

趋化因子受体6基因与陕西汉中地区 类风湿关节炎汉族人群相关性

闫铭锋¹ 李晓波² 苏扬³ 李婷¹ 陈苗² 柴阳²

【摘要】目的 探讨趋化因子受体6基因单核苷酸多态性位点与中国陕西汉中地区类风湿关节炎汉族人群的相关性。**方法** 采用病例-对照研究方法,收集768例RA患者和960例正常对照DNA样本;用聚合酶链反应(PCR)法扩增目的条带,使用单碱基延伸法(SnapShot)对rs1331301、rs1556413、rs3093024、rs1854853和rs3093023位点基因分型,分析与RA的相关性。**结果** CCR6基因5个标签SNP位点均符合哈迪温伯格平衡(HWE),RA组和对照组基因型差异均无统计学意义($P > 0.05$)。rs3093024位点A等位基因($OR = 1.22$ 、 $P = 0.003$),显性模式($OR = 1.33$ 、 $P = 0.0048$)RA组与对照组差异具有统计学意义。rs1854853位点A等位基因($OR = 1.20$ 、 $P = 0.0067$),显性模式($OR = 1.35$ 、 $P = 0.0063$),RA组与对照组差异具有统计学意义。rs3093023位点T等位基因($OR = 1.26$ 、 $P = 0.0009$),显性模式($OR = 1.38$ 、 $P = 0.0015$),隐性模式($OR = 1.33$ 、 $P = 0.025$),RA组与对照组差异具有统计学意义。rs1331301和rs1556413两个SNP位点等位基因和显性、隐性模式,RA组与对照组差异均无统计学意义。**结论** CCR6基因rs3093023、rs3093024和rs1854853三个单核苷酸多态性位点,可能是陕西汉中地区汉族人类风湿关节炎的易感基因位点。

【关键词】 趋化因子受体6基因; 类风湿关节炎; 单核苷酸多态性

Association of chemokine (C-C motif) receptor 6 gene polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis in Hanzhong Area of Shanxi Province Yan Mingfeng¹, Li Xiaobo², Su Yang³, Li Ting¹, Chen Miao², Chai Yang². ¹Department of Clinical Laboratory, ²Department of Microbiology and Immunology Laboratory, 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Hanzhong 723000, China; ³Department of Clinical Laboratory, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

Corresponding author: Li Xiaobo, Email: leexiaobo46@163.com

【Abstract】 Objectives To assess the association of chemokine (C-C motif) receptor 6 (CCR6) gene polymorphisms with rheumatoid arthritis (RA) among ethnic Han Chinese in Hanzhong Area of Shanxi Province. **Methods** The data of 768 patients with RA and 960 healthy controls were analyzed by case-control association method. All individuals were collected in Hanzhong Area of Shanxi Province of Han Chinese descent. Five (rs1331301, rs1556413, rs3093024, rs1854853 and rs3093023) single nucleotide polymorphisms (SNP) in CCR6 gene region were genotyped by the Snapshot method. **Results** There were a significant association of the rs3093024 [A] Allele ($OR = 1.22$, $P = 0.003$) and dominant model ($OR = 1.33$, $P = 0.004$) with RA susceptibility with Hanzhong of ShanXi Han Chinese population. The rs1854853 [A] Allele ($OR = 1.20$, $P = 0.007$) and Dominant model ($OR = 1.35$, $P = 0.006$) frequency distribution were significantly different between RA group and normal control group. Equally important, rs3093023 [T] Allele ($OR = 1.26$, $P = 0.009$), dominant model ($OR = 1.38$, $P = 0.002$) and recessive model ($OR = 1.33$, $P = 0.025$) frequency distribution were significantly different between RA group and normal control group. The rs1331301 and rs1556413 allele and genotyped polymorphisms were not significantly associated with RA susceptibility. **Conclusions** CCR6 gene of rs3093024, rs1854853 and rs3093023 are significantly associated with rheumatoid arthritis of Han Chinese population in Hanzhong Area of Shanxi Province.

【Key words】 Chemokine (C-C motif) receptor 6 (CCR6) gene; Single nucleotide polymorphism; Rheumatoid arthritis

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.02.013

作者单位: 723000 汉中市, 西安交通大学附属3201医院检验科¹、微免科²; 610072 成都市, 四川省人民医院检验科³

通讯作者: 李晓波, Email: leexiaobo46@163.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫系统性疾病, 病变常导致慢性炎症, 引起关节损伤和慢性疼痛。在成年人发病率约为1%^[1-2], 亚洲国家RA发病率约为0.2%~0.3%^[3], 其中女性RA发病人数约为男性患者的2倍^[4]。RA发病的病理机制除环境因素影响外, 约60%的患者与遗传因素有关^[5]。人体免疫系统在调节类风湿关节炎发病中提到关键性作用, 但其具体的病理机制还不清楚。

病原学研究发现, HLA-DRB1基因编码合成的人类主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex class II, MHC-II) 在自身免疫性疾病中发挥关键作用^[6]。CD4⁺辅助性T淋巴细胞 (Th CD4⁺) 在其中发挥关键的抗原递呈作用, 其中Th细胞亚型Th1细胞产生的 γ -干扰素在RA患者滑膜腔组织中高表达, 同时新发现Th细胞亚型Th17细胞表达白细胞介素17 (IL-17) 在RA动物模型中表达异常^[7]。CCR6基因编码生成的趋化因子受体6是一种鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 实验证明其是Th细胞亚群Th17细胞的感受器与多种自身免疫性疾病有关^[8-10]。Kochi等^[11]通过全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 发现CCR6基因在日本RA人群以及随后验证的欧洲RA人群中明显关联。随后Prasad等^[12]在北部印度人中发现CCR6基因rs1331301和rs1556413两个SNP位点与RA有关联。然而, 中国汉族人类类风湿关节炎人群未见CCR6基因相关报道, 为此本研究选取陕西汉中地区类风湿关节炎人群验证之前在欧洲、日本、北部印度人群中阳性单核苷酸多态性位点 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是否也是陕西汉中地区汉族人的易感基因位点, 报道如下。

资料与方法

一、研究对象

收集2010年9月至2014年7月陕西省汉中地区研究对象共1 728例, 其中确诊类风湿关节炎患者768例, 平均年龄 (49.5 ± 12.3) 岁; 正常对照组960例, 平均年龄 (48.9 ± 12.8) 岁。RA组收集于陕西省汉中市3201医院风湿血液科, 经临床医师确诊的患者, 诊断标准依据1987年美国风湿病学会风湿病诊断标准^[13]。对照组收集于3201医院体检中心, 社区健康体检人群, 经风湿科门诊医师询问家族遗

传史、生活史并健康体检; 类风湿因子、C-反应蛋白、红细胞沉降率和X线骨扫描均无异常的健康人群。

本研究得到3201医院伦理委员会批准, 操作程序符合赫尔辛基宣言, 所有纳入研究对象均征得受试者同意并签署知情同意书。RA组与对照组均按年龄和地域分布进行配比, 均为无亲缘关系人群。

二、方法

1. 病史询问及体格检查: 对全部研究对象采用标准化问卷调查, 包括年龄、性别、籍贯、职业、疾病史、家族史和并发症等, 并测量类风湿因子及抗环瓜氨酸抗体。

2. 基因组DNA提取和纯化: 采用低渗盐析法提取基因组DNA: 收集10 ml EDTA-K²抗凝静脉血, 加入0.2%低渗NaCl溶液, 振荡混匀, 置于冰上静置15 min, 后3 500 r/min离心10 min (有效离心半径 $r = 13$ cm), 弃去上清液, 再加入0.2%低渗NaCl溶液3 500 r/min离心10 min, 弃去上清液; 加入10 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 和10 mmol/L EDTA (4 ml), 10% SDS, 25 mg/ml的蛋白酶K和10 mg/ml的RNaseA, 混匀, 37 °C过夜温育; 加入4 ml酚/Tris溶液, 混匀; 3 500 r/min离心10 min, 氯仿提取两次, 获得水相, 加入1/10体积的3 mol/L NaAC (pH = 5.2), 两倍体积乙醇, 使DNA沉淀; 75%的乙醇洗涤1次, 以获得基因组DNA; 加入100 μ l TE DNA缓冲液, 然后定量测定 A_{260}/A_{280} 的吸光率。调整DNA浓度用ddH₂O校正至50 ng/ μ l, 统一编号置于-80 °C冰箱保存备用。

3. 标签SNPs选择和引物设计、合成: 本研究选择之前在其他类风湿人群报道的相关SNPs位点^[17, 19], 依据Hapmap、NCBI和Ensemble生物信息网站查找有关中国汉族人 (CHB) 数据库信息以MAF > 0.05为标签SNP选择标准。引物设计使用Primer Premier 5软件, 单倍体型分析使用Hapview 4.2软件。

4. 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增目的片段: 模板DNA (50 ng/ml) 1.0 μ l, 正反向引物 (上海生物工程有限公司) 各0.5 μ l, Taq扩增酶 (北京康为世纪生物有限公司) 7.5 μ l加水补足至15 μ l。反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 61 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 共进行35个循环; 最后72 °C延伸7 min, 12 °C保温。

5. 基因分型：基因分型采用单碱基延伸 (SnapShot)。PCR产物纯化分两组，第一组 (rs3093023、rs1854853和rs3093024) 和第二组 (rs1331301、rs1556413) 扩增产物各2 μ l混合。加入1 U碱性磷酸酶 (FastAP, 美国Promega公司) 以及1 U核酸外切酶 (*Exo I* 酶, 英国Biolabs公司), 混匀, 37 $^{\circ}$ C、30 min, 然后

80 $^{\circ}$ C、30 min灭活。取纯化后混合产物2 μ l, 分别加入SNaPshot引物各0.2 μ l, SNPshot[®] RMultiplex试剂1 μ l (美国ABI公司), 用ddH₂O补足5 μ l。荧光PCR反应条件: 96 $^{\circ}$ C预变性1 min; 96 $^{\circ}$ C变性10 s, 50 $^{\circ}$ C退火5 s, 60 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共进行25个循环; 12 $^{\circ}$ C保温。最后在5 μ l上述反应产物中加入0.5 μ l FastAP, 混匀, 37 $^{\circ}$ C条件下作用15 min, 80 $^{\circ}$ C条件下作用15 min, 灭活, 取上步纯化好的产物2 μ l, 加入8 μ l Hi-Di Formamide (高纯甲胺) 溶液。ABI 3730XL型测序分析仪 (美国ABI公司) 检测基因型。GeneMapper 4.0软件分析实验结果。为确定分型结果, 随机选取5%样本通过直接测序方法进行验证。

三、统计学处理

使用IBM SPSS 19.0软件分析结果。年龄采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 t 检验; 性别资料及单核苷酸多态性基因型和等位基因频率统计采用卡方检验, 检验结果采用Logistic回归分析方法用年龄和性别数据校正, 单倍体型分析使用Haploview 4.2软件。抗-环瓜氨酸阳性 (ACCP⁺) 是类风湿关节炎的重要评价指标, 本研究把ACCP⁺ RA与正常对照基因型和等位基因独立统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、流行病学基本资料和引物

本研究纳入研究对象共1728例, 其中类风湿关节炎组共768例, 其中女性RA患者性别比例显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P = 0.011$)。RA组与对照组年龄组差异无统计学意义 ($P = 0.547$)。抗-环瓜氨酸阳性 (ACCP⁺) RA组与正常对照比较性别比例差异具有统计学意义 ($P = 0.005$), 年龄差异亦具有统计学意义 ($P = 0.044$), 详见表1~2。

所入选CCR6基因5个SNP位点扩增PCR引物以及基因分型所用SnapShot引物序列、扩增退火温度和产物片段大小, 通过小样本实验来确定反应条件, 详见表3。

二、CCR6基因标签SNP位点等位基因和基因型频率与类风湿关节炎相关性

CCR6基因5个标签SNP位点 (rs1331301、rs1556413、rs3093024、rs1854853和rs3093023) 基因分型结果, 统计分析均通过了哈迪-温伯格平衡检验 ($P > 0.05$), 证明本研究样本具有群体代表性, 详见表4。

CCR6基因内含子区域rs3093024位点A等位基因和AA基因型频率分别为42.1%和16.7%, 均高于对照组的37.2%和13.5%; 其中A等位基因携带者患类风湿关节炎的风险是对照组的1.22倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.003$); 在显性基因型模式 (AG + GG VS. AA) 组中RA组患病风险是对照组的1.33倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0048$);

表1 类风湿关节炎组和正常对照组流行病学资料

分组	例数	性别 (男/女)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	患病时间 ($\bar{x} \pm s$, 年)	RF+ [例 (%)]	抗-CCP阳性 [例 (%)]
RA组	768	247/521	49.5 \pm 12.3	3.81 \pm 2.9	643 (83.7)	526 (68.5)
对照组	960	375/585	48.9 \pm 12.8	—	—	—
统计量		$\chi^2 = 6.612^b$	$t = 0.551^a$	—	—	—
P值		0.011	0.547	—	—	—

注: “—”无相关数据

表2 ACCP⁺ RA组和正常对照组流行病学资料

分组	例数	性别 (男/女)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	患病时间 ($\bar{x} \pm s$, 年)
ACCP ⁺ RA组	526	155/371	47.7 \pm 10.2	3.81 \pm 2.9
对照组	960	375/585	48.9 \pm 12.8	—
统计量		$\chi^2 = 13.634^b$	$t = 3.824^a$	—
P值		0.000	0.044	—

注: RA, 类风湿关节炎; RF, 类风湿关节炎因子; Anti-CCP, 抗环瓜氨酸抗体; ^a检测使用 t 检验; ^b检测使用卡方检验。“—”无相关数据

在隐性基因型模式 (AA + AG VS. GG) 组中RA组患病风险是对照组的1.28倍, 但两组差异无统计学意义 ($P = 0.068$), 详见表3~4。抗-环瓜氨酸阳性 (ACCP⁺) RA组与对照组比较发现rs3093024位点A等位基因携带者患类风湿关节炎的风险是对照组的1.27倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.002$); 在显性基因型模式组中ACCP⁺ RA组患病风险是对照组的1.38倍, 两组数据差异具有统计学意义 ($P = 0.0048$); 在隐性基因型模式组中ACCP⁺ RA组患病风险是对照组的1.35倍, 差异亦具有统计学意义 ($P = 0.03$), 详见表6~7。

rs1854853位点A等位基因和AA基因型频率分别为50.6%和24.7%, 均高于对照组的46.0%和21.4%; 其中A等位基因携带者患RA风险是对照组的1.20倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0067$); 在显性

基因型模式 (AG + GG VS. AA) 组中RA组患病风险是对照组的1.35倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0063$) 而隐性基因型模式 (AG + AA VS. GG) 组中RA组与对照组差异无统计学意义 ($P = 0.083$), 详见表4~5。在ACCP⁺ RA组与对照组比较发现, rs1854853位点A等位基因携带者患RA风险是对照组的1.24倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0043$); 在显性基因型模式组中ACCP⁺ RA组患病风险是对照组的1.45倍 ($P = 0.0029$); 隐性基因型模式组中ACCP⁺ RA组与对照组差异无统计学意义 ($P = 0.084$), 详见表5~6。

rs3093023位点T等位基因和TT基因型频率分别为42.6%和17.6%, 均高于对照组37.1%和13.9%; 其中T等位基因携带者患RA风险是对照组的1.26倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0009$);

表3 CCR6 基因 SNPs 位点 PCR 及 SNaPShot 引物设计

SNP	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	产物大小 (bp)
rs1331301	正向	58	800
	反向		
	SnapShot		
rs1556413	正向	58	690
	反向		
	SnapShot		
rs3093024	正向	58	479
	反向		
	SnapShot		
rs1854853	正向	58	503
	反向		
	SnapShot		
rs3093023	正向	58	369
	反向		
	SnapShot		

表4 CCR6 基因 SNPs 位点等位基因频率分布

SNP	位置	等位基因	HWE		RA组 [例 (%)]	对照组 [例 (%)]	OR值 (95%CI)	P值	*P值
			RA组	对照组					
rs1331301	Chr6: 167089150	C	0.463	0.944	701 (45.6)	828 (43.1)	1.11 (0.97~1.27)	0.139	0.128
		A			835 (54.4)	1 092 (56.9)			
rs1556413	Chr6: 167111255	A	0.697	0.615	693 (45.1)	824 (42.9)	1.09 (0.96~1.25)	0.195	0.181
		G			843 (54.9)	1 096 (57.1)			
rs3093024	Chr6: 167119305	A	0.245	0.665	646 (42.1)	715 (37.2)	1.22 (1.07~1.40)	0.004	0.003
		G			890 (57.9)	1 205 (62.8)			
rs1854853	Chr6: 167119574	A	0.346	0.799	777 (50.6)	883 (46.0)	1.20 (1.05~1.38)	0.007	0.007
		G			759 (49.4)	1 037 (54.0)			
rs3093023	Chr6: 167120802	T	0.492	0.933	655 (42.6)	713 (37.1)	1.26 (1.10~1.44)	0.001	0.009
		C			881 (57.4)	1 207 (62.9)			

注: SNP, 单核苷酸多态性; 位置, 来源于 NCBI 数据库; HWE, 哈迪-温伯格平衡; *P: 通过 Logistic 回归分析方法经年龄、性别修正后的 P 值

在显性基因型模式 (CT + CC VS. TT) 组中RA组患病风险是对照组的1.38倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0015$); 隐性基因型模式 (CT + TT VS. CC) 组中RA组患病风险是对照组的1.33倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.025$), 详见表4~5。在ACCP + RA组与对照组比较发现, rs3093023位点T等位基因携带者患RA风险是对照组的1.26倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0029$); 在显性基因型模式组中ACCP⁺ RA组患病风险是对照组的1.41倍 ($P = 0.0026$); 而隐性基因型模式组中ACCP⁺ RA组与对照组差异无统计学意义 ($P = 0.079$), 详见表6~7。

验证发现与北部印度RA人群相关联的rs1331301和rs1556413两个易感SNP位点在陕西汉中地区汉族RA人群等位基因、显性基因型模式、隐性基因型模式RA组与对照组差异均无统计学意义, 详见表4~7。

三、CCR6基因5个标签SNP位点连锁分析

应用Haploview 4.2软件, 分析CCR6基因5个标签SNP位点连锁分布, 结果发现rs3093024、rs1854853和rs3093023三个SNP位点在同一连锁不平衡区域, 图1可见5个标签SNP位点D'值均> 0.80, 其中rs3093024和rs1854853两个SNP位点完全连锁。对rs3093024、rs1854853和rs3093023三个

表5 CCR6 基因 SNPs 位点显性模型和隐性模型频率分布

SNP	基因型	RA组 [例 (%)]	对照组 [例 (%)]	显性模式			隐性模式		
				OR值 (95%CI)	P值	*P值	OR值 (95%CI)	P值	*P值
rs1331301	CC	165 (21.5)	178 (18.5)	1.10 (0.90~1.35)	0.354	0.339	1.20 (0.95~1.52)	0.128	0.109
	AC	371 (48.3)	472 (49.2)						
	AA	232 (30.2)	310 (32.3)						
rs1556413	AA	159 (20.7)	173 (18.0)	1.08 (0.88~1.33)	0.444	0.427	1.19 (0.93~1.51)	0.160	0.152
	AG	375 (48.8)	478 (49.8)						
	GG	234 (30.5)	309 (32.2)						
rs3093024	AA	128 (16.7)	130 (13.5)	1.33 (1.09~1.62)	0.005	0.005	1.28 (0.98~1.66)	0.070	0.068
	AG	390 (50.8)	455 (47.4)						
	GG	250 (32.6)	375 (39.1)						
rs1854853	AA	190 (24.7)	205 (21.4)	1.35 (1.09~1.68)	0.007	6.259×10 ⁻³	1.21 (0.97~1.52)	0.096	0.083
	AG	397 (51.7)	473 (49.3)						
	GG	181 (23.6)	282 (29.4)						
rs3093023	TT	135 (17.6)	133 (13.9)	1.38 (1.13~1.68)	0.002	1.536×10 ⁻³	1.33 (1.02~1.72)	0.034	0.025
	CT	385 (50.1)	447 (46.6)						
	CC	248 (32.3)	380 (39.6)						

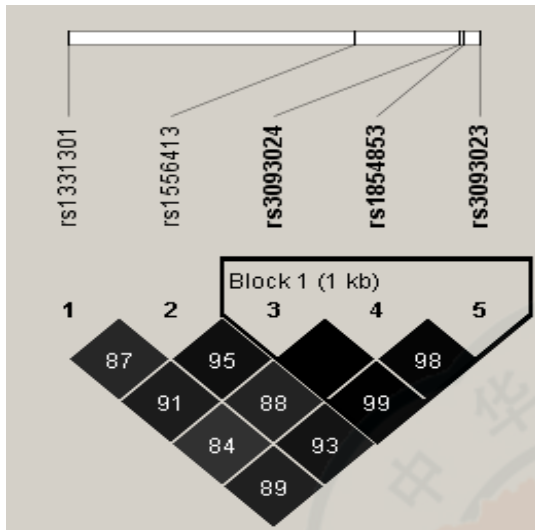
表6 ACCP 阳性 RA 组和对照组 CCR6 基因 SNPs 位点等位基因频率分布

SNP	等位基因	HWE		ACCP ⁺ RA组 [例 (%)]	对照组 [例 (%)]	OR值 (95%CI)	P值	*P值
		RA组	对照组					
rs1331301	C	0.325	0.944	478 (45.4)	828 (43.1)	1.10 (0.94~1.28)	0.225	0.208
	A			574 (54.6)	1092 (56.9)			
rs1556413	A	0.576	0.615	488 (46.4)	824 (42.9)	1.15 (0.99~1.34)	0.068	0.061
	G			564 (53.6)	1096 (57.1)			
rs3093024	A	0.405	0.665	451 (42.9)	715 (37.2)	1.27 (1.09~1.47)	0.003	0.002
	G			601 (57.1)	1205 (62.8)			
rs1854853	A	0.215	0.799	541 (51.4)	883 (46.0)	1.24 (1.07~1.45)	0.005	0.004
	G			511 (48.6)	1037 (54.0)			
rs3093023	T	0.230	0.933	449 (42.7)	713 (37.1)	1.26 (1.08~1.47)	0.003	0.003
	C			603 (57.3)	1207 (62.9)			

注: SNP, 单核苷酸多态性; 位置, 来源于NCBI数据库; HWE, 哈迪-温伯格平衡; *P: 通过Logistic回归分析方法经年龄、性别修正后的P值

SNP位点组成的连锁不平衡区域单倍体型分析发现, GGC单倍体型RA组频率显著低于对照组, 两者差异具有统计学意义 ($P = 0.004$), RA组患病

风险是对照组的0.82倍, 可见GGC单倍体型提到保护性作用。AAT单倍体型RA组频率显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P = 0.002$), RA组患病风险是对照组的1.24倍, GGC单倍体型可能是危险碱基, 详见表8。



注: 图中方框颜色深浅表示连锁紧密程度; 方框内数字表示D' 值; Block1表示3个SNP位点处于一个连锁不平衡区域

图1 CCR6基因5个SNP位点连锁图

讨论

类风湿关节炎是一种常见的自身免疫性疾病, 病变导致滑膜衬里细胞增生、间质大量炎性细胞浸润, 以及微血管的新生、血管翳的形成及软骨和骨组织的破坏。环境因素和遗传因素交互作用在RA发病中起到重要作用。目前遗传学通过全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 已经在多个种族成功定位了包括HLA、PADI4、IRF5和PTPN22等多个基因与RA有关联^[14-15]。CCR6基因编码生成的趋化因子受体6是Th细胞亚群Th17细胞的感受器参与了多种自身免疫性疾病^[8-10]。CCR6基因高表达增加 $\gamma\delta$ T淋巴细胞、B淋巴细胞、树突状细胞生成IL-17的能力^[16-17]。IL-17是一种强力的延

表7 ACCP 阳性 RA 组和对照组等位基因及显性模型和隐性模型频率分布

SNP	基因型	ACCP ⁺ [例 (%)]	对照 [例 (%)]	显性模式			隐性模式		
				OR值 (95%CI)	P值	*P值	OR值 (95%CI)	P值	*P值
rs1331301	CC	103 (19.6)	178 (18.5)	1.18 (0.94~1.49)	0.153	0.142	1.07 (0.82~1.40)	0.624	0.605
	AC	272 (51.7)	472 (49.2)						
	AA	151 (28.7)	310 (32.3)						
rs1556413	AA	110 (20.9)	173 (18.0)	1.21 (0.96~1.53)	0.106	0.096	1.20 (0.92~1.57)	0.175	0.159
	AG	268 (51.0)	478 (49.8)						
	GG	148 (28.1)	309 (32.2)						
rs3093024	AA	92 (17.5)	130 (13.5)	1.38 (1.10~1.73)	0.005	0.005	1.35 (1.01~1.81)	0.041	0.030
	AG	267 (50.8)	455 (47.4)						
	GG	167 (31.7)	375 (39.1)						
rs1854853	AA	132 (25.1)	205 (21.4)	1.45 (1.14~1.86)	0.003	0.003	1.23 (0.96~1.59)	0.100	0.084
	AG	277 (52.7)	473 (49.3)						
	GG	117 (22.2)	282 (29.4)						
rs3093023	TT	90 (17.1)	133 (13.9)	1.41 (1.13~1.76)	0.003	0.003	1.28 (0.96~1.72)	0.093	0.079
	CT	269 (51.1)	447 (46.6)						
	CC	167 (31.7)	380 (39.6)						

注: SNP: 单核苷酸多态性; ACCP: 抗-环瓜氨酸

表8 CCR6 基因一个连锁不平衡区域中 3 个 SNP 单倍体频率分布

单倍体型	RA组频率	对照组频率	χ^2 值	OR值 (95%CI)	P值
G-G-C	0.490	0.539	8.189	0.82 (0.72~0.94)	0.004
A-A-T	0.421	0.370	9.421	1.24 (1.08~1.42)	0.002
G-A-C	0.084	0.088	0.126	0.96 (0.75~1.22)	0.723

迟细胞反应的细胞因子,作用类似于 γ -干扰素,其在多种组织增加单核细胞和中性粒细胞聚集引起炎症反应;另外,IL-17可诱导IL-23参与组织损伤作用^[18]。

CCR6基因内含子区域rs3093024位点, Kochi等^[11]通过GWAS研究在日本RA人群和随后欧洲RA人群验证中都证明了与rs3093024位点存在相关性,并且在欧洲RA人群中发现与rs3093023位点存在密切连锁关系 D' 值 > 0.99 ,本研究同样验证出这两个位点存在密切连锁关系 $D' = 0.99$ 。另外Teng等^[19]和Chang等^[20]团队分别在新加坡和台湾类风湿关节炎人群中证实rs3093024是CCR6的易感基因位点。本研究在陕西汉中地区汉族人群同样验证出rs3093024是RA的易感基因位点与新加坡、中国台湾和欧洲RA人群结果一致,并且在随后单倍体分型中首次发现rs3093024、rs1854853和rs3093023在同一个连锁不平衡区域。Jiang等^[21]发现rs1854853位点与北京、上海汉族RA人群具有相关性,本研究在北京、上海地区汉族RA验证结果一致。rs3093023位于rs3093024位点下游相距1 496 bp, Stahl等^[14]在欧洲RA人群通过GWAS首次发现rs3093023与RA相关联,并在其他欧洲RA人群中验证出相同结果。Kochi等^[11]在日本人群也发现CCR6基因rs3093023与RA有关联。本次陕西汉中地区汉族人群验证中再次证明rs3093023与RA有关联,可能是类风湿关节炎的易感基因位点。rs1331301和rs1556413位点首次报道是北部印度类风湿关节炎的易感基因位点^[12],本研究在陕西汉中地区汉族人群中未能证明与RA存在相关性,可能与种族异质性有关系。

类风湿关节炎是环境因素和遗传多因素交互作用形成,目前致病机制仍不清楚。本研究验证出CCR6基因内含子区域rs3093023、rs3093024和rs1854853共3个SNP位点与陕西汉中地区汉族类风湿关节炎人群有关联。该研究结果对后续研究提供了理论依据,不同碱基变化具体作用机制尚有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*,2010,376(9746):1094-1108.
- 2 Kim HR, Park MK, Cho ML, et al. Induction of macrophage migration inhibitory factor in ConA-stimulated rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the p38 map kinase-dependent signaling pathway[J]. *Korean J Intern Med*,2010,25(3):317-326.
- 3 Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res*,2002,4(Suppl 3):S265-S272.
- 4 Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. *Nature*,2003,423(6937):356-361.
- 5 MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins[J]. *Arthritis Rheum*,2000,43(1):30-37.
- 6 Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, et al. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis[J]. *Genes Immun*,2004,5(3):151-157.
- 7 Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model[J]. *J Exp Med*,2007,204(12):2803-2812.
- 8 Williams IR. Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system[J]. *Immunol Res*,2004,29(1-3):283-292.
- 9 Hemdan NY, Birkenmeier G, Wichmann G, et al. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*,2010,9(11):785-792.
- 10 Romagnani S, Maggi E, Liotta F, et al. Properties and origin of human Th17 cells[J]. *Mol Immunol*,2009,47(1):3-7.
- 11 Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, et al. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility[J]. *Nat Genet*,2010,42(6):515-519.
- 12 Prasad P, Kumar A, Gupta R, et al. Caucasian and Asian specific rheumatoid arthritis risk loci reveal limited replication and apparent allelic heterogeneity in north Indians[J]. *PLoS One*,2012,7(2):e31584.
- 13 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*,1988,31(3):315-324.
- 14 Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci[J]. *Nat Genet*,2010,42(6):508-514.
- 15 Kim K, Bang SY, Lee HS, et al. High-density genotyping of immune loci in Koreans and Europeans identifies eight new rheumatoid arthritis risk loci[J]. *Ann Rheum Dis*,2014,74(3):e13.
- 16 Haas JD, González FH, Schmitz S, et al. CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN- γ -producing gammadelta effector T cells[J]. *Eur J Immunol*,2009,39(12):3488-3497.
- 17 Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,2003,14(5):409-426.
- 18 Astry B, Venkatesha SH, Moudgil KD. Involvement of the IL-23/IL-17 axis and the Th17/Treg balance in the pathogenesis and control of autoimmune arthritis[J]. *Cytokine*,2015,74(1):54-61.
- 19 Teng E, Leong KP, Li HH, et al. Analysis of a genome-wide association study-linked locus (CCR6) in Asian rheumatoid arthritis[J]. *DNA Cell Biol*,2012,31(4):607-610.
- 20 Chang WC, Woon PY, Wei JC, et al. A single-nucleotide polymorphism of CCR6 (rs3093024) is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis but not ankylosing spondylitis, in a Taiwanese population[J]. *J Rheumatol*,2012,39(8):1765-1766.
- 21 Jiang L, Yin J, Ye L, et al. Novel risk loci for rheumatoid arthritis in Han Chinese and congruence with risk variants in Europeans[J]. *Arthritis Rheumatol*,2014,66(5):1121-1132.

(收稿日期: 2015-07-27)

(本文编辑: 孙荣华)