

# 大骨节病患者 12 号染色体 7 个 STR 位点基因频率分析

康龙丽 郭雄 左弘 平智广 张宝弟 赖江华 耿冬

**【摘要】** 目的 分析大骨节病患者、病区内对照人群和非病区外对照人群 12 号染色体上 7 个短串联重复序列 (STR) 位点的多态性。方法 采用荧光标记基因扫描方法, 对 12 号染色体上 D12S1718、D12S1675、D12S358、D12S367、D12S1638、D12S1646 和 D12S1682 位点在陕西省永寿县、榆林地区大骨节病区患者和病区内对照人群及咸阳地区非病区外对照人群中的多态性进行分析, 计算相应人群中 7 个位点的基因频率、基因型频率, 并对各组间基因频率进行  $\chi^2$  检验。结果 D12S1718、D12S1675、D12S358、D12S367、D12S1638、D12S1646 和 D12S1682 位点在大骨节病患者中分别检出 4、7、7、8、5、5 和 7 个等位基因, 5、12、13、11、10、9 和 13 个基因型; 在病区内对照人群中分别检出 4、9、7、6、6、6 和 8 个等位基因, 5、10、12、14、12、9 和 13 个基因型; 在非病区外对照人群中分别检出 7、9、7、7、5、8 和 11 个等位基因, 9、16、17、16、12、15 和 20 个基因型; 各组间基因频率进行比较, 在 D12S367 位点和 D12S1638 位点, 患者与病区内对照 (D12S367:  $P=0.034$ ; D12S1638:  $P=0.041$ ) 及非病区外对照间 (D12S367:  $P=0.029$ ; D12S1638:  $P=0.028$ ) 均有显著性差异; 在 D12S1646 位点, 患者与病区内对照间无差异 ( $P=0.446$ ), 但病区人群与非病区外对照间有差异 (患者-非病区外对照:  $P=0.036$ ; 病区内对照-非病区外对照:  $P=0.039$ )。结论 大骨节病患者 12 号染色体的 7 个 STR 位点中 D12S367 和 D12S1638 等位基因分布显著不同于病区与非病区正常人。

**【关键词】** 大骨节病; 短串联重复序列; 12 号染色体

**Analysis on allele frequencies of 7 short tandem repeat loci of Kashing-Beck disease patients on chromosome 12** KANG Long-li, GUO Xiong, ZUO Hong, PING Zhi-guang, ZHANG Bao-di, LAI Jiang-hua, GENG Dong. The State Key Laboratory of Environment and Disease Gene, Institute of Endemic Disease, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: GUO Xiong, Email: Guox@mail.xjtu.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To analyze the allele frequencies of 7 short tandem repeat (STR) loci (D12S1718, D12S1675, D12S358, D12S367, D12S1638, D12S1646 and D12S1682) on chromosome 12 among Kashing-Beck disease (KBD) patients and the control population living in the KBD areas and non-KBD area. **Methods** EDTA-blood specimens were collected from 102 unrelated individuals of Chinese Han population in Shaanxi province including 29 KBD patients, 30 controls living in the KBD area and 43 living in the non-KBD area. DNA samples were extracted using the Wizard Genomic DNA purification kit (<http://www.Promega.com>) and were amplified by polymerase chain reaction (PCR) technique. The PCR products were analyzed by ABI 3100 Genetic Analyzer. **Results** (1) In KBD patients group, the allele number for 7 STR loci were 4, 7, 7, 8, 5, 5 and 7, the genotype number were 5, 12, 13, 11, 10, 9 and 13; (2) In the control population living in KBD area, the allele number for 7 STR loci were 4, 9, 7, 6, 6, 6 and 8, the genotype number were 5, 10, 12, 14, 12, 9 and 13; (3) In the control population living in the non-KBD area, the allele number for 7 STR loci were 7, 9, 7, 7, 5, 8 and 11, the genotype number were 9, 16, 17, 16, 12, 15 and 20; (4) Compared with the allele frequencies among three groups, there were significant differences between KBD patients and the controls living in the KBD area (D12S367:  $P=0.034$ ; D12S1638:  $P=0.041$ ) and the controls living in the non-KBD area (D12S367:  $P=0.029$ ; D12S1638:  $P=0.028$ ) in the D12S367 and D12S1638 loci; (5) There were significant differences among KBD patients ( $P=0.036$ ), controls living in the KBD area ( $P=0.039$ ) and controls living in the non-KBD area

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371252); 西藏自治区科技厅重点资助项目 (05-53); 西藏民族学院基金课题 (05MY11)

作者单位: 710061 西安交通大学环境与疾病相关基因教育部重点实验室环境与地方病研究所

第一作者现工作单位: 712082 咸阳, 西藏民族学院医学系 (康龙丽)

通讯作者: 郭雄, Email: Guox@mail.xjtu.edu.cn

in the D12S1646. **Conclusion** There was significant difference between KBD patients and the controls in the D12S367 and D12S1638 loci.

**[Key words]** Kashing-Beck disease; Short tandem repeats; Chromosome 12

大骨节病(Kashing-Beck disease, KBD)是一种严重危害人民身体健康的地方性畸形性骨关节病,主要分布在我国从东北到西南的低硒地带,现有患者80.87万,10 734.02万人口受威胁。目前我国西部地区患病最严重<sup>[1]</sup>,西藏地区儿童的患病率为18.69%~51.52%,青海省为29.63%~38.28%,陕西省为14.04%~21.10%。四肢透明软骨发生细胞变性、坏死及继发性改变是该病发生的关键环节。长期以来认为该病的软骨细胞退变是环境有害因素所致,曾提出硒缺乏、粮食真菌污染及其毒素中毒和饮水中有机物中毒等多种环境病因假说<sup>[2,3]</sup>。但近年的研究提示,KBD环境中的有害因素,如低硒、低碘、粮食真菌毒素等均有致DNA损伤和突变的作用<sup>[4-9]</sup>。

国外报道骨关节病的发生与Ⅱ型胶原基因突变有关<sup>[10-12]</sup>。Ⅱ型胶原基因位于12号染色体。根据KBD与骨关节病有相似的软骨病变,加之已获得的骨关节病易感基因、KBD软骨胶原表型表达及细胞分化异常、凋亡与软骨细胞退变<sup>[13-16]</sup>,及KBD发生有一定程度的家庭聚集倾向的研究结果<sup>[15,17]</sup>,我们拟定12号染色体短串联重复序列(short tandem repeat, STR)基因扫描和软骨主要胶原COL2A易感性两个方面筛选致软骨细胞退变的相关基因,以进一步进行候选基因的克隆、表达。

## 材料与方法

1. 病区、研究对象的选择:根据KBD病区判定和划分标准(GB 16395-1996)以及1978年陕西省KBD病区临床患病率,在KBD中度病区(临床患病率为10%~20%)和重度病区(临床患病率>20%)的陕西省永寿县南邵村和榆林地区榆阳区调查450例。以年满18岁为界,将调查对象分为成人和儿童两个年龄段。选择其中102例,分为三个组,即KBD组29例(男14,女15;1组),其中儿童患者为20例(男10,女10),成人患者9例(男4,女5);病区健康内对照组30例(男14,女16;2组),其中儿童24例(男11,女13);成人6例(男3,女3)和非病区健康外对照组43例(男21,女22;3组),其中儿童23人(男10,女13),成人20人(男10,女10)。成人

病例和病区健康内对照选自陕西省永寿县南邵村(成人KBD患病率为39.58%),儿童病例和病区健康内对照选自榆林地区榆阳区(7~12岁儿童X线阳性检出率为17.62%),非病区成人和儿童健康外对照组选自陕西省咸阳市渭城区农村。成人组年龄为(38.02±11.33)岁,儿童组年龄为(10.60±1.74)岁。

2. 诊断标准:所有病例与对照均进行临床和右手正位X线拍片检查,按照参考文献[18]进行诊断或排除诊断。健康对照组需排除其他骨关节系统疾病患者。KBD组中20名儿童患者X线片显示骨端阳性改变13例;无明显临床表现,掌指骨和干端阳性改变4例;骨端(++)改变1例;三联症2例。成人I度患者有3例,II度患者有6例。

3. 标本收集及DNA提取:采集每例观察对象静脉血2 ml,乙二胺四乙酸二钠(EDTA)抗凝备用。采用Wizard Genomic DNA Purification Kit(美国Promega公司)提取外周血基因组DNA,按试剂盒说明操作,定量稀释为50 ng/μl备用。

4. 多态位点及引物:所选用的7个多态位点来源于美国人类连锁合作中心(CHLC)研制的人类基因组扫描引物组。这7个STR位点均为2个单核苷酸重复序列。用来扩增这7个多态位点的荧光标记引物及试剂购自美国ABI公司。

5. PCR扩增:反应体系为15 μl,其中基因组DNA 1.2 μl(50 ng/μl),1 μl引物混合液,等位基因PCR混合液9 μl(包括PCR缓冲液,2.5 mmol/L dNTP混合液,Taq DNA聚合酶5 U/μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>),双蒸水3.8 μl。反应条件为:95℃预变性12 min,然后进行94℃变性15 s,55℃ 15 s,72℃退火30 s,循环10个周期;89℃退火15 s,55℃延伸15 s,72℃延伸30 s,循环20个周期;最后在72℃延伸10 min,4℃冰箱避光保存。

6. 扩增产物的电泳及等位基因分型:取Hi-Di甲酰胺(去离子甲酰胺)9 μl,GS-500Liz分子量标准0.5 μl,每个样本7个引物扩增产物混和后取0.5 μl,95℃变性3 min后迅速放入冰盒,放入ABI 3100遗传分析仪进行基因扫描,用GeneScan Analysis 3.7和Genotyper 3.7软件进行检测分型。

7. 统计学分析:用直接计数法计算各基因座的基因型、等位基因频率。采用  $\chi^2$  检验进行组间等位基因频率比较。采用 SPSS 11.0 软件分析。

**结 果**

1. 等位基因及基因型频率: 12 号染色体上 D12S1718、D12S1675、D12S358、D12S367、D12S1638、D12S1646 和 D12S1682 位点在 KBD 患者分别检出 4、7、7、8、5、5 和 7 个等位基因, 5、12、13、11、10、9 和 13 个基因型; 在病区正常人群中分别检出 4、9、7、6、6、6 和 8 个等位基因, 5、10、12、14、12、9 和 13 个基因型; 在非病区正常人群中分别检出 7、9、7、7、5、8 和 11 个等位基因, 9、16、17、16、12、15 和 20 个基因型; 各等位基因片段的大小、基因频率见表 1。

2. 7 个 STR 位点上等位基因频率在三组间的比较: 将各组间 7 个 STR 位点上基因频率进行比较, 在 D12S367 位点和 D12S1638 位点, 患者与病区

正常组(D12S367:  $P=0.034$ ; D12S1638:  $P=0.041$ ) 及非病区正常组间(D12S367:  $P=0.029$ ; D12S1638:  $P=0.028$ ) 差异均有统计学意义; 在 D12S1646 位点, 患者与病区正常组间无差异( $P=0.446$ ), 但病区人群与非病区人群间有差异(患者-非病区正常组:  $P=0.036$ ; 病区正常组-非病区正常组:  $P=0.039$ )(表 2)。

**讨 论**

疾病相关基因的定位与克隆是人类基因组计划的重要组成部分, 基因组扫描是目前定位疾病基因最常用的方法<sup>[19]</sup>。STR 作为第二代遗传标记, 与限制性片段长度多态性及单核苷酸多态性相比, 主要优势是具有高度信息度。衡量一个遗传标记是否具有高度信息度的主要指标是杂合度( $H$ )和多态信息含量(PIC)<sup>[20]</sup>。一般说来, 当  $PIC > 0.50$  时, 标记具有高度的可提供信息性; 当  $0.50 < PIC < 0.25$  时, 标记能够较合理的提供信息; 当  $PIC < 0.25$ , 标记可提

表1 三组人群在 12 号染色体上 7 个 STR 位点等位基因频率

等位基因 频率	D12S1718			D12S1675			D12S358			D12S367						
	片段 (bp)	患者	病区 正常组	非病区 正常组	片段 (bp)	患者	病区 正常组	非病区 正常组	片段 (bp)	患者	病区 正常组	非病区 正常组				
1	153	-	-	0.0116	167	0.0192	-	-	255	-	0.0185	-	135	-	-	0.0476
2	155	-	-	0.0349	211	0.0000	-	0.0125	257	-	-	0.0122	137	0.0192	0.0667	0.0595
3	157	0.1071	0.1207	0.1628	213	0.4808	0.5893	0.4375	259	0.3036	0.2778	0.2805	139	0.2692	0.2500	0.1905
4	159	0.0357	-	0.0581	215	-	0.0179	0.0375	261	0.1071	0.1482	0.1220	141	0.2500	0.1000	0.1190
5	161	0.8036	0.8276	0.6628	217	-	0.0179	0.0375	263	0.1786	0.1852	0.2349	143	0.1154	0.3333	0.2262
6	163	0.0536	0.0345	0.0581	219	0.2885	0.2679	0.2375	265	0.2857	0.3333	0.1951	145	0.2885	0.2167	0.3452
7	165	-	0.0172	0.0116	221	0.0385	0.0179	0.0250	267	0.0536	0.0185	0.0976	147	-	-	0.0119
8					223	0.0385	0.0179	0.0625	269	0.0179	0.0185	0.0488	149	0.0192	-	-
9					225	0.0192	0.0179	0.0250	271	0.0179			157	0.0192	-	-
10					227	0.1154	0.0359	0.1250			-	-	159	-	0.0333	-
11					229	-	0.0179	-					161	0.0192	-	-
合计		1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000

  

等位基因 频率	D12S1682			D12S1646			D12S1638					
	片段 (bp)	患者	病区 正常组	非病区 正常组	片段 (bp)	患者	病区 正常组	非病区 正常组	片段 (bp)	患者	病区 正常组	非病区 正常组
1	136	0.0227	-	0.0357	247	-	0.0333	-	201	-	0.0333	-
2	138	0.0682	0.0345	0.0238	251	0.0526	0.0333	-	209	0.3810	0.1833	0.1585
3	140	-	0.0862	0.1548	253	0.2368	0.2167	0.2048	211	0.0476	0.0333	0.0244
4	142	0.1818	0.1724	0.1667	255	0.3158	0.3833	0.4578	213	0.0952	0.2667	0.2195
5	144	0.3182	0.2931	0.1905	257	0.1579	0.1667	0.1084	215	0.4048	0.3333	0.4268
6	146	0.2727	0.2931	0.2381	259	-	-	0.0482	217	0.0714	0.1500	0.1707
7	148	0.0909	0.0862	0.0714	261	0.2368	0.1667	0.0964				
8	150	0.0455	0.0172	0.0476	263	-	-	0.0602				
9	152	-	0.0172	0.0357	265	-	-	0.0241				
10	154	-	-	0.0119								
11	160	-	-	0.0238								
合计		1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000

表2 12 号染色体上 7 个位点基因频率在三组人群间的比较( $\chi^2$  检验)

等位基因位点	患者-病区正常组	患者-非病区正常组	病区正常组-非病区正常组
D12S1718	0.3613	0.3130	0.0750
D12S1675	0.0790	0.3560	0.3080
D12S358	0.1480	0.2500	0.1390
D12S367	0.0340*	0.0290*	0.1590
D12S1638	0.0410*	0.0280*	0.5280
D12S1646	0.4460	0.0360*	0.0390*
D12S1682	0.2790	0.1780	0.3410

\*  $P < 0.05$

供的信息性较差。7 个 STR 基因座除了 D12S1718 ( $H = 0.4428, PIC = 0.3034$ ) 外,其他 6 个位点杂合度值  $H$  在 0.6610~0.8239,多态信息量 PIC 在 0.6604~0.8117,属于人类高识别能力遗传标记系统。基因型的观察值与期望值均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律( $P > 0.05$ )(数据待发表)。说明所选 7 个 STR 位点用于定位疾病基因及连锁分析是可行的。

本实验将三个组间 7 个 STR 位点上基因频率进行比较,在 D12S1646 位点,患者与病区正常组间无差异( $P = 0.446$ ),但病区人群与非病区人群间有差异(患者-非病区正常组: $P = 0.036$ ;病区正常组-非病区正常组: $P = 0.039$ )。说明此差异是由于 D12S1646 基因在不同人群间分布的多态性所致,与 KBD 的发生无关。在 D12S367 位点和 D12S1638 位点,患者与病区正常组(D12S367: $P = 0.034$ ;D12S1638: $P = 0.041$ )及非病区正常组间(D12S367: $P = 0.029$ ;D12S1638: $P = 0.028$ )均有显著性差异;以上结果提示,在 D12S367 位点和 D12S1638 位点,KBD 患者与病区正常及非病区正常人群间存在显著性差异。然而,是否环境有害因素会导致患者遗传易感性发生改变,需要进一步扩大样本例数及进行核心家系研究,从而为 KBD 发生机理及防治研究提供科学依据。

(感谢陕西省永寿县地方病研究所、榆林地区地方病研究所和咸阳地区地方病研究所协助采集血样)

参 考 文 献

1 全国大骨节病监测组. 2002 年全国大骨节病病情监测总结报告. 中国地方病学杂志,2002,21:368-370.  
 2 Allander E. Kashin-Beck disease: An analysis of research and public

health activities based on a bibliography 1849 - 1992. Scand J Rheumatol Suppl,1994,99:1-36.  
 3 杨建伯. 真菌毒素与大骨节病. 中国地方病学杂志,2002,21:314-317.  
 4 周令望,钟学宽,高彦辉,等. 低硒致乳鼠心肌细胞凋亡的实验研究. 中国地方病学杂志,1999,18:422-424.  
 5 El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. Mutat Res,2001,18:123-139.  
 6 Moreno-Reyes R, Suetens C, Mathieu F, et al. Kashin-Beck Osteoarthropathy in Rural Tibet in Relation to Selenium and Iodine Status. N Engl J Med,1998,339:1112-1120.  
 7 Giray B,Hincal F. Oxidative DNA base damage,antioxidant enzyme activities and selenium status in highly iodine-deficient goitrous children. Free Radic Res,2002,36:55-62.  
 8 莫东旭. T-2 毒素、MON 和硒对中国小香猪罹患骨软骨病的影晌. 中国地方病学杂志,1996,11:130-133.  
 9 杨天府,贾志强,沈彬. T-2 毒素致胎儿软骨细胞凋亡的观察. 中国地方病学杂志,2001,20:84-86.  
 10 Aigner T, Bartnik E, Zine A, et al. Functional genomic of Osteoarthritis. Pharmacogenomics,2002,3:635-650.  
 11 Khonry MJ. Human genome epidemiology (HuGE): Translating advances human genetics in population based date for medicine and public health. Genet,1999,1:71-74.  
 12 Meulenbelt I, Bijkerk C, De Wildt Sc, et al. Haplotype analysis of three polymorphism of col2A1 gene and association with generalized radiological osteoarthritis. Ann Hum Genet,1999,63:393-400.  
 13 杨璐,郭雄,张增铁,等. 大骨节病患者关节软骨细胞凋亡及相关调控因子 Bcl-2 表达分布的特点. 中国地方病学杂志,2002,21:341-343.  
 14 郭雄,Angner T,Lanmi P,等. 大骨节病关节软骨胶原表型表达和软骨细胞异常分化的研究. 中国病理学杂志,1998,27:19-22.  
 15 Guo X, Yang YN. Occurrence characteristic of Kashin- Beck disease based on nuclear family pedigrees. J Xi'an Med Univ,2003,15:34-37.  
 16 Khoury MJ,Flanders WD. Nontraditional epidemiologic approaches in the analysis of gene-environment interaction: case-control studies with no controls. Am J Epidemiol,1996,144:207-213.  
 17 平智广,郭雄,王福歧,等. 大骨节病核心家庭发病特点的流行病学研究. 中华流行病学杂志,2004,25:848-851.  
 18 杨建伯,王志武,刘铺先,等. 大骨节病诊断标准. 中国地方病学杂志,1994,13:309-317.  
 19 况少青,张宇舟,陈竺. 基因组扫描——遗传病相关基因定位的有力工具. 医学遗传学,1997,14:99-103.  
 20 李生斌,赖江华,高树辉,等. 中国五个民族 STR 位点遗传多态性(2). 遗传学报,2000,27:1035-1041.

(收稿日期:2004-11-16)

(本文编辑:孙强正)