

泉州市人群 ABCG2 基因 rs3114018 单核苷酸多态性与原发性痛风的相关性研究

陈荫楠 李振喜 罗彩林 郑晨娜 郭娜燕 杨会勇

摘要 目的 研究泉州市人群三磷酸腺苷结合转运蛋白 G2 基因 (ABCG2) rs3114018 位点基因多态性与原发性痛风的相关性,为痛风的早期诊断和预防提供参考。方法 本研究共选取了 163 例来自泉州市的痛风患者和 187 例健康对照志愿者。通过等位基因特异性聚合酶链式反应 (AS-PCR) 对 SNP 位点 (rs3114018) 进行基因分型,并用 SPSS 16.0 统计学软件分析不同基因型与原发性痛风的相关性。结果 痛风组 CC 基因型携带频率为 36.20%,正常组携带频率为 19.25%,两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。Logistic 回归分析显示,CC 基因型与 AA 型比较,发病风险提高了 4.619 倍 (OR = 4.619, 95% CI: 2.437 ~ 8.869, $P < 0.001$)。C 等位基因携带者与 A 等位基因比较,发病风险提高了 2.099 倍 (OR = 2.099, 95% CI: 0.756 ~ 1.587, $P < 0.001$)。另外,rs3114018 位点的基因多态性对痛风发病的相关指标如血尿酸、尿素、C 反应蛋白、甘油三酯、肾结石等有显著影响。结论 ABCG2 基因 rs3114018 位点单核苷酸多态性可能与泉州市原发性痛风的易感性相关,等位基因 C 可能是原发性痛风发病的危险因素,CC 基因型的携带者可能增加原发性痛风的发病风险。

关键词 泉州市 痛风 rs3114018 位点 单核苷酸多态性

中图分类号 R446.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.02.017

Research on the Correlation of ABCG2 rs3114018 Polymorphism with Primary Gout in Quanzhou. CHEN Yinnan, LI Zhenxi, LUO Cailin, et al. Department of Basic Medical Sciences, Quanzhou Medical College, Fujian 362000, China

Abstract Objective To investigate the correlation between the polymorphism of ATP-binding cassette transporter G member 2 (ABCG2) gene locus rs3114018 and the incidence of primary gout in Quanzhou population to provide reference for the early diagnosis and prevention of gout. **Methods** Totally 163 cases of gout patients and 187 cases of healthy volunteers were respectively used as the case group and control group. Their clinical data and laboratory test results and their venous blood for biochemical testing and genetic testing were collected. This genotyping method was performed by AS-PCR, and the data results were analyzed by the statistical software SPSS 18.0. **Results** Genotype carrying frequencies of CC in the gout group and control group were 36.20% and 19.25%. The genotype frequencies distribution of rs3114018 in gout group was significant differently ($P < 0.001$). Logistic regression analysis showed that genotype CC increased the risk of gout by 4.619 times (OR = 4.619, 95% CI: 2.437 ~ 8.869, $P < 0.001$), and allele C increased the risk of gout by 2.099 times (OR = 2.099, 95% CI: 0.756 ~ 1.587, $P < 0.001$). In addition, the snps of rs3114018 was significantly associated with the uric acid, urea nitrogen, C-reactive protein, TG and kidney stone. **Conclusion** The rs3114018 locus of the ABCG2 gene single nucleotide polymorphism may be associated with the incidence of primary gout in Quanzhou, and allele C may be a risk factor of primary gout. Individuals with CC genotype are more susceptible to gout.

Key words Quanzhou; Primary gout; rs3114018; Signal nucleotide polymorphism

近年来统计数据显示,福建省泉州市中老年人群的高尿酸血症的患病率居于全国前列,其中男性为

27.3%,女性为 15.5%^[1]。逐年上升的发生率除了跟泉州市人群在饮食习惯上好饮啤酒、爱吃海鲜有关以外,也受遗传易感性的影响,因此有关痛风相关 SNP 遗传分子机制研究也逐渐受到重视^[2,3]。研究显示,ABCG2 是重要的肾脏尿酸转运蛋白,相比其他尿酸盐转运体,其基因变异种类最多,与血尿酸水平升高和痛风的发生都密切相关^[4~8]。rs3114018 位点是 ABCG2 上的一个错义性突变位点,有研究表明该位点的突变与原发性痛风的发病存在相关性,但关

基金项目:福建省教育厅中青年教育科研项目(JAT171161);泉州科技计划项目(2018Z169);泉州医学高等专科学校科研项目(XJK1617B);泉州医学高等专科学校重点科研项目(XJK1603A)

作者单位:362000 泉州医学高等专科学校基础医学部(陈荫楠、李振喜、罗彩林、郑晨娜、郭娜燕);362000 泉州华侨大学药物研究所(杨会勇)

通信作者:郑晨娜,电子信箱:165456164@qq.com

于该位点的研究相对较少且尚无泉州市相关文献报道^[9]。因此,本研究共选取来自泉州市的 163 例痛风患者和 187 例健康对照者,利用三引物等位基因法直接分别对其外周血样品进行扩增检测,对比 rs3114018 位点在痛风组和健康对照组中的基因型携带频率及等位基因携带频率,并分析此位点的多态性是否与痛风的发病相关,为进一步探讨泉州市人群痛风发病机制提供理论支持和数据分析。

资料与方法

1. 一般资料:本研究共选取 2016 年 12 月~2019 年 12 月在泉州市正骨医院已确诊的 163 例痛风患者和 187 例在体检过程中健康志愿者为研究对象。163 例痛风患者(患病组)均符合 1977 年美国风湿病协会制定的痛风性关节炎诊断标准,并排除患有肝病、糖尿病、肾病和其他代谢性疾病的患者,以消除其对尿酸水平的影响;187 例健康体检者作为对照组,已排除存在痛风、高尿酸血症或其他严重疾病的个人或家族病史的人员。在没有使用药物治疗的情况下测量了所有参与者的血清总蛋白、白蛋白、球蛋白、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、血尿素氮、肌酐和尿酸。本研究方案经泉州市正骨医院医学伦理学委员会审批,所有参与者均签署知情同意书。

2. 基因组 DNA 提取:抽取所有参与者的外周静脉血,取其中 200μl,采用 Pure Gene DNA Blood Kit (德国 QIAGEN 公司),根据使用说明书提取基因组 DNA。

3. 三引物等位基因特异性 PCR (allele specific PCR, AS - PCR):使用 Primer 5.0 软件,根据 rs3114018 (A > C) 位点附近序列设计相应的引物设计引物,为了提高特异性,在每个特异性引物 3'端第一位和 3'端倒数第 3 位置引入错配碱基^[11,12],引物序列如表 1 所示。PCR 反应体系(总体积 20μl)包括 0.2μl Taq DNA 聚合酶、2.5mmol/L dNTPs 0.4μl 和正反引物各为 0.8μl(每个样品需要两管 PCR 进行反应,内引物分别为反向引物 1 和反向引物 2),2μl Taq buffer(日本 TaKaRa 公司)的混合液,4μl 50% 甘油以及 5μl 5 × YW 缓冲液(本课题组研发),最后加无菌水至 19.4μl。PCR 管震荡混匀稍离心后加入 0.6μl 模板 DNA^[1]。反应参数设置如下:96℃ 预变性 3min;然后 94℃ 变性 20s,58℃ 退火 20s,72℃ 延伸 35s,以上程序共 38 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。将扩增产物在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,GelRed 染料

染色,用凝胶成像仪观察并记录结果。根据各样本电泳后条带的位置和数目,分析其基因型。

表 1 等位基因特异性 PCR 所用引物

基因位点	引物序列 (5'→3')
rs3114018	正向引物:CCTTCAGCCACTGAGGAAAAG
	反向引物 1:ACTCTTTCTTGGGTACTTTAGCTCTTAT
	反向引物 2:ACTCTTTCTTGGGTACTTTAGCTCTTAG

错配碱基以粗斜体及下划线标示

4. 痛风相关生化指标检测:采用全自动生化分析仪检测患病人群和对照人群的血尿酸、C 反应蛋白、血糖、甘油三酯等与痛风相关的生化指标,同时还测量肾结石的大小和分布,将该指标进行量化。其中,1 表示双肾未见明显异常,2 表示单侧肾结石,3 表示双侧肾结石^[1]。

5. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析。通过非参数检验方法分析患病人群与对照人群的各项临床参数是否存在差异,用 χ^2 检验分析患病人群和对照的 SNP 基因型是否偏离 Hardy - Weinberg 平衡 (HWE)。以非条件 Logistic 模型分析相对危险度 OR 的比值和 95% 的可信区间。用方差分析 (ANOVA) 计算痛风患者的基因型与临床特征之间的关联,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患病组和对照组各项指标比较:对照组和患病组之间临床特征的差异详见表 2。结果显示,痛风患者中男性比例显著高于女性 ($P < 0.001$)。与对照组比较,痛风患者的白蛋白、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、C 反应蛋白和肌酐水平异常。

2. ABCG2 基因 rs3114018 多态性与痛风发病相关性分析:采用在线工具对痛风组和健康对照组的 SNP 进行 Hardy - Weinberg 平衡分析,对照组和痛风组的 P 均 > 0.05 。结果显示,rs3114018 位点在各组中均符合 Hardy - Weinberg 平衡,因此样本具有群体代表性。

检测结果和等位基因频率详见表 3。在痛风患者中,C/C、A/C 和 A/A 基因型的频率分别为 36.20%、50.30% 和 13.50%,在健康对照组中分别为 19.25%、47.59% 和 33.16%。这两组等位基因分布比较,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 23.37, P < 0.001$)。痛风患者中 C 等位基因的频率显著高于健康对照组(分别为 61.35% 和 43.05%)。

表 2 患病组和健康对照组各项指标对比 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 ($n = 187$)	患病组 ($n = 163$)	P
男性/女性	120/67	152/11	<0.0001
年龄(岁)	45.21 ± 13.44	42.62 ± 15.10	>0.05
血清总蛋白(g/L)	70.46 ± 10.84	69.73 ± 17.31	>0.05
白蛋白(g/L)	44.40 ± 4.98	47.26 ± 6.25	<0.0001
球蛋白(g/L)	27.56 ± 5.28	27.86 ± 7.95	>0.05
总胆固醇(mmol/L)	5.20 ± 1.13	9.41 ± 40.31	0.03
甘油三酯(mmol/L)	1.56 ± 1.82	3.18 ± 10.78	<0.0001
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.32 ± 0.55	2.07 ± 9.79	0.005
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	4.51 ± 15.84	3.63 ± 1.45	<0.0001
血尿素氮(mmol/L)	5.26 ± 1.77	5.80 ± 4.49	>0.05
肌酐(μmol/L)	104.33 ± 66.02	112.27 ± 32.32	<0.0001
C反应蛋白(mg/L)	20.20 ± 5.45	3.54 ± 1.02	<0.001

表 3 痛风组与对照组 rs3114018 位点的基因型和等位基因频率分布的比较 [$n(\%)$]

组别	基因型				等位基因频率	
	AA	AC	CC	AC + CC	C	A
痛风组	22(13.50)	82(50.30)	59(36.20)	139(85.28)	200(61.35)	126(38.65)
对照组	62(33.16)	89(47.59)	36(19.25)	125(66.85)	161(43.05)	213(56.95)
χ^2	23.37				23.36	
P	<0.001				<0.001	

为了进一步分析 rs3114018 位点基因型与痛风发病的相关性,采用逻辑回归法分析 OR 值,校正因子为年龄、性别。结果发现,与 AA 基因型比较,携带 AC 基因型者对象发生痛风的风险提高了 2.597 倍(OR = 2.597,95% CI: 1.466 ~ 4.599, $P = 0.007$),校正后为 2.233 倍(OR = 2.233,95% CI: 1.260 ~ 3.954, $P = 0.025$);携带 CC 基因型对象发生痛风的风险提高了 4.619 倍(OR = 4.619,95% CI: 2.437 ~ 8.869, $P < 0.001$),校正后为 4.251 倍(OR = 4.619,95% CI: 2.244 ~ 8.054, $P = 0.023$);C 等位基因型

携带者发病风险与 A 等位基因比较提高了 2.099 倍(OR = 2.099,95% CI: 0.756 ~ 1.587, $P < 0.001$)。以上结果表明,C 等位基因可能是痛风发病的危险等位基因,携带 AC 和 CC 基因型的个体更容易患痛风。

3. 痛风相关生化指标与 rs3114018 位点基因型的关联性分析:根据 rs3114018 位点与痛风的显著相关性,笔者将各基因型与痛风相关生化指标进行了单因素方差分析,进一步研究了不同基因型与临床特征之间的关系。血尿酸、甘油三酯、尿素氮、C 反应蛋白、肾结石等表型与基因型之间存在关联性(表 4)。

表 4 rs3114018 位点的基因型与痛风相关生化指标的关联性

基因型	血尿酸 (μmol/L)	C 反应蛋白 (mg/L)	血糖 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)	尿素氮 (mmol/L)	肌酐 (mmol/L)	肾结石指标均值
AC + CC	485.78	14.81	5.56	2.05	5.54	5.73	110.45	1.53
AA	389.12	8.34	5.61	1.68	5.33	4.83	106.82	1.19
P	<0.001	0.006	0.771	0.001	0.128	0.021	0.289	<0.001

讨 论

根据目前对痛风遗传方式的研究和致病易感基因的筛选,已经确定 SLC17A3、SLC2A9 和 ABCG2 是重要的肾脏尿酸转运蛋白^[7,9]。ABCG2 基因主要表达于肾近曲小管刷状缘膜上,负责转运排泄尿酸。相比 SLC17A3、SLC2A9 尿酸盐转运体,其基因变异类型最多,基因水平上 SNP 突变可能会导致 ABCG2 蛋白表达异常,从而影响尿酸的转运。因此,ABCG2 的

单核苷酸多态性与血尿酸水平升高和痛风发病密切相关。常见的变异基因主要有 Q126X(rs72552713)和 Q141K(rs2231142)两个错义突变位点,被认为是原发性痛风及高尿酸血症的易感位点^[13]。rs3114018 单核苷酸多态点位于 ABCG2 基因的内含子区域,研究发现其虽然不直接参与蛋白的编码表达,但可能通过影响 RNA 的剪接,从而对 ABCG2 蛋白的功能或表达造成影响。Ren 等^[14]研究发现,CC 基因型的携带

者痛风发病风险明显高于 AA 和 AC 基因型, Yu 等^[15]研究发现,与正常组比较,等位基因 C 可能是原发性痛风发病的危险因素。

rs3114018 基因多样性与痛风的发病在泉州市人群中还未作充分研究。本研究选取 163 例痛风患者和 187 例健康对照者为研究对象进行分析,发现痛风患者携带高风险基因型(AC/CC 基因型)的比率为 85.28%,正常人群中为 66.85%;痛风组 rs3114018 位点 AA、AC、CC 基因型与对照组比较,携带频率比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。根据本研究对发病风险评估,CC 基因型携带者较 AA 基因型携带者相比痛风发病风险提高了 4.619 倍,C 等位基因携带者发病风险与正常 A 等位基因携带者比较提高了 2.099 倍。因此,C 等位基因与原发性痛风的发生具有相关性。同时,研究结果显示痛风患者的空腹甘油三酯、胆固醇、血尿素氮、肌酐均高于健康对照组,AC/CC 基因型的携带者的血尿酸、C 反应蛋白、甘油三酯、肾结石等指标都显著高于 AA 基因型的携带者,提示了 ABCG2 基因的 rs3114018 位点多态性与高脂血症、冠心病、肥胖的发生有关系,这与实际临床痛风患者常伴有糖、脂肪等物质代谢紊乱的表征相符^[16,17]。

血尿酸水平升高是痛风重要的特征,尿酸水平过高会促进低密度脂蛋白胆固醇的氧化和脂质的过氧化,进一步诱发或加重脂类代谢紊乱。过多的血尿酸蓄积在血管内皮,会对血管内皮造成损伤,引起动脉粥样硬化及血栓形成。由此可看出痛风与基础疾病之间有密切关系,临床治疗痛风时应对患者进行相关的健康教育,合理控制高糖、高脂肪食物的摄入,以减少心脑血管疾病的发病风险。

综上所述,本研究发现 ABCG2 基因 rs3114018 位点的多态性可能与泉州市人群的原发性痛风有关联,C 等位基因可能是易感基因位,但具体发病机制需开展进一步研究予以证实。同时,本研究尚有不足之处,由于研究样本量不够大,且泉州市不同种族间 SNP 等位基因频率存在差异,导致未检测到某些基因型,这可能导致统计效力的降低,使结果存在一定的偏差。因此,研究中观察到的结果有待于扩大样本量予以进一步证实,需要从大样本量不同种族分析 rs3114018 位点的多态性与泉州市人群痛风易感性之间的关联,同时联合其他易感基因,以提高原发性痛风易感性的预测水平,从而加强早期的预防和诊断。

参考文献

1 杨会勇, 许超尘, 王清瑶, 等. ABCG2 基因单核苷酸多态性与

- 闽南地区人群原发性痛风相关性研究[J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(1): 24-28
- 2 郑敏, 麻骏武. 高尿酸血症和痛风的遗传学研究进展[J]. 遗传, 2016, 38(4): 300-313
- 3 阎胜利, 赵世华, 李长贵, 等. 山东沿海居民高尿酸血症及痛风五年随访研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(7): 548-552
- 4 石白, 殷海波, 张锦花, 等. 痛风现代流行病学及其发病机制研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(6): 51-55
- 5 Li YL, Huang HB, Liang B, *et al.* Prevalence survey of hyperuricemia and its association with hypertriglyceridemia and hypertension in elderly people in Quanzhou of Fujian province[J]. Chin J Geriatr, 2013, 7(2): 15-18
- 6 Wang Q, Chen R, Du L, *et al.* An epidemiological and clinical study of primary gout[J]. Zhonghua Nei Ke, 2001, 40(1): 313-315
- 7 Zeng Q, Wang Q, Chen R, *et al.* Primary gout in Shantou: a clinical and epidemiological study[J]. Chin Med J, 2003, 116(3): 66-69
- 8 Nan H, Qiao Q, Dong Y, *et al.* Tuomilehto J. The prevalence of hyperuricemia in a population of the coastal city of Qingdao, China[J]. J Rheumatol, 2006, 33: 1346-1350
- 9 Dai SM, Han XH, Zhao DB, *et al.* Prevalence of rheumatic symptoms, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and gout in Shanghai, China: a COPCORD study[J]. J Rheumatol, 2003, 30: 2245-2251
- 10 韩瑞刚, 冯凯, 刘保池, 等. 单核苷酸多态性数据的卡方及 Logistic 回归分析在 SPSS 统计软件中的实现[J]. 总装备部医学学报, 2008, 10(2): 63-65
- 11 郑晨娜, 王清瑶, 黄玉香, 等. 采用改进的三引物等位基因扩增法对痛风相关 SNP 位点的分型研究[J]. 重庆医学, 2014, 8(5): 1308-1317
- 12 徐晓菲, 姜宝法, 张源潮, 等. 山东沿海地区人群血尿酸水平及其在痛风筛查中的意义[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(3): 205-206
- 13 Karis E, Crittenden DB, Pillinger MH. Hyperuricemia, gout, and related comorbidities: cause and effect on a two-way street[J]. South Med J, 2014, 107(4): 235-241
- 14 Ren YC, Jin TB, Sun XD, *et al.* PDK2 and ABCG2 genes polymorphisms are correlated with blood glucose levels and uric acid in Tibetan gout patients[J]. Gene Mol Res, 2016, 15(1): 1-8
- 15 Yu KH, Chang PY, Chang SC, *et al.* A comprehensive analysis of the association of common variants of ABCG2 with gout[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9988-10002
- 16 George RL, Keenan RT. Genetics of hyperuricemia and gout: implications for the present and future[J]. Curr Rheumatol Rep, 2013, 15(2): 309-313
- 17 Woodward OM. ABCG2: the molecular mechanisms of urate secretion and gout[J]. Am J Physiology - Renal Physiol, 2015, 309(6): F485-F488
- 18 夏燕, 陆光辉, 黄琼, 等. ABCG2 基因 rs3114018 单核苷酸多态性与武陵山地区痛风及高尿酸血症的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(7): 1054-1058

(收稿日期: 2021-08-27)

(修回日期: 2021-09-18)