

基于候选基因关联分析的非创伤性股骨头坏死 基因组学研究进展

袁兆丰¹ 高润子² 张长昊³ 张志广¹ 夏天卫^{3△} 沈计荣^{3△}

[关键词] 股骨头坏死;基因组学;单核苷酸多态性;全基因组关联研究

[中图分类号] R681.8 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2022)02-0081-04

非创伤性股骨头坏死(Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head, NONFH)是股骨头坏死(Osteonecrosis of the Femoral Head, OFH)按病因学分类的一个亚型,也是临床最常见的 ONFH 类型。引发 NONFH 的危险因素包括皮质内固醇使用、酗酒、减压病、镰刀细胞贫血等^[1]。但一些因风湿免疫疾病而长期服用激素的患者却终生没有出现 NONFH,而一些仅接受短期激素治疗的患者却罹患该疾病。类似的“剂量悖论”也会出现在饮酒群体患病情况中,这提示不同个体对以上危险因素的敏感和耐受性存在差异。长久以来,研究者们对造成这种差异的原因难以给出客观的解释,直到基因组学方法被应用于 ONFH 发病机制的研究中。这些研究提示遗传变异是 NONFH 发病机制中的重要原因,而基因组学研究成为阐明 NONFH 发病机制的精准手段,为临床预防、诊断、治疗 NONFH 提供了新的策略。

1 基因组学及候选基因关联分析

基因组学是研究整个基因组的结构和功能的学科,主要对生物细胞包括结构基因、调控序列和非编码 DNA 在内的全基因组进行分析,并在结构及功能上阐述其基因序列的含义。随着基因技术、蛋白质技术等的发展和成熟,基因组学、转录组学、蛋白质组学等已广泛应用于生物研究。基因组学涉及对生物中所有基因组进行测序及鉴定的过程。基因芯片、第二代测序技术(Next-Generation Sequencing, NGS)等最新基因测序手段,依靠其高通量、低成本、高准确性、高灵敏度、高自动化程度^[2]的优点完成所期望的基因测序,推动了基因组学的快速发展。目前使用最广泛的方法就

是 DNA 微阵列分析(DNA Microarray Analysis)技术。通过事先在芯片中包被特异性的荧光探针序列,因其包含目前人类发现的所有基因组,理论上可检测样本中所有基因的表达情况。出于基因的多样性,基因变异产生的多态性也愈加被科学家所重视,因此科学家们提出单个核苷酸变异导致的单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)这一概念,SNPs 作为第三代 DNA 遗传标记,是最为常见的可遗传变异,也是人类基因组中最广泛的多态性形式。对 SNPs 的关联分析已成为各种疾病研究中常用的基因组学方法。

在 SNPs 的基础上,全基因组关联研究(Genome-Wide Association Study, GWAS)是基于对目标人群基因组中已知的功能基因碱基、核苷酸序列等变异测定的候选基因关联分析,对同一物种不同个体全基因组遗传变异的关联性研究,用以观察基因与表征之间的关联性。其往往侧重于单核苷酸多态性与主要人类疾病等特征之间的关联,但同样可以应用于任何其他遗传变异和任何其他生物。而方兴未艾的单细胞测序、META 基因组测序及古人类基因组测序也为探究生命演化和疾病发生发展过程提供了新的视角。

2 基于候选基因关联分析的 NONFH 研究

非创伤性股骨头坏死是一种常见疾病,其特征是由于血流不足导致骨细胞死亡而导致髋关节周围骨死亡,致残率高,严重影响生活质量。在中国, NONFH 最常见的是激素性股骨头坏死及酒精性股骨头坏死。因其早期症状不明显,患者往往错过早期干预预防的阶段,最后必须通过全髋关节置换手术治疗,医疗费用及工作能力下降往往为患者家庭带来巨大的经济负担。血管内凝血、骨内压增高、脂质代谢紊乱、骨质疏松、成骨细胞凋亡等是目前公认的几种 NONFH 发病机制观点。基于以上观点,一些具有代表性的分子标志物的发现成为 NONFH 发病机制研究的重要进展。通过分析编码这些分子标志物的基因的遗传标记在

¹ 南京中医药大学(南京, 210029)

² 南京市中医院

³ 南京中医药大学附属医院骨伤科

△通信作者 E-mail: 1263638610@qq.com(夏天卫)
joint66118@sina.com(沈计荣)

NONFH 患者和正常人群中的遗传差异,可帮助发现 NONFH 的易感基因,这一基于候选基因关联分析的方法是 NONFH 基因组学研究的重要组成。

基于候选基因 SNP 的关联分析研究,也是现阶段 NONFH 发病机制研究的热点,本文着重挑选了凝血、纤溶有关基因,成血管相关因子有关基因,骨、脂代谢相关基因三个方面的关联分析研究进行文献回顾。

2.1 凝血、纤溶有关基因

NONFH 过程中,股骨头血供出现中断或受损,引起细胞死亡及随后的修复,而当血液处于高凝低纤溶状态时,头内静脉血压升高,同样会引起股骨头血供受损。基于凝血、纤溶系统参与 NONFH 病理过程的证据,有关凝血、纤溶相关基因的关联分析研究被不断开展。此类关联基因包括:

1) 丝氨酸蛋白酶抑制剂 E1 (Serine Protease Inhibitor E1, SERPINE1) 基因:编码基因可编码纤溶酶原激活物抑制剂 1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1) 的基因,故又被称为 PAI-1 基因。PAI-1 可以减少纤维蛋白降解引起的蛋白聚集,维持凝血和纤溶系统的动态平衡。Kim 等^[4]发现编码 PAI-1 的 rs1799889 的 4G 等位基因,rs2227631 的 A 等位基因和 rs11178 的 C 等位基因与 NONFH 风险增加显著相关,A-4G-C 单体型(Haplotype)明显增加韩国人群发生 NONFH 的风险。李明等对 106 例被诊断为 NONFH 的患者和 109 例股骨颈骨折健康人群的股骨头标本进行基因芯片检测发现 NONFH 组 SERPINE1 表达明显上升,其中 rs2227631 AA 等位基因频率显著增高。

2) 凝血因子 V (Coagulation Factor V, FV) 相关基因:FV 是内、外源凝血的交汇点,并同时参与凝血和抗凝过程,是凝血过程的重要因子。荷兰一项对 169 例 1.5~13.5 岁 Perthes 病患儿及正常对照组的多项凝血指标检测中发现,编码 FV 基因的核苷酸链第 1691 位点上鸟苷酸被腺苷酸取代导致的 FV Leiden 突变与 Perthes 病的发生有较高相关性,其中杂合突变情况更为常见。同一研究还发现凝血酶原(Fibrinogen)的编码基因突变(C20210A)也与 Perthes 病发生相关^[5]。

(3) 此外编码亚甲基四氢叶酸还原酶(Methylene Tetra Hydro Folate Reductase, MTHFR)^[6-7]、血管紧张素转换酶(Angiotensin Converting Enzyme, ACE)^[8]、内皮一氧化氮合酶(Endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS)^[9-10]等基因的 SNPs 都被实验证明与 NONFH 的发生有关。

2.2 成血管相关因子有关基因

血管形成和修复贯穿人一生的生理和病理过程。

而在 NONFH 中,因为血供受损而发生的血管形成贯穿整个病理过程。新生血管侵袭原有骨关节结构,导致股骨头的塌陷^[6]。基于这一病理观察,成血管相关因子有关基因关联分析在 NONFH 逐步得到重视,现有的研究成果包括:

1) 血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 基因:VEGF 具有促进新生血管形成以及增强血管通透性双重作用,Radke 等研究显示在 ONFH 患者股骨头的坏死水肿区出现 VEGF 的高表达,提示 VEGF 在骨坏死修复中起到重要作用^[11]。Ma 等^[12]对 489 例 NONFH 患者和 1273 例正常对照组进行基因多态性研究发现,rs2010963 的 C 等位基因和更高的 VEGF 表达相关,较 G 等位基因增加了 NONFH 约 20% 的发生率。此外 VEGF-634C/G 基因多态性与 NONFH 发生的相关性也是研究的热点^[13]。

2) 低氧诱导因子 1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α , HIF-1 α) 基因:HIF-1 α 是 VEGF 上游的转录因子^[14],低氧状态下 HIF-1 α 对血管新生的刺激作用主要是通过 VEGF 的生理功能来实现^[15-16],Hong 等^[17]对 384 例 NONFH 患者 HIF-1 α 多态性分析发现-2755C>A、+41224T>C 和 +51610C>T 基因多态性及 HIF-1 α 的 CTCC 单体型与男性特发性 ONFH 发生相关。

3) 胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1) 基因:IGF-1 具有调节细胞生长和分化的作用,胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (Insulin-like Growth Factors Binding protein-3, IGFBP-3) 被证明是细胞生长抑制剂及细胞凋亡启动子,IGFBP-3 可竞争地与 IGF-1 结合,抑制其生理功能。IGFBP-3 可通过 IGF 通路调节新生血管形成,编码 IGFBP 的基因位于染色体 7p12.3。Song 等^[18]研究发现 IGFBP-3 rs3110697 和 rs2453839 的 SNPs 会显著增加 NONFH 的发生风险。其中 rs2453839 CT 等位基因在 Ficat IV 期患者中表达较 Ficat II, III 期患者明显增加,而 CC 等位基因出现明显减少。韦伟对 130 例 NONFH 患者与 111 例正常对照人群行限制性片段长度多态性分析技术分析后 IGFBP-3 rs924140 GG/AG+GG 等位基因和 G 等位基因是 NONFH 的保护因子。

2.3 骨、脂代谢相关基因

脂代谢紊乱也是 NONFH 进展的一个重要因素:血脂升高会导致微血管脂肪栓塞,骨内脂肪含量增加,继而引起骨头内微循环障碍,骨细胞缺血缺氧坏死,而缺氧会再刺激血管生成。而骨内成骨、成脂分化是由骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs) 形成。在 ONFH 病理过程中, BMSC

出现异常分化,成骨、成脂平衡紊乱,推进其病理过程^[19-21]。NONFH 病理过程中的损伤与修复失衡是其快速进展至塌陷期的重要原因,而骨、脂代谢的失衡是其核心研究内容。目前关于致 NONFH 的骨、脂类代谢有关基因关联分析主要包括:

1)过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma, PPAR γ) 基因:PPAR γ 是细胞核受体超家族的一员,是机体能量代谢的重要调节器,激活后参与胰岛素增敏、脂肪细胞分化等代谢过程。在骨组织中,PPAR γ 可调节成骨细胞的分化及破骨细胞增殖和活性,作为成脂调控转录因子,可促使 BMSCs 向成脂方向分化。Song 等^[22]对 200 例 NONFH 患者和 177 例正常对照组多项 SNP 分析结果显示 NONFH 组 PPAR γ rs2920502 的 CC 等位基因及 C 等位基因较对照组明显增加,而 GG 等位基因及 G 等位基因较对照组减少。随后的 Logistic 回归分析显示 rs2920502 (G/C) 所有等位基因与 NONFH 发生风险增高显著有关。而先前韩国的一项研究则认为 PPAR γ 的基因多态性与 NONFH 发生风险无关^[23]。对比两篇文献,认为造成该差异的原因可能与种族差异及所选择观察的核苷酸序列不同有关。

2)载脂蛋白(Apolipoprotein, Apo)是血浆脂蛋白的蛋白质组分,可稳定脂蛋白稳定,调节其代谢,在体内脂质成分转运和利用过程中起到重要作用。目前已知 Apo 有 20 余中,包括 Apo A (1,2,5),ApoB (48,100),ApoC (2,3),ApoE、ApoH、ApoJ 等。ApoA1^[24]、ApoA5^[25]、ApoB^[26]、ApoE 等^[27] 基因多态性已被发现与 NONFH 发生具有相关性。

3)RUNX2 是 Runt 相关基因家族成员之一,调控成骨细胞分化、软骨细胞成熟、骨基质产生等过程,在骨代谢、骨重塑中起到关键作用,编码 Runx2 的基因位于染色体 6p21.1。Song 等^[22] 研究发现 NONFH 组患者 RUNX2 rs3763190(G/A)中 AA 等位基因明显多于健康对照组。

4)基质金属蛋白酶家族(Matrix Metalloproteinases, MMPs)是一组可降解包括骨组织在内的各类组织细胞外基质的蛋白酶家族,在细胞外基质修复、重塑过程中起重要作用。有研究显示,MMP3 rs650108 优势等位基因 A/G-G/G 可能减少 NONFH 发生风险,而 rs522616 C/C 等位基因则可能增加疾病发生风险^[28]。同一课题组的研究还发现 MMP14 rs2236302 GG 等位基因会增加激素性 NONFH 的发生风险^[29],MMPs 的天然抑制剂 TIMPs 6 个 SNPs 组成的单体型 TCAGAC (rs99365, rs17035945, rs308952, rs3817004, rs28897670, rs227950)与野生型 CCGAAA 相比,单体型与降低激素性 ONFH 的发生风险显著相

关^[30]。

3 不足与展望

基因组学研究发现,NONFH 在不同的病理阶段中,其编码基因的调控各不相同^[31-33]。加上复杂的环境暴露因素的参与,仅使用候选基因关联分析将面临巨大的局限性:1)NONFH 的发病过程中伴随着多种生理、病理的变化,相关的研究需要蛋白质组学、转录组学等多学科的结合。2)生物体信号传递多以层级、扩增、拮抗、协同的方式相互作用,单纯的候选基因关联分析将难以发现与 NONFH 相关的所有易感或致病基因,也不能全面解释 NONFH 的发病机制,因此结合全基因组的分析将尤为必要。

随着生命科学技术的发展,未来基因研究手段将更加多元化高效化,不断吸收这些新技术并应用到疾病研究中,将为 NONFH 的研究开拓新的道路。

参考文献

- [1] 中华医学会骨科分会显微修复学组.成人股骨头坏死诊疗标准专家共识(2012 年版)[J].中国骨与关节外科,2012,5(2):188-195.
- [2] 郭奕斌.基因诊断中测序技术的应用及优缺点[J].遗传,2014,36(11):1121-1130.
- [3] GUERADO E,CASO E. The physiopathology of avascular necrosis of the femoral head: an update[J]. Injury,2016,47(6):S16-S26.
- [4] KIM H,CHO C,CHO Y,et al. Significant associations of PAI-1 genetic polymorphisms with osteonecrosis of the femoral head[J]. BMC Musculoskelet Disord,2011,12:160.
- [5] VOSMAER A,PEREIRA R R,KOENDERMAN J S,et al. Coagulation abnormalities in Legg-Calvé-Perthes disease[J]. J Bone Joint Surg Am,2010,92(1):121-128.
- [6] 刘丙立,李子荣,孙伟,等.酒精性股骨头坏死与亚甲基四氢叶酸还原酶 677 C/T 单核苷酸多态性的关系[J].中国修复重建外科杂志,2009,23(9):1079-1082.
- [7] 李盛华,周明旺,郭铁峰,等.非创伤性股骨头坏死中医体质类型与亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 位点多态性的相关性研究[J].中华中医药杂志,2015,30(6):2194-2198.
- [8] HONG J M,KIM T H,KIM H J,et al. Genetic association of angiogenesis-and hypoxia-related gene polymorphisms with osteonecrosis of the femoral head[J]. Exp Mol Med,2010,42(5):376-385.
- [9] ZHENG L,WANG W,NI J,et al. The association of eNOS gene polymorphism with avascular necrosis of femoral head[J]. PLoS One,2014,9(2):e87583.
- [10] SONG G G,LEE Y H. Association of eNOS polymorphisms with susceptibility to osteonecrosis of the femur head: a meta-analysis[J]. Z Rheumatol,2017,76(3):267-273.

- [11] RADKE S, BATTMANN A, JATZKE S, et al. Expression of the angiatrix and angiogenic proteins CYR61, CTGF, and VEGF in osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(5): 945-952.
- [12] MA W, XIN K, CHEN K, et al. Relationship of common variants in VEGFA gene with osteonecrosis of the femoral head: a Han Chinese population based association study[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16221.
- [13] WANG Y, XIA C J, WANG B J, et al. The association between VEGF-634C/G polymorphisms and osteonecrosis of femoral head: a meta-analysis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6): 9313-9319.
- [14] 周启璠, 于淼, 陈国良. 缺氧诱导因子-1 α 及其抑制剂的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2014, 24(1): 48-58.
- [15] ZHANG E Y, GAO B, SHI H L, et al. 20(S)-Protopanaxadiol enhances angiogenesis via HIF-1 α -mediated VEGF secretion by activating p70S6 kinase and benefits wound healing in genetically diabetic mice[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(10): e387.
- [16] 胡亮, 王军海, 王志烈, 等. 血管内皮生长因子联合突变型低氧诱导因子 1 α 的促血管生成作用[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(3): 378-383.
- [17] HONG J M, KIM T H, CHAE S C, et al. Association study of hypoxia inducible factor 1alpha (HIF1alpha) with osteonecrosis of femoral head in a Korean population[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15(6): 688-694.
- [18] SONG Y, DU Z, YANG Q, et al. Associations of IGFBP3 gene polymorphism and gene expression with the risk of osteonecrosis of the femoral head in a Han population in northern China[J]. *DNA Cell Biol*, 2016, 35(12): 836-844.
- [19] HOUDEK M T, WYLES C C, PACKARD B D, et al. Decreased osteogenic activity of mesenchymal stem cells in patients with corticosteroid-Induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Arthroplasty*, 2016, 31(4): 893-898.
- [20] WANG Q, YANG Q, CHEN G, et al. LncRNA expression profiling of BMSCs in osteonecrosis of the femoral head associated with increased adipogenic and decreased osteogenic differentiation[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9127.
- [21] LI J, WANG Y, LI Y, et al. The effect of combined regulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and calcitonin gene-related peptide on alcohol-induced adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1/2): 39-48.
- [22] SONG Y, DU Z, REN M, et al. Association of gene variants of transcription factors PPAR γ , RUNX2, osterix genes and COL2A1, IGFBP3 genes with the development of osteonecrosis of the femoral head in Chinese population[J]. *Bone*, 2017, 101: 104-112.
- [23] KIM T H, HONG J M, PARK E K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene polymorphisms are not associated with osteonecrosis of the femoral head in the Korean population[J]. *Mol Cells*, 2007, 24(3): 388-393.
- [24] CHEN L, WEI P, JIANG K, et al. Apolipoprotein A1 and neuronal nitric oxide synthase gene polymorphisms and hormone-related osteonecrosis of the femoral head[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(14): 3159-3163.
- [25] CUI Y, KAISAIERJIANG A, CAO P, et al. Association of apolipoprotein A5 genetic polymorphisms with steroid-induced osteonecrosis of femoral head in a Chinese Han population[J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 229.
- [26] HIRATA T, FUJIOKA M, TAKAHASHI K A, et al. ApoB C7623T polymorphism predicts risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation[J]. *J Orthop Sci*, 2007, 12(3): 199-206.
- [27] YUAN L, LI W, WANG X, et al. The relationship between genetic polymorphisms in apolipoprotein E (ApoE) gene and osteonecrosis of the femoral head induced by steroid in Chinese Han population[J]. *Genes Genomics*, 2018, 40(2): 225-231.
- [28] QI Y, ZHU Y, CAO Y, et al. Association between MMP-3 polymorphisms among Chinese patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65): 108859-108866.
- [29] QI Y, WANG J, SUN M, et al. MMP-14 single-nucleotide polymorphisms are related to steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in the population of northern China[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(2): e00519.
- [30] WANG J, AN F, CAO Y, et al. Association of TIMP4 gene variants with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in the population of northern China[J]. *Peer J*, 2019, 7: e6270.
- [31] ADAPALA N S, KIM H K. Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in piglets[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153174.
- [32] BOYLE E A, LI Y I, PRITCHARD J K. An expanded view of complex traits: from polygenic to omnigenic[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1177-1186.
- [33] ZHAO D, LIU Y, MA C, et al. A mini review: stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head and pharmacological aspects[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(10): 1099-1104.

(收稿日期: 2021-07-12)