

广西壮族人群骨桥蛋白基因位点 rs4754 多态性研究^①

陈善萍¹, 韦宝斌¹, 郭钊², 徐冲¹, 韦贵将³, 王俊利³②

(1. 右江民族医学院医学检验学院 2013 级, 广西 百色 533000

E-mail: 1308104223@qq.com;

2. 右江民族医学院医学检验学院 2011 级, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 分析骨桥蛋白基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点 rs4754 的各等位基因和基因型在广西壮族人群中的分布频率, 以及对比其在不同种族中的分布差异。 **方法** 采用 SNaPshot SNP 的分型技术检测 150 例广西壮族人群骨桥蛋白基因 SNP 位点 rs4754 基因型, 并对比国际人类基因组单倍型图谱计划(HapMap)上欧洲人群、非洲人群、日本人群以及北京人群的骨桥蛋白基因 SNP 分型数据, 分析这几个人群的骨桥蛋白基因 SNP 位点 rs4754 的等位基因和基因型频率差异。 **结果** 在广西壮族人群中存在骨桥蛋白基因 rs4754 多态性, 骨桥蛋白基因 rs4754 位点的等位基因和基因型频率在广西壮族人群中与在欧洲人群、非洲人群、日本人群及中国北京人群中差异均具有统计学意义($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 骨桥蛋白基因 SNP 位点 rs4754 等位基因和基因型在广西壮族人群中的分布频率与其他地区人群相比存在差异, 不同种族间骨桥蛋白相关疾病临床表现及发病率的差异可能是种族间的差异导致的。

关键词: 骨桥蛋白; 单核苷酸多态性; 种族

中图分类号: R394.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)01-0006-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2017.01.002

The osteopontin genetic polymorphism of rs4754 locus in Guangxi Zhuang population

Chen Shanping¹, Wei Baobin¹, Guo Zhao², Xu Chong¹, Wei Guijiang³, Wang Junli³

(1. Undergraduate Student of Grade 2013, School of Medical Laboratory Science, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000 Guangxi, China E-mail: 1308104223@qq.com;

2. Undergraduate Student of Grade 2011, School of Medical Laboratory Science, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000 Guangxi, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000 Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To analyze the distribution frequencies of the allele gene and genotype at osteopontin gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) of rs4754 locus in Guangxi Zhuang population, and to compare the racial distribution difference. **Methods** A SNaPshot SNP typing detection technology was used to genotype the osteopontin gene SNP in locus rs4754 in 150 cases of Guangxi Zhuang population, and compared the distribution frequencies with the international human genome haplotype map project (HapMap) on European populations, African populations, the Japanese populations and Beijing populations SNP points data and the analysis of gene and genotype frequency differences of osteopontin gene SNPs of locus rs4754 among these populations was done. **Results** Osteopontin gene polymorphisms of rs4754 locus existed in Guangxi Zhuang population, comparing the allele and genotype frequencies of osteopontin gene at locus rs4754 between Guangxi

① **基金项目:** 国家自然科学基金(81560461), 广西自然科学基金(2012GXNSFBA053121), 2015 年度广西高校科学技术研究项目重点课题(KY2015ZD094)

② **通信作者,** E-mail: baiseswangjunli@163.com

Zhuang population and European populations, African populations, the Japanese populations and the Chinese Beijing population showed that there were statistically significant differences ($P < 0.001$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The allele and genotype distribution frequencies in osteopontin gene SNPs of locus rs4754 in Zhuang Guangxi population differed from other regions populations. The differences of clinical manifestations and incidence of osteopontin-related diseases among different races may be due to the racial differences.

Key words: osteopontin; single nucleotide polymorphism; race

骨桥蛋白(OPN)是一种酸性分泌型糖蛋白,具有亲水性且带负电荷,并表达于上皮细胞及骨组织中,于染色体4q13位点上有其编码基因,同时具备很多种生物学功能,与肿瘤细胞的迁移、浸润、粘附、肿瘤的微环境和血管新生有着密切的联系并在其中起着很重要的作用^[1]。研究发现在人类的肿瘤组织或其血浆中出现OPN过量表达以及OPN基因异常扩增现象^[2]。近年来随着分子流行病学及分子生物学的不断发展,从新的研究中可知OPN基因存在多种功能性多态性位点,且这些多态性位点可能与甲状腺乳头状瘤、鼻咽癌及尿路结石等多种疾病的发展进程相关^[3-4]。因此,研究OPN基因多态性在不同种族间的异同能为OPN的进一步研究以及相关的一些疾病的发展提供有利的实验依据。为此,我们采用SNaPshot SNP分型技术检查150例广西壮族人群OPN基因rs4754位点的遗传多态性,并将结果与HapMap公布的四个人群(欧洲、非洲、日本和北京人群)的SNP检测结果作对比,从而分析不同人种OPN基因的SNP差异,为与OPN相关的遗传和疾病等方面的研究提供实验资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择于右江民族医学院附属医院体检健康者作为研究对象(时间:2012年1月—8月,人数:150名,男性:87名,女性:63名)。入选的研究对象均为广西壮族人群,籍贯为广西且长期居住于广西。年龄范围为25~84岁,各项实验室检查以及临床检查指标均为正常。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 抽取研究对象的静脉血2 ml,使用碘化钠法提取细胞基因组的DNA,于低温下保存待用。

1.2.2 PCR反应 根据NCBI上查找的OPN的DNA序列,选择含有rs4754位点的序列,并通过输入引物设计软件Primer Premier 5.0,得到用于特异性扩增含有rs4754位点OPN基因的PCR上游引物、下游引物及延伸引物。rs4754位点的上游引物序列为:5'-TTCCCGGCCATCTTAATTTTCA-3',下游引物序列为:5'-AAAACCTTCGGTTGCTGGCAGGT-

3',延伸引物序列为:5'-TTTTTTTTTTTTTTT-GAGTCCTGGCTGTCCACATGGTC-3'。PCR扩增反应体系包括:0.3 mmol/L dNTPs 2.0 μ l,10 \times PCR反应缓冲液2.0 μ l,上游引物1.0 μ l,下游引物1.0 μ l,基因组DNA为1.0 μ l,Hotstart Taq DNA聚合酶为1.0 U,不足体积用水补充到20 μ l。PCR产物在4 $^{\circ}$ C下保存。PCR反应的条件为:94 $^{\circ}$ C,15 min;94 $^{\circ}$ C \times 30 s,60 $^{\circ}$ C \times 30 s,72 $^{\circ}$ C \times 20 s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C \times 10 min。PCR产物在4 $^{\circ}$ C下保存。

1.2.3 SNaPshot SNP分型技术 PCR产物经过外切酶I和虾碱酶纯化后,应用ABI公司的SNaPshot Multiplex kit进行延伸实验。延伸产物使用虾碱酶纯化之后在ABI3130XL上样。SNP分型采用Gene Mapper 4.0(Applied Biosystems)来分析。

1.3 统计学方法 计算OPN基因rs4754位点的等位基因和基因型频率(依据测序的结果直接计算),登陆NCBI查找HapMap公布的四个人群(欧洲、非洲、日本和北京人群)OPN基因rs4754位点分型结果,应用SPSS 17.0软件进行 χ^2 检验计算,并对比四个人群与广西壮族人群的基因型和等位基因频率差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN基因rs4754位点的检测结果 包含OPN基因rs4754位点的PCR扩增产物片段大小为244 bp。ABI 3130XL的SNP分型结果表明,rs4754位点的基因型有三种,分别为CC、TT和CT。

2.2 广西壮族人群中OPN基因多态性的分布 150例样本的OPN基因rs4754位点的等位基因和基因型频率符合Hardy-Weinberg平衡,表明研究对象可以代表中国广西地区人群OPN基因多态性分布情况,rs4754位点的统计结果如表1所示。在广西壮族人群中,OPN基因rs4754位点的CC基因型是最常见的,约为57.33%;C等位基因型的频率是最高的,约为76.33%。OPN等位基因及基因型频率的男女组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 广西壮族人群OPN基因多态性与其他四个人群的对比 通过对比广西壮族人群OPN基因多态性

和欧洲人群等四个人群的 OPN 基因多态性可以发现, OPN 基因 rs4754 位点的等位基因和基因型频率在广西壮族人群中与在欧洲人群、非洲人群、日本人群

及中国北京人群中差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。比较结果如表 2 所示。

表 1 广西壮族人群中骨桥蛋白基因 rs4754 位点的分布 ($n, \%$)

组别	n	基因型频率			χ^2	P	等位基因频率		χ^2	P
		CC	CT	TT			C	T		
男	87	47(54.02)	37(42.53)	3(3.45)	2.173	0.337	131(75.29)	43(24.71)	0.251	0.616
女	63	39(61.90)	20(31.75)	4(6.35)			98(77.78)	28(22.22)		
合计	150	86(57.33)	57(38.00)	7(4.67)			229(76.33)	71(23.67)		

表 2 广西壮族人群与不同人群骨桥蛋白 rs4754 位点多态性的比较 ($n, \%$)

组别	n	基因型频率			χ^2	P	等位基因频率		χ^2	P
		CC	CT	TT			C	T		
欧洲人群	226	16(7.08)	70(30.97)	140(61.95)	160.916	<0.001	102(22.57)	350(77.43)	211.543	<0.001
非洲人群	226	6(2.66)	46(20.35)	174(76.99)	218.383	<0.001	58(12.83)	394(87.17)	308.113	<0.001
日本人群	172	56(32.56)	96(55.81)	20(11.63)	21.134	<0.001	208(60.49)	136(39.53)	18.500	<0.001
中国北京人群	86	34(39.53)	38(44.19)	14(16.28)	12.209	0.002	106(61.63)	66(38.37)	11.476	0.001
广西壮族人群	150	86(57.33)	57(38.00)	7(4.67)			229(76.33)	71(23.67)		

3 讨论

OPN 是一种分泌型钙结合的磷酸化糖蛋白,它可以在许多细胞和正常组织中表达,包括肾脏、骨骼、血管、活化的巨噬细胞及淋巴细胞等。人类 OPN 基因包含 6 个内含子和 7 个外显子,蛋白相对分子质量约为 44×10^3 ,且 OPN 蛋白中含有一个特殊序列[精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGU)],该序列与细胞黏附功能相关,同时其含有凝血酶作用位点,可被凝血酶分解暴露出隐秘的 C 末端以及整合素结合基序,从而可以与细胞外基质中整合素 CD44v6、91、41 结合,参与肿瘤细胞的浸润与转移^[5]。

众多研究发现,OPN 基因单核苷酸多态性与多种疾病(如冠心病、狼疮肾炎、哮喘和宫颈癌等)的发病有密切关系。如胡敏等^[6]采用对照法得出 OPN 基因 386T/C 多态位点基因变异同冠心病亚组心肌梗死的发病可能存在关联性,表明 OPN 基因与冠心病可能密切相关。徐安平等^[7]对 109 例狼疮肾炎患者采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法进行研究,研究中发现 OPN 基因 rs9250 位点多态性与狼疮肾炎明显相关,提示 OPN 基因可能是狼疮肾炎的易感基因。阳爱梅等^[8]对湖南省的 98 例哮喘患儿及 30 例非哮喘儿童(作为对照组)抽取其外周血进行 ORMDL3 基因单核苷酸多态性分析并检测 OPN 含量,最终研究发现 OPN 参与了哮喘的发生发展过程;ORMDL3 基因 rs7216389 位点并不影响 OPN 的表达,可能与气道重

塑无明显相关性。王立岩等^[9]采用 RT-PCR、ELISA、Western-blotting 法检测已构建好的 OPN 抑制的宫颈癌 HeLa 细胞模型,从而得出 OPN 基因可能通过调节 MMP-2 与 VEGF 的途径控制宫颈癌细胞的侵袭和增殖。以上研究都表明了 OPN 单核苷酸多态性与一些疾病有着密切的联系,并为一些疾病和肿瘤方面的研究提供参考数据。

本研究采用 SNaPshot SNP 的分型技术检测 150 例广西人的骨桥蛋白基因 rs4754 位点的基因型,并与 HapMap 上四个人群(欧洲、人群、日本和中国人群)的 SNP 分型数据做对比,同时对比五个人群的 OPN 基因 rs4754 位点等位基因和基因型频率差异。结果表明,OPN 基因及等位基因频率男女组间比较无明显差异,说明此位点等位基因以及基因型频率和性别是没有关系的。研究可知广西壮族人群的等位基因和基因型频率与欧洲人群、非洲人群、日本人群及中国北京人群的等位基因和基因型频率相比均存在差异明显,表明此位点等位基因以及基因型频率与种群有密切相连的关系。

总之,本研究表明广西壮族人群 OPN 基因 rs4754 位点的等位基因和基因型频率同性别没有关系,和人群的分布有关联。且研究结果提供了广西壮族人群 OPN 基因 rs4754 位点多态性分布,并对比了 SNP 在不同人种 OPN 基因的差异,为与 OPN 相关的遗传和疾病等方面的研究提供实验性资料。

参考文献:

- [1] 杨春林, 马建婷, 邵华江, 等. 20 例女性腹膜恶性间皮瘤患者血清骨桥蛋白、糖链抗原 125 的检测[J]. 肿瘤学杂志, 2015, 21(12): 1019-1022.
- [2] 何主强, 杨国平, 赵洪洋. 骨桥蛋白及整合素 β_3 亚基与脑膜瘤恶性程度相关性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2014, 19(1): 665-667.
- [3] 韦贵将, 梁丽娜, 罗桂飞, 等. 广西壮族人群骨桥蛋白基因的单核苷酸多态性研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(33): 4677-4682.
- [4] 韦贵将, 杨凤莲, 陆璐, 等. OPN 基因多态性与广西壮族人群鼻咽癌易感性的关系[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(7): 489-492.
- [5] SHARIF SA, DU X, MYLES T, et al. Thrombin-activatable carboxypeptidase B cleavage of osteopontin regulates neutrophil survival and synoviocyte binding in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(10): 2902-2912.
- [6] 胡敏, 殷民德, 于金德. 骨桥蛋白基因多态性及其与冠心病关系[J]. 中国交通医学杂志, 2005, 19(5): 433-435.
- [7] 徐安平, 梁艳仪, 吕军, 等. 骨桥蛋白基因多态性与狼疮肾炎的相关性研究[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(9): 1348-1351.
- [8] 阳爱梅, 黄榕, 金世杰. 湖南省 98 例哮喘儿童 ORMDL3 基因多态性分析及与 OPN、TGF- β 1 水平相关性探讨[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(4): 324-328.
- [9] 王立岩, 王雪, 郝筱诗, 等. OPN 基因抑制对宫颈癌 Hela 细胞生长侵袭影响与 VEGF 和 MMP-2 关系[J]. 临床医药文献杂志, 2015, 2(7): 1217-1218.

收稿日期: 2016-02-05; 修回日期: 2017-01-13

《右江民族医学院学报》采编系统启用通告

为适应信息化时代期刊发展的需要, 缩短审稿流程, 加快稿件处理速度, 方便作者投稿和专家审稿, 本刊自 2015 年 10 月 1 日起至 2015 年 10 月 31 日期间试运行期刊采编系统, 2015 年 11 月 1 日起正式投入使用。

登录本刊网站 <http://yjmyxy.cnjournals.com/> 即可进入采编系统平台进行投稿或审稿。该采编系统平台由作者在线投稿、专家在线审稿、主编在线办公和编辑在线办公四部分组成。作者进行在线投稿并可查询稿件的处理进度, 审稿专家从专家登录口进入审稿中心可进行稿件审阅。试运行期间作者可使用原学报投稿邮箱 yyxb1979@126.com, 自 2015 年 11 月 1 日起正式启用期刊采编系统后, 学报投稿邮箱停止使用投稿功能。敬请广大读者、投稿作者、审稿专家使用本系统, 并向编辑部反馈意见, 以不断对系统进行改进。如您在操作上遇到任何问题, 请与编辑部联系: 0776-2843414。感谢您对本刊的关注与支持! 欢迎踊跃投稿!



扫一扫

《右江民族医学院学报》编辑部