

CRLR 基因单核苷酸多态性与原发性前房角关闭人群的关联研究

秦 柏, 石海红, 朱蓉嵘, 张俊芳, 杨 梅, 管怀进

基金项目:江苏省卫生厅科技项目(No. H201424)

作者单位:(226001)中国江苏省南通市,南通大学附属医院眼科
作者简介:秦柏,毕业于南通大学,学士,技师,研究方向:眼科分子生物学。

通讯作者:石海红,毕业于南通医学院,硕士研究生,副主任医师,研究方向:青光眼发病机制. shihaihong2@163.com

收稿日期:2016-04-25 修回日期:2016-07-04

Association of the single nucleotide polymorphisms in the calcitonin receptor-like receptor gene with primary angle closure in a Han Chinese population

Bai Qin, Hai-Hong Shi, Rong-Rong Zhu, Jun-Fang Zhang, Mei Yang, Huai-Jin Guan

Foundation item: Science and Technology Project of Department of Public Health in Jiangsu (No. H201424)

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hai-Hong Shi. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. shihaihong2@163.com

Received:2016-04-25 Accepted:2016-07-04

Abstract

• **AIM:** To study the association of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs1157699 in the calcitonin receptor-like receptor (CRLR) gene with primary angle closure (PAC) in a Han Chinese population.

• **METHODS:** All samples, involved 232 PAC cases and 306 controls, were obtained from an epidemiologic survey conducted in Funing, Jiangsu Province, China. Genotyping were carried out by TaqMan-MGB probe using the real time quantitative polymerase chain reaction system to study the relationship between SNP of rs1157699 in CRLR gene and PAC.

• **RESULTS:** The prevalence of CRLRrs1157699 genotype was 67.4%, 30.0%, 2.6% for CC, CT, TT in cases, and 71.3%, 27.0%, 1.7% in controls respectively. There was no difference between the two groups in the distribution of genotype and allele frequencies of rs1157699 ($P>0.05$).

• **CONCLUSION:** Our results do not support a significant role for rs1157699 in CRLR with PAC.

• **KEYWORDS:** primary angle closure; calcitonin receptor-like receptor gene; single nucleotide polymorphism; Han Chinese population

Citation: Qin B, Shi HH, Zhu RR, *et al.* Association of the single nucleotide polymorphisms in the calcitonin receptor-like receptor gene with primary angle closure in a Han Chinese population. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(8):1570-1572

摘要

目的:探讨降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与汉族原发性前房角关闭人群的关联性。

方法:以流行病学人群为研究对象,采用病例对照设计。收集江苏省阜宁县流行病学调查中筛查出的原发性前房角关闭(primary angle closure, PAC)患者232例,正常对照306例。血样经DNA提取后采用TaqMan-MGB荧光探针法检测CRLR基因的rs1157699(C/T)位点SNP基因型,比较两组等位基因及基因型频率的分布。

结果:病例组的基因型分布(CC 67.4%, CT 30.0%, TT 2.6%),对照组的基因型分布(CC 71.3%, CT 27.0%, TT 1.7%),两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论:中国汉族人群的CRLR rs1157699位点SNP与原发性前房角关闭无相关性。

关键词:原发性前房角关闭;降钙素受体样受体基因;单核苷酸多态性;中国汉族人群

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.8.46

引用:秦柏,石海红,朱蓉嵘,等. CRLR 基因单核苷酸多态性与原发性前房角关闭人群的关联研究. 国际眼科杂志 2016; 16(8):1570-1572

0 引言

青光眼是全球第二大致盲眼病,不可逆盲是最主要的原因^[1]。原发性闭角型青光眼(primary angle-closure glaucoma, PACG)是我国青光眼的主要类型,至2020年我国PACG的患者数将达到1 009万,约占世界PACG总数的48%^[1-2]。根据其自然病程可将PACG分为可疑原发性房角关闭(primary angle closure suspect, PACS)、原发性前房角关闭(primary angle closure, PAC)及PACG三个阶段^[3]。

房角关闭最大的危险因素是浅前房和窄房角,但是只有10%窄房角的人会发生房角关闭^[4]。如能找出引起窄房角发生房角关闭的关键因素,就有可能阻止房角关闭和青光眼的发生。有研究^[5]发现在瞳孔括约肌过度表达降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)的转基因鼠易发生瞳孔散大和急性眼压升高。刘杏等做了CRLR基因的rs1157699单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与PACG的关联研究^[6],发

现该基因多态性与原发性急性闭角型青光眼 (acute primary angle-closure glaucoma, APACG) 可能有关, 而与原发性慢性闭角型青光眼 (chronic primary angle-closure glaucoma, CPACG) 无关。本研究以“江苏眼病研究”中筛查出的 PAC 人群为对象, 进一步探讨该位点 SNP 与汉族 PAC 人群的关联性。

1 对象和方法

1.1 对象 本研究是江苏眼病研究的一部分。研究方案经南通大学附属医院伦理委员会批准, 所有参加者签署知情同意书。2011-05 我们在盐城市阜宁县完成了 PAC 筛查, 按偏倚控制要求统一管理现场调查, 受检率达 90%, 其中血样标本收集率达 95%, 在接受调查的 6 032 人中筛选出年龄为 50 岁及以上的 PAC 232 例, 对照组 306 例。病例组和对照组的一般情况见表 1。两组间在性别、年龄、全身病等方面无统计学差异, 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 分组标准 病例组 (PAC 组): 参照国际地域性和流行病学眼科学组的 PACG 的分级方法进行分组^[7]。

(1) 任一眼前房角镜下或明、暗状态下 UBM 检查发现周边虹膜与后部小梁接触或粘连 >180 度; (2) 至少有下列情况之一: 眼压 >21 mmHg; 小梁网上有过多的色素沉积; 虹膜萎缩; 青光眼斑; 有急性发作过的症状; 暗状态下 UBM 检查眼压较明状态下升高 ≥ 8 mmHg。 (3) 无青光眼视盘损害 (视盘杯盘比 ≤ 0.5) 及视野缺损; (4) 排除外伤、手术、葡萄膜炎等引起的继发性青光眼; 既往无手术史及虹膜激光治疗史; 排除视网膜脱离、黄斑变性及严重白内障影响眼底观察者; (5) 四代内均为汉族。对照组: 前房周边深度大于 2/3CT (coneaal thickness); 眼压小于 21 mmHg; 无 PACG 家族史; 视盘及视野正常; 无明显眼部病变, 除了轻微白内障不影响眼底观察者; 屈光不正小于 3 个屈光度; 四代内均为汉族。按性别、年龄与病例组频数匹配。

1.2.2 研究方法

1.2.2.1 病史和相关混杂因素收集 除性别、年龄、职业、文化程度、居住地等一般资料外, 收集研究对象与 PACG 相关的其他因素, 如慢性支气管炎、糖尿病、高血压等全身病史情况; 皮质类固醇等药物使用情况; 青光眼手术史及家族史等。测量血压, 检测血糖、肝肾功能、血脂、血粘度等。

1.2.2.2 眼部基本检查 参照我国九省眼病调查方案进行^[8], 包括视力检查 (远、近视力及日常生活视力)、裂隙灯检查、眼底检查、眼前节照相、眼底照相、Goldmann 眼压检查、主觉验光和客观验光等。

1.2.2.3 PAC 筛查 对浅前房眼进行前房角镜、A 超、UBM 检查, Humphrey 视野检查。 (1) 周边前房深度的检查: 应用裂隙灯按 Van Herick 方法测量周边前房深度^[9]。将周边前房深度 $\leq 1/3$ CT 眼定为浅前房眼。 (2) 前房角镜检查: 对浅前房眼行前房角镜检查, 按 Scheie 分类法进行分级^[10]。静态下不能满意看到房角隐窝时则在动态下检查。观察前房角宽度、入射角和虹膜根部形态。虹膜根部与后部小梁接触 >180° 为接触性关闭, 虹膜根部与后部小梁粘连 >180° 为房角粘连性关闭, 均纳入 PAC 组, 否则为房角开放。 (3) 明、暗条件下的 UBM 检查: 参照赵家良等的方法^[11], 双眼分别进行 UBM (SW-3200A 型便携式 UBM) 检查。分别对受检眼上方、颞上方、颞侧、颞下方、下方、鼻下方、鼻侧及鼻上方 8 个位置进行检查, 先在暗室

表 1 研究对象的一般情况

一般情况	对照组	PAC 组	χ^2/t	P
女性 (例, %)	268 (87.58)	209 (90.09)	0.82	>0.05
男性 (例, %)	38 (12.42)	23 (9.91)		
平均年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	65.08 \pm 7.53	64.84 \pm 8.59	0.34	>0.05
年龄范围 (岁)	50 ~ 85	50 ~ 83		
高血压 (例, %)	66 (19.64)	46 (19.83)	0.16	>0.05
糖尿病 (例, %)	24 (7.36)	20 (8.6)	0.09	>0.05
脑血管疾病 (例, %)	10 (3.27)	4 (1.72)	1.18	>0.05

下检查, 结束后 5 min 在距离受检眼 30 cm 处的 30 W 白炽灯照射下重复以上检查。记录前房角接触性关闭或粘连性关闭的范围。 (4) 视野检查: 采用全自动视野计 (Humphrey-720) 进行中心及周边视野检查。 (5) A 超检查: 眼科 A/B 超仪 (B-SCAN) 测量前房深度、晶状体厚度和眼轴长度。

1.2.3 提取 DNA 收集血液样本, 在知情同意的前提下, 采集每个研究对象的外周静脉血, -4°C 短暂保存。采用 QIAGEN 公司产品试剂抽提。 (1) 在 200 μ L 静脉血中加入 20 μ L 蛋白酶、200 μ L Buffer AL 吹打混匀; (2) 56°C 水浴孵化 10 min, 短暂全速离心, 加入 200 μ L 无水乙醇, 充分混匀; (3) 将混合液移至 Spin Column, 全速离心 1 min, 将离心柱移至 2 mL 收集管; (4) 加入 500 μ L Buffer AW1, 8 000 r/min 离心 1 min, 将柱移至新收集管; (5) 加入 500 μ L Buffer AW2, 全速离心 3 min; (6) 将柱放入 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μ L Buffer AE, 室温下孵育 5 min, 8 000 r/min 离心 1 min 后 -80°C 保存。

1.2.4 检测 SNP 采用 TaqMan-MGB 法。使用双探针分别探测 PCR 产物中所含的野生位点和 SNP 位点。检测条件简述如下: 以 10 μ L 为反应体积, 取 1 μ L (10 ng) DNA 为模板, 5 μ L 2 \times PCR 反应液, 0.2 μ L TaqMan-MGB 探针及引物, 余下用 DEPC 处理水补足。结果以双探针 (VIC 或 FAM) 的荧光信号判定。

统计学分析: 采用 SAS 9.3 软件进行统计分析。病例与对照在性别、年龄、全身病等方面是否有差异采用 *t* 检验和卡方检验。对组内 SNP 分布行哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE) 检验; 在加性模型 (additive model, AM), 显性模型 (dominant model, DM) 和隐性模型 (recessive model, RM) 下用 Logistic 回归分析 SNP 与 PAC 的关系, 计算优势比 (odds ratio, OR), 95% 可信区间 (95% confidence interval, 95% CI)。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HWE 平衡检验 基因分型检出率为 98.5%, 其中对照组 98.0% (300/306), 病例组 99.1% (230/232)。对照组的 HWE 平衡检验, $\chi^2 = 0.73$, *P* > 0.05; 病例组的 HWE 检验, $\chi^2 = 0.26$, *P* > 0.05, 两组均符合 HWE 平衡。

2.2 两组的基因型分布及等位基因频率 PAC 组与对照组的基因型分布及等位基因频率见表 2, 两组之间差异无统计学意义。

3 讨论

PACG 是一种由于前房结构拥挤, 导致前房角关闭、房水流出受阻, 进而引起眼压升高、视神经损害的疾病。PACG 的病因和发病机制尚不甚明确, 目前多认为是一种

表2 两组的基因型和等位基因频率比较

rs6759535	基因型分布(例,%)			χ^2	P	OR(95% CI)
	对照组	PAC组				
等位基因	C	509(84.8)	379(82.4)	1.142	0.285	1.20(0.84~1.66)
	T	91(15.2)	81(17.6)			
基因型	CC	214(71.3)	155(67.4)	1.261	0.53	DM=1.20(0.83~1.75) RM=1.58(0.48~5.25)
	CT	81(27.0)	69(30.0)	0.957	0.33	
	TT	5(1.7)	6(2.6)	0.569	0.45	

多因素、多基因疾病^[12]。浅前房是 PACG 最大的危险因素^[13],但目前无法预测浅前房是否会发生前房角关闭,以及何时会发生前房角关闭。

rs1157699 位于 CRLR 基因的第一内含子区域,可能对基因的表达起调控作用。该序列变异可能导致 CRLR 过表达,进而导致肾上腺髓质素(adrenomedullin, AM)介导的瞳孔括约肌松弛,瞳孔扩大,从而引起急性前房角关闭^[5]。AM 是存在于心、脑、肾、眼等多种组织的多肽,在血管内皮、血管平滑肌细胞、房水中可检测到其表达^[14-15]。通过与受体活性修饰蛋白 2(RAMP2)和 CRLR 结合而发生生物学效应^[16]。AM 具有舒张血管,降低炎症渗出,降低内皮细胞通透性的作用,从而具有保护心脑血管免受感染性休克、缺血和高血压的损伤,维护血流,增加组织抗氧化应激的能力^[17]。刘杏等做了 APACG(109 例),CPACG(98 例)与 CRLR 的 rs1157699 的关联研究^[6],发现 rs1157699 与 APACG 可能相关,而与 CPACG 无关。在 APACG 组的基因型分布为 CC 52.3%,CT 44%,TT 3.7%,在对照组的基因型分布为 CC 67.3%,CT 29.3%,TT 3.4%,差异有统计学意义(P=0.024),提示 T 等位基因可能是 APACG 的危险因素。但在多重校正后失去了统计学意义(P=0.2),我们认为有必要进行更大样本量和不同人群的验证。

本研究利用来自江苏省盐城阜宁县流行病学调查筛选出的 PAC 人群,对 rs1157699 与 PAC 的关系进行了关联研究。以流行病学人群为对象可以克服以医院患者为对象的诸多局限性,如选择性偏倚、回忆偏倚和对照组选择上的偏倚,因而具有良好的可信性和代表性。考虑到 AM 能增加组织血供,可能对视神经损伤有保护作用,本研究选取了 PAC 群体为研究对象,不包括已发生视神经损伤的 PACG,这样可以更好地反映基因序列变异与房角关闭发生的关系,去除一些混杂因素的影响。我们的研究结果显示,PAC 组的 T 等位基因频率高于对照组,与刘杏等的研究相似,但差异无统计学意义。我们未能验证刘杏等的结果^[6],可能有以下原因:(1)PACG 系多因素疾病,其发病机制和遗传方式非常复杂,可能是多种基因序列变异的累积效应及环境因素共同作用的结果。对于与遗传有关的多因素疾病,由于每一个致病基因单独所起的作用较小,即使对与疾病高度相关的 SNP,在不同的研究中也常常得不到验证^[18]。另外,刘杏的研究对象为 APACG,而我们的研究对象为 PAC。结果的差异可能和疾病表型不同有关。由于我们阜宁流行病学中的 PACG 达不到关联分析所需要的样本量,本研究未做该位点与 PACG 的关联分析。CPACG 的发生虽然较 APACG 复杂,但两者都具有共同的眼前节解剖特征,都是各种因素导致虹膜根部与房角相贴或粘连。

总之,我们的研究结果说明 rs1157699 与 PAC 之间无相关性。但也不能排除 CRLR 在原发性闭角型青光眼发病中的作用。有必要增加样本量,选取多基因多位点进行关联研究,进一步阐明 PAC 及 PACG 的发病机制。

参考文献

- 1 Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90(3):262-267
- 2 陈翔宇,才瑜.闭角型青光眼的流行病学研究及分类现状. *中华眼科杂志* 2011;47(10):949-952
- 3 美国眼科学会(编).赵家良(译).眼科临床指南.北京:人民卫生出版社 2006:122-143
- 4 Wang N, Wu H, Fan Z. Primary angle closure in Chinese and Western populations. *Chin Med J* 2002;115(11):1706-1715
- 5 Itter LM, Schwerdefeger K, Kunz TH, et al. Transgenic mice with ocular overexpression of an adrenomedullin receptor reflect human acute angle-closure glaucoma. *Clin Sci* 2008;114(1):49-58
- 6 Cao D, Lin X, Guo XM, et al. Investigation of the association between CALCRL polymorphisms and primary angle closure glaucoma. *Mol Vis* 2009;15(27):2202-2208
- 7 Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, et al. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol* 2002;86(2):238-242
- 8 赵家良,王羽,周学成,等.我国九省眼病调查设计的抽样和测量方法. *中华眼科杂志* 2011;9(47):779-784
- 9 Foster PJ, Devereux JG, Alsbirk PH, et al. Detection of gonioscopically occludable angles and primary angle closure glaucoma by estimation of limbal chamber depth in Asians; modified grading scheme. *Br J Ophthalmol* 2000;84(2):186-192
- 10 Barkana Y, Dorairaj SK, Gerber Y, et al. Agreement between gonioscopy and ultrasound biomicroscopy in detecting iridotrabecular apposition. *Arch Ophthalmol* 2007;125(10):1331-1335
- 11 张扬,赵家良,杨渊鉴.明暗光线下超声活体显微镜检查在发现前房角关闭中的作用. *中华眼科杂志* 2009;45(1):8-13
- 12 Alsbirk PH. Primary angle - closure glaucoma. Oculometry, epidemiology, and genetics in a high risk population. *Acta Ophthalmol Suppl* 1976;127:5-31
- 13 Sihota R, Lakshmaiah NC, Agarwal HC, et al. Ocular parameters in the subgroups of angle closure glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2000;28(4):253-258
- 14 Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M. Adrenomedullin; a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192(2):553-560
- 15 Udono-Fujimori R, Udono T, Totsune K, et al. Adrenomedullin in the eye. *Kegul Pept* 2003;112(1-3):95-101
- 16 Born W, Muff R, Fischer JA. Functional interaction of G protein-pled receptors of the adrenomedullin peptide family with accessory receptor-activity-modifying proteins(RAMP). *Microsc Res Tech* 2002;57(1):14-22
- 17 Serrano J, Alonso D, Fernandez AP. Adrenomedullin in the central nervous system. *Microsc Res Tech* 2002;57(2):76-85
- 18 Ardeljan D, Meyerle CB, Agron E, et al. Influence of TIMP3/SYN3 polymorphisms on the phenotypic presentation of age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 2012;21(10):1152-1157