

· 论 著 ·

缓激肽 B2 受体基因多态性在膝骨关节炎发生和发展中的作用

徐若男¹, 陈 烁², 刘宏滨², 蔡筱松²

[摘要] 目的 研究缓激肽 B2 受体(BDKRB2)基因多态性对膝骨关节炎易感性和严重性的影响。方法 在原发性膝骨关节炎 245 例(观察组)及健康志愿者 264 例(对照组)中,针对 BDKRB2 基因多态性 -58T/C 和 +9/-9,分别进行基因型测定。结果 +9/-9 基因多态性的基因型分布和等位基因频率,在两组之间存在明显差异。回归分析显示 -9/-9 基因型相对于 +9/+9 基因型,罹患膝关节炎的风险明显增高(OR=2.354, $P<0.01$)。同时, +9/-9 基因多态性与骨关节炎的放射学分型存在相关性, -9 等位基因可能与骨关节炎的严重程度有关。 -58T/C 基因多态性与骨关节炎的易感性和严重性无相关性。结论 缓激肽 B2 受体基因多态性 +9/-9 可能成为检测骨关节炎易感性和严重性的基因标记物。

[关键词] 缓激肽 B2 受体;基因多态性;骨关节炎

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.04.014

Bradykinin B2 receptor polymorphisms contribute to the susceptibility and severity of knee osteoarthritis

XU Ruo-nan¹, CHEN Shuo², LIU Hong-bin², CAI Xiao-song². 1. Offices of Health Care, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Orthopedics Surgery, 97 Hospital of PLA, Xuzhou, Jiangsu 221004, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of bradykinin B2 receptor polymorphisms on the susceptibility and severity of knee osteoarthritis. **Methods** A total of 245 patients with primary knee OA and 264 healthy volunteer were recruited. BDKRB2 gene polymorphisms, -58T/C and +9/-9 polymorphisms, were genotyped. **Results** The genotype distributions and allele frequencies of +9/-9 polymorphisms significantly differed between OA and control subjects. Logistic regression analysis showed carriers with -9/-9 genotype had a significantly increased risk for knee OA compared with the +9/+9 genotype (OR=2.354, $P<0.001$). The +9/-9 polymorphisms also determined the OA radiographic severity. The presence of -9 was associated with severer OA. The -58T/C polymorphisms did not affect OA risk and severity. **Conclusion** The +9/-9 polymorphisms of BDKRB2 gene may be used as a genetic marker for the susceptibility and severity of OA.

[Key words] bradykinin B2 receptor; polymorphisms; osteoarthritis

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种引起疼痛并导致关节功能逐渐丧失的退行性关节疾病,如不及时加以治疗,最终令患者致残并严重影响其生活质量^[1]。骨关节炎的病理变化发生于关节的全部结构,包括骨、软骨及滑膜组织,其中软骨的退变最为显著^[2]。骨关节炎的发病机制尚不明确,研究表明年龄、创伤、激素和力学因素都与骨关节炎的发生和发展有关^[3]。另外,有报道某些基因多态性可能与骨关节炎的发病机制有关^[4]。

无菌性炎症被公认为是骨关节炎的重要发病机制之一^[5]。炎症产生高分解代谢状态,引起软骨细胞凋亡,最终导致关节软骨持续性退变^[6]。缓激肽(bradykinin, BK),是激肽释放酶作用于激肽原的反应产物,能显著促进炎症反应过程,包括疼痛、充血和血浆蛋白漏出等。研究报道缓激肽广泛存在于包

括骨关节炎在内的所有关节炎患者的滑液内^[7]。缓激肽 B2 受体(BDKRB2)广泛存在于包括关节组织在内的各种组织,介导了大多数缓激肽引起的炎症反应,骨关节炎患者的血管内皮细胞和滑膜衬里细胞都检测出缓激肽 B2 受体^[8]。B2 受体拮抗剂的临床应用有效地缓解了关节炎引起的疼痛,改善了膝关节炎的病情,提示缓激肽 B2 受体可能与骨关节炎的发生和发展有关^[9]。

缓激肽 B2 受体的遗传变异可能引起其功能蛋白的生物活性发生变化。然而,缓激肽 B2 受体的遗传变异与骨关节炎的关系尚未阐明。本实验以膝关节炎为研究对象,研究缓激肽 B2 受体在骨关节炎发生和发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 对象 2011 年 1 月-2012 年 1 月原发性膝关节炎 245 例为观察组,另有健康参与者 264 例为对照组,参与者均自愿参加并签署知情同意书。

作者单位: 1. 210002 江苏南京,南京军区南京总医院保健办; 2. 221004 江苏徐州,解放军 97 医院骨科
通讯作者: 陈 烁, E-mail: drchenhuo@gmail.com

纳入标准:骨关节炎的诊断参照美国风湿病协会制定的骨关节炎诊断标准^[10]。骨关节炎的严重程度参照 Kellgren-Lawrence 评分标准,评分 ≥ 2 可纳入。排除标准:观察组排除其他病因导致的关节疾患,如炎性关节炎(风湿病、类风湿病、多发性关节炎、自身免疫性疾病)、创伤性关节炎、化脓性关节炎、骨骼发育不良等。对照组无任何关节炎或关节疾病的症状和表现,如疼痛、肿胀、压痛及活动受限。记录所有对象的临床特征,如年龄、性别、体重指数、吸烟状况及体力劳动情况等。

1.2 缓激肽 B2 受体基因型测定 由于缓激肽 B2 受体基因启动子区 -58T/C 和第 1 外显子 +9/-9 两种多态性与疾病相关性研究较多,故选择为本研究测定的多态位点。

1.2.1 基因组 DNA 提取 按照常规方法采集外周静脉血 5 ml,用低渗法分离白细胞,蛋白酶 K 消化过夜,用酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.2.2 检测 +9/-9 基因多态性 采用聚合酶链式反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)技术,正向引物序列 5'-TCCAGCTCTGGCTTCTGG-3',反向引物序列 5'-AGTCGCTCCCTGGTACTGC-3'(均由大连生工合成)。PCR 反应体系:基因组 DNA 100 ng,缓冲液 25 μ l,脱氧核苷三磷酸底物 0.2 mmol/L, MgCl 21.0 mmol/L, Tris/HCl (pH: 8.4) 20 mmol/L, KCl 50 mmol/L、正、反向引物各 0.015 nmol 和 Taq 酶 0.5 U (购自美国 Invitrogen 公司)。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后进入 40 个循环,每个循环中 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。进行单链构象多态性分析,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,电泳缓冲液为 Tris-硼酸,溴乙啶染色,紫外灯下观察鉴定基因型。

1.2.3 检测 -58T/C 基因多态性 采用 PCR-SSCP 技术,正向引物序列 5'-AAGGTGGCCGACGCTTCC-3',反向引物序列 5'-CTCATCTTTCAAGGGCTGGC-TA-3'(均由大连生工合成)。PCR 反应体系:基因组 DNA 100 ng,缓冲液 25 μ l,脱氧核苷三磷酸底物 0.2 mmol/L, MgCl 21.0 mmol/L, Tris/HCl (pH: 8.4) 20 mmol/L, KCl 50 mmol/L、正、反向引物各 0.015 nmol 和 Taq 酶 0.5 U。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后进入 40 个循环,每个循环中 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、57 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。其反向引物包含一个 G-C 碱基置换,在等位基因 C 存在时产生一个 BfaI 限制性核酸内切酶的识别位点(5'-CTAG-3')。在等位基因 C 存在时可将长度为 133 bp 的 PCR 产物酶切为 112 + 21 bp。

所有酶切产物进行单链构象多态性分析,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,电泳缓冲液为 1 \times Tris-硼酸,溴乙啶染色,紫外灯下观察鉴定基因型。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,计算比值比(OR)和 95% 可信区间(95% CI)。对观察组和对照组的基因型频率和临床特征,应用 χ^2 检验和 Fisher 精确检验进行对比, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。如果每一个单核苷酸多态性都与骨关节炎有独立相关性,为避免因临床变量产生混杂效应,则采用多元回归分析进行对比。

2 结果

2.1 一般资料 观察组与对照组在年龄、性别、吸烟状况和重体力劳动方面无明显差异。肥胖在观察组中的发生率明显高于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者的一般资料

临床特征	观察组($n=245$)	对照组($n=264$)
年龄(岁)	57.4 \pm 7.6	58.2 \pm 6.7
性别[女,例(%)]	148(60.4)	155(58.7)
肥胖	132(53.9)*	116(43.9)
吸烟状况[例(%)]	99(40.4)	98(37.1)
重体力劳动[例(%)]	65(26.5)	61(23.1)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 缓激肽 B2 受体多态性的基因型分布与等位基因频率 经检验所有多态性的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),具有群体代表性。缓激肽 B2 受体 -58T/C 的基因型和等位基因频率在观察组和对照组中无明显差异($P > 0.05$)。-9/-9 基因型在观察组中的频率明显高于对照组(33.23% 比 20.13%)。相应地,-9 等位基因在观察组中的频率明显高于对照组(57.54% 比 47.33%, $P < 0.01$)。回归分析显示,经过临床指标调整后,-9/-9 基因型相对于 +9/+9 基因型罹患膝关节骨关节炎的风险明显增大(OR = 2.354, 95% CI: 1.402 ~ 3.941, $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 基因型与骨关节炎的放射学分型之间的关系

所有骨关节炎患者分为两个亚组:KL 评分 ≤ 3 患者组和 KL 评分 > 3 患者组。研究发现,+9/+9 基因型在 KL 评分 > 3 即病情较轻的患者中出现频率远高于 KL 评分 ≤ 3 的患者。+9/-9 和 -9/-9 基因型罹患严重骨关节炎的风险明显增高(分别为 OR = 2.91, $P < 0.01$ 和 OR = 3.07, $P < 0.001$)。-9 等位基因比 +9 等位基因罹患严重骨关节炎的风险更高(OR = 1.97, $P < 0.01$)。见表 3。

表 2 两组患者缓激肽 B2 受体多态性的基因型分布与等位基因频率

基因型/等位基因		观察组[例(%)]	对照组[例(%)]	OR	95% CI	
					下限	上限
+9/-9	+9/+9	44(17.96)	67(25.38)	1.000		
	+9/-9	119(48.57)	144(54.54)	1.258	0.787	1.986
	-9/-9	82(33.46)*	53(20.08)	2.356	1.398	3.937
	+9	208(42.33)	278(52.65)	1.000		
	-9	282(57.67)*	250(47.35)	1.520	1.186	1.947
-58T/C	TT	80(32.65)	64(24.24)	1.000		
	TC	102(41.63)	121(45.83)	0.674	0.404	1.008
	CC	63(25.72)	79(29.93)	0.638	0.435	1.069
	T	262(53.47)	249(47.16)	1.000		
	C	228(46.53)	279(52.84)	0.778	0.612	1.011

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表 3 缓激肽 B2 受体多态性与骨关节炎放射学分型的关系

基因型/等位基因		KL ≤ 3 [例(%)]	KL > 3 [例(%)]	OR	95% CI	
					下限	上限
+9/-9	+9/+9	35(23.08)	45(47.20)	1.000		
	+9/-9	72(47.56)*	30(31.20)	2.910	1.610	5.620
	-9/-9	44(29.54)*	19(22.60)	3.070	1.540	6.150
	+9	142(46.72)	120(62.80)	1.000		
	-9	160(53.38)*	68(37.20)	1.970	1.350	2.950
-58T/C	TT	29(19.40)	15(16.13)	1.000		
	TC	67(43.78)	52(55.65)	0.670	0.310	1.340
	CC	55(36.82)	27(28.22)	1.040	0.470	2.230
	T	125(41.29)	82(43.95)	1.000		
	C	177(58.71)	106(56.05)	1.100	0.780	1.610

注:与 KL > 3 比较,* $P < 0.05$

3 讨论

3.1 BDKRB2 的生物学特性 BDKRB2 由骨关节炎滑膜组织产生,是一种炎症性、具有扩张血管作用的九肽。它通过引发并维持炎症反应,刺激神经纤维并提高神经纤维敏感性,从而导致疼痛,激活滑液和软骨中内环境平衡的主要细胞:滑膜细胞和软骨细胞。另外,BDKRB2 还能协同增强促炎因子产生的作用。BDKRB2 持续表达于多数组织,通过持续产生和释放一氧化氮产生强烈的扩张血管和致炎效果。

3.2 BDKRB2 的变异 人类的缓激肽 B2 受体基因位于染色体 14q32,基因含有数个多态位点,在基因的第一个外显子有 9 个碱基对的插入点/缺失点(+9/-9,rs5810761),启动子区有 C-T 转换点(C-58T,rs1799722)。缓激肽 B2 受体的编码基因上 9 个碱基对的缺失会产生较高浓度的受体 mRNA,而 -58T/C 变异可引起转录效率下降,提示与相应

地功能密切相关。Lung 的研究结果提示启动子区与第 1 外显子基因变异与 BDKRB2 基因转录效率相关。已报道缓激肽 B2 受体 +9/-9 和 -58T/C 基因多态性与一系列病理状态有关,包括冠心病、高血压和肺动脉高压引起的左心肥大^[11],故本研究选择上述两种多态位进行检测。尽管缓激肽 B2 受体在炎症中的作用已被阐明,但关于缓激肽 B2 受体基因多态性与炎症关系的研究还很少。

3.3 BDKRB2 基因多态性与骨关节炎的关系 骨关节炎是一种引起疼痛的退行性关节疾病^[12],目前全世界骨关节炎患者有 3.55 亿人。本实验在中国人群中检测 BDKRB2 基因多态性与骨关节炎易感性的关系,是针对缓激肽 B2 受体基因多态性与骨关节炎关系的研究。实验结果显示 -9/-9 基因型相对于 +9/+9 基因型罹患膝关节骨关节炎的风险明显增大,而且 +9/-9 和 -9/-9 基因型相对于 +9/+9 基因型罹患严重骨关节炎的风险明显增高。本研究提示了缓激肽 B2 受体基因多态性与骨

关节炎的关系。研究发现 +9/-9 基因多态性不仅与骨关节炎的发病有关,并且与骨关节炎的严重程度密切相关,-58T/C 基因多态性与骨关节炎无明显相关性。研究结果表明缓激肽 B2 受体 +9/-9 基因多态性可能作为骨关节炎发生和发展的基因标记,可成为重要的临床筛查指标。

本研究才刚刚起步,研究结果有待于更大样本、多种族的进一步研究的检验。基因多态性影响骨关节炎的分子生物学机制需要更加深入的研究。

【参考文献】

- [1] Forestier R, Francon A, Briole V, et al. Prevalence of generalized osteoarthritis in a population with knee osteoarthritis[J]. Joint Bone Spine, 2011, 78(3): 275-278.
- [2] Bae JY, Park KS, Seon JK, et al. Biomechanical analysis of the effects of medial meniscectomy on degenerative osteoarthritis[J]. Med Bio Eng Com, 2012, 50(1): 53-60.
- [3] Anderson DD, Marsh JL, Brown TD, et al. The pathomechanical etiology of post-traumatic osteoarthritis following intraarticular fractures[J]. Iowa Ortho J, 2011, 31(1): 1-20.
- [4] 朱伦庆,戴进,史冬泉,等. Asporin 基因研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2009, 30(3): 155-157.
- [5] 李颖,刘英娜,覃仕化,等. 类风湿关节炎大鼠模型的相关细胞因子研究[J]. 东南国防医药, 2011, 13(3): 214-216.
- [6] Michou L. Genetics of digital osteoarthritis[J]. Joint Bone Spine, 2011, 78(4): 347-351.
- [7] Ikegawa S. Recent advance in the genomic study for osteoarthritis[J]. Clinical Calcium, 2011, 21(6): 826-830.
- [8] Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis[J]. Cur Opin Rheum, 2011, 23(5): 471-478.
- [9] Bouillet L, Boccon-Gibod I, Massot C, et al. Bradykinin mediated angioedema[J]. RevMed Inte, 2011, 32(4): 225-231.
- [10] 周敏,刘云鹏,李坤,等. 玻璃酸钠腔内注射治疗退变性髌关节炎疗效观察[J]. 东南国防医药, 2010, 12(1): 82-84.
- [11] Warde N. Osteoarthritis: local antagonism of endothelin-1 and bradykinin receptors improves OA pain and joint morphology in rats[J]. Nat Rev Rheum, 2011, 7(7): 375-377.
- [12] 李颖,刘英娜,覃仕化,等. 类风湿性关节炎患者韧带及关节囊组织炎性浸润机制研究[J]. 东南国防医药, 2011, 13(4): 314-331.

(收稿日期: 2013-03-01; 修回日期: 2013-04-26)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)

编写军区卫生工作史的几点体会

南京军区联勤部卫生部原部长 李富荣

本人自 2000 年退休后,先后参加南京军区疾病预防控制中心《军事医学研究所志》、《前进发展的 50 年》画册编制,以及《南京军区卫生工作 60 年》、《南京军区卫生人物志》等编写出版工作,共撰稿近 200 万字,主审通审编辑和校审 450 万字。参加卫生史编写主要有以下几点体会:

1. 编史是军休干部的历史责任。本人在南京军区卫生系统工作长达 45 年,并担任军区卫生部领导 10 余年,对军区卫生工作情况熟悉,有责任承担编史任务。卫生史是军史、党史的重要内容,编写卫生史非常重要而有意义。自己作为一名 70 多岁的军队退休干部,能继续为军区卫生事业做点事,既是人生的乐趣,更是应有的历史责任。我们要以编史告慰前人,镜鉴后人。

2. 编史是一种奉献须付出辛勤汗水。编史不同于写书、写文章,要付出代价和辛勤的劳动。编史涉及单位多整体策划协调难,时间跨度长收集历史资料难,历史事件多设计编写纲目撰稿难,工作量大,必须知难而上。本人在编写《南京军区卫生工作 60 年》时,为了赶进度,用脑过度,发生脑梗 2 次住院治疗,出院后医生和组织上要我在家好好休息,但自己想到这是历史责任,在部队工作了一辈子,退休不能退军人本色,奉献无“休”字,不能丢下不管,只有坚持有了结果,才算尽到责任,出院后的第二天就投入了编写工作。

3. 编史要怀着对老前辈的感恩之情。南京军区卫生工作走过了辉煌的 64 年,为促进部队的全面建设,保障部队的战斗力发挥了重要的作用,这是军区一代又一代卫勤领导、专家和广大卫生人员共同努力的结果,我们编写卫生史,要怀着对老前辈深厚的感情,全面充分地反映老前辈为军区卫生工作做出的贡献,积累留下的宝贵经验和光荣传统。

4. 编史是为了传承历史教育后人。历史不可忘记,忘记了历史,意味着忘记了过去,也忘记了自己,也就看不到未来的发展。历史中有印记、有经验,更有作风和精神,我们编写卫生史,就是为了使军区卫生系统的宝贵经验和光荣传统一代一代地传承下去,发扬光大。作为历史编写者,必须尊重历史,实事求是,用历史教育和激励后人。