

## 6 号染色体上可能存在银屑病易感基因

王红 刘维达 李辉 赵敬军 陈炜 金力

**【摘要】** 目的 研究中国人寻常型银屑病与 6p21.3 区域内的六个微卫星标记和 4q 上的两个微卫星标记是否连锁,以寻找银屑病易感基因位点。方法 利用选取的微卫星位点作为标记,采用微卫星荧光标记-基因扫描及分型技术,选取 205 例经确诊并符合寻常型银屑病诊断标准的患者,对其中 14 个银屑病家系进行连锁分析。结果 在研究的家系中未发现 4q 上的微卫星标记与银屑病易感基因之间的连锁,而在染色体 6p21.3 区域存在着与之有连锁关系的微卫星标记位点(在 D6S273 位点上两点分析最大 LOD 值为 1.26)。结论 本研究表明在中国人银屑病患者中,染色体 6p21.3 区域可能存在银屑病易感基因。

**【关键词】** 银屑病;染色体,人,6 对;连锁(遗传学)

**Evidence for Psoriasis-susceptibility Locus in China: Locus on Chromosome 6p21.3** WANG Hong, LIU Weida, LI Hui, ZHAO Jingjun, CHEN Wei, JIN Li. Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China

**【Abstract】 Objective** To elucidate the genetic base of psoriasis for Chinese patients, the positional candidate loci (D6S273, D6S276, D6S422, D6S299, D6S291, D4S1535, D4S1652, D4S171) previously reported in the regions 6p21.3 and 4q were studied in some carefully examined psoriatic families in order to establish whether the eight reported microsatellites loci (STRs) underlay susceptibility to psoriasis in different populations. **Methods** Two hundred and five probands with psoriasis vulgaris were identified from outpatients attending the Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences. Genotypes were generated at 8 polymorphic loci on chromosome 6p21 and 4q in 14 pedigrees. The results were analyzed parametrically by linkage 5.0 software. **Results** There was evidence for linkage to D6S273 in 6p21.3 (the LOD score was 1.26). No evidence for linkage was obtained at other loci including three loci on chromosome 4q. **Conclusions** This study confirms the presence of a psoriasis-susceptibility locus on chromosome 6p previously studied. It is shown that there may be psoriasis susceptibility locus D6S273 on chromosome 6p21.3 in the Chinese population.

**【Key words】** Psoriasis; Chromosomes, human, pair 6; Linkage (Genetics)

群体流行病学调查和双生子研究早已揭示了银屑病发病中的遗传因素<sup>[1,2]</sup>。Brandrup 等在 1982 年对双生子研究发现同卵双生同患银屑病的发病率为 70%,而异卵双生同时患病的概率为 20%。由于该病的遗传模式并不明确,候选基因的研究大部分没有结果。但在过去的 6 年中,至少有 8 个独立的全基因组扫描研究寻找染色体上银屑病易感基因的位置,利用家系连锁分析方法发现银屑病易感基因分布在染色体 6p<sup>[3-5]</sup>、17q<sup>[4,6]</sup>、4q<sup>[7]</sup>、1q<sup>[8]</sup>、3q<sup>[9]</sup>上,这些位点现已被命名为 Psors 1 - Psors 7。一些研究还发现在 1p、2q、8q、16q、19p、20P 上也有银屑病的相关位点<sup>[3,4]</sup>。有研究<sup>[3,5]</sup>表明,银屑病易感的主要基因位

点在 6p21.3 的 12cM 区域,该区域包含有 4Mb MHC 等重要的与免疫学有关的基因,由于银屑病病因学研究认为免疫调节因子参与了致病过程,因此 MHC 基因引起了特别的注意<sup>[10]</sup>。本研究试图在中国人银屑病患者中,初步探索染色体 6p21.3 区域是否存在银屑病易感基因。

### 材料和方法

#### 一、研究对象

1998 年 9 月至 1999 年 2 月之间就诊于本院门诊的南京及其周边地区无血缘关系的患者(经皮肤科医生确诊符合寻常型银屑病诊断标准的患者,仅头皮或指甲受累者不入选)共 205 例,年龄 5~72 岁,平均发病年龄 26 岁。其中男 130 例,发病年龄平均 27.38 岁;女 75 例,发病年龄平均 24.27 岁;≤40 岁发病者(I 型)181 例(88.3%),40 岁以上发病者 24 例(11.7%)。调查发现有家系遗传史的先证者有

作者单位:中国医学科学院、中国协和医科大学皮肤病研究所(王红、刘维达、赵敬军、陈炜);复旦大学遗传所群体遗传学实验室(李辉、金力);美国德克萨斯大学休斯顿分校人类遗传学中心(金力)

通信作者:刘维达,210042 南京,中国医学科学院、中国协和医科大学皮肤病研究所

表 1 8 对荧光标记引物序列及荧光染料类型

位点	引物序列	染料	片段大小	重复碱基
D6S299	AGGTCATTGTGCCAGGTGTCTATGTATACTCCTGAATGTCT	FAM	206 - 226	DI
D6S273	ACCAAACCTCAAATTTTCGGGAGTATTCTGCAACTTTTC	FAM	130 - 140	DI
D6S276	TCAATCAAATCATCCCCAGAAGGGGTGCAACTTGTTCCTCCT	FAM	198 - 226	DI
D6S291	GGGGATGACGAATTATTCACCTAAGGATTCAGGCATGCCTGGC	FAM	198 - 210	DI
D6S422	TTTAGGGGACTGTGGGTGCCTACATGCTGAAGAC	FAM	191 - 211	DI
D4S1535	ACTTGTGATATATACCTGCCGTGTGAGAGCAGAATGTTGAG	TET	185 - 193	DI
D4S1652	AATCCCTGGGTACATTATATTTCAGACATTCTTTATTCTTTACCTCC	HEX	136 - 148	TETRA
D4S171	TGGGTAAGAGTGAGGCTGGGTCCATGAAGAGGACACT	FAM	143 - 161	DI

注 :FAM、TET、HEX 分别为微卫星序列所标记的荧光染料 ,DI 表示两碱基重复 ,TETRA 表示四碱基重复

50 例(24.4%)。从中筛选出 14 个家系 ,患者 55 例(包括 14 例先证者),正常人 76 例。

## 二、方法

1. DNA 提取 :参见文献[11]。

2. 荧光标记引物及其分子量标准来源 :所有荧光标记引物(微卫星标记)根据已发表的文献和遗传图中进行选择<sup>[5, 12-14]</sup>。引物和分子量标准由美国德克萨斯大学休斯顿分校人类遗传学中心惠赠。引物序列及荧光类型等见表 1;荧光标记分子量标准为 GS-350 TAMRA,片段大小为 75、100、139、150、160、200、250、300、340、350 bp。

3. PCR 反应条件及体系 :用多重 PCR 方法在 5  $\mu$ L 反应体系内同时进行多对引物扩增,并对多重 PCR 反应条件进行优化。PCR 反应在 96 孔微量板中进行,每组的 3~4 对引物,在 5  $\mu$ L 的总反应体积中共同扩增,其反应体系为:10  $\times$  PCR 缓冲液 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.3), MgCl<sub>2</sub> 3.0 mmol/L, dNTPs 200  $\mu$ mol/L, Taq 聚合酶 0.05 U, Taq Start 抗体 1.1  $\mu$ g/ $\mu$ L,引物 0.05  $\mu$ mol/L(每个引物),基因组 DNA 4 ng/ $\mu$ L。其中 Taq Start<sup>TM</sup> 抗体必须先与抗体缓冲液及 Taq 酶在室温下孵育 15 min。应根据每次需要进行反应的样品数目来制备 PCR 反应混合物,每个反应孔加 4  $\mu$ L PCR 混合物和 1  $\mu$ L 基因组 DNA,在 9600 循环仪上进行 PCR 反应。反应条件为 Touch-Down PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 变性 20 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s,在起始的 14 个循环中退火温度为 63  $^{\circ}$ C~56  $^{\circ}$ C,每次递减 0.5  $^{\circ}$ C,持续时间为 60 s,在后 20 个循环里,退火温度固定为 56  $^{\circ}$ C,60 s。

4. 微卫星位点的分型:基因分型工作在 ABI 377 DNA 测序仪完成,0.5  $\mu$ L PCR 产物与 0.2  $\mu$ L ABI GS-350 TAMRA 分子量标准和 1.8  $\mu$ L 甲酰胺上样液混合,95  $^{\circ}$ C 加热变性 2 min,冰中骤冷,6% 聚丙烯酰胺和 7 mol/L 尿素中电泳 2 h;应用 Genescan<sup>TM</sup>3.0 软件进行数据收集及校正,测量迁移片段

表 2 STR 位点与银屑病易感基因连锁分析 LOD 值

假定连锁值	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
D4S1652	-7.45	-2.04	-0.73	-0.21	-0.03	0.00
D4S171	-16.69	-4.68	-1.76	-0.58	-0.12	0.00
D6S291	-12.15	-1.57	-0.09	0.20	0.11	0.00
D6S273	-7.50	0.74	1.26*	0.82	0.26	0.00
D4S1535	-14.11	-3.26	-0.88	-0.16	-0.001	0.00
D6S299	-14.04	-2.77	-0.71	-0.08	0.04	0.00
D6S276	-14.02	-2.96	-0.77	-0.05	0.067	0.00
D6S422	-8.45	-0.49	0.42	0.38	0.13	0.00

注 :\* 提示紧密连锁

大小等;用 Genotype<sup>TM</sup>2.0.2 软件进行基因分型。

5. 数据分析 :用 Linkage 5.0 分析,优势对数似分值(log of odd score, LOD) $\geq 1$  提示连锁存在。

## 结 果

连锁分析:各 STR 多态性位点与银屑病易感基因的连锁状况用 Linkage 5.0 软件分析。结果见表 2。

## 讨 论

银屑病的分子遗传学基础很复杂,多个位点可能参与了致病过程。银屑病的病原学研究提示在 6p21.3 区域内寻找银屑病易感基因可能会带来实质性的进展。但由于遗传模式、不同种族和不同群体的异质性、银屑病不同临床表现、不同研究方法等原因,对该区域的标记位点与银屑病基因间关系的研究结果并不很一致。而目前认为表示肯定有意义的连锁值标准是由 Lander 等提出的 LOD $\geq 3.3$ ,并且可在另外的群体中得到证实。迄今在中国汉族群体中,对于银屑病家系 HLA 以外位点的易感基因研究尚未见报道。

我们的家系连锁分析结果表明在 D6S273 位点上,在显性遗传模式基础上外显率 99%、重组率不到 20% 的时候出现了较大的 LOD 值:1.26。尽管该结果 LOD 不高,但它至少提示紧密连锁的实际存在。这与文献报道<sup>[3, 15]</sup>的结果一致,但他们的研究同

时表明 D6S276、D6S291 与银屑病易感位点之间有着紧密的连锁关系(D6S291 的 LOD = 4.63, Burden; LOD = 1.20, Balenderan; D6S276 的 LOD = 1.84, Balenderan; D6S299、D6S273、D6S422 的 LOD 值分别为 2.91、5.01、2.19; Trembath)。本课题的研究结果说明在中国银屑病患者家系中, 6p21.3 区域内或其附近可能存在至少一个或几个与银屑病遗传易感有关的基因。

Matthews 等<sup>[7]</sup>于 1996 年对 6 个家系进行研究后认为 D4S1535(PSORS3)附近存在与银屑病有关的基因, 在显性遗传模式及外显率 70% 条件下, 其最大 LOD 值为 3.03( $\theta = 0.08$ )。但在以后的研究中并未得到大多数研究者的证实<sup>[4, 16, 17]</sup>。我们对染色体 4q 上的 4 个标记的扫描结果进行连锁分析后未发现连锁的证据。尽管 D4S422 在重组率为 20% 时 LOD 值大于 0 小于 1, 但并不能够提示连锁的存在。该结果也与 Nair 等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。

尽管我们研究所用的家系数量较少, 但国外也有文献报道利用 6 个家系探测到了银屑病的易感基因位点, 而且在小样本量的家系中我们得到位于 6p21.3 区域的 D6S273 位点与寻常型银屑病具有连锁关系, LOD 值为 1.26; 说明该位点与银屑病易感基因联系较紧密, 信号较强。同时我们还利用群体的相关分析方法证实该位点与银屑病相关 ( $P < 0.0001$ , 数据未附)。由此可以初步认为该区域可能是中国人寻常型银屑病易感基因的候选区域之一。由于 6p21.3 区内的大多数基因与机体免疫调节等功能密切相关, 而银屑病的病因学研究也支持免疫功能的失调及紊乱在该病发病中具有重要的地位, 因此, 在该区域内进行标记位点的加密, 进一步缩小与银屑病易感基因的距离以至最终克隆该基因, 同时采集大样本的银屑病家系进行全基因组扫描以确定可能存在的其它易感基因, 研究与银屑病发病有关的基因的功能将是今后人们研究的重点。

## 参 考 文 献

- 1 邵长庚. 我国的银屑病的流行和防治现状. 中华皮肤科杂志, 1996 29:75-76.
- 2 Elder JT, Nair RP, Guo S-W, et al. The genetics of Psoriasis. Arch Dermatol, 1994, 130: 216-224.
- 3 Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, et al. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. Hum Mol Genet, 1997, 6: 813-820.
- 4 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.
- 5 Burden DA, Javed S, Bailey M, et al. Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. J Invest Dermatol, 1998, 110(6): 958-960.
- 6 Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, et al. et al. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. Science, 1994, 264: 20.
- 7 Matthews D, Fry L, Powles A, et al. Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. Nat Genet, 1996, 14: 231-233.
- 8 Capon F, Novelli G, Semprini S, et al. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: Genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. J Invest Dermatol, 1999, 112: 32-35.
- 9 Enlund F, Samuelsson L, enerback C, et al. Psoriasis susceptibility locus in chromosome regions 3q21 identified in patients from south-west Sweden. Eur J Hum genet, 1999, 7(7): 783-790.
- 10 Barker JN: The pathophysiology of psoriasis. Lancet, 1991, 338: 227-230.
- 11 J 萨姆布鲁 EF, 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, 1993. 463-469.
- 12 Reed PW. Chromosome-specific microsatellite sets for fluorescence-based semi-automated genome mapping. Nature Genet, 1994, 7: 390-395.
- 13 Dib C, Faure S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5, 264 microsatellites. Nature, 1996, 380: 152-154.
- 14 Capon F, Semprini M, Dallapiccola B, et al. Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. Am J Hum Genet, 1999, 65: 1798-1800.
- 15 Balenderan 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.
- 16 Matthews D, Fry L, Powles A, et al. Confirmation of genetic heterogeneity in familial psoriasis. J Med Genet, 1995, 32: 546-548.
- 17 Nair RP, Guo SW, Jenish S, et al. Scanning chromosome 17 for psoriasis susceptibility: lack of evidence for a distal 17q locus. Hum Hered, 1995, 45: 219-230.

(收稿日期: 2001-06-19)

## 中华医学会音像出版社 VCD 出版发行信息

中华医学会音像出版社是卫生部主管, 中华医学会主办的医学专业音像出版社。近年来邀请著名医学专家策划制作了一批专业 VCD 制品, 采用多媒体手段, 形式多样, 形象生动, 是临床医生进行业务学习的有效方式和途径。价格优惠, 欢迎垂询、批发、邮购。VCD 目录: 性传播疾病、尖锐湿疣及其激光治疗、红丝带——迎战艾滋病、健康英语听说系列(音带 12 盘或 VCD12 盘, 附书 3 册)。尚有《健康英语听说系列教材》出版发行。联系地址: 北京东四西大街 42 号中华医学会音像出版社郝秀萍、王月书; 邮编: 100710; 电话: (010) 65133608; 传真: (010) 65133609; E-mail: cmavo@public.bta.net.cn