

# 新疆地区维吾尔族与汉族强直性脊柱炎患者的差异性基因表达

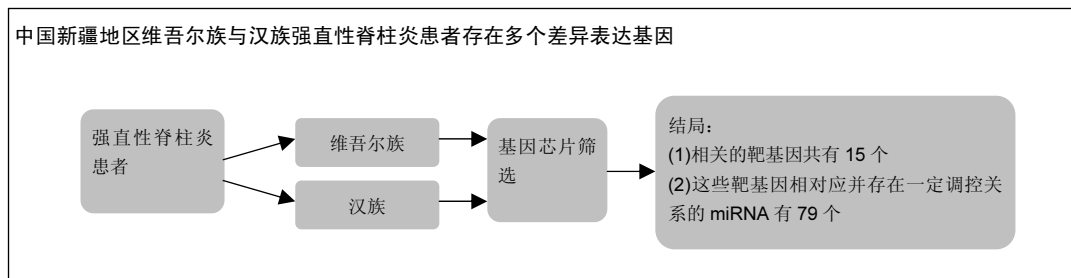
刘振峰, 梁治权, 洪汉刚, 方锐, 艾力江·阿斯拉, 赵疆(新疆维吾尔自治区中医医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000)

引用本文: 刘振峰, 梁治权, 洪汉刚, 方锐, 艾力江·阿斯拉, 赵疆. 新疆地区维吾尔族与汉族强直性脊柱炎患者的差异性基因表达[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(15):2233-2240.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.15.015

ORCID: 0000-0002-8768-3312(刘振峰)

文章快速阅读:



刘振峰, 男, 汉族, 1982年生, 新疆维吾尔自治区人, 助理研究员, 硕士, 主治医师, 主要从事骨与关节损伤疾病的临床与基础研究。

通讯作者: 赵疆, 硕士, 主任医师, 新疆维吾尔自治区中医医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)15-02233-08

稿件接受: 2016-02-17

<http://WWW.crter.org>

## 文题释义:

**差异表达基因:** 在细胞分化过程中某些奢侈基因表达的结果生成一种类型的分化细胞, 另一组奢侈基因表达的结果导致出现另一类型的分化细胞的现象。

**miRNAs:** 是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA, 由 20-25 个核苷酸组成。成熟的 miRNAs 是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的, 随后组装进 RNA 诱导的沉默复合体, 通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA, 并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译。

## 摘要

**背景:** 目前强直性脊柱炎的发病机制尚不清楚, 其发生可能与遗传因素、环境因素、慢性感染和自身免疫功能紊乱等因素有关。目前普遍认为遗传学因素在发病机制中起着重要作用, 而且强直性脊柱炎的发病具有明显的家族聚集以及民族间的差异现象, 目前寻找不同地区、不同民族之间强直性脊柱炎的差异性基因成为研究热点之一。

**目的:** 应用基因表达谱芯片技术筛选出当地维吾尔族与汉族强直性脊柱炎患者差异性基因, 并对这些差异性基因进行比较分析。

**方法:** 随机采集新疆维吾尔自治区中医医院风湿科处于活动期的维吾尔族、汉族强直性脊柱炎患者各 5 例, 另外分别选取各 3 例健康志愿者为对照, 提取外周血中的 RNA, 制备探针后用于表达谱芯片杂交, 筛选强直性脊柱炎组织差异表达基因, 并采用半定量 RT-PCR 法验证芯片结果。

**结果与结论:** 通过对维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者差异性基因表达研究发现, 两组之间筛选出差异有显著性意义的 miRNA 20 个( $P < 0.05$ ); 通过对维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者靶基因与 miRNA 对应关系分析发现, 相关的靶基因共有 15 个, 这些靶基因相对应并存在一定的调控关系的 miRNA 有 79 个, 这些基因主要为白细胞抗原类和白细胞介素类, 均与人体免疫相关。结果证实, 在中国新疆地区维吾尔族与汉族强直性脊柱炎患者之间, 可筛选出与强直性脊柱炎相关多个差异表达基因。

## 关键词:

组织工程; 组织工程; 基因表达谱芯片; 维吾尔族; 强直性脊柱炎; 差异表达基因; 芯片; 靶基因; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

## 主题词:

组织工程; 遗传; 基因

## 基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2013211B68)

Liu Zhen-feng, Master,  
Research assistant,  
Attending physician,  
Department of  
Orthopedics, Xinjiang  
Uygur Autonomous Region  
Hospital of Traditional  
Chinese Medicine, Urumqi  
830000, Xinjiang Uygur  
Autonomous Region,  
China

Corresponding author:  
Zhao Jiang, Master, Chief  
physician, Department of  
Orthopedics, Xinjiang  
Uygur Autonomous Region  
Hospital of Traditional  
Chinese Medicine, Urumqi  
830000, Xinjiang Uygur  
Autonomous Region,  
China

## Differential gene expression between Xinjiang Uygur and Han patients with ankylosing spondylitis

Liu Zhen-feng, Liang Zhi-quan, Hong Han-gang, Fang Rui, Elijan•Asla, Zhao Jiang (Department of Orthopedics, Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Genetic factors, environment, chronic infection, and autoimmune disorders are considered to be involved in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. Genetic factors play an important role in the pathogenesis of the disease. Ethnic and regional diversity of differentially expressed genes has become research hotspot because of family aggregation and ethnic diversity of ankylosing spondylitis.

**OBJECTIVE:** To screen differentially expressed genes in Xinjiang Uygur and Han patients with ankylosing spondylitis by microarray screening and compare differences in gene expressions.

**METHODS:** Uygur and Han patients with active ankylosing spondylitis in department of rheumatology of our hospital were randomly collected with five patients for each. In addition, three healthy volunteers were selected as controls. RNA from peripheral blood was extracted and used for microarray hybridization after probe preparation to screen differentially expressed genes in ankylosing spondylitis samples and the microarray results were verified by semi-quantitative RT-PCR analysis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Twenty differentially expressed miRNAs were screened in Uygur and Han patients with active ankylosing spondylitis ( $P < 0.05$ ). From relationship analysis of target genes and miRNAs, 15 target genes corresponding to the 79 miRNAs involved in human leucocyte antigens and interleukins which linked to human immunity system were found. These findings suggest that differentially expressed genes can be screened from Uygur and Han patients with ankylosing spondylitis.

**Subject headings:** Tissue Engineering; Heredity; Genes

**Funding:** the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China, No. 2013211B68

**Cite this article:** Liu ZF, Liang ZQ, Hong HG, Fang R, Elijan-Asla, Zhao J. Differential gene expression between Xinjiang Uygur and Han patients with ankylosing spondylitis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(15):2233-2240.

## 0 引言 Introduction

流行病学调查显示强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 多发生于10-40岁, 发病高峰为20-30岁, 40岁以后发病者少见<sup>[1]</sup>。儿童强直性脊柱炎可很早发病, 多见于约12岁的男性, 男女患病比为(3-10):1。强直性脊柱炎发病有种族差异, 90%-95%患者人类白细胞抗-B-27(HLA-B27)阳性<sup>[2-3]</sup>。

但在约10%的强直性脊柱炎患者中, 其HLA-B27检测为阴性; 然而就算在健康人群中HLA-B27的阳性率约为8%, 在HLA-B27阳性的人群中也仅有约5%的人最终会罹患强直性脊柱炎, 以上数据表明除了常见的HIA-B27以外还可能其他的未被发现的基因参与发病<sup>[4-6]</sup>。因此, 探寻强直性脊柱炎的发病机制, 寻找易感基因, 为其早期诊断与个体化治疗提供理论基础与治疗靶标仍是目前该研究领域的热点与焦点。大量研究资料表明, 强直性脊柱炎在欧洲白种人群中的发病率约为0.5%, 在中国人群中的发病率约为0.3%, 而在非洲黑人中几乎不发病; 同时单卵双生研究表明, 强直性脊柱炎几乎完全是由遗

传因素决定的, 遗传度> 90%<sup>[7-10]</sup>。以上研究结果说明强直性脊柱炎发病具有明显的人群特异性和鲜明的遗传易感性特点。

近年来基于强直性脊柱炎易感基因的研究越来越多, 可见医学研究者对此病的关注度是愈来愈高, 这使得强直性脊柱炎遗传易感性研究获得了重大进展<sup>[11-14]</sup>。与强直性脊柱炎相关的致病基因, 目前可分为主要组织相容性复合体(major histobility complex, MHC)和非MHC共2类。MHC主要以HLA-B27及其亚型、人类白细胞抗原-B60(HLA-B60)、人类白细胞抗-DR (HLA-DR) 及肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )等基因为代表, 非MHC类最具代表性的为白细胞介素家族, 包括白细胞介素1, 10, 16。

新疆地区自然、社会环境与国内外其他地区不同, 强直性脊柱炎的遗传特点可能存在特殊性与差异性。基于上述原因笔者拟通过基因芯片、PCR等技术方法对维吾尔族、汉族两个民族与强直性脊柱炎发病相关的遗传基因进行筛选与鉴定, 从而明确新疆地区强直

性脊柱炎发病的特殊规律、遗传基因的表达特点和分布特征;找出新疆地区强直性脊柱炎发病的易感基因及其高发病率的原因。实验以期寻找强直性脊柱炎新的易感基因位点、阐明强直性脊柱炎可能的发病机制、降低新疆地区强直性脊柱炎的发病率以及建立早期诊断与个体化治疗方案提供有重要的参考数据与指导意义。

## 1 对象和方法 Subjects and methods

### 1.1 设计 病例-对照研究。

1.2 时间及地点 于2013年6月至2015年6月在新疆医科大学第四附属医院重点实验室完成。

1.3 对象 选取新疆维吾尔自治区中医医院风湿科于2014年1月至12月期间收治入院、并明确诊断的强直性脊柱炎的患者16例,其中汉族正常对照组3例,汉族强直性脊柱炎患者5例,男4例,女4例,平均年龄30.2岁;正常维吾尔族对照组3例,维吾尔族强脊炎患者5例,其中男5例,女3例,平均年龄29.5岁,以上研究对象均为当地常住居民。

**病例纳入标准:**均处于活动期:①有炎性的腰背疼痛。②骨盆X射线片显示骶髂关节有骨化线。③C-反应蛋白( $> 8.2 \text{ mg/L}$ )、血浆水平升高(成年男性 $> 15 \text{ mm/h}$ 成年女性 $> 20 \text{ mm/h}$ )、HLB-27(+)阳性。④符合1984年美国风湿病协会修订的纽约标准。⑤均处于疾病的活动期。

**排除标准:**①风湿类风湿性关节炎患者以及处于应激状态者,如急性感染和手术等。②有家族遗传病史者。③患有精神系统类疾病者(如抑郁症和精神分裂症患者)。④未签署知情同意书的患者。

选取本院体检科进行常规体检的正常健康汉族、维吾尔族各3例作为对照组。实验采用程序严格遵循本院人体试验委员会制定的伦理学标准,同时获得该委员会批准,并征得全部患者的知情同意,伦理审查批件号:2013XE063。

1.4 材料 为获得血浆进行实验,使用抗凝管采集全血,并尽快进行血浆分离:1 000×g离心10 min,分离血浆和细胞组分。将采集好的血浆转移至单独的冻存管,按照每600 μL/管分装好,放入或-80 °C冰箱保存。

### 1.5 实验方法

#### 1.5.1 RNA提取 按试剂说明书操作,实验流程作如下:

①取适量的血浆400 μL(最多可抽800 μL,不足100 μL时,用Cell Disruption Buffer补至100 μL),加入等量的

2×Denaturing Solution,涡旋混匀,冰上放置5 min。②加入等体积的酚/氯仿,涡旋混匀30–60 s,室温,最高转速离心5 min。③小心吸取上清到新的1.5 mL离心管中,添加1.25倍体积的无水乙醇,涡旋混匀。④转移至柱子中(最大体积700 μL),13 000×g,离心30 s。⑤加入35 μL miRNA Wash Solution 1到离心柱中,13 000×g,室温离心15 s,弃流过液,将离心柱重新放置到收集管中。⑥混合10 μL DNase I和70 μL Buffer RDD QIAGEN (#79254) 总体积:80 μL,加到离心柱中的膜上,室温放置15 min。⑦加入350 μL miRNA Wash Solution 1到离心柱中,13 000×g,室温离心15 s,弃流过液,将离心柱重新放置到收集管中。⑧加入500 μL Wash Solution 2/3过柱2次,空柱离心1 min。将离心柱放置到新的收集管中,柱中心加100 μL 95 °C预热的Elution Solution,室温最高转速离心20–30 s,收集管中的液体即为提取的Total RNA,可放置在-70 °C保存。

1.5.2 芯片杂交 先取100 ng total RNA起始,定容到2 μL:①去磷酸化。②样品变性:在每管样品中添加2.8 μL 100% DMSO,混匀离心,将上述反应混合液置于100 °C PC仪中5–10 min(7 min),迅速转入冰水浴中冷却。③连接标记:将10×T<sub>4</sub> RNA Ligase Buffer置于37 °C温育并间隔涡旋,直至沉淀全部溶解,然后将其冷却至室温备用。④标记后RNA纯化。⑤纯化后样品抽干:45 °C浓缩1 h(如未经纯化的样品45 °C浓缩3 h),将抽干的样品重新溶解在17 μL nuclease-free 水中。⑥准备10×Blocking Agent:在冻干的10×GE Blocking Agent管中加入125 μL nuclease-free水,轻微涡旋,以使其完全溶解,必要时可将其置于37 °C温育四五分钟,稍离心,放置备用。配制好的10×GE Blocking Agent可放置在-20 °C保存2个月,每次融化使用时,注意涡旋混匀并离心。⑦准备杂交反应:上芯片检测,55 °C 20 h,20 r/min滚动杂交。⑧芯片洗涤:取出芯片于洗液1中洗涤5 min,再将芯片放入洗液2中洗涤5 min(37 °C)。⑨芯片扫描:Agilent扫描仪中选择相应的参数扫描。

1.5.3 数据分析 在筛选差异 miRNA 之前,先进行探针过滤,用于比较的每组样本中至少有一组100%标记为Detected的探针留下进行后续分析。对于有生物学重复的分析,利用T检验得到的差异显著性P值和标准化信号值的差异倍数 Fold change值进行筛选,标准为Fold change $\geq 2.0$ 且P $\leq 0.05$ 。

表 1 维吾尔族与汉族生物样本 RNA 纯度检测

Table 1 Determination of RNA purity of biological samples from Xinjiang Uygur and Han patients with active ankylosing spondylitis

| 样品编号    | A <sub>260 nm/280 nm</sub> | A <sub>260 nm/230 nm</sub> | 浓度(mg/L) | 体积(μL) | 质量(ng) | 检测结果 |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------|--------|--------|------|
| 正常维吾尔族  | 0.95                       | 0.24                       | 22.74    | 10     | 227.40 | Pass |
| 正常维吾尔族  | 1.23                       | 0.36                       | 20.87    | 10     | 208.70 | Pass |
| 正常维吾尔族  | 1.63                       | 0.04                       | 6.16     | 10     | 161.60 | Pass |
| 正常汉族    | 1.16                       | 0.16                       | 19.22    | 10     | 192.20 | Pass |
| 正常汉族    | 1.44                       | 0.11                       | 16.49    | 10     | 164.90 | Pass |
| 正常汉族    | 1.40                       | 0.30                       | 19.30    | 10     | 193.00 | Pass |
| 维吾尔族 AS | 1.47                       | 0.09                       | 15.85    | 10     | 158.50 | Pass |
| 维吾尔族 AS | 1.13                       | 0.26                       | 20.30    | 10     | 203.00 | Pass |
| 维吾尔族 AS | 1.22                       | 0.33                       | 14.23    | 10     | 142.30 | Pass |
| 维吾尔族 AS | 1.35                       | 0.41                       | 15.54    | 10     | 155.40 | Pass |
| 维吾尔族 AS | 1.30                       | 0.24                       | 19.01    | 10     | 190.10 | Pass |
| 汉族 AS   | 1.89                       | 1.45                       | 23.34    | 10     | 233.40 | Pass |
| 汉族 AS   | 1.27                       | 0.29                       | 13.22    | 10     | 132.20 | Pass |
| 汉族 AS   | 1.24                       | 0.33                       | 15.34    | 10     | 153.40 | Pass |
| 汉族 AS   | 1.21                       | 0.32                       | 14.67    | 10     | 146.70 | Pass |
| 汉族 AS   | 1.04                       | 0.20                       | 15.89    | 10     | 158.90 | Pass |

表注: AS: 强直性脊柱炎; A: 吸光度值。

表 2 汉族强直性脊柱炎与正常对照组差异性基因表达

Table 2 Differential gene expression between Han patients with ankylosing spondylitis and normal controls

| 序号 | 基因号    | 名称                 | 倍数变化  | 假定值    | 错误发现率 | 表达关系 |
|----|--------|--------------------|-------|--------|-------|------|
| 1  | 28019  | hsa-miR-10a-3p     | 0.510 | 0.0287 | 0.605 | 上调   |
| 2  | 14313  | hsa-miR-499a-5p    | 0.399 | 0.049  | 0.745 | 上调   |
| 3  | 147845 | hsa-miR-3173-3p    | 0.397 | 0.039  | 0.691 | 上调   |
| 4  | 147919 | kshv-miR-K12-12-3p | 0.570 | 0.037  | 0.680 | 上调   |
| 5  | 27565  | hsa-miR-423-5p     | 0.511 | 0.017  | 0.510 | 上调   |
| 6  | 11045  | hsa-miR-302c-5p    | 0.483 | 0.030  | 0.610 | 上调   |
| 7  | 42502  | hsa-miR-204-3p     | 0.461 | 0.021  | 0.516 | 上调   |
| 8  | 42522  | ebv-miR-BART19-3p  | 0.429 | 0.007  | 0.443 | 上调   |
| 9  | 148038 | hsa-miR-3679-3p    | 0.323 | 0.009  | 0.447 | 下调   |
| 10 | 168943 | hsa-miR-4769-3p    | 0.427 | 0.005  | 0.446 | 上调   |
| 11 | 46356  | hsa-miR-30b-3p     | 0.346 | 0.018  | 0.510 | 上调   |
| 12 | 27537  | ebv-miR-BART13-3p  | 0.459 | 0.001  | 0.280 | 上调   |
| 13 | 11245  | hsa-miR-433-5p     | 0.651 | 0.037  | 0.680 | 上调   |
| 14 | 147751 | hsa-miR-4274       | 0.319 | 0.023  | 0.539 | 上调   |
| 15 | 168971 | hsa-miR-4449       | 0.393 | 0.009  | 0.446 | 上调   |
| 16 | 46259  | hsa-miR-885-5p     | 0.222 | 0.002  | 0.328 | 上调   |
| 17 | 46850  | hsa-miR-1237-3p    | 0.348 | 0.037  | 0.680 | 上调   |
| 18 | 148132 | hsa-miR-3622a-3p   | 0.226 | 0.012  | 0.477 | 下调   |
| 19 | 168950 | hsa-miR-4646-3p    | 0.444 | 0.028  | 0.605 | 上调   |
| 20 | 148639 | hsa-miR-4298       | 0.401 | 0.005  | 0.446 | 上调   |
| 21 | 169183 | hsa-miR-4644       | 0.649 | 0.007  | 0.446 | 上调   |
| 22 | 148361 | hsa-miR-3911       | 0.559 | 0.013  | 0.482 | 上调   |
| 23 | 148482 | hsa-miR-874-5p     | 0.242 | 0.041  | 0.703 | 上调   |
| 24 | 168792 | hsa-miR-4434       | 0.426 | 0.036  | 0.680 | 上调   |
| 25 | 169323 | hsa-miR-4723-3p    | 0.369 | 0.010  | 0.452 | 上调   |
| 26 | 168696 | hsa-miR-4739       | 0.428 | 0.014  | 0.482 | 上调   |
| 27 | 169143 | hsa-miR-4459       | 0.491 | 0.002  | 0.328 | 上调   |

表3 汉族与维吾尔族正常对照组之间差异性基因表达

Table 3 Differential gene expression between Han and Uyghur normal controls

| 序号 | 基因号    | 名称              | 倍数变化  | 假定值   | 错误发现率 | 表达关系 |
|----|--------|-----------------|-------|-------|-------|------|
| 1  | 169120 | hsa-miR-4787-3p | 4.025 | 0.032 | 0.864 | 上调   |
| 2  | 10964  | hsa-miR-155-5p  | 1.591 | 0.031 | 0.864 | 上调   |
| 3  | 11182  | hsa-miR-98-5p   | 3.108 | 0.048 | 0.864 | 上调   |
| 4  | 146163 | hsa-miR-224-3p  | 1.607 | 0.016 | 0.864 | 上调   |
| 5  | 46266  | hsa-miR-1825    | 2.358 | 0.035 | 0.864 | 上调   |
| 6  | 169395 | hsa-miR-4484    | 1.593 | 0.047 | 0.864 | 上调   |
| 7  | 146072 | hsa-miR-1469    | 1.522 | 0.049 | 0.864 | 上调   |
| 8  | 56873  | hsa-miR-3124-5p | 2.074 | 0.037 | 0.864 | 上调   |
| 9  | 14328  | hsa-miR-124-3p  | 1.821 | 0.046 | 0.864 | 上调   |
| 10 | 17898  | hsa-miR-99b-3p  | 2.736 | 0.045 | 0.864 | 上调   |
| 11 | 17961  | hsa-miR-629-5p  | 2.083 | 0.049 | 0.864 | 下调   |

表4 维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者差异性基因表达

Table 4 Differential gene expression between Han and Uyghur patients with ankylosing spondylitis

| 序号 | 基因号    | 名称                 | 倍数变化  | 假定值   | 错误发现率 | 表达关系 |
|----|--------|--------------------|-------|-------|-------|------|
| 1  | 169221 | hsa-miR-4748       | 0.436 | 0.018 | 0.816 | 上调   |
| 2  | 147845 | hsa-miR-3173-3p    | 0.365 | 0.010 | 0.816 | 上调   |
| 3  | 147919 | kshv-miR-K12-12-3p | 0.585 | 0.016 | 0.816 | 上调   |
| 4  | 147851 | hsa-miR-3201       | 0.428 | 0.034 | 0.816 | 上调   |
| 5  | 11045  | hsa-miR-302c-5p    | 0.486 | 0.030 | 0.816 | 上调   |
| 6  | 42522  | ebv-miR-BART19-3p  | 0.600 | 0.035 | 0.816 | 下调   |
| 7  | 146158 | hsa-miR-3202       | 0.443 | 0.038 | 0.816 | 上调   |
| 8  | 11245  | hsa-miR-433-5p     | 0.564 | 0.022 | 0.816 | 上调   |
| 9  | 148351 | hsa-miR-3945       | 0.366 | 0.026 | 0.816 | 上调   |
| 10 | 146196 | hsa-miR-711        | 0.463 | 0.025 | 0.816 | 上调   |
| 11 | 168793 | hsa-miR-4483       | 0.401 | 0.020 | 0.816 | 上调   |
| 12 | 169395 | hsa-miR-4484       | 0.408 | 0.038 | 0.816 | 上调   |
| 13 | 148639 | hsa-miR-4298       | 0.457 | 0.035 | 0.816 | 上调   |
| 14 | 148688 | hsa-miR-765        | 0.225 | 0.004 | 0.816 | 上调   |
| 15 | 17328  | ebv-miR-BART8-3p   | 0.581 | 0.025 | 0.816 | 下调   |
| 16 | 168792 | hsa-miR-4434       | 0.480 | 0.043 | 0.816 | 上调   |
| 17 | 17498  | hsa-miR-601        | 0.394 | 0.007 | 0.816 | 下调   |
| 18 | 169110 | hsa-miR-4497       | 0.438 | 0.015 | 0.816 | 上调   |
| 19 | 169221 | hsa-miR-4748       | 0.436 | 0.018 | 0.816 | 上调   |
| 20 | 147845 | hsa-miR-3173-3p    | 0.365 | 0.010 | 0.816 | 上调   |

1.5.4 RT-PCR验证芯片结果 根据芯片分析结果, 选取差异表达基因并设计引物。

以对照组和强直性脊柱炎试验组总RNA为模板, 按照one-step RNA PCR Kit方法对芯片筛选结果进行RT-PCR验证, 实验重复3次。PCR产物电泳后进行灰度扫描并统计。对照组和强直性脊柱炎组灰度值进行 $t$ 检验以判断其有无统计学差异。

1.6 主要观察指标 各组差异性基因表达。

1.7 统计学分析 应用SPSS 19.0软件对数据进行统

计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用百分比描述, 组间数值服从正态分布则采用配对 $t$ 检验, 不服从正态分布则采用配对的Wilcoxon秩和检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 维吾尔族与汉族生物样本RNA纯度检测 实验组与对照组样品RNA通过检测纯度较高, 而且完整性较好, 符合芯片检测要求, 见表1。

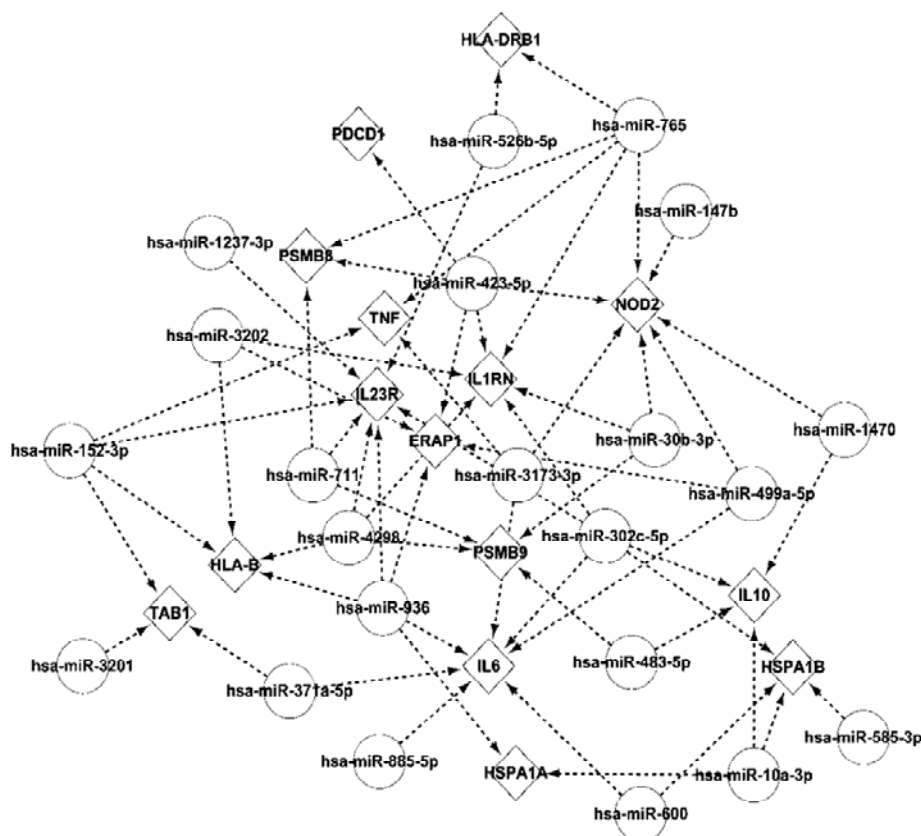


图 1 维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者靶基因与 miRNA 对应关系分析网络图

Figure 1 Network diagram of corresponding relationship analysis for target genes and miRNAs in Uyгур and Han patients with ankylosing spondylitis

## 2.2 维吾尔族与汉族差强直性脊柱炎异性基因结果与分析

### 汉族强直性脊柱炎与正常对照组差异性基因表达:

通过基因芯片技术将汉族强直性脊柱炎患者外周血标本与正常对照组比较,结果发现两组间具有统计学意义的差异性miRNA表达数量为27个( $P < 0.05$ ),见表2。

汉族与维吾尔族正常对照组之间差异性基因表达: 将汉族与维吾尔族正常人群通过基因芯片技术进行比较, 结果发现2组间存在差异性基因的表达, 经统计分析2组之间差异性miRNA表达的数量为11个, 名称分别为: hsa-miR-4787-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-224-3p, hsa-miR-1825, hsa-miR-4484, hsa-miR-1469, hsa-miR-3124-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-99b-3p, hsa-miR-629-5p(表3)。

**维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者差异基因表达:** 通过对维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者差异性基因表达研究发现, 两组之间筛选出具有显著性差异的 miRNA 20 个, 名称分别 hsa-miR-4748, hsa-miR-3173-3p, kshv-miR-K12-12-3p、hsa-miR-3201, hsa-miR-302c-5p, ebv-miR-BART19-3p、hsa-miR-3202, hsa-miR-433-5p, hsa-miR-3945, hsa-miR-711, hsa-miR-4483, hsa-miR-4484, hsa-miR-

4298, hsa-miR-765, ebv-miR-BART8-3p, hsa-miR-4434, hsa-miR-601, hsa-miR-4497, hsa-miR-4748, hsa-miR-3173-3p(表4)。

**维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者靶基因与miRNA对应关系分析:** 通过对维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者靶基因与miRNA对应关系分析发现, 相关的靶基因共有15个, 这些靶基因相对应(也存在一定的调控关系)miRNA有79个(图1)。

### 3 讨论 Discussion

强直性脊柱炎其发病机制尚不明确,临床亦无有效的治疗措施<sup>[15-18]</sup>。探寻强直性脊柱炎的发病机制,寻找易感基因,为其早期诊断与个体化治疗提供理论基础与治疗靶标仍是目前该研究领域的热点与焦点。强直性脊柱炎发病具有明显的人群特异性和鲜明的遗传易感性特点<sup>[19-22]</sup>。近年来基于强直性脊柱炎易感基因的研究越来越多,可见医学研究者对此病的关注度亦是愈来愈高,这使得强直性脊柱炎遗传易感性研究获得了重大进展<sup>[22-26]</sup>。MHC 主要以 HLA-B27 及其亚型、人类白细胞抗原 -B60(HLA-B60)、人类白细胞抗原 -DR(HLA-DR)及肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等基因为代表,非 MHC 类最具代表性的为白细胞介素家族,包

括白细胞介素 1, 10, 16。

近年来针对强直性脊柱炎开展的研究工作较为广泛,学者们借助分子生物学技术和方法从不同角度探讨了强直性脊柱炎的发病机制及遗传基因,也得出了一些令人振奋的结果<sup>[27-30]</sup>。但是,在已有的报道中在不同地区、不同民族之间开展的差异性基因的研究较少。作者组通过随机采集本院风湿科处于活动期的维吾尔族、汉族强直性脊柱炎患者各 3 例,另外分别选取 3 例健康志愿者为对照,提取外周血中的 RNA,制备探针后用于表达谱芯片杂交,筛选强直性脊柱炎组织差异表达基因,并采用半定量 RT-PCR 法验证芯片结果。最终发现:

①汉族强直性脊柱炎患者外周血标本与正常对照组比较发现两组间具有统计学意义的差异性 miRNA 表达数量为 27 个,其中上调的基因为 25 个,下调的基因有 2 个。②将汉族与维吾尔族正常人群通过基因芯片技术进行比较,结果发现两组间存在差异性基因的表达,经统计分析两组之间差异性 miRNA 表达的数量为 11 个,名称分别为: hsa-miR-4787-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-224-3p, hsa-miR-1825, hsa-miR-4484, hsa-miR-1469, hsa-miR-3124-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-99b-3p, hsa-miR-629-5p, 其中上调的基因个数为 10 个,下调的基因个数为 1 个;③通过对维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者差异性基因表达研究发现,两组之间筛选出差异有显著性意义的 miRNA 20 个,名称分别为 hsa-miR-4748, hsa-miR-3173-3p, kshv-miR-K12-12-3p, hsa-miR-3201 等,其中上调的基因为 17 个,下调的基因有 3 个。④通过对维吾尔族强直性脊柱炎与汉族强直性脊柱炎患者靶基因与 miRNA 对应关系分析发现,相关的靶基因共有 15 个,这些靶基因相对应(也存在一定的调控关系)miRNA 有 79 个。上述维吾尔族与汉族之间强直性脊柱炎表达的差异性基因通过分析归纳主要可分:①人类白细胞抗原类,如 HLA-DRB1;②白细胞介素类,如白细胞介素 1RN, 6, 10 等。

强直性脊柱炎病因较为复杂,通过复习文献发现近年来的相关性研究包含诸多相同的单核苷酸基因多态性遗传位点,大量循证医学证据也表明在不同人群中亦存在不同的单核苷酸基因多态性与强直性脊柱炎相关。笔者虽然通过应用基因表达谱芯片技术,筛选出了当地维吾尔族与汉族强直性脊柱炎患者差异性新的基因,但是对于种族间差异性基因的研究,大样本的家系研究才是关键。

因此,有关强直性脊柱炎易感基因以及民族间差异性基因还需要更加深入的探讨与研究,最终才能更好地制定防控措施,降低发病率。

**作者贡献:** 第一作者和通讯作者负责设计、数据分析和文章撰写;第二、三作者负责病例收集,标本采集;第四、五作者负责检测及资料整理。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

**伦理问题:** 试验采用程序严格遵循本院人体试验委员会制定的伦理学标准,同时获得该委员会批准,并征得全部患者的知情同意,伦理审查批件号: 2013XE063。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] 张政,张毓洪,马玲玲,等.强直性脊柱炎遗传易感性基因的研究进展[J].中国老年保健医学杂志,2015,13(2):110-113.
- [2] 蒋娟,熊小敏,张卫云,等.人白细胞抗原HLA-B27在强直性脊柱炎中的临床意义[J].生物技术通讯,2014,25(3):410-411.
- [3] 陈彬,徐卫东.强直性脊柱炎的易感基因研究[J].中华关节外科杂志(电子版),2012,2(7):777-781.
- [4] 张志坚,奚永志,孙玉英.全基因组单核苷酸多态性与强直性脊柱炎遗传易感性的研究进展[J].中华医学杂志,2011,91(18):1289-1291.
- [5] 刘永杰,张小芳,张运刚,等.HLA-B27检测对强直性脊柱炎诊断的临床意义[J].国际检验医学杂志,2014,35(10):1285-1286.
- [6] 张志坚,奚永志,孙玉英.全基因组单核苷酸多态性与强直性脊柱炎遗传易感性的研究进展[J].中华医学杂志,2011,91(18):1289-1291.
- [7] Smith JA, Mrker Hermann E, Colbert RA. Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2006;20(3):571-591.
- [8] Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, et al. The pathogenic role of HLAB-27 and its subtypes. Autoimmun Rev. 2007;6(3):183-189.

- [9] Robinson WP, van der Linden SM, Khan MA, et al. HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27<sup>+</sup> patients. *Arthritis Rheum.* 1989;32(9):1135-1141.
- [10] Wei JC, Tsai WC, Lin HS, et al. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43(7):839-842.
- [11] Vargas-Alarcon G, Londono JD, Hernandez-Pacheco G, et al. Effect of HLA-B and HLA-DR genes on susceptibility to and severity of spondyloarthropathies in Mexican patients. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(8):714-717.
- [12] 古洁若, 黄烽, 余得恩. cDNA芯片技术在强直性脊柱炎研究中的初步应用[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(17): 1030-1034.
- [13] Braun J, van der Heijde D. Novel approaches in the treatment of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides. *Exp Opin Invest Drugs.* 2003; 12(7):1097-1109.
- [14] Brown MA, Kennedy LG, Darke C, et al. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1998;41(3): 460-465.
- [15] Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, et al. The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy: a comprehensive study of 70 multiplex families. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(3):201-206.
- [16] Inanc B, Elcin AE, Elcin YM, et al. Osteogenic induction of human periodontal ligament fibroblasts under two- and three-dimensional culture conditions. *Tissue Eng.* 2006;12(2):257-266.
- [17] Maksymowych WP, Suarez-Almazor M, Chou CT, et al. Polymorphism in the LMP2 gene influences susceptibility to extraspinal disease in HLA-B27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1995;54(4):321-324.
- [18] Laval SH, Timms A, Edwards S, et al. Whole Genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of Non-MHC genetic-susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):918-926.
- [19] Maksymowych WP, Reeve JP, Reveille JD, et al. High-throughput single-nucleotide polymorphism analysis of the IL1RN locus in patients with ankylosing spondylitis by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):2011-2018.
- [20] Timms AE, Crane AM, Sims AM, et al. The Interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am J Hum Genet.* 2004;75(4): 587-595.
- [21] Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 2002;190:40-52.
- [22] Vivier E, Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witnesses of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):190-198.
- [23] Jaakkola E, Crane AM, Laiho K, et al. The effect of transforming growth factor (beta)1 gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43:32-38.
- [24] Tsui HW, Inman RD, Paterson AD, et al. ANKH variants associated with ankylosing spondylitis: gender differences. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R513-R525.
- [25] Lee SH, Lee YA, Woo DH, et al. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korea population. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R163.
- [26] 莫红梅, 田永芳, 阿孜古力. 对2个民族强直性脊柱炎白细胞抗原-B27阳性表达与性别年龄分布特点的研究[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(6):491-495.
- [27] 邹红云, 余伍忠, 何江, 等. 某地区维吾尔族强直性脊柱炎患者HLA-B27亚型频率分布[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3):310-312.
- [28] 张志坚, 奚永志, 孙玉英. 全基因组单核苷酸多态性与强直性脊柱炎遗传易感性的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(18):1289-1291.
- [29] Végvári A, Szabó Z. The genetic background of ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine.* 2009;76: 623-628.
- [30] 王碧琦, 周斌, 高文静, 等. 双生子在表观遗传学研究中的价值[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(4):402-404.