

中国南方地区体检人群 rs9263726 等位基因频率的分析

李晓敏 张萍萍 陈泽娜 曹双燕 魏秋静 古洁若

【摘要】 目的 了解中国南方地区体检人群单核苷酸多态性 (SNP) rs9263726 位点等位基因频率。**方法** 纳入中国南方地区 191 名健康体检者, 从全血中提取 DNA, 采用 Sanger 测序法对所有 DNA 样本进行检测, 分析 rs9263726 位点等位基因频率。**结果** rs9263726 位点突变纯合子 AA 基因型频率为 1.57%, 野生纯合子 GG、突变杂合子 GA 的基因型频率分别为 87.43%、10.99%, A 等位基因携带率为 12.57%, 频率为 7.07%。GG 分型者的年龄及性别与 GA 及 AA 者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 中国南方地区健康体检者 rs9263726 位点存在突变, 该突变无年龄、性别倾向性。

【关键词】 rs9263726; 基因频率

Analysis of allele frequency of rs9263726 in physical examination population from South China Li Xiaomin, Zhang Pingping, Chen Zena, Cao Shuangyan, Wei Qiujing, Gu Jieruo. Rheumatic Department, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China
Corresponding author, Gu Jieruo, E-mail: gujieruo@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the allele frequency of single nucleotide polymorphism (SNP) rs9263726 in the physical examination population from South China. **Methods** In this study, 191 healthy individuals receiving physical examination were enrolled. DNA sample was extracted from the whole blood and subject to Sanger sequencing to detect the allele frequency of rs9263726. **Results** The allele frequency of variant homozygote A/A at rs9263726 was 1.57%, 87.43% for wild homozygote G/G, 10.99% for mutant heterozygote G/A. The allele frequency of A was 7.07%, and 12.57% for carrier frequency of A. Age and gender did not significantly differ between the individuals carrying G/G and their counterparts carrying G/A or A/A (both $P > 0.05$). **Conclusions** The mutation of allele frequency of rs9263726 was observed in the physical examination population from South China. This mutation had no age or gender preponderance.

【Key words】 rs9263726; Allele Frequency

别嘌醇是黄嘌呤氧化酶的抑制剂, 可阻止次黄嘌呤和黄嘌呤代谢为尿酸, 减少尿酸的生成, 是治疗痛风的首选药。随着药物的大量使用, 其不良反应日益突出, 主要是与用药相关的药疹情况。别嘌醇可引起中毒性表皮坏死松解症 (TEN)、重症渗出性多形红斑药疹 (SJS) 及药物超敏综合征 (HSS) 等严重皮肤不良反应 (SCAR), 发生率约 5%, 致死率高^[1]。2005 年 Hung 等^[2]首次发现台湾汉族人群 HLA-B * 58:01 等位基因与别嘌醇引起 SCAR 强相关。在中国大陆汉族人群中也随后发现这种相关性, 并且轻微型和严重型皮肤不良反应与

HLA-B * 58:01 均呈强相关^[3]。但是, 由于 HLA 分型技术及基因本身的复杂性等原因, 难以在临床检测中普及。日本研究者 Tohkin 等^[4]发现单核苷酸多态性 (SNP) rs9263726 位点 A 等位基因与别嘌醇引起 SCAR 相关, 并与 HLA-B * 58:01 呈完全连锁不平衡。因此, rs9263726 A 等位基因期望能代替 HLA-B * 58:01, 成为别嘌醇致 SCAR 的预测因子, 并指导痛风患者的用药, 而目前国内相关研究较少。为此, 本研究检测南方地区汉族体检人群 SNP rs9263726 等位基因频率, 并探讨其与性别、年龄的关系, 现报告如下。

对象与方法

一、研究对象

2013 年在我院收集 191 名籍贯为南方地区的汉族健康体检者，男 107 名，女 84 名，年龄 (46.6 ± 10.2) 岁，来自广东 143 名，其他地区 48 名。入组对象血清尿酸水平均正常。

二、方 法

1. 标本采集及资料收集

采集所有入组对象的静脉血检测 rs9263726 位点等位基因，同时记录研究对象的样本编号、性别、年龄、籍贯等资料。入组患者均已签署知情同意书。

2. rs9263726 等位基因的检测

以盐析法提取 DNA，采用 Sanger 测序法对所有 DNA 样本进行检测。将提取所得模板 DNA 行 PCR 扩增。rs9263726 序列来自 GeneBank 数据库。应用 Primer Premier 5.0 设计引物，由达安基因公司合成。引物序列如下：上游 5'-ACCCAC-TAGCTTTGTCCTC-3'；下游 5'-GTCCTTTGCC TGCA-CACCA-3'，产物长度为 370 bp。反应体系 50 μl：模板 DNA 10 μl，5 倍缓冲液 10 μl，5 mmol/L Be-tain (Sigma，美国) 8 μl，2.5 mmol/L 脱氧核糖核-甘三磷酸 (Promega，美国) 0.5 μl，10 μmol/L 上-游引物 1 μl，10 μmol/L 下游引物 0.3 μl，Taq 热-启动酶 (Sigma，美国) 0.4 μl，重蒸水 19.8 μl。PCR 扩增程序为 50℃ 预变性 3 min，95℃ 变性 15 min，94℃ 变性 30 s，55℃ 维持 40 s，72℃ 延伸 40 s，共 45 个循环，最后 72℃ 延伸 7 min，4℃ 保存。扩增产物交由苏州金唯智测序公司测序，用 ABI 3730xl DNA 分析仪的毛细管电泳和荧光染料终止技术对样品进行分析。使用生物编辑序列校准编辑器查看测序峰图。测序图底峰不高，信号较均一，无衰减信号，并与美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 比对确认目的序列。分析 SNP rs9263726 位点等位基因分型及频率，并总结其他亚洲人群 rs9263726 (G > A) 的相关研究结果。

三、统计学处理

数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用成组设计 t 检验；计数资料以频数 (构成比) 描述，组间比较采用 χ^2 检验；对基因型频率分布进行 Hardy-Wein-berg 遗传平衡检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、南方地区健康体检人群 SNP rs9263726 位点基因型确定

191 例标本测序结果如图 1 所示，野生型 (GG) 及突变型纯合子 (AA) 表现为单一峰，杂合型表现为套峰 (AG)。

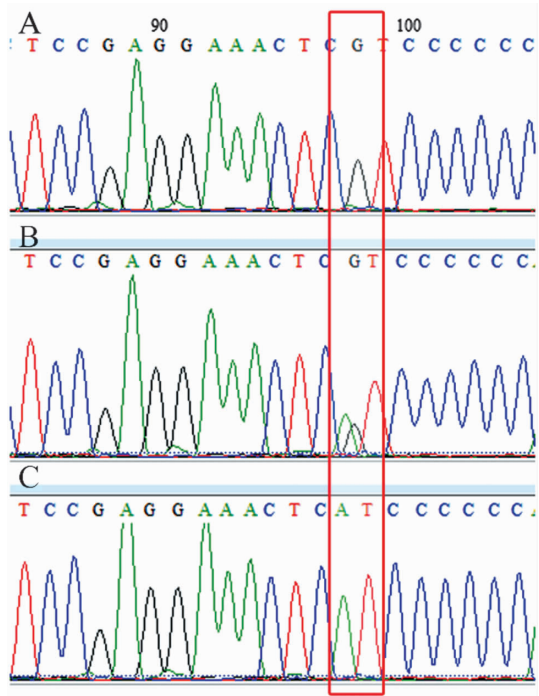


图 1 rs9263726 多态性位点测序分型测序峰图
A: rs9263726 的 GG 野生型；B: rs9263726 的 GA 突变杂合子；C: rs9263726 的 AA 突变纯合子

二、南方地区健康体检人群 rs9263726 的基因型分布

191 例标本中，GG 基因型 167 例，频率为 87.43%；GA 基因型 21 例，频率为 10.99%；AA 基因型 3 例，频率为 1.57%。G 为优势等位基因，等位基因频率为 92.93% (359/382)，携带率为 98.43 (188/191)；A 的等位基因频率为 7.07% (6/382)，携带率 12.57% (24/191)。基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($\chi^2 = 5.079$, $P = 0.079$)。

三、南方地区健康体检人群中 rs9263726 不同等位基因分型者的年龄、性别比较

因 GA 及 AA 分型较少，故将其合并计算，结果示 rs9263726 位点 GG 分型者的年龄及性别与 GA 及 AA 者比较差异无统计学意义 ($t = 0.060$, $P = 0.953$; $\chi^2 = 0.038$, $P = 0.845$)，见表 1。

表 1
南方地区健康体检人群
rs9263726 不同基因型的个体分布

基因型	例数	年龄（岁）	性别（例）	
			男	女
GG	167	46.6 ± 10.5	94	73
GA&AA	24	46.7 ± 8.0	13	11

四、中国南方地区与其他亚洲人群 rs9263726 (G > A) 的基因频率分析

目前对 rs9263726 的研究较少，且多为地区性的小群体研究，其他亚洲人群的 rs9263726 (G > A) 相关研究结果见表 2。

表 2
国内外健康志愿者
rs9263726 (G > A) 等位基因频率

地 区	例数	rs9263726 A (G > A) 等位基因频率
日本（日本人群） ^[4]	991	0.006
美国（美籍华人群） ^[5]	200	0.105
中国（汉族人群） ^[6]	99	0.141 ^a
中国（南方汉族人群） ^b	191	0.071

注：^a rs9263726-A 等位基因携带率；^b 本研究数据

讨 论

自 2005 年 Hung^[2] 等首次报道中国台湾汉族人 51 个别嘌呤致 SCAR 患者均携带 HLA-B * 58:01 基因后，陆续在多个国家包括中国香港和大陆等地区也发现 HLA-B * 58:01 与服用别嘌呤致 SCAR 强相关^[3,7]。携带 HLA-B * 58:01 等位基因的中国汉族患者服用别嘌呤发生皮肤过敏反应的风险较未携带此基因型的汉族人群风险比增加 339 倍^[3]。在中国，痛风的患病率为 0.15% ~ 1.98%，而使用别嘌呤治疗的患者中发生 HSS 大约为 1:260 (0.4%)，SCAR 发病率和致死率增加，病死率可高达 26%^[8]。

2012 年美国风湿病学会痛风指南指出中国汉族人和泰国人应用别嘌呤前应行 HLA-B * 58:01 等位基因检测^[9]。但由于 HLA 分型的血清学分型和基因分型各有不足，难以在临床工作中广泛开展。寻找替代的分子遗传标志物成为研究重点。

最近一项中国汉族人群的 HLA-B 等位基因的 药物反应和疾病风险的标签 SNP 研究中，发现 7 个 SNP 位点可标记 HLA-B * 58:01，其中的 rs9262570 (C > T) T 等位基因标记 HLA-B * 58:01

的敏感度和阴性预测值均为 100%，但其阳性预测值较低，仅 76.4%，未能排除假阳性情况^[10]。

日本的全基因组关联分析研究纳入 14 例别嘌呤 SJS/TEN 患者和 991 名健康人，也提示了 HLA-B * 58:01 和别嘌呤相关 SCAR 密切相关 (OR = 62.8, P < 0.001)^[4]。该研究也发现其他几个分别位于 BAT1、HCP5、MICC 和 PSORS1C1 基因的 SNP 与别嘌呤相关的 SJS 或 TEN 有关 (OR > 61, P < 0.001)。在 206 例日本个体分析显示，位于 PSORS1C1 基因 rs9263726 的 SNP 与 HLA-B * 58:01 呈完全连锁不平衡 (r² = 1.000, D' = 1.000)。提示 rs9263726 (G > A) 可作为预测日本人群发生别嘌呤致 SJS/TEN 的分子标志物。随后的研究采用 PCR-RFLP 法检测 rs9263726 3 种基因型，发现在日本的美籍华人 rs9263726 位点 A 等位基因频率为 0.105，远高于当地日本人群^[5]。最近，一项中国人群 rs9263726 (G > A) A 等位基因替代 HLA-B * 58:01 作为预测别嘌呤致 SCAR 发生分子标志物的可行性研究发现，HLA-B * 58:01 和 PSORS1C1 rs9263726 (G > A) 多态位点间呈强连锁不平衡 (r² = 0.902, D' = 0.966)。rs9263726 (G > A) A 等位基因用于预测该人群别嘌呤致 SCAR 发生的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 91.30%、88.89%、90.32% 和 90.00%，提示诊断效能良好^[6]。

本研究发现在中国南方地区健康体检人群中，rs9263726 (G > A) AA 突变纯合子携带率为 1.57%，A 等位基因频率达 7.07%。在 ENSEMBL 网页数据库搜索到的千人基因组计划中，北京汉族人 rs9263726 位点 A 等位基因频率为 0.087 (18 例)；而南方汉族人等位基因频率为 0.062 (13 例)，远高于日本人群的等位基因频率 0.014 (3 例)，且与本研究结果相符合。在 Allele frequencies 数据库搜索到中国南方汉族人 HLA-B * 58:01 的等位基因频率为 0.089 (284 例)，与 rs9263726 位点 A 等位基因频率相近。本研究中，野生型和突变型纯合子与杂合子比例在性别上无差异，提示该位点突变无性别倾向性。

目前 rs9263726 (G > A) 与 HLA-B * 58:01 的关联分析尚少，样本量不大。若 rs9263726 位点 A 等位基因与 HLA-B * 58:01 的连锁不平衡关系在其他人群也能得到证实，那么，相对易分型的 rs9263726 (G > A) A 等位基因可望成为临床预测别嘌呤致 SCAR 风险的替代分子遗传标志物。

参 考 文 献

- [1] 周晓明. 药物超敏综合征 12 例临床分析. 新医学, 2007, 38 (4): 240-242.
- [2] Hung SI, Chung WH, Liou LB, Chu CC, Lin M, Huang HP, Lin YL, Lan JL, Yang LC, Hong HS, Chen MJ, Lai PC, Wu MS, Chu CY, Wang KH, Chen CH, Fann CS, Wu JY, Chen YT. HLA-B * 5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (11): 4134-4139.
- [3] Cao ZH, Wei ZY, Zhu QY, Zhang JY, Yang L, Qin SY, Shao LY, Zhang YT, Xuan JK, Li QL, Xu JH, Xu F, Ma L, Huang HY, Xing QH, Luo XQ. HLA-B * 58:01 allele is associated with augmented risk for both mild and severe cutaneous adverse reactions induced by allopurinol in Han Chinese. *Pharmacogenomics*, 2012, 13 (10): 1193-1201.
- [4] Tohkin M, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kurose K, Nishikawa J, Hasegawa R, Aihara M, Matsunaga K, Abe M, Furuya H, Takahashi Y, Ikeda H, Muramatsu M, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z; Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium. A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Pharmacogenomics J*, 2013, 13 (1): 60-69.
- [5] Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y. Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B * 58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27 (4): 447-450.
- [6] 熊艳. 中国人群别嘌醇致严重皮肤不良反应的遗传标志物研究. 中南大学, 2014.
- [7] Chiu ML, Hu M, Ng MH, Yeung CK, Chan JC, Chang MM, Cheng SH, Li L, Tomlinson B. Association between HLA-B * 58:01 allele and severe cutaneous adverse reactions with allopurinol in Han Chinese in Hong Kong. *Br J Dermatol*, 2012, 167 (1): 44-49.
- [8] Yeo SI. HLA-B * 5801: utility and cost-effectiveness in the Asia-Pacific Region. *Int J Rheum Dis*, 2013, 16 (3): 254-257.
- [9] Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh MK, Neogi T, Pillinger MH, Merill J, Lee S, Prakash S, Kaldas M, Gogia M, Perez-Ruiz F, Taylor W, Lioté F, Choi H, Singh JA, Dalbeth N, Kaplan S, Niyar V, Jones D, Yarows SA, Roessler B, Kerr G, King C, Levy G, Furst DE, Edwards NL, Mandell B, Schumacher HR, Robbins M, Wenger N, Terkeltaub R; American College of Rheumatology. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic non-pharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64 (10): 1431-1446.
- [10] Liu X, Sun J, Yu H, Chen H, Wang J, Zou H, Lu D, Xu J, Zheng SL. Tag SNPs for HLA-B alleles that are associated with drug response and disease risk in the Chinese Han population. *Pharmacogenomics J*, 2015, 15 (5): 467-472.

(收稿日期: 2015-11-20)

(本文编辑: 林燕薇)

