

中国汉族人寻常型银屑病 AIM2 基因多态性遗传模式分析

李 阁, 陶 露, 徐 钰, 窦进法, 王文俊, 郑晓冬, 王再兴, 周文明

摘要 目的 探讨 AIM2 基因多态性的遗传模式与银屑病表型的相关性。方法 研究团队前期通过外显子芯片研究表明 AIM2(rs2276405) 基因是中国汉族人寻常型银屑病的易感基因之一, 以此为基础, 运用 PLINK 1.07 和 SPSS 20.0 软件对 16 876 例银屑病患者和 22 920 例健康对照者的基因型-表型数据和各表型的遗传模式进行统计分析。结果 基因型和等位基因分布结果显示 A 为最小等位基因, G 为风险基因。遗传模式分析显示显性模式是 AIM2 基因多态性位点的最佳遗传模式。与对照组比较, 在显性遗传模式中 $PASI \leq 20$ ($OR = 0.83, P = 1.10 \times 10^{-7}$) 的分布较 $PASI > 20$ ($OR = 0.91, P = 3.62 \times 10^{-1}$) 更显著, 其次, 家族史阴性 ($OR = 0.82, P = 6.85 \times 10^{-8}$) 较家族史阳性患者 ($OR = 0.90, P = 1.01 \times 10^{-1}$) 统计学差异更有显著性。各表型在病例与对照之间比较差异无统计学意义。结论 AIM2(rs2276405) 与中国汉族人寻常型银屑病的发病有显著相关性, 在各亚型中显性遗传模式是寻常型银屑病的最佳遗传模式, 可能与家族史阴性的轻中度寻常型银屑病患者有关, 并因此可能导致寻常型银屑病临床表型的多样性。

关键词 银屑病; AIM2; 基因型; 表型; 遗传模式

中图分类号 R 758.63; R 394.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)10-1486-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.020

银屑病是一种常见的、T 细胞介导的、炎症性皮肤病, 影响全球约 1%~3% 的人口^[1], 由环境因素、遗传因素和免疫因素等多种因素共同引起, 遗传因素是其重要的发病原因^[2]。对银屑病患者行大规模的全外显子区域关联分析研究^[3]显示 15 个与银屑病相关的新易感基因/位点, AIM2 是其中一个新易感基因/位点。以此为依据, 该研究对参与研究的 16 876 例寻常型银屑病(psoriasis vulgaris, PV) 和 22 920 例健康对照者进行临床表型(皮损类型、疾病严重程度和家族史)的分层分析和各亚型的遗传模

式分析, 探讨 AIM2 基因在中国汉族人 PV 中的遗传模式及对银屑病发病机制的影响, 为以后的靶向治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本试验中的 16 876 例 PV 患者来自安徽医科大学第一附属医院皮肤性病科及全国各合作医院, 由 2 名以上经验丰富的副主任医师诊断。22 920 例健康对照样本来自合肥地区多所院校的大学生入学体检的健康人群和全国多家医院健康体检中心的志愿者。病例组中男 9 360 例, 女 6 485 例; 年龄 1~89 (32.21 ± 16.59) 岁, 发病年龄为 (27.28 ± 13.37) 岁。对照组中男 11 737 例, 女 11 183 例; 年龄 1~97 (33.88 ± 15.55) 岁。所有的参与者填写调查表和知情同意书, 本研究得到各个医院的伦理委员会批准。本研究样本量较大, 部分调查者的临床信息缺失。

1.2 临床表型分类 根据皮损类型(点滴和斑块)、家族史(只要患者的一、二、三级亲属中有 1 位银屑病患者, 则认为该家族史阳性, 反之, 家族史阴性), 根据皮损的红斑、鳞屑、浸润的深度及累及的皮损面积算出 PASI 评分, 医师根据 PASI 评分作为判断严重程度的标准。PASI ≤ 20 分为轻中度, PASI > 20 分为重度^[4]。

1.3 DNA 提取及 SNP 分型 用试剂盒(QIAGEN FlexiGene DNA Kit)从采集的外周血中分离 DNA, 运用 Illumina 人类基因组外显子亚洲芯片(Exome_Asian Array)和外显子精细定位芯片(Exome_Fine Array)(美国 Illumina 公司)这两种外显子芯片对 SNP rs2276405 进行基因分型。

1.4 功能注释 通过 NCBI 网站查找 AIM2(rs2276405) 基因的蛋白序列, 并保存为 fasta 文件格式, 然后将 AIM2 的蛋白序列导入到 KOBAS2.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>) 网站进行功能注释。

1.5 统计学处理 通过 PLINK 1.07 和 SPSS 20.0 软件分析比较病例组和对照组的等位基因和基因型分布频率, 得出 P 值、比值比(OR 值)、95% 置信区

2016-07-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271747)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院皮肤性病科, 合肥 230022

作者简介: 李 阁, 女, 硕士研究生;

周文明, 男, 副教授, 主任医师, 研究生导师, 责任作者, E-mail: aydzwm@163.com

间(95% CI),分析 AIM2(rs2276405)在病例组间与病例和对照间的等位基因的关联性时,以 $\alpha = 0.05$ 为标准来判断统计结果是否有意义。

2 结果

2.1 等位基因、基因型和遗传模式分析 等位基因和基因型分析显示在中国汉族人群中 AIM2(rs2276405)的等位基因为 A/G, A 为最小等位基因, G 为风险基因。遗传模式分析显示显性模式是 AIM2 的最佳遗传模式。见表 1。

2.2 AIM2(rs2276405)在 PV 各亚型的遗传模式

和表型相关性分析 AIM2(rs2276405)在病例组和对照组间各亚型的遗传模式分析显示:与对照组比较,在显性遗传模式中 $PASI \leq 20$ 分($OR = 0.83, P = 1.10 \times 10^{-7}$)的分布较 $PASI > 20$ 分($OR = 0.91, P = 3.62 \times 10^{-1}$)更显著,其次,家族史阴性($OR = 0.82, P = 6.85 \times 10^{-8}$)较家族史阳性患者($OR = 0.90, P = 1.01 \times 10^{-1}$)统计学差异更显著。见表 2。基因型、等位基因频率比较显示, AIM2(rs2276405)等位基因频率分布在皮损类型、严重程度和家族史中差异均无统计学意义。见表 3。

2.3 功能注释结果 本研究预测 AIM2 通过影响

表 1 AIM2(rs2276405)基因型和等位基因分布及遗传模式分析

项目	病例组	对照组	OR(95% CI)	P 值
基因型 $n(\%)$				
AA	58(0.34)	105(0.43)	0.79(0.57~1.08)	1.39×10^{-1}
AG	1 617(9.59)	2 730(11.18)	0.84(0.79~0.90)	1.87×10^{-7}
GG	15 195(90.07)	21 590(88.39)	—	—
等位基因 $n(\%)$				
A	1 733(5.14)	2 940(6.02)	0.85(0.80~0.90)	6.91×10^{-8}
G	32 007(94.86)	45 910(93.98)	—	—
显性模式 [AA + AG] vs GG, n	1 675/15 195	2 835/21 590	0.84(0.79~0.90)	7.69×10^{-8}
隐性模式 [AA vs (AG + GG), n]	58/16 812	105/24 320	0.80(0.58~1.10)	1.70×10^{-1}
累加模式 (AA vs AG vs GG, n)	58/1 617/15 195	105/2 730/21 590	—	4.91×10^{-7}

表 2 AIM2 在 PV 各亚型中的遗传模式分析

项目	显性模式 (AA + AG) vs GG		隐性模式 AA vs (AG + GG)		累加模式 AA vs AG vs GG
	OR(95% CI)	P 值	OR(95% CI)	P 值	P 值
皮损类型					
点滴型	0.79(0.72~0.86)	2.88×10^{-7}	0.91(0.59~1.40)	6.71×10^{-1}	1.67×10^{-6}
斑块型	0.88(0.81~0.95)	8.39×10^{-4}	0.76(0.50~1.14)	1.82×10^{-1}	2.86×10^{-3}
PASI 评分(分)					
≤ 20	0.83(0.78~0.89)	1.10×10^{-7}	0.80(0.57~1.13)	2.04×10^{-1}	7.20×10^{-7}
> 20	0.91(0.74~1.12)	3.62×10^{-1}	1.20(0.49~2.96)	6.86×10^{-1}	5.58×10^{-1}
家族史					
阳性	0.90(0.79~1.02)	1.01×10^{-1}	1.04(0.57~1.89)	9.06×10^{-1}	2.39×10^{-1}
阴性	0.82(0.77~0.88)	6.85×10^{-8}	0.78(0.55~1.11)	1.66×10^{-1}	4.37×10^{-7}

表 3 病例组与对照组间 rs2276405 间等位基因和基因型频率比较(n)

项目	<i>n</i>	等位基因		基因型			病例组 - 对照组	
		A	G	AA	AG	GG	<i>P</i> 值	OR(95% <i>CI</i>)
皮损类型								
点滴型	6 636	648	12 624	26	596	6 014	6.54×10^{-7}	0.80(0.73 ~ 0.87)
斑块型	8 912	947	16 877	29	889	7 994	5.81×10^{-4}	0.88(0.81 ~ 0.94)
PASI 评分(分)								
>20	967	108	1 826	5	98	864	4.31×10^{-1}	0.92(0.76 ~ 1.13)
≤20	14 453	1 476	27 430	50	1 376	13 027	1.09×10^{-7}	0.84(0.79 ~ 0.90)
家族史								
阳性	2 693	296	5 090	12	272	2 409	1.24×10^{-1}	0.91(0.80 ~ 1.03)
阴性	12 837	1 297	24 377	43	1 211	11 583	6.12×10^{-8}	0.83(0.78 ~ 0.89)

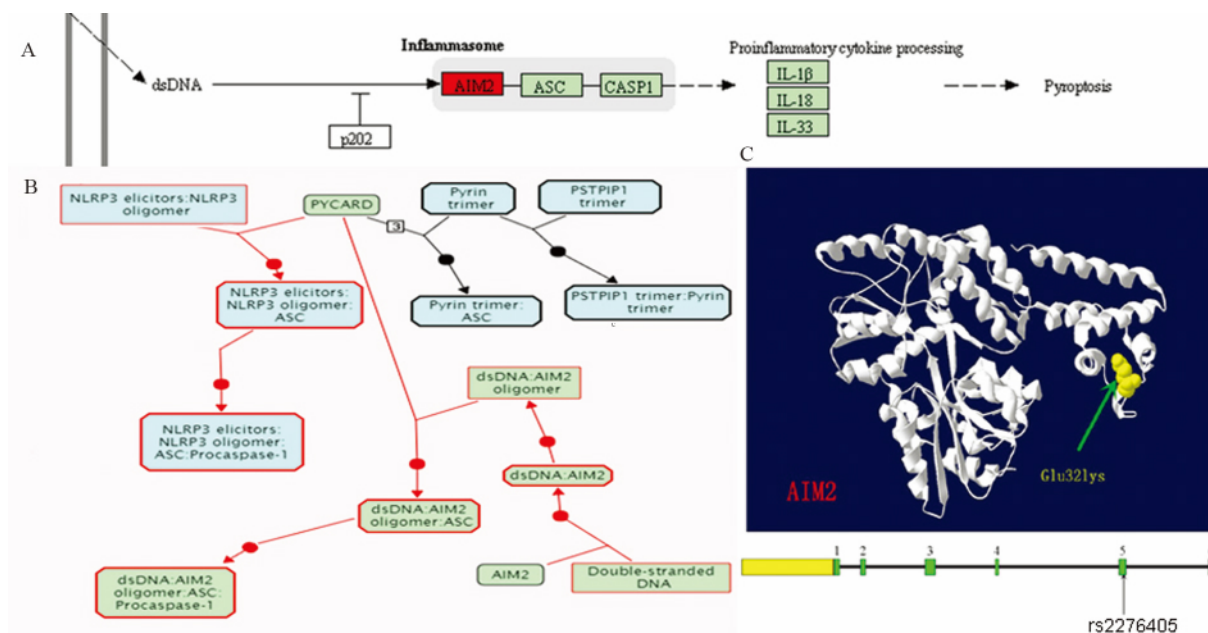


图1 信号通路和 AIM2 结构图

A: 胞质 DNA 信号通路; B: 炎性小体的信号通路; C: AIM2 的一级结构和三级结构图

蛋白功能而导致银屑病发病的,为了验证这一猜想,通过 KOBAS2.0 网站测出了 AIM2 的一些功能,且同时也得出了 AIM2 与银屑病发病相关的信号通路:胞质 DNA 信号通路和炎性小体的通路。通过 DNAMAN 软件和 swiss-pdbviewer 4.1.0 里绘制 AIM2 的一级、三级结构图。见图 1。

3 讨论

目前,全基因组关联分析(GWAS)是寻找常见复杂疾病的易感基因的重要工具^[9]。随着这项技术的发展,已经发现了银屑病的众多易感基因。本次研究显示在汉族人群中 AIM2(rs2276405)与 PV 显著相关($P = 3.22 \times 10^{-8}$)。显性遗传模式在 PASI ≤ 20 分、家族史阴性 PV 患者中的 P 值分别 1.10×10^{-7} 、 6.85×10^{-8} ,因此,在中国汉族人群中,AIM2 在轻中度、家族史阴性的 PV 中可能起着重要作用。

rs2276405 位于 AIM2 基因的 5 号外显子上。AIM2 是 IFN 诱导蛋白,C 端 HIN 结构域能够结合 dsDNA,N 端 PYD 结构域通过 PYD-PYD 的相互作用结合 ASC^[9]。AIM2(rs2276405)的氨基酸残基 32 埋藏在蛋白结构中的 α 螺旋中央。由于谷氨酸残基是酸性、赖氨酸残基是碱性的,两者的化学特性正好完全相反,因此, α 螺旋结构不稳定^[9]。

AIM2 基因编码的蛋白主要在脾脏、外周白细胞和小肠中表达。病毒、细菌、宿主细胞结合胞质 ds-

DNA,然后通过募集 ASC 和 CASP1 的前体等接受器组装成 AIM2 炎性体。当 AIM2 炎性体激活,能够释放 IL-18 和 IL-1 β 的前体,进一步促进 IL-18 和 IL-1 β 炎性因子的释放^[9]。在健康人群中,AIM2 作为保护屏障^[9]。当病原体入侵,皮肤屏障受损,AIM2 表达上调。然而,如果屏障受损持续存在,AIM2 诱导的 IL-1 β 激活,从而导致银屑病等慢性炎症性皮肤病的发生^[9]。

NLRP3 和 AIM2 炎性体是两条重要的防御路线,对有害的胞质 dsDNA 作出反应,然后通过半胱天冬酶-1 将 IL-18 和 IL-1 β 的前体裂解为激活体^[9]。通过功能注释网站 KOBAS 2.0^[10],本研究显示 NLRP3 和脯氨酸丝氨酸苏氨酸磷酸酶相互作用蛋白 1(PSTPIP1)在 Reactome 数据库($P = 8.0 \times 10^{-4}$)和 KEGG 数据库中胞质 DNA 通路($P = 3.0 \times 10^{-3}$)与炎性体的通路有关(<http://www.reactome.org/>)。NLRP3 和 PSTPIP1 在 IL-1 β 的分泌中发挥重要作用,IL-1 β 是强有力的促炎细胞因子,能够促进许多与感染、炎症和免疫有关的固有免疫反应^[11]。IL-1 β 分泌减少和炎性体的表达在银屑病的病理生理中起着重要作用^[12]。

在 NLRP3 缺乏的巨噬细胞中,AIM2 能够废除所有炎性体的活性。AIM2 是 NLRP3 炎性体先天免疫反应的备份^[13]。Pyrin 是 PSTPIP1 的胞质受体,能够激活 ASC 低聚物和半胱天冬酶-1 活化体,然后

组装成炎性体(PSTPIP1)。PSTPIP1 突变体在自身免疫性疾病中与 IL-1 β 的增加有关。由于 Pyrin 可以提高半胱天冬酶-1 的激活和 IL-1 β 的分泌,其下降有相反效果,或许可以推断 Pyrin 在自身炎症性疾病中,PSTPIP1 突变体对于半胱天冬酶-1 的激活发挥重要作用^[14]。

研究^[15]表明遗传因素在很大程度上影响疾病的严重程度,早发型 PV 患者一般病情更严重且家族史阳性,而晚发型患者病情较轻且家族史阴性。AIM2(rs2276405)在各亚型中显性模式是 PV 的最佳遗传模式,可能与家族史阴性的轻中度 PV 患者有关,并因此可能导致 PV 临床表型的多样性。

综上所述,本研究对银屑病的病理生理机制提出了新的见解,同时也为以后对炎性体通路和胞质 DNA 通路中的靶向治疗提供指导。

参考文献

- [1] Zhang C, Zhu K J, Liu H, et al. The TNFAIP3 polymorphism rs610604 both associates with the risk of psoriasis vulgaris and affects the clinical severity [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2015, 40(4): 426–30.
- [2] Boehncke W H. Etiology and pathogenesis of psoriasis [J]. *Rheumatic Dis Clin North Am*, 2015, 41(4): 665–75.
- [3] Zuo X B, Sun L D, Yin X Y, et al. Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6793.
- [4] Revicki D A, Jin Y, Wilson H D, et al. Reliability and validity of the psoriasis symptom inventory in patients with moderate-to-severe psoriasis [J]. *J Dermatolog Treat*, 2014, 25(1): 8–14.
- [5] Klein R J. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration [J]. *Science*, 2005, 308(5720): 385–9.
- [6] Ponomareva L, Liu H, Duan X, et al. AIM2, an IFN-inducible cytosolic DNA sensor, in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(10): 1193–202.
- [7] Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 266–72.
- [8] Jin T, Perry A, Smith P, et al. Structure of the absent in melanoma 2 (AIM2) pyrin domain provides insights into the mechanisms of AIM2 autoinhibition and inflammasome assembly [J]. *J Bio Chem*, 2013, 288(19): 13225–35.
- [9] Kopfnagel V, Wittmann M, Werfel T. Human keratinocytes express AIM2 and respond to dsDNA with IL-1 β secretion [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(12): 1027–29.
- [10] Xie C, Mao X, Huang J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Suppl 2): W316–22.
- [11] Barker B R, Taxman D J, Ting J P. Cross-regulation between the IL-1 β /IL-18 processing inflammasome and other inflammatory cytokines [J]. *Cur Opin Immunol*, 2011, 23(5): 591–7.
- [12] Jiang W, Zhu F G, Bhagat L, et al. A Toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist inhibits Th1 and Th17 responses and inflammasome activation in a model of IL-23-induced psoriasis [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(7): 1777–84.
- [13] Rathinam V A, Jiang Z, Waggoner S N, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 395–402.
- [14] Yu J W, Fernandes-Alnemri T, Datta P, et al. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants [J]. *Mol Cell*, 2007, 28(2): 214–27.
- [15] Boehncke W H, Schon M P. Psoriasis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9997): 983–94.

Genetic model analysis of AIM2 single nucleotide polymorphism in Han Chinese patients with psoriasis vulgaris

Li Ge, Tao Lu, Xu Yu, et al

(Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the association between AIM2 rs2276405 and genetic model of psoriasis. **Methods** Recently, the team presented a large-scale whole-exome array analysis for psoriasis and discovered that AIM2 was one of the new genes/loci associated with psoriasis. 16 876 cases and 22 920 controls were analyzed about the association between AIM2(rs2276405) and genetic model of in Chinese Han population using PLINK 1.07 software and SPSS 20.0. **Results** The comparison of genotype and allele distributions revealed that A was minor allele, G was risk gene risk. In addition, the dominant model provided the best fit for AIM2. Combined with controls, the frequency of dominant model in patients with PASI $\leq$ 20($OR=0.83, P=1.10\times 10^{-7}$), sporadic psoriasis($OR=0.82, P=6.85\times 10^{-8}$) was more significantly than in PASI>20($OR=0.91, P=3.62\times 10^{-1}$), positive

翼状胬肉中 MMP-9、TIMP-1 及 VEGF 的表达及意义

李盈龙, 马 应, 王李松, 蒋正轩

摘要 目的 比较金属基质蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1)、新生血管因子(VEGF)在翼状胬肉中的表达,探讨3者在翼状胬肉中的作用。方法 收集复发性翼状胬肉患者翼状胬肉标本38例、初发性翼状胬肉患者翼状胬肉标本47例和斜视患者球结膜标本32例。采用免疫组化法检测85例翼状胬肉和32例正常人球结膜中MMP-9、TIMP-1及VEGF的表达,比较MMP-9、TIMP-1及VEGF在3组中的表达差异,分析3者在翼状胬肉中表达的相关性。结果 复发性翼状胬肉和初发翼状胬肉标本均有MMP-9、TIMP-1和VEGF的表达,MMP-9、TIMP-1和VEGF在复发翼状胬肉和初发翼状胬肉中阳性表达均显著高于正常球结膜。经相关检验分析,在翼状胬肉中,MMP-9和VEGF的阳性表达存在相关性;而TIMP-1与VEGF表达间无显著相关性。结论 MMP-9在翼状胬肉发生和复发过程中发挥重要作用。其可能通过破坏细胞外基质的屏障和促进VEGF产生来调控翼状胬肉的发生和复发。细胞外基质屏障的打破可能是翼状胬肉发病的基础。

关键词 细胞外基质;翼状胬肉;复发;免疫组织化学;新生血管

中图分类号 R 382.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)10-1490-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.021

翼状胬肉是我国眼科常见病和多发病。眼球的睑裂部球结膜和结膜下组织变性增生,并向角膜侵

润,外观呈三角形^[1]。翼状胬肉的病因复杂,是环境因素和自身因素共同作用的结果,但其确切的发病机制至今尚不完全清楚。一致认为,在紫外线等外界因素的作用下,睑裂区的球结膜变性纤维血管组织大量增生,且有较强侵袭能力;同时外界的危险因素损伤了角膜缘的干细胞,使增生的组织侵入透明的角膜组织,逐渐增大覆盖角膜^[1-2]。由此可见,在翼状胬肉发病过程中,纤维血管组织的增生和不断的侵袭是翼状胬肉形成的基础,细胞间基质屏障和角膜缘屏障的破坏可能是该病进展的主要原因。

金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是降解细胞外基质的重要酶类,几乎能降解细胞外基质中的全部成分。其可能通过破坏细胞外基质的降解平衡而促进病变的组织增生侵袭,突破细胞外基质的组织屏障,从而侵袭周围的组织^[3]。MMP-9是依赖金属锌离子的金属酶,其底物广泛,是当今研究热点^[4]。基质金属蛋白酶抑制剂(matrix metalloproteinase inhibitor, TIMP)是MMP的抑制剂,能抑制MMP活性及其生物学功能,防止细胞外组织屏障的破坏。人体内发现4种TIMP,其中TIMP-1被广泛研究^[5]。然而,这2种蛋白酶在复发、初发翼状胬肉中的作用及机制尚不清楚。该研究利用免疫组化法检测复发、初发翼状胬肉及正常球结膜组织中MMP-9、TIMP-1及新生血管的表达差异,从而阐明MMP在翼状胬肉发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本收集 收集2012年7月~2015年2月行

family history ($OR = 0.90, P = 1.01 \times 10^{-1}$). The frequencies distribution of genotypes and alleles for AIM2 rs2276405 were not significant in skin lesion group, severity and family history group and control. **Conclusion** AIM2(rs2276405) is significantly associated with susceptibility of psoriasis in Han Chinese population. In all subtypes of psoriasis, the dominant model provides the best fit for AIM2. The data support that AIM2 may be associated with mild-moderate and sporadic psoriasis and might contribute to the complexity of clinical feature of psoriasis.

Key words psoriasis; AIM2; genotype; phenotype; genetic model