143	33(8.7)	11(2.9)	3.10(1.48~6.64)	< 0.01
145	23(6.1)	15(4.1)	1.52(0.75~3.12)	> 0.05
147	121(32)	54(14.7)	2.74(1.88~3.98)	< 0.01
149	20(5.3)	35(9.5)	0.53(0.29~0.97)	< 0.05
151	98(25.9)	36(9.8)	3.23(2.09~4.99)	< 0.01
153	36(9.5)	28(7.6)	1.28(0.74~2.21)	> 0.05
155	7(1.9)	14(3.8)	0.48(0.17~1.28)	> 0.05
157	2(0.5)	25(6.8)	0.07(0.01~0.32)	< 0.01
159	2(0.5)	110(29.9)	0.01(0.00~0.05)	< 0.01
161	5(1.3)	6(1.6)	0.81(0.21~3.02)	> 0.05
163	1(0.2)	8(2.2)	0.12(0.01~0.94)	< 0.05
165	8(2.1)	7(1.9)	1.12(0.36~3.45)	> 0.05
合计	378	368		

注: 银屑病患者组和对照组分别有 2 例和 7 例实验失败, 未统计在内

感性有关。

在银屑病患者组, D17S784 的各等位基因中 228 bp、232 bp 的频率显著高于对照组, OR 值分别为 7.88 和 2.86; 而 230 bp 的等位基因频率明显低于对照组, 其 OR 值为 0.13。在 D17S928 各等位基因中 143 bp、147 bp、151 bp、153 bp 的频率相对于对照组明显增高, 差异具有显著性, OR 值均 > 1; 而 149 bp、157 bp、159 bp 则较对照组明显降低, OR 值均 < 1, $P < 0.05$ 。提示患者组中一些等位基因高频率的存在使患银屑病的风险高于正常人, 而某些等位基因低频率的存在也许意味着起一定的保护作用。

参 考 文 献

- Nair RP, Henseler T, Jenisch S, et al. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. Hum Mol Genet, 1997, 6: 1349-1356.
- Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, et al. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. Science, 1994, 264: 1141-1145.
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, et al. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. Eur J Hum Genet, 1999, 7: 783-790.
- Balendran N, Clough RL, Arguello JR, et al. Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. J Invest Dermatol, 1999, 113: 322-328.
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, et al. Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large Swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6p (HLA region), and to 17q, but not to 4q. Hum Hered, 1999, 49: 2-8.
- Capon F, Semprini S, Dallapiccola B, et al. Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. Am J Hum Genet, 1999, 65: 1798-1800.
- J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1992. 463-468.

表 1 D17S784 等位基因片段在银屑病患者与健康对照人群中的频率分布及比较

等位基因片段 (bp)	银屑病患者组 (n=180) 染色体条数 (%)	对照组 (n=185) 染色体条数 (%)	OR 值 (95% 可信区间)	P 值
228	99(27.5)	17(4.6)	7.88(4.48~14.03)	< 0.01
230	66(18.3)	236(63.8)	0.13(0.09~0.18)	< 0.01
232	125(34.7)	58(15.7)	2.86(1.98~4.14)	< 0.01
234	33(9.2)	35(9.5)	0.97(0.57~1.64)	> 0.05
236	31(8.6)	18(4.9)	1.84(0.98~3.50)	> 0.05
238	6(1.7)	6(1.6)	1.03(0.29~3.63)	> 0.05
合计	360	370		

注: 病例组和对照组分别有 11 例和 7 例样本失败, 未统计在内

(收稿日期 2000-04-28)