

斑秃易感位点与中国汉族人群相关性研究

杜 鹃 高金平 周文明

摘要 目的 研究国外斑秃人群已发现的易感基因与中国汉族人群斑秃的相关性。方法 选择 736 例斑秃患者和 1 840 例对照者,提取基因组 DNA,利用 Sequenom Massarray 系统,对国外报道的斑秃易感基因位点 [17 个单核苷酸多态性(SNPs)] 进行验证,用 Plink 1.07 软件对基因型进行关联分析。结果 CTLA4 基因上 rs3087243 ($P = 0.041$, $OR = 1.18$, $95\% CI = 1.01 \sim 1.38$) 经 Bonferroni 校正后无显著相关性($P_c = 0.697$),其余 16 个位点(TLR1、DMBT1、CHIT1、GBP4、CIITA、IL31RA、CD96、INPPL1、MASP2、IL-13、KIAA0350、PTPN22、SPATA5、TRAF1/C5、IL1A、IL2RA) 等位基因频率在病例组和对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);分层分析显示发病年龄 > 20 岁与 ≤ 20 岁两组之间比较,TRAF1 基因中 rs2416808 位点($P = 0.0184$, $OR = 1.35$, $95\% CI = 1.05 \sim 1.74$);轻型与重型斑秃、有无家族史等位基因频率在两两之间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 国外报道的 17 个 SNPs 与中国汉族人群的斑秃没有显著相关性,不同人群之间可能存在遗传异质性,进一步的研究需要在较大的斑秃样本中进行。

关键词 斑秃;遗传学;关联分析;单核苷酸多态性

中图分类号 R 758.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0612-04

斑秃在国外报道的患病率为 0.1% ~ 0.2%,各个年龄阶段中的男性和女性均可以发病。根据斑秃的临床表现形式可以将斑秃分为局限性脱发、全秃和普秃。尽管斑秃的发病机制尚不明确,但有研究^[1]表明遗传构成斑秃易感性的主要因素,环境因素如感染和心理压力也可能在斑秃中发挥重要作用。遗传因素在斑秃的发病机制中发挥重要作用,国外斑秃人群中验证出大量斑秃的易感基因。我们选择了全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)、候选基因关联分析及外显子测序中一些重要的基因进行验证研究,选取了外显子测序的 9 个基因 DMBT1、GBP4、CIITA、CHIT1、IL31RA、

MASP2、INPPL1、ILR1、CD96^[2], GWAS 发现的 2 个基因 KIAA0350、IL-13^[3],以及候选基因发现的 6 个基因 PTPN22^[4]、SPATA5^[5]、TRAF1^[6]、IL1A^[7]、IL2RA^[8]、CTLA4^[9],共 17 个基因,选取 736 例病例及 1 840 例对照者进行验证研究,确定这些易感基因是否也是中国汉族斑秃人群的易感基因。

1 材料与方法

1.1 病例资料 病例总样本数 736 例,包括男 457 例,女 279 例。男女比例 1.63 : 1,年龄 2 ~ 74 (32.58 ± 13.71) 岁,本课题组入组患者均为 2005 年 5 月 ~ 2014 年 4 月间就诊于安徽医科大学第一附属医院皮肤科的门诊病例,均是中国汉族人群(表 1)。由皮肤科 2 名副高以上的医师确诊。斑秃遗传流行病学调查表和正常对照调查表,由经过专门培训的流行病学调查员通过对患者与对照者进行问卷调查。调查的内容包括患者性别、年龄、有无家族史、发病年龄,指患者或其家属首次发现本病,而同时或其后被医师诊断为斑秃。临床特征是指疾病严重程度、病程、首发部位、有无伴发其他疾病等。对照组 1 840 例均来自安徽医科大学第一附属医院体检中心,对照组与病例组没有血缘关系,同时要求其一、二、三级亲属中也无斑秃患者,自身免疫性疾病、唐氏综合征和特纳综合征排除在外。经调查对象知情同意,采集外周静脉血 3 ~ 4 ml 放置于 5 ml 的 EDTANa₂ 抗凝管中, -80 °C 冻存。该项研究得到了安徽医科大学伦理委员会的批准,患者与对照者都签写了知情同意书。进行了分层分析,将局限性斑秃归类为轻型斑秃;全秃和普秃归类为严重斑秃^[10]。将发病年龄 > 20 岁归为高年龄组, ≤ 20 岁归为低年龄组^[11];及有无家族史(阳性家族史是指其一、二或三级亲属中至少有一位斑秃患者)。

1.2 方法

1.2.1 SNP 点的选择要求 选择最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) $> 1\%$, $P < 0.05$,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) 在对照样本中均符合 Hardy-Weinberg 平衡,优势比(odds ratio, OR) 越大越好,综合这些依据,

2015-03-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171493)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院皮肤性病科,安徽医科大学皮肤病研究所,合肥 230032

作者简介:杜 鹃,女,硕士研究生;

周文明,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhouwenming@medmail.com.cn

表1 病例与对照组的一般资料

项目	病例组	对照组
总人数 (n)	736	1 840
性别[n(%),男/女]	457(62.1)/279(37.9)	1 059(57.6)/781(42.2)
年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	32.58 ± 13.71	31.40 ± 10.93
年龄段(岁)	2~74	3~73
家族史[n(%)]	55(7.5)	-
发病年龄[岁 n(%)]		
>20	564(76.6)	-
≤20	172(23.4)	-
斑秃类型[n(%)]		
轻型	624(84.8)	-
重型	112(15.2)	-

选取了 GWAS、候选基因关联分析及外显子测序中重要的基因位点,共 17 个 SNPs 进行验证研究,见表 2。本实验没有选择人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)区域上的位点,因为在设计引物的时候比较困难。

1.2.2 DNA 提取、引物设计及合成 用 QIAGEN 基因组 DNA 提取试剂盒,按照产品操作说明书提取样本基因组 DNA,将 DNA 稀释至标准实验浓度(15~25 ng/μl);用 Sequenom MassArray Assay Designer

3.1 软件设计引物,将 DNA 进行 PCR 扩增,用 Sequenom plex 验证实验(SNP 的基因分型)。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验计算基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,用 Bonferroni 法对检验水平进行调整,得到校正 P 值 P_c ,校正后需要达到 0.0029 才有意义。用 Plink 1.07 软件进行分层

分析,在整个样本中,将 17 个 SNPs 位点进行分层分析:发病时间、轻型及严重斑秃、有无家族史。比较各组间等位基因频率,计算 P 值、OR 值、95% 可信区间(confidence interval, CI)。

2 结果

2.1 17 个 SNPs 位点验证研究的关联结果 在 736 例 AA 患者和 1 840 例对照者中有一个位点 rs3087243 ($P = 0.041$, $OR = 1.18$, $95\% CI = 1.01 \sim 1.38$),但经校正后 P 值无显著相关性($P_c = 0.697$)。其余 16 个位点的 P 值在 0.07~0.90,等位基因频率在病例组和对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.2 年龄分层分析 年龄 >20 岁的 564 例患者与 ≤20 岁的 172 例患者的基因型和等位基因频率相比较:发病年龄 >20 岁与 ≤20 岁之间,位点 rs2416808 差异有统计学意义($P = 0.018$, $OR = 1.35$, $95\% CI = 1.05 \sim 1.74$),但校正后无显著相关性,见表 4。

2.3 疾病严重程度、有无家族史的关联分析 轻型斑秃与重型斑秃之间差异无显著相关性;有家族史和无家族史之间其等位基因频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

研究^[12]表明,斑秃是一种由 T 淋巴细胞介导的

表2 17 个 SNPs 的基本信息

作者(年)	染色体	基因	SNP	物理位置*	P 值	OR 值	对照组最小等位基因频率	
							中国	欧洲
Lee(2013) ^[2]	10q26.13	DMBT1	rs2277244	124358583	3.00×10^{-3}	6.074	0.08	0.08
	1p22.2	GBP4	rs17130745	89659086	9.00×10^{-3}	6.083	0.05	0.03
	16p13.13	CIITA	rs78108426	11001421	9.00×10^{-3}	4.667	0.15	0.13
	1q32.1	CHIT1	rs2297950	203194186	6.00×10^{-3}	4.024	0.29	0.30
	5q11.2	IL31RA	rs161704	55206444	2.30×10^{-2}	3.160	0.33	0.36
	1p36.22	MASP2	rs2273346	32603056	4.60×10^{-2}	2.522	0.21	0.18
	11q13.4	INPPL	rs17847215	71941033	3.60×10^{-2}	4.000	0.06	0.08
	4p14	TLR1	rs117033348	38800022	1.00×10^{-3}	7.754	0.02	0.01
	3q13.13-2	CD96	rs2276872	111286275	2.40×10^{-2}	3.025	0.13	0.16
	Jagielska(2012) ^[3]	16p13.13	KIAA0350	rs998592	1199678	2.45×10^{-7}	1.320	0.38
5q31.1		IL-13	rs20541	131995964	2.00×10^{-4}	1.260	0.31	0.25
El-Zawahry(2013) ^[4]	1p13.2	PTPN22	rs2476601	114377586	2.30×10^{-2}	2.601	-	-
Forstbauer(2012) ^[5]	4q28.1	SPATA5	rs304650	124083918	3.43×10^{-4}	1.240	0.47	0.35
Redler(2010) ^[6]	9q33.2	TRAF1/C5	rs2416808	123706283	6.70×10^{-2}	1.120	0.48	0.48
Lu(2013) ^[7]	2q13	IL1A	rs3783553	1113531715	3.32×10^{-7}	0.470	0.33	-
Redler(2012) ^[8]	10p15.2	IL2RA	rs3118470	6101713	3.80×10^{-4}	1.300	0.48	0.47
Megiorni(2013) ^[9]	2q33.2	CTLA4	rs3087243	204738919	4.10×10^{-2}	0.580	0.21	-

* Based on HapMap data release 27

表3 16个SNPs位点验证研究的关联结果

SNPs	基因	A* /B	等位基因频率		P值	OR值(95% CI)
			病例组	对照组		
rs117033348	TLR1	G/A	0.01	0.02	0.547	0.85(0.50~1.45)
rs161704	IL31RA	T/C	0.33	0.33	0.692	1.03(0.90~1.17)
rs17130745	GBP4	C/T	0.04	0.05	0.43	0.89(0.66~1.20)
rs17847215	INPPL	C/G	0.06	0.06	0.485	0.91(0.70~1.19)
rs20541	IL43	T/C	0.31	0.31	0.882	1.01(0.88~1.16)
rs2273346	MASP2	C/T	0.20	0.21	0.067	0.87(0.74~1.01)
rs2276872	CD96	G/C	0.13	NA	NA	NA
rs2277244	DMBT1	T/C	0.07	0.08	0.844	1.02(0.81~1.30)
rs2297950	CHIT1	T/C	0.29	0.29	0.899	0.99(0.86~1.14)
rs2416808	TRAF1	G/A	0.50	0.48	0.341	1.06(0.94~1.20)
rs304650	SPATA5	G/A	0.46	0.47	0.755	0.98(0.87~1.11)
rs3087243	CTLA4	A/G	0.21	0.18	0.041	1.18(1.01~1.38)
rs3118470	IL2RA	T/C	0.48	0.50	0.292	0.94(0.83~1.06)
rs3783553	IL1A	TTCA/	0.33	0.33	0.823	1.02(0.89~1.16)
rs78108426	CIITA	A/C	0.14	0.15	0.432	0.93(0.78~1.11)
rs998592	KIAA0350	A/G	0.30	0.38	0.000	0.69(0.59~0.81)

* risk allele; SNP(rs2476601) 基因分型失败

表4 16个SNPs与不同年龄组间相关性分析

SNPs	A* /B	等位基因频率		P值	OR值(95% CI)
		>20岁	≤20岁		
rs117033348	G/A	0.02	0.01	0.209	2.49(0.57~1.09)
rs161704	T/C	0.32	0.36	0.270	0.86(0.66~1.12)
rs17130745	C/T	0.04	0.06	0.127	0.65(0.37~1.14)
rs17847215	C/G	0.06	0.04	0.215	1.45(0.80~2.62)
rs20541	T/C	0.31	0.33	0.421	0.90(0.69~1.17)
rs2273346	C/T	0.19	0.20	0.639	0.93(0.68~1.27)
rs2276872	G/C	0.14	0.11	0.263	1.25(0.85~1.84)
rs2277244	T/C	0.07	0.10	0.103	0.70(0.46~1.08)
rs2297950	T/C	0.29	0.29	0.897	1.02(0.77~1.34)
rs2416808	G/A	0.52	0.44	0.018	1.35(1.05~1.74)
rs304650	G/A	0.47	0.44	0.459	1.10(0.86~1.41)
rs3087243	A/G	0.20	0.22	0.397	0.88(0.65~1.19)
rs3118470	T/C	0.48	0.47	0.556	1.08(0.84~1.38)
rs3783553	TTCA/DEL	0.32	0.36	0.174	0.84(0.64~1.08)
rs78108426	A/C	0.14	0.16	0.303	0.83(0.59~1.18)
rs998592	A/G	0.30	0.28	0.535	1.11(0.80~1.54)

* risk allele

毛囊相关的自身免疫性疾病,在斑秃遗传易感的个体中,由于毛囊缺失了免疫赦免,导致T细胞介导的免疫反应攻击生长初期的毛囊所致。目前多数研究^[13]主要集中在细胞因子上,如白介素1、白介素10等,缺乏遗传方面的相关研究。

本研究对国外斑秃人群已发现的17个易感基因与中国汉族人群相关性的研究。研究国外报道的斑秃易感位点与中国汉族人群斑秃相关性。国外报道的17个SNPs中,发现1个SNP的P<0.05,校正后无统计学意义,提示细胞毒T淋巴细胞抗原4

(cytotoxic T-lymphocyte antigen 4,CTLA4)基因与斑秃的相关性具有提示意义。本研究结果表明,CTLA4基因(P=0.041),与意大利人群P值结果保持一致^[9]。但本研究结果经校正后,P值无统计学意义。CTLA4是T细胞诱导外周免疫耐受的重要性调节分子,是首个在独立人群中被验证出来的AA相关的GWAS基因。Megiorni et al^[9]研究表明此基因与斑秃、类风湿性关节炎、1型糖尿病、小儿乳糜泻有关联。

在所有的病例中,进行了分层分析,包括发病时间、严重程度、有无家族史。数据也表明,肿瘤坏死因子受体相关因子1受体(tumor necrosis factor receptor-associated factor 1,TRAF1)似乎与发病年龄>20岁有关,有研究^[6]表明,TRAF1与家族史及严重斑秃有显著相关性。TRAF1参与AA的发病机制,且和其他免疫性疾病有相关性,如类风湿性关节炎等。同时也表明脑恶性肿瘤缺失基因1(deleted in malignant brain tumors,DMBT1)可能与严重斑秃有关联,韩国人群研究^[2]结果表明,DMBT1基因(P=0.003)与严重斑秃具有相关性。现在的观点表明,DMBT1基因并不是一种与免疫防御和免疫监督有关的抑癌基因,而是在免疫系统和肿瘤细胞间发生交互作用^[14]。

本研究提示仅有一个CTLA4基因与斑秃有关联,与国外结果有显著差异,造成这种发病机制的差异,认为可能有以下几点原因:首先,可能与有不同的遗传背景、地域及环境有很大的关联,存在一定的遗传异质性,也对实验组中对照者的位点与欧美人群的MAF进行比较,发现确实存在差异;其次,可能这些SNP对汉族人群的斑秃影响小,验证需要更大的样本;再次,在病例-对照研究中,是存在一定的差异性,从而导致假阴性结果,因为这是一个以医院为基础的病例对照研究,对照不能代表所有正常人群;最后,本课题主要是选择欧美人群中的斑秃易感基因进行验证,有可能这些基因不参与汉族人群的致病通路,又或者这些基因是间接的参与斑秃的发病机制。

在本课题中,以国外斑秃人群GWAS及候选基因、外显子测序发现的SNPs点为基础,选择位于不同基因上的17个显著位点,在中国汉族人群中进行验证,发现这些位点可能与中国汉族人群斑秃发病无相关性,不同人群可能存在一定的遗传异质性,进一步的研究是需要在较大的斑秃样本中进行。

参考文献

- [1] Seetharam K A. Alopecia areata: an update[J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2013, 79(5): 563-75.
- [2] Lee S, Paik S H, Kim H J, et al. Exomic sequencing of immune-related genes reveals novel candidate variants associated with alopecia universalis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53613.
- [3] Jagielska D, Redler S, Brockschmidt F F, et al. Follow-up study of the first genome-wide association scan in alopecia areata: IL13 and KIAA0350 as susceptibility loci supported with genome-wide significance [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(9): 2192-7.
- [4] El-Zawahry B M, Azzam O A, Zaki N S, et al. PTPN22 gene polymorphism in Egyptian alopecia areata patients and its impact on response to diphencyprone immunotherapy [J]. *Gene*, 2013, 523(2): 147-51.
- [5] Forstbauer L M, Brockschmidt F F, Moskvina V, et al. Genome-wide pooling approach identifies SPATA5 as a new susceptibility locus for alopecia areata [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(3): 326-32.
- [6] Redler S, Brockschmidt F F, Forstbauer L, et al. The TRAF1/C5 locus confers risk for familial and severe alopecia areata [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 162(4): 866-9.
- [7] Lu D, Chen L, Shi X, et al. A functional polymorphism in interleukin-1 α (IL1A) gene is associated with risk of alopecia areata in Chinese populations [J]. *Gene*, 2013, 521(2): 282-6.
- [8] Redler S, Albert F, Brockschmidt F F, et al. Investigation of selected cytokine genes suggests that IL2RA and the TNF LTA locus are risk factors for severe alopecia areata [J]. *Br J Dermatol*, 2012, 167(6): 1360-5.
- [9] Megiorni F, Mora B, Maxia C, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) +49AG and CT60 gene polymorphisms in Alopecia Areata: a case-control association study in the Italian population [J]. *Arch Dermatol Res*, 2013, 305(7): 665-70.
- [10] Alkhalifah A. Alopecia areata update [J]. *Dermatol Clin*, 2013, 31(1): 93-108.
- [11] Wengraf D A, McDonagh A J, Lovewell T R, et al. Genetic analysis of autoimmune regulator haplotypes in alopecia areata [J]. *Tissue Antigens*, 2008, 71(3): 206-12.
- [12] Alkhalifah A, Alsantali A, Wang E, et al. Alopecia areata update: part I. Clinical picture, histopathology, and pathogenesis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2010, 62(2): 177-88.
- [13] Ito T, Ito N, Bettemann A, et al. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(2): 623-34.
- [14] Diegelmann J, Czamara D, Le Bras E, et al. Intestinal DMBT1 expression is modulated by Crohn's disease-associated IL23R variants and by a DMBT1 variant which influences binding of the transcription factors CREB1 and ATF-2 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e77773.

Association study of alopecia areata susceptibility loci in Han Chinese population

Du Juan, Gao Jinping, Zhou Wenming

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

Abstract Objective To study the correlation between alopecia areata and the susceptibility genes identified in our previous study with Han Chinese population. **Methods** The study performed an independent replication study using 736 cases and 1 840 controls. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by salting out with saturated NaCl solution according to standard methods. The evidence for association had been obtained from former gene study. Then a fine-mapping study and genotyped the locus with an additional 17 SNPs were performed. Data were analyzed with the use of Plink 1.07 software. **Results** Only one SNP achieved nominal significance, rs3087243 ($P=0.041$, $OR=1.18$, $95\% CI=1.01\sim 1.38$). The other 16 genes (TLR1, DMBT1, CHIT1, GBP4, CIITA, IL31RA, CD96, INPPL1, MASP2, IL-13, KIAA0350, PTPN22, SPATA5, TRAF1/C5, IL1A, IL2R) failed. A further stratification analysis of alopecia areata was adopted, including the analysis of family history, the age of onset and the severity of alopecia areata. The stratification analysis revealed that the age of onset >20 years achieved nominal significance $P<0.05$ for one SNP, rs2416808 ($P=0.018$, $OR=1.35$, $95\% CI=1.05\sim 1.74$), whereas, the other results were of no statistical significance. **Conclusion** The results indicate that 17 SNPs may not be associated with AA in Han Chinese population. Further study should be performed in a larger Han Chinese samples.

Key words alopecia areata; genetics; association study; single-nucleotide polymorphism