

HTRA1 多态性与汉族人群湿性年龄相关性黄斑变性遗传易感性的关系

杨楠¹, 邢杰², 邵岩¹, 朱珠¹, 巴艳雨¹, 魏巍¹

作者单位:¹(116021) 中国辽宁省大连市, 中国人民解放军第210 医院眼科;²(116001) 中国辽宁省大连市, 武警大连医院门诊部

作者简介:杨楠, 毕业于第四军医大学, 博士, 副主任医师, 眼科主任, 研究方向:眼底病、眼整形、眼视光。

通讯作者:魏巍, 毕业于大连医科大学, 硕士, 主治医师, 研究方向:眼底病学. 639092@qq.com

收稿日期:2017-10-13 修回日期:2018-04-10

Relationship between HTRA1 polymorphism and genetic susceptibility of wet age-related macular degeneration in Han population

Nan Yang¹, Jie Xing², Yan Shao¹, Zhu Zhu¹, Yan-Yu Ba¹, Wei Wei¹

¹Department of Ophthalmology, the 210th Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Dalian 116021, Liaoning Province, China; ²Outpatients Department, Dalian Armed Police Hospital, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Wei Wei. Department of Ophthalmology, the 210th Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Dalian 116021, Liaoning Province, China. 639092@qq.com

Received:2017-10-13 Accepted:2018-04-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the relationship between high temperature essential factor A-1 (HTRA1) polymorphism and genetic susceptibility of wet age-related macular degeneration (AMD) in Han population.

• **METHODS:** Totally 201 patients of wet AMD in Han population were selected from May 2014 to January 2017 in our hospital as disease group, and 201 healthy persons of Han were selected as health group. Blood samples of peripheral vein were collected and genomic DNA was extracted. HTRA1 polymorphism loci were detected, and the rs11200638 and rs2248799 loci of HTRA1 gene were detected by Sequenom mass spectrometry platform. Then the relationship between HTRA1 polymorphism and genetic susceptibility of wet AMD were analyzed.

• **RESULTS:** The grade distributions of the genotype of the rs11200638 and rs2248799 loci in the two groups subjects had significant differences ($P < 0.01$), and the frequencies of AA and TT in the disease group were respectively 51.2% and 57.7%, of which the health group were respectively 20.9% and 28.4%, and the former

were significantly higher than the latter, with significant differences ($P < 0.01$). The frequencies of risk allele A of rs11200638 loci and risk allele T of rs2248799 loci in the disease group were respectively 69.7% and 73.6%, of which the health group respectively were 45.8% and 52.5%, and the former were significantly higher than the latter, with significant differences ($P < 0.01$). The OR values of rs11200638 genotype AA and AG were respectively 5.36 and 3.45, which were the risk factors of wet AMD ($P < 0.01$). The OR values of rs2248799 genotype TT and TC were respectively 2.36 and 1.98, which were the risk factors of wet AMD ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** The rs11200638 and rs2248799 polymorphisms of HTRA1 gene are associated with the incidence of wet AMD, and the genotype AA and TT are closely related to the risk of wet AMD in Han population, of which the higher frequencies can increase the risk of wet AMD.

• **KEYWORDS:** high temperature essential factor A-1; Han population; wet age-related macular degeneration; genetic susceptibility

Citation: Yang N, Xing J, Shao Y, *et al.* Relationship between HTRA1 polymorphism and genetic susceptibility of wet age-related macular degeneration in Han population. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(5):815-818

摘要

目的:探讨高温必需因子 A-1 (HTRA1) 多态性与汉族人群湿性年龄相关性黄斑变性 (AMD) 遗传易感性的关系。
方法:选取本院 2014-05/2017-01 收治的汉族湿性 AMD 患者 201 例, 汉族正常健康者 201 例, 分别设为病例组和健康组。采集研究对象外周静脉血样并提取基因组 DNA, 利用 Sequenom 质谱分析平台对 HTRA1 基因的 rs11200638、rs2248799 位点进行基因型检测, 分析 HTRA1 多态性与湿性 AMD 遗传易感性的关系。

结果:两组研究对象 rs11200638、rs2248799 位点的基因型等级分布比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 病例组 AA、TT 的频率分别为 51.2%、57.7%, 健康组 AA、TT 的频率分别为 20.9%、28.4%, 前者均明显高于后者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 病例组 rs11200638 位点危险性等位基因 A 与 rs2248799 位点危险性等位基因 T 分布的频率分别为 69.7%、73.6%, 健康组分别为 45.8%、52.5%, 前者均明显高于后者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。rs11200638 基因型 AA、AG 的 OR 值分别为 5.36 与 3.45, 是湿性 AMD 发病的危险因素 ($P < 0.01$); rs2248799 基因型 TT、TC 的 OR 值分别为 2.36 与 1.98,

是湿性 AMD 发病的危险因素 ($P < 0.01$)。

结论: HTRA1 基因 rs11200638 和 rs2248799 多态性与湿性 AMD 发病关系显著, 基因型 AA、TT 与汉族人群湿性 AMD 患病风险关系密切, 其频率增高可增加湿性 AMD 患病风险。

关键词: 高温必需因子 A-1; 汉族人群; 湿性年龄相关性黄斑变性; 遗传易感性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.5.10

引用: 杨楠, 邢杰, 邵岩, 等. HTRA1 多态性与汉族人群湿性年龄相关性黄斑变性遗传易感性的关系. 国际眼科杂志 2018; 18(5):815-818

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是与年龄相关的慢性进展性致盲眼病, 是引起老年人中心视力损害的主要原因, 随着我国人口老龄化日趋加重, AMD 患病率逐年上升^[1]。临床上将 AMD 分为干性和湿性两种类型, 其中湿性 AMD 是指多种因素诱导黄斑部视网膜下脉络膜新生血管生成, 继而引起出血、渗出等病理改变, 湿性 AMD 病程较长, 且尚无较好的根治方法, 严重影响患者的日常生活质量^[2]。高温必需因子 A-1 (high temperature factor A-1, HTRA1) 属于热休克丝氨酸蛋白酶家族, 在人类基因组中高度保守, 其编码的蛋白质广泛表达于视网膜上, 参与细胞外基质蛋白多糖降解和抑制转化生长因子 β 分泌, 且参与炎症反应与血管生成^[3]。近年来, 随着人类基因组测序的完善以及单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 单体型图谱的构建, SNPs 已广泛应用到患病风险的关联分析中^[4]。有研究表明, HTRA1 基因的 rs11200638、rs2248799 多态性与湿性 AMD 发病有显著关系^[5-6]。本研究以汉族人群湿性 AMD 患者和正常健康者为受试对象, 分别将其设为病例组与健康组, 选择 HTRA1 基因多态性位点, 采用 Sequenom 质谱分析平台分析 HTRA1 多态性与汉族人群湿性 AMD 遗传易感性的关系, 现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取本院 2014-05/2017-01 收治的汉族湿性 AMD 患者 201 例作为病例组, 其中男 105 例, 女 96 例; 年龄 60~83 (平均 70.38 \pm 5.89) 岁。选取汉族正常健康者 201 例作为健康组, 其中男 105 例, 女 96 例; 年龄 60~83 (平均 70.38 \pm 5.89) 岁。纳入标准: (1) 病例组患者符合湿性 AMD 诊断标准^[7], 且经眼科详细检查 (光学相干断层扫描、荧光素视网膜血管造影等) 确诊; (2) 健康组受试者经检查眼底正常, 无 AMD 家族史, 无血液疾病、肾功能不全、恶性肿瘤, 无青光眼、白内障、视网膜血管阻塞、高度近视、视神经病变、视网膜脉络疾病、视网膜脱离及其它眼部疾患。排除标准: 干性 AMD、卵黄样黄斑变性晚期、高度近视性脉络膜新生血管 (CNV)、视网膜血管阻塞、青光眼、脉络膜视网膜炎、白内障、Stargardt 病、糖尿病视网膜病变等其它眼疾。两组研究对象一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究取得医院伦理委员会批准, 受试者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 实验材料 (1) 实验试剂: QIAamp DNA Blood Mini

Kit (德国 Qiagen 公司)、琼脂糖 (杭州琼盛有限公司)、50 \times TAE (碧云天有限生物科技公司)、DNA Marker (天根生化科技有限公司)、iPLEX Pro Reagent Kit (美国 Sequenom 公司); (2) 实验仪器与设备: MVS-T 涡旋振荡器 (北京北德科学器材有限公司)、水平琼脂糖电泳槽与稳压电泳仪 (北京六一仪器厂)、多用凝胶成像分析系统 (美国 BIO-RAD 公司)、MassARRAY 与 MassARRAY Nanodispenser RS1000 芯片点样仪 (美国 Sequenom 公司)、NanoDrop2000c 紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

1.2.2 采集血样和提取基因组 DNA 采集研究对象静脉血 4mL 并予以抗凝处理, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰冻保存备用。提取 DNA 前, 将血标本置于室温解冻, 并分装于 1.5mL 的 EP 管中, 根据 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒操作步骤提取 DNA。

1.2.3 测定 DNA 样本含量 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 样本浓度进行初步判断, 且用 NanoDrop2000c 紫外分光光度计进行进一步测定, 检测 A_{260}/A_{280} 值以及 DNA 样本的浓度和纯度。

1.2.4 选择 SNPs 与检测所选 SNPs 位点分型 依据相关基因数据库及文献资料^[4-6] 选择与湿性 AMD 显著相关的 HTRA1 基因 2 个 SNPs 位点, 即 rs11200638、rs2248799, 由北京基因组研究所的 MassARRAY 分子量阵列技术平台利用 MALDI-TOF 软件对所选 SNPs 位点的分型进行检测, 获得分型结果, 并进行病例组和健康组的对照分析。

1.2.5 观察指标 检测两组研究对象 HTRA1 基因 rs11200638、rs2248799 的等位基因分布及基因型分布, 并观察分析其等位基因及基因型分布与湿性 AMD 患病风险的关系。

统计学分析: 采用 SPSS19.0 统计学软件分析相关检测结果。两样本等级资料的比较采用秩和检验, 两样本基因型频率的比较采用 χ^2 检验; 并采用 Logistic 逐步回归模型对 SNPs 位点与湿性 AMD 的关联性进行统计学分析, 计算两组效应比值比 (OR) 及其 95% 置信区间 (95% CI), 分析各位点之间的交互作用。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组研究对象基因型分布比较 两组研究对象 rs11200638、rs2248799 位点的基因型比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且病例组 AA、TT 均明显高于健康组, 差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 40.141, 35.322, P < 0.01$), 见表 1。

2.2 两组研究对象等位基因分布比较 病例组 rs11200638 位点危险性等位基因 A 的频率 (69.7%) 明显高于健康组 (45.8%), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 病例组 rs2248799 位点危险性等位基因 T 的频率 (73.6%) 明显高于健康组 (52.5%), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 rs11200638 和 rs2248799 的基因型与湿性 AMD 患病风险关系比较 分别对 rs11200638 位点 AA、AG 和 GG 基因型赋值为 1、2、0, 对 rs2248799 位点 TT、TC 和 CC 赋值为 1、2、0, 代入 Logistic 多元回归分析模型, 可得 rs11200638 基因型 AA、AG 的 OR 值分别为 5.36、3.45, 二者均是 AMD 发病的危险因素 ($P < 0.01$); rs2248799

表 1 两组研究对象基因型分布对比

例(%)

组别	例数	rs11200638			rs2248799		
		AA	AG	GG	TT	TC	CC
病例组	201	103(51.2)	74(36.8)	24(11.9)	116(57.7)	64(31.8)	21(10.4)
健康组	201	42(20.9)	100(49.8)	59(29.4)	57(28.4)	97(48.3)	47(23.4)
Z		6.879			5.697		
P		<0.01			<0.01		

注:病例组:湿性 AMD 患者;健康组:正常健康者。

表 2 两组研究对象等位基因分布对比

频次(%)

组别	例数	rs11200638		rs2248799	
		A	G	T	C
病例组	201	280(69.7)	122(30.3)	296(73.6)	106(26.4)
健康组	201	184(45.8)	218(54.2)	211(52.5)	191(47.5)
χ^2		46.968		38.577	
P		<0.01		<0.01	

注:病例组:湿性 AMD 患者;健康组:正常健康者。

表 3 rs11200638 和 rs2248799 的基因型与湿性 AMD 患病风险关系对比

SNPs	β	SE	Wald χ^2	P	OR(95% CI)
rs11200638					
AA	0.641	1.325	28.396	<0.01	5.36(2.67 ~ 10.64)
AG	0.971	0.324	23.278	<0.01	3.45(2.01 ~ 5.87)
GG	0 ^a				
rs2248799					
TT	0.823	0.276	21.967	<0.01	2.36(1.57 ~ 3.24)
TC	0.706	0.234	16.458	<0.01	1.98(1.28 ~ 2.96)
CC	0 ^a				

注:a 表示预测变量(常量),在此模型的回归分析中无变化。

基因型 TT、TC 的 OR 值分别为 2.36、1.98,二者均是 AMD 发病的危险因素($P < 0.01$),见表 3。

3 讨论

湿性 AMD 是与年龄相关的、多基因的眼部疾病,有高度遗传特性,可导致中心视力进行性损害,居于老年人群致盲性眼病首位^[8]。湿性 AMD 的发生与环境因素及遗传因素有关,且遗传因素是个体发病的基础。目前,关于湿性 AMD 的发病机制尚未有明确结论,其临床治疗多以消除和抑制新生血管生成为主,但治疗效果并不理想,严重威胁患者的社会生活,给家庭和社会带来沉重的负担^[9]。HTRA1 是染色体 10q26 上的基因,其过度表达能够破坏 Bruch 膜的完整性,促使毛细血管侵入视网膜,出现与湿性 AMD 相类似的临床改变^[10]。有研究表明,HTRA1 基因 rs11200638、rs2248799 与 AMD 显著相关,可增加湿性 AMD 患病的风险,且 HTRA1 多态性强,是高危遗传易感位点^[11]。SNP 是遗传标记,其具有易于分型、遗传稳定、分布广、数量大、高通量检出等特点,通过对候选基因 SNPs 的对比,对某个群体中特定基因的基因频率、特定位点上的基因型及表型差异进行分析,可能提示湿性 AMD 的发病机制,有利于指导湿性 AMD 的治疗及预防^[12]。

本研究结果发现,病例组 rs11200638 位点基因型 AA 所占比率为 51.2%,健康组所占比率为 20.9%,病例组明显高于健康组($P < 0.01$),且病例组 rs11200638 位点危险性等位基因 A 的频率为 69.7%,明显高于健康组的 45.8%($P < 0.01$),rs11200638 基因型 AA、AG 的 OR 值分

别为 5.36 与 3.45,是湿性 AMD 发病的危险因素($P < 0.01$),提示 HTRA1 基因 rs11200638 与湿性 AMD 发病有显著关系,基因型 AA 频率增高均可增加湿性 AMD 患病风险。Askari 等^[13]研究显示,rs11200638 的等位基因和基因型分布与 AMD 显著相关,在此位点上携带 AA 基因型的人 AMD 患病风险明显增加。另有研究发现,HTRA1 基因 rs11200638 与湿性 AMD 有显著关联,该位点上的等位基因 A 可增加湿性 AMD 的遗传易感性,危险度高出正常人 10 倍^[14],这与本研究结果相符,分析当 SNP rs11200638 出现等位基因 A 及基因型 AA 时,HTRA1 启动子内的相关因子的亲和力发生改变,HTRA1 基因转录增强,HTRA1 高表达能够破坏 Bruch 膜结构,脉络膜毛细血管突破 Bruch 膜进入视网膜,导致类似湿性 AMD 临床表现的发生。因此,HTRA1 基因 rs11200638 等位基因 A 及基因型 AA 可增加湿性 AMD 患病风险。

此外,本研究发现病例组 rs2248799 位点的基因型 TT 所占比例为 57.7%,健康组所占比例为 28.4%,病例组明显高于健康组($P < 0.01$),病例组 rs2248799 位点危险性等位基因 T 的频率为 73.6%,明显高于健康组的 52.5%($P < 0.01$),rs2248799 基因型 TT、TC 的 OR 值分别为 2.36 与 1.98,是湿性 AMD 发病的危险因素($P < 0.01$),提示 HTRA1 基因 rs2248799 与湿性 AMD 发病有显著关系,基因型 TT 频率增高可增加湿性 AMD 的患病风险。Karkhane 等^[15]研究表明,rs2248799 的等位基因和基因型分布同 AMD 有极大的关联性,在此位点上携带 TT 基因型

的人可增加AMD的患病风险与易感性。另有研究结果显示,HTRA1基因rs2248799同湿性AMD遗传易感性关联效应较强,该位点上的等位基因T可增加湿性AMD的遗传易感性^[16],这与本研究结果相符,分析SNP rs2248799与HTRA1 mRNA及蛋白的过表达有关,当等位基因T及基因型TT出现时,HTRA1 mRNA转录激活,促进HTRA1蛋白表达,随着HTRA1过表达,其在Bruch膜结构重构、视网膜色素上皮细胞萎缩及脉络膜新生血管形成中发挥重要作用,与湿性AMD的发生显著相关。因此,HTRA1基因rs2248799等位基因T及基因型TT可使湿性AMD患病风险增加。

综上,HTRA1基因rs11200638和rs2248799多态性在湿性AMD发病中发挥关键作用,基因型AA、TT是湿性AMD发病的危险因素,其频率增高可增加湿性AMD患病风险。

参考文献

- 1 向伟,迟昊,薛中洪,等. 血管内皮生长因子受体1基因单核苷酸多态性及吸烟与宁夏地区汉族、回族年龄相关性黄斑变性的相关性. 中华实验眼科杂志 2016;34(6):534-540
- 2 Cruz-González F, Cabrillo Estévez L, Cañete Campos C, et al. The presence of CFH, HTRA1, ARMS2, VEGF-A and VEGF-R and the appearance of age-related macular degeneration sub-types. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2016;91(4):177-183
- 3 Qureshi IZ, Ambreen F. Serum APOE, leptin, CFH and HTRA1 levels in Pakistani age related macular degeneration patients. *Pak Med Assoc* 2017;67(6):852-857
- 4 石瑜,曹秉振,王晓玲,等. 慢病毒介导的HTRA1突变基因感染对人脑血管平滑肌细胞生物学特性影响. 中华神经医学杂志 2016;15(8):757-762
- 5 Altay L, Scholz P, Schick T, et al. Association of Hyperreflective Foci Present in Early Forms of Age-Related Macular Degeneration With Known Age-Related Macular Degeneration Risk Polymorphisms. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(10):4315-4320
- 6 Grassmann F, Heid IM, Weber BH. International AMD Genomics

Consortium (IAMDCG). Recombinant Haplotypes Narrow the ARMS2/HTRA1 Association Signal for Age-Related Macular Degeneration. *Genetics* 2017;205(2):919-924

- 7 刘家琦,李凤鸣. 实用眼科学:眼科学. 北京:人民卫生出版社 2010:45-47
- 8 Jacobo SM, Deangelis MM, Kim IK, et al. Age-related macular degeneration-associated silent polymorphisms in Htra1 impair its ability to antagonize insulin-like growth factor 1. *Mol Cell Biol* 2013;33(10):1976-1990
- 9 Tosi GM, Caldi E, Neri G, et al. HTRA1 and TGF- β 1 Concentrations in the Aqueous Humor of Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(1):162-167
- 10 周天球,管怀进,苏舒,等. rs7624556和rs13119914位点与干性年龄相关性黄斑变性的关系. 江苏医药 2015;41(21):2536-2538
- 11 班桂飞,陈凤,欧永富,等. Htra1、TGF- β 1及Smad3在人牙髓细胞向成牙本质细胞分化过程中的动态表达研究. 广西医科大学学报 2017;34(5):676-680
- 12 Cruz-Gonzalez F, Cabrillo-Estevéz L, Rivero-Gutierrez V, et al. Influence of CFH, HTRA1 and ARMS2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet age-related macular degeneration in a Spanish population. *Int J Ophthalmol* 2016;9(9):1304-1309
- 13 Askari M, Nikpoor AR, Gorjipour F, et al. Association of Htra1 gene polymorphisms with the risk of developing AMD in Iranian population. *Rep Biochem Mol Biol* 2015;4(1):43-49
- 14 Ruamviboonsuk P, Tadarati M, Singhanetr P, et al. Genome-wide association study of neovascular age-related macular degeneration in the Thai population. *J Hum Genet* 2017;62(11):957-962
- 15 Karkhane R, Ahmadraji A, Riazi Esfahani M, et al. Complement factor H and LOC387715/ARMS2/HTRA1 variant's frequencies and phenotypic associations in neovascular age-related macular degeneration, a pilot study. *Curr Ophthalmol* 2016;28(1):32-36
- 16 Tsiloulis AN, Zacharaki F, Kotoula MG, et al. Genetic variants in complement pathway and ARMS2/HTRA1 genes and risk of age-related macular degeneration in a homogeneous population from central Greece. *Ophthalmic Genet* 2016;37(3):339-344