

# 甘肃汉族人群 COL9A2 基因多态性与腰椎间盘突出症术后复发的相关性研究

王兴盛<sup>1</sup> 王想福<sup>2</sup> 赵宁<sup>2</sup> 范有福<sup>2</sup> 孙凤岐<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:探讨 COL9A2 基因 rs12077871 和 rs3737820 位点基因多态性与甘肃汉族人群腰椎间盘突出症术后复发的关系。方法:分析来自 2006 年 3 月至 2013 年 3 月甘肃省中医院脊柱骨科就诊并行手术治疗,且年龄、性别相匹配的腰椎间盘突出症患者行髓核摘除术后无复发且无临床症状者(95 例)为对照组;髓核摘除术后复发且有临床症状者(82 例)为病例组。收集两组患者外周血样本,提取 DNA,应用聚合酶链反应—连接酶检测反应(PCR-LDR)法分析病例组与对照组 rs12077871 和 rs3737820 位点基因型及等位基因频率,采用“病例-对照”方法分析基因型相关性。结果:rs12077871 位点的各基因型与等位基因频率分布在病例组和对照组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而 rs3737820 位点的各基因型与等位基因频率分布在病例组和对照组之间均差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:COL9A2 rs12077871 位点基因多态性与甘肃汉族人群腰椎间盘突出症术后复发易感性存在关联性。

**[关键词]** 腰椎间盘突出症术后;COL9A2;基因多态性

**[中图分类号]** R681.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)11-0007-04

## Correlation Research of COL9A2 Gene Polymorphism in Gansu Han Population and Postoperative Recurrence of Lumbar Disc Herniation

WANG Xingsheng<sup>1</sup> WANG Xiangfu<sup>2</sup> ZHAO Ning<sup>2</sup> FAN Youfu<sup>2</sup> SUN Fengqi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gansu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China;

<sup>2</sup>Gansu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China.

**Abstract Objective:** To explore the relationship between the gene polymorphism of rs12077871 and rs3737820 locus in COL9A2 and the postoperative recurrence of lumbar disc herniation in Han population in Gansu province. **Methods:** An analysis was performed on the patients with lumbar disc herniation who went to the department of orthopedics in Gansu provincial hospital of traditional Chinese medicine(TCM)and was treated with operation from March 2006 to March 2013. In addition, their age and gender were matched. The patients who had no recurrence and no clinical symptoms after the micro endoscopic discectomy(MED, 95 cases)were divided into the normal group. And the other who had recurrence and clinical symptoms after MED(82 cases)were divided into the case group. First, the blood sample of the two groups were collected. Secondly, the DNA was extracted from the sample. Then the genotype and allele frequency of rs12077871 and rs3737820 between the normal and case group were analyzed by PCR-LDR. Finally, the correlation of genotype was analyzed according to the ways of the case-control study. **Results:** The genotype and allele frequency at rs12077871 locus had significant difference between the two group( $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference at rs3737820 locus between the two group( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** There is an association between the gene polymorphism of rs12077871 locus in COL9A2 and the susceptibility of postoperative recurrence of lumbar disc herniation in Han population in Gansu Province.

**Keywords:** postoperative recurrence of lumbar disc herniation; COL9A2; gene polymorphism

基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(1310RJZA053)

<sup>1</sup> 甘肃省中医药研究院(兰州, 730050)

<sup>2</sup> 甘肃省中医院

遗传因素对腰椎间盘突出症(Lumbar Disc Herniation, LDH)的发展有重要作用,分析基因变异及多态性对 LDH 的发展及预后具有重要意义<sup>[1]</sup>。多项相关研究

证实 COL9A2 等位基因突变体与椎间盘退变疾患的发展具有显著关联性,其 COL9A2 基因 Trp2 突变发生率高达 4%<sup>[2]</sup>。然而目前关于 COL9A2 基因多态性对于 LDH 行髓核摘除术后的影响还未见相关报道,研究 COL9A2 基因多态性对腰椎间盘突出症术后患者预后及预防治疗具有重要意义,为了解 COL9A2 基因多态性在甘肃汉族人群中的分布及其与 LDH 术后复发的相关性,笔者对 LDH 术后复发患者的 COL9A2 启动子区域两个多态性位点(rs12077871 和 rs3737820 位点)进行了分析,现报告如下。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象

对自 2006 年 3 月至 2013 年 3 月甘肃省中医院脊柱骨科就诊并行手术治疗的 177 例腰椎间盘突出症患者进行分组随访,其中 LDH 行髓核摘除术后无复发且无临床症状者(95 例)纳为对照组,LDH 行髓核摘除术后复发且有临床症状者(82 例)纳为病例组,采取静脉血以备检测。

### 1.2 腰椎间盘突出症复发诊断

1)患者在术后腰痛、下肢放射痛及下肢麻木症状缓解或消失,半年后上述症状再次出现或加重;2)CT, MRI 或椎管造影检查显示原手术节段椎间盘突出、骨质增生、侧隐窝狭窄,硬膜外纤维化或椎体滑脱。

### 1.3 纳入及排除标准

病例组纳入标准主要依靠详细病史,临床检查结合影像学检查。包括:1)症状,腰痛伴下肢放射痛,可有间歇性跛行;2)体征包括相对应神经区感觉、肌力或键反射异常中的一项,直腿抬高试验阳性,可有椎旁深压痛;3)脊髓造影、CT 或 MRI 扫描诊断与临床检查定位相一致;4)经过 3~6 个月非手术治疗无效;5)症状严重影响工作与生活;6)不包括单纯腰椎管狭窄、腰椎滑脱症病例;7)既往有腰椎间盘突出症,并于甘肃省中医院脊柱骨科住院由同一主刀医师行髓核摘除手术的。排除标准:1)合并其他腰椎相关疾病如腰椎管内肿瘤等;2)患者存在严重内科基础疾病等;3)影像学资料、临床资料不完整的腰椎间盘突出患者;4)未获得知情同意。

对照组纳入标准:1)同期于甘肃省中医院脊柱骨科手术并门诊复查患者;2)年龄、性别、劳动强度与病例组匹配,均为甘肃汉族人群;3)知情同意。排除标准:1)未获得知情同意;2)既往有相关脊柱外伤和其他脊柱手术史;3)脊柱肿瘤、结核等。

### 1.4 主要试剂

1)DNA 提取试剂盒;2)琼脂糖,EB 染料,DNA maker,DNA 上样缓冲液,Tris,硼酸,EDTA,10×PCR Buffer,dNTP,Taq DNA 聚合酶等购自上海迪奥生物科技有限公司。

## 1.5 方法

**1.5.1 外周血基因组 DNA 分离** 1)DNA 提取 采用离心柱法提取 DNA,将血液样品 37℃ 融化,采用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

2)全 DNA 的鉴定:(1)紫外分光光度计法:将提取的样品利用无 DNAse 的去离子水稀释 100 倍,紫外分光光度计检测其在 260,280,320 nm 处吸光值,利用 260/280 判断提取 DNA 的纯度,260 和 320 计算 DNA 的浓度。(2)琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性:用 TAE 缓冲液配制 1.5%~2%(质量浓度)的琼脂糖凝胶。装好电泳板,用琼脂糖液封闭缝隙。再向琼脂糖液中加入 2 μL EB,(小心 EB 中毒)最后将琼脂糖液倒入电泳板中,冷却。待琼脂糖冷却之后,拔出梳子,将胶块放入电泳槽。将提取的 DNA 样品 2 μL 与上样缓冲液混合,上样于凝胶中,调节电压为 130 V,时间 40 min,进行电泳。电泳结束之后,将胶块放入紫外扫描分析仪中观察、照相。

**1.5.2 PCR-LDR 反应** 利用 GENBANK 数据库查的 COL9A2 的基因全序列及基因号,送大连宝利生物科技有限公司进行引物设计,设计进自行检查后进行引物合成。rs12077871 位点 PCR 上游引物为 ATTT-GTAICTTTTGTTATCTGTCTAT;下游引物为 AGAATGGAGGGAGAGGGAA, rs3737820 位点 PCR 上游引物为 ACCATCTGTGCCAAGAGC,下游引物为 ATTGCTGGAATCTCATTGTCT。PCR 反应体系为 20 μL,水 367 μL,10×PCR Buffer 50 μL,MgCl<sub>2</sub> 30 μL,dNTP 7 μL,Taq DNA 聚合酶 6 μL,引物 20 μL。取 100 μL 离心管 18 个,将上述料液分装到 18 个离心管中,每管 24 μL。向上述 18 个 EP 管中加入 18 种番茄的 DNA,每管 1 μL。按照下列参数对 PCR 仪输入程序:94℃ 预变性 4 min,35 个循环,94℃ 变性 30 s,36.5℃ 退火 1 min,65℃ 延伸 1 min。循环结束 65℃ 延伸 5 min。将装有 PCR 反应料液的 EP 管装入 PCR 仪,启动上述程序进行 PCR 扩增。LDR 反应体系为 20 μL,含特异性探针 1 μL,PCR 产物 ≥1 μL,Buffer 1 μL,连接酶 0.05 μL。LDR 反应参数为 95℃ 预变性 2 min,94℃ 30 s,50℃ 2 min,30 次循环。

**1.5.3 基因型检测** 取 LDR 产物,应用 DNA 测序仪检测不同长度 DNA 片段的荧光强度,根据产物片段大小确定基因型。

### 1.6 统计学方法

SHEsis 软件检测两组基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。应用 SPSS13.0 软件进行统计分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COL9A2 基因扩增结果

基因扩增结束后,进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示。

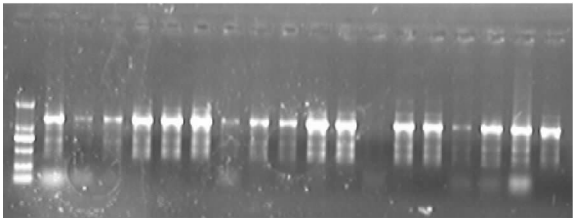


图 1 基因扩增结束后电泳检测图

表 1 两组患者基因型分布

基因型	病例组		对照组		P	调整 OR	95%CI <sup>1)</sup>
	例数	频率	例数	频率			
rs12077871	82		95				
AA	30	36.6	48	50.5		1.00	
AT	29	35.3	33	34.7	<0.01	1.67	1.17~2.54
TT	23	28.1	14	14.8		3.52	2.12~5.17
rs3737820							
CC	55	67.2	74	77.9		1.00	
CT	7	8.5	7	7.3	0.871	1.00	0.35~2.20
TT	20	24.3	14	14.8		1.89	0.69~2.04

注:1)调整因素为年龄、性别、体质量。

2.3 COL9A2 基因 rs12077871 和 rs3737820 位点等位基因分布情况

表 2 可见,rs12077871 等位基因的频率在病例组和对照组中分布差异有统计学意义(分别  $P<0.01$ );而 rs3737820 的等位基因频率在 2 组间的分布差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 2 两组 COL9A2 等位基因分布比较

SNPs	等位基因	病例组		对照组		P
		例数	频率	例数	频率	
rs12077871	A	86	52.4	128	67.4	<0.01
	T	78	47.6	62	32.6	
rs3737820	C	128	78.1	155	81.6	0.365
	T	36	21.9	35	18.4	

3 讨论

腰椎间盘突出症(LDH)是引起下腰痛及坐骨神经痛的主要原因。除了传统的保守治疗外,随着手术治疗方法普及和提高,腰椎间盘突出症手术治疗的效果令人满意,治愈率不断上升,手术疗效优良率一般在 90%左右,尽管大多数椎间盘摘除手术都取得了良好的疗效,但仍有一部分术后患者出现症状不缓解、加重甚至复发<sup>[3,4]</sup>。而以往的临床研究重点主要关注其病因学研究,如术中良好的外科技技术、术后适当的功能锻炼及节段的机械稳定等,其他因素如身高、体质量和遗传学则较少关注。随之临床病因研究发现处在相同环境因素中(如同一医师手术,同一部位等)出现某些人

2.2 COL9A2 基因 rs12077871 及 rs3737820 位点多态性分布

由表 1 可见,经检测两组基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,说明本研究人群具有群体代表性,rs12077871 位点的基因型在 2 组分布差异有统计学意义( $P<0.01$ ),将年龄、性别、肥胖和劳动等因素调整之后,rs12077871 位点(A/T)的位点变异与 LDH 髓核摘除术后复发呈正关联,rs3737820 位点各基因型在病例组和对照组之间分布差异无统计学意义( $P=0.871$ )。

群发病概率显著增高而无法解释。

随着遗传病学的研究深入,目前研究显示除外其他如吸烟、精神等危险因素的外遗传因素对 LDH 发展发挥重要作用<sup>[5,6]</sup>。IX 型胶原蛋白(COL9)是髓核、纤维环和椎间盘终板的一个小的结构部分,对椎间盘提供机械支撑,COL9 是由 COL9A1,COL9A2 和 COL9A3 基因编码的三个  $\alpha$  链( $\alpha_1$ , $\alpha_2$  和  $\alpha_3$ )组成的异源三聚体<sup>[7]</sup>。现已知 COL9 突变会对小鼠模型以及人类的椎间盘退变产生影响。应用转基因技术致小鼠的突变体  $\alpha_1$ (IX)胶原蛋白和小鼠灭活 COL9A1 基因过度表达,发现其有加速椎间盘退变的趋势<sup>[8]</sup>。研究发现 TRP2(Gln326Trp)和 TRP3(Arg103Trp)两种多态性分别在 COL9A2 和 COL9A3,并且与人类椎间盘退变有关。TRP2 和 TRP3 等位基因已被证实与退行性腰椎管狭窄症相关<sup>[9,10]</sup>,因此,它们是有关椎间盘退变研究的候选基因多态性。

Videman 等<sup>[11]</sup>首次报道 TRP2 等位基因与椎间盘退变的关联性,该研究显示存在 TRP2 等位基因 157 人中有 6 人(3.8%)出现椎间盘突出症的典型症状如坐骨神经痛,而对照组 174 人却没有发现。73%的坐骨神经痛患者在 MRI 检查上椎间盘都有退变的表现,遗传连锁分析显示在所有四个分类的研究中,该 TRP2 等位基因与疾病表型共分离,并且 804 名中国人种大样本研究证实了这一发现<sup>[12]</sup>。研究显示从 MRI 检查观察在 30~39 岁年龄区间 TRP2 等位基因

出现椎间盘退变及许莫氏结节高于常人 4 倍,在 40~49 岁年龄区间则高于常人 2.4 倍<sup>[12]</sup>。TRP2 在中国人口的出现率为 20%,日本人口为 21.3%,研究还发现 TRP2 是一种与年龄相关的危险因素,尤其在年轻患者<sup>[13]</sup>,年龄小于 40 岁且伴有症状的腰椎间盘突出症患者,TRP2 将增加 6 倍的严重退化风险,而在 105 例希腊人群未发现等位基因 TRP2<sup>[13]</sup>。但也有文献报道在德国人群中 TRP2 等位基因与患有椎间盘疾患并行手术治疗的患者无显著关联<sup>[14]</sup>,在日本人口的研究却发现另一易感等位基因 COL9A2 是与椎间盘退变,甚至更严重退化有关<sup>[15]</sup>。TRP2 与椎间盘退变关联性的差异可能归因于不同民族间不同的等位基因频率。因此研究不同人种、不同地域人群的遗传因素变化对探索 LDH 的遗传学机制有重要意义。

近年来伴随人类基因组的测序完成,可认识到基因多态性可以解释为什么某些个体处于复发的较高的风险中。这些多态性存在丰富的基因组中,在人类相对频繁但部分确具有显著生物效应,因此多态性对研究具有重要意义。目前,大多数遗传多态性的确切作用仍然未被揭开。阐明与 LDH 髓核摘除术后复发有关的遗传组分可能提供深入了解该过程的机制。本研究结果表明,中国甘肃汉族 LDH 髓核摘除术后患者中, COL9A2 基因变异与 LDH 术后复发相关, rs12077871 位点三种基因型在 LDH 术后复发组中的分布频率 AA:AT:TT 为 0.366:0.353:0.281,与对照组分布频率相比差异有统计学意义,且(A/T)的位点变异与 LDH 髓核摘除术后复发呈正关联,说明 COL9A2 基因 rs12077871 位点多态性对人体腰椎间盘突出症术后复发的易感性具有较大的影响,而 rs3737820 位点多态性不影响人体对腰椎间盘突出症术后复发易感性。

综上所述:COL9A2 基因多态性与甘肃汉族人群腰椎间盘突出症术后复发易感性之间存在关联性,但由于存在样本量及病例组患者症状主观性所限,还需增大样本量及更多客观指标加以证实。

## 参考文献

- [1] 徐光辉,徐杰,郑冰,等. 福建地区汉族人群 VDR 基因 Taq I 多态性与腰椎间盘突出退行性变的相关性研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2014,29(9):882-884.
- [2] Zhu Y, Wu JJ, Weis MA, et al. Type IV collagen neo-deposition in degenerative discs of surgical patients whether genotyped plus or minus for COL9 risk alleles[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(24):2031-2038.
- [3] 赵兵,崔易坤,宋晋刚,等. 腰椎间盘突出症再手术原因分析与手术方式选择[J]. 成都医学院学报, 2016, 11(5): 592-596.

- [4] 谢新景,贾世青,陈涛. 手术治疗椎间盘突出症的长期疗效及其影响因素[J]. 中外医学研究, 2015, 13(21): 113-114.
- [5] 袁启令,李新友,刘亮,等. Fas/FasL/Caspase-9 凋亡基因多态性和环境危险因素的交互作用与腰椎间盘突出症的关系[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2015, 36(3): 350-356.
- [6] 郭涛,魏人前,邓睿. 腰椎间盘突出症术后复发的相关因素分析[J]. 西部医学, 2016, 28(8): 1110-1113.
- [7] Janeczko L, Janeczko M, Chrzanowski R, et al. The role of polymorphisms of genes encoding collagen IV and VI in lumbar disc disease[J]. Neurologia i neurochirurgia polska, 2014, 48(1): 60-62.
- [8] Boyd LM, Richardson WJ, Allen KD, et al. Early-onset degeneration of the intervertebral disc and vertebral end plate in mice deficient in type IX collagen[J]. Arthritis & Rheumatism, 2008, 58(1): 164-171.
- [9] Zawilla NH, Darweesh H, Mansour N, et al. Matrix metalloproteinase-3, vitamin D receptor gene polymorphisms, and occupational risk factors in lumbar disc degeneration [J]. J Occup Rehabil, 2014, 24(2): 370-381.
- [10] Kamper M, Hamann N, Prein C, et al. Early changes in morphology, bone mineral density and matrix composition of vertebrae lead to disc degeneration in aged collagen IX-/-mice[J]. Matrix Biology, 2016, 49: 132-143.
- [11] Videman T, Saarela J, Kaprio J, et al. Associations of 25 structural, degradative, and inflammatory candidate genes with lumbar disc desiccation, bulging, and height narrowing[J]. Arthritis & Rheumatism, 2009, 60(2): 470-481.
- [12] Jim JJ, Noponen-Hietala N, Cheung KM, et al. The TRP2 allele of COL9A2 is an age-dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(24): 2735-2742.
- [13] Kales SN, Linos A, Chatzis C, et al. The role of collagen IX tryptophan polymorphisms in symptomatic intervertebral disc disease in Southern European patients[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2004, 29(11): 1266-1270.
- [14] Bagheri MH, Honarpisheh AP, Yavarian M, et al. MRI phenotyping of COL9A2/Trp2 and COL9A3/Trp3 alleles in degenerative disc disease: a case-control study in south-western iranian population reveals a significant Trp3-disease association in males[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2016, 6(Epub ahead of print).
- [15] Hyun SJ, Park BG, Rhim SC, et al. A haplotype at the COL9A2 gene locus contributes to the genetic risk for lumbar spinal stenosis in the Korean population[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(16): 1273-1278.

(收稿日期:2017-05-02)