

Nogo 及雌激素受体基因多态性与多发性硬化的研究

孟丽红¹⁾, 胡登科²⁾, 杨昆胜²⁾

(1) 昆明医科大学第六附属医院, 云南 玉溪 653100; 2) 昆明医科大学第一附属医院神经内科, 云南 昆明 650000)

[摘要] **目的** 分析 Nogo 基因和雌激素受体多态性在多发性硬化的分布特点, 探讨上述基因多态性与云南多发性硬化患者发病的相关性. **方法** 分别采用聚合酶链式反应 (PCR) 分析方法和限制性片段长度多态性聚合酶链式反应 (PCR-RFLP) 分析方法, 分析 47 例 MS 患者及 47 例健康对照者的 Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 插入/缺失突变的基因型和等位基因频率及雌激素受体 (estrogen receptor, ER) α 基因 Pvu II、Xba I 酶切多态性的分布, 采用 SPSS 软件分析上述基因多态性与 MS 的关系. **结果** MS 组的 Nogo Del 型等位基因频率和 ER Pvu II 大 P 等位基因频率明显高于对照组, 经 χ^2 检验 2 组间分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 对 Nogo 及 ER 等位基因进行 Logistics 回归分析, ER Pvu II 小 P 等位基因, 与 MS 发生成负相关, 相关系数为 -1.670 ($P = 0.013$), 发生 MS 相对危险度的 95% 可信区间为 $0.050 \sim 0.704$, Nogo Ins 型等位基因, 与 MS 发生成负相关, 相关系数为 -1.248 ($P = 0.013$), 发生 MS 相对危险度的 95% 可信区间 $0.087 \sim 0.948$. **结论** Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 缺失突变可能是云南汉族人群患 MS 后不易缓解的危险因素之一, 而 Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 插入突变可能是云南汉族人群患 MS 后易修复的因素之一; ER Pvu II 大 P 可能是云南汉族人群易感 MS 的危险因素之一.

[关键词] 多发性硬化; 雌激素受体基因 Pvu II; Nogo 基因; 基因多态性

[中图分类号] R744.5*1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0088 - 05

The Relationship between Nogo and Estrogen Receptor Gene Polymorphism and Multiple Sclerosis

MENG Li - hong¹⁾, HU Deng - ke²⁾, YANG Kun - sheng²⁾

(1) Dept. of Rehabilitation Medicine, People's Hospital of Yuxi City, Yuxi Yunnan 653100; 2) Dept. of Neurology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650000, China)

[Abstract] **Objectives** To find the the association of Nogo and estrogen receptor gene polymorphism with multiple sclerosis. **Methods** (1) The blood samples prepared from 47 MS patients and 47 normal person who were matched in age, sex and ethnic were used in this study. (2) To identify the Nogo 3 UTR CAA insertion/deletion polymorphism, polymerase chain reaction (PCR) and polyacrylamide gel electrophoresis were employed. (3) To explore Pvu II and XbaI restriction fragment length polymorphism of estrogen receptor (ER) gene, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used. (4) Data analysis was performed using SPSS. **Results** Significant difference in Nogo 3 UTR CAA insertion/deletion allele frequencies was observed between the patients with multiple sclerosis and control ($P < 0.05$). The gene polymorphism of Nogo and ER were also analyses using Logistics Regression, the results showed that ER Pvu II p allele was negatively associated with MS, the correlation coefficient was -1.670 ($P = 0.013$) with 95% confidence interval between 0.050 and 0.704 . And Nogo Insert allelic gene was also negative associated with MS, correlation coefficient was -1.248 ($P = 0.013$) with 95% confidence interval between 0.087 and 0.948 . **Conclusions** This study confirms an association of Nogo 3 UTR CAA insertion/deletion polymorphism and Pvu II restriction fragment length polymorphism of estrogen receptor (ER) gene with multiple sclerosis. In addition, ER Pvu II p and Nogo Insert

[作者简介] 孟丽红 (1976~), 女, 云南玉溪市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事康复医学临床工作.

[通讯作者] 杨昆胜. E-mail:kushengyangLG_1245@163.com

allelic gene may be protection factors for MS.

[Key words] Multiple Sclerosis ; Pvu II; Nogo; Gene polymorphism

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是一种血脑屏障遭破坏, 伴有炎症、髓鞘损害为特征的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 慢性自身免疫性疾病。Nogo 是 4 种神经生长抑制因子之一, 因其具有强烈的抑制中枢神经元再生的能力倍受关注。MS 的好发人群、好发年龄和妊娠后 MS 复发率下降, 产后复发率又上升^[1]均提示雌激素水平与多发性硬化具有相关性, 雌激素需与受体相结合后才能发挥生物效应。雌激素受体的表达必然影响雌激素的功能。本研究以 MS 为研究表型, 探讨 Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 插入 / 缺失突变以及等位基因频率及雌激素受体 α 基因 Pvu II、Xba I 酶切多态性与 MS 患病的相关性。

1 资料与方法

1.1 对象

MS 组 47 例, 脑型 MS 39 例 (83.0%), 脊髓型 8 例 (17.0%)。根据病程分型: 复发缓解 (RR) 型 38 例, 继发进展型 (SP) 9 例。分别来自 2003 年 9 月至 2010 年 3 月昆明医科大学第一附属医院神经内科、2007 年 9 月到 2010 年 2 月玉溪市人民医院。患者之间均无血缘关系且双亲为三代云南籍汉族病人。全部病例符合 McDonald (2001) 多发性硬化诊断标准。患者年龄 17 ~ 53 岁, 平均 (34.38 ± 9.31) 岁。病程 1 个月 ~ 24 a, 平均 4.02 a。正常对照组为门诊健康无血缘关系的体检者 47 例, 均为云南汉族的健康人群, 年龄 18 ~ 47 岁, 平均 (31.89 ± 6.37) 岁。对照者均无免疫性疾病史、家族史及其它神经系统疾病史。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 抽取 94 例受试者清晨空腹外周静脉血 (肝素抗凝) 3 mL, 应用 DNA 试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司提供) 按说明提取基因组 DNA, 经紫外线分光光度仪测定浓度及纯度。

1.2.2 Nogo 基因型分析 扩增条件: PCR 反应总体积为 25 μ L, 其中内含 50 ng 基因组 DNA, Taq 酶 PCR 混合试剂 12.5 μ L, 各 1 μ L 上下游引物^[2] (上游引物: 5'-TCA ACA TGA AAT GCC ACA CAA-3', 下游引物: 5'-CAG TCA GTC TGT GCA ATG AAA-3', 由昆明晨绿生物技术有限公司合

成), 最后补充去离子水至终体积 25 μ L。PCR 反应条件为: 采用两步法反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 59 $^{\circ}$ C 退火及复性 40 s, 共 35 个循环。12 g/L 琼脂糖凝胶溴化乙锭电泳分离, 将凝胶至于紫外线投射仪下照射分析基因型。

1.2.3 ER 基因型分析 扩增条件为 PCR 反应总体积为 30 μ L, 其中内含 0.1 μ g 基因组 DNA, Taq 酶 PCR 混合试剂 15 μ L, 各 0.5 μ L 上下游引物^[3] (上游引物: 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3', 下游引物: 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3', 由昆明晨绿生物技术有限公司合成)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 63 $^{\circ}$ C 退火及复性 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 S, 共 35 个循环。扩增产物片段为 1 300 bp, 分别取 10 μ L 扩增物与 1.5 μ L Pvu II 酶和 1.5 μ L Xba I 酶放于 37 $^{\circ}$ C 的电热恒温箱内酶切 4 h。12 g/L 琼脂糖凝胶溴化乙锭电泳分离, 将凝胶至于紫外线投射仪下照射分析基因型。

1.3 统计学处理

按基因计数法计算基因型和等位基因频率, 使用 SPSS 统计分析软件进行数据分析, 各组间差异采用多样本 R \times C 表 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; Nogo 及 ER 基因多态性与 MS 的相关性采用 Logistic 回归分析方法。

2 结果

2.1 MS 组和对照组在年龄、性别上的分布

MS 组和对照组在年龄、性别上的分布无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。Nogo 基因酶切结果, 见图 1。

Nogo 基因的 Del/Del、Ins/Del、Ins/Ins 基因型在 MS 及对照组中的分布没有统计学差异 ($P = 0.167$); Del、Ins 等位基因在 2 组间的分布具有统计学差异 ($P = 0.028$), 见表 2。ER α 基因 Pvu II 酶切位结果, 见图 2。

ER 基因 Pvu II 的 PP、Pp、pp 基因型及 P、P 等位基因在两组间的分布有统计学差异 (P 值分别等于 0.014 和 0.004), 见表 3; 而 XX、Xx、xx 的基因型及 X、x 等位基因在统计学上无差异, 见表 4。

2.2 Nogo 及 ER 基因多态性与 MS 的相关性采用 Logistic 回归

Nogo 及 ER 基因多态性与 MS 的相关性采用

Logistic 回归显示: p、Ins 等位基因与 MS 呈负相关, 回归系数分别为 -1.670 和 -1.248, 见表 5.

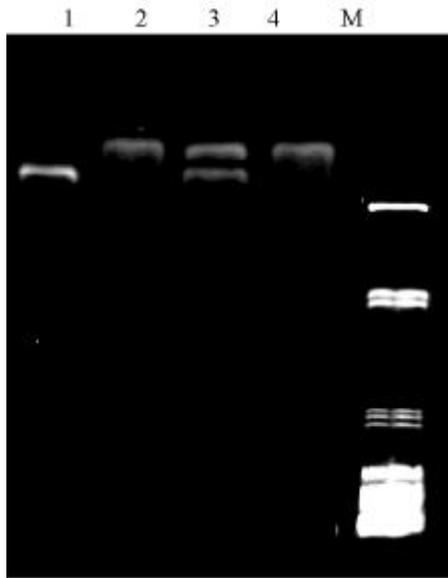


图 1 Nogo 基因 3' 末端编码区 CAA 插入 / 缺失突变基因多态性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 The polyacrylamide gel electrophoresis of CAA insertion/deletion mutation gene polymorphism in 3'coding region of Nogo gene

M:分子量标准; 2, 4:基因型为 Del/Del; 3:基因型为 Ins/Del; 1:基因型为 Ins/Ins.

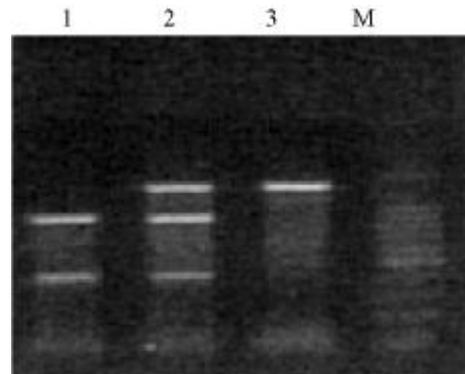


图 2 ER α 基因 Pvu II 酶切位点基因多态性琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of the polymorphism of ER α gene at Pvu II restriction enzyme digestion site

1:pp 基因型 850 bp, 450 bp; 2:Pp 基因型 1 300 bp, 850 bp, 450 bp; 3:PP 基因型 1 300 bp; M:Marker.

表 1 MS 组与对照组一般资料 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The general data of patients in MS group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	年龄 (岁)	性别	
			男	女
MS 组	47	32.49 \pm 8.78	12	35
对照组	47	31.89 \pm 6.37	11	36

表 2 MS 与对照组 Nogo 基因 3' 末端编码区 CAA 插入 / 缺失突变基因型分布和等位基因频率分布 [n(%)]

Tab. 2 The frequency of genotype and allele of CAA insertion/deletion mutation gene polymorphism in 3'coding region of Nogo gene in MS group and control group [n(%)]

组 别	n	基因型频率 a			等位基因频率 b	
		Del/Del	Ins/Del	Ins/Ins	Del	Ins
MS 组	47	18(38.30)	13(27.66)	16(34.04)	49(52.13)*	45(47.87)*
对照组	47	10(21.28)	14(29.78)	23(48.93)	34(36.17)	60(63.83)

与对照组比较, *P < 0.05.

表 3 MS 患者与对照组 ER- α 基因 Pvu II 基因型及等位基因频率的分布 [n(%)]Tab. 3 The frequency of genotype and allele of ER- α gene at Pvu II digestion site in MS group and control group [n(%)]

组别	n	Pvu II 基因型 1			Pvu II 等位基因 2	
		PP	Pp	pp	P	p
MS 组	47	17(36.17)**	11(23.40)**	19(40.43)**	45(47.87)**	49(52.13)**
对照组	47	5(10.64)	16(30.04)	26(55.32)	26(27.66)	68(72.34)

与对照组比较, ** $P < 0.01$.

表 4 MS 组与对照组 ER- α 基因 Xba I 位点基因型的分布 [n(%)]Tab. 4 The frequency of genotype of ER- α gene at Xba I enzyme digestion site in MS group and control group [n(%)]

组别	n	Xba I 基因型			Xba I 等位基因	
		XX	Xx	xx	X	x
MS 组	47	8(17.02)	15(31.92)	24(51.06)	31(32.98)	63(67.02)
对照组	47	3(6.38)	19(40.43)	25(53.19)	25(26.60)	69(73.40)

表 5 多发性硬化 (MS) 相关基因的多因素 logistic 回归分析结果

Fig. 5 The multiple factor logistic regression analysis result of the related genes of MS

变量 (1= 是, 0= 否)	回归系数	标准误	统计量 Wald	自由度	P	相对危险度	95%CI (%)
ER Pvu II 大 P 等位基因	-0.072	0.521	0.019	1	0.890	0.930	0.335 ~ 2.584
ER Pvu II 小 p 等位基因	-1.670	0.673	6.154	1	0.013	0.188	0.050 ~ .704
Nogo-A Del 等位基因	0.257	0.554	0.215	1	0.643	1.293	0.437 ~ 3.830
Nogo-A Ins 等位基因	-1.248	0.610	4.192	1	0.041	0.287	0.087 ~ .948

3 讨论

多发性硬化的病理特征是中枢神经髓鞘脱失, 晚期伴有轴索受损崩解、神经细胞减少, 代之以神经胶质形成的硬斑. 众所周知哺乳动物中枢神经系统 (CNS) 损伤后神经元的再生能力非常有限. CNS 神经元内在的再生能力缺陷以及 CNS 微环境中存在的各种外源性抑制因子影响轴突的再生是 CNS 轴突再生障碍的 2 个主要原因^[4]. 目前确认的神经生长抑制因子有 Nogo (Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C)、髓磷脂相关糖蛋白 (myelin-associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白 (oligo dendrocyte-myelin glycoprotein, OMgp) 和软骨素硫酸盐糖蛋白 (chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs) 等 4 大类型, 其中 Nogo 因具有较强抑制轴突生长的作用而备受关注. 中枢神经系统中髓鞘来源于少突胶质细胞, 目前认为 Nogo 是一种主要表达于中枢神经系统少突胶质细胞中的神经生长抑制因子. 如果其产生增多, 必然抑制受损神经元的修复, 反之其产生减少, 可以减弱抑制作用, 使受损神经元得到修复. 本研究推论

Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 插入 / 缺失突变中有 CAA 序列时, 即 Ins 型等位基因, 使 Nogo-A 产生减少, 从而增强受损神经元修复; 而 Del 型等位基因中因为缺乏此序列, 转录速度相对较高, 产生的 Nogo 也多, 从而抑制受损神经元的修复.

雌激素对免疫反应具有双向剂量依赖效应, 生理状态下 (低剂量) 时雌激素能够增加特异性免疫活性, 而高剂量时雌激素能够抑制特异性免疫活性^[5]. 从而解释了多发性硬化患者中女性是男性的 2~3 倍, 但是高水平雌激素又可以治疗 MS^[6]. 雌激素只有在细胞核的 ER 的介导下才能发挥生物效应, 由于 ER α 基因的 1 号内含子中含有增强子、启动子等重要序列, 因此在其中发生点突变可能会影响到 ER 的表达和功能, ER 的不同表达水平和功能差异必将直接影响到个体内雌激素的最终生理效应, 进而对 MS 的发生、发展和预后产生影响. 综上所述 ER α 的 Pvu II 酶切位点发生突变可影响 ER 的表达和功能, 从而影响着雌激素的最终生物效应.

Nogo 为修复基因, 而 ER α 为易感基因, 当携带 ER α 的小 p 和 Nogo 的 Ins 等位基因时, 易感风

险降低, 修复功能增强, 不易患 MS. 当携带 ER α 的大 P 和 Nogo 的 Ins 等位基因时, 易感风险增加, 修复功能增强, 易患 MS, 且症状容易缓解, 表现为临床型的 RR-MS; 当携带 ER α 的大 P 和 Nogo 的 Del 等位基因时, 易感风险增加, 修复功能降低, 临床表现为 SP-MS.

本研究中发现: (1) MS 组携带 Nogo-A Del 等位基因频率高于对照组, 对照组携带 Nogo-A Ins 等位基因频率高于 MS 组; (2) 携带 ER α 的大 P 等位基因比携带小 p 等位基因者更易患 MS; (3) Nogo-A Del 等位基因为抑制受损神经元修复的基因, Nogo Ins 等位基因为促进受损神经元修复的基因; ER α 的大 P 等位基因为 MS 易感基因, 小 p 为 MS 的非易感基因; (4) 在 Nogo-A 及雌激素受体等位基因进行 Logistic 回归分析中, ER Pvu II 大 P 等位基因和 Nogo-A Del 等位基因与 MS 发生的相关性无统计学意义, 可能与该实验样本数量少及研究时不易分组, 且 MS 组绝大多数的为复发缓解型有关, 需进一步扩大样本量, 进行分组研究.

综上所述, Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 插入/缺失突变以及等位基因频率与 MS 具有相关性, Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 缺失突变可能是云南汉族人群患 MS 后不易缓解的危险因素之一, 而 Nogo 基因 3' 端未编码区 CAA 插入突变可能是云南汉族人群患 MS 后易修复的因素之一; ER 基因 Pvu

II 酶切多态性与 MS 具有相关性, ER Pvu II 大 P 可能是云南汉族人群易感 MS 的危险因素之一, ER Pvu II 小 p 可能为 MS 非易感基因; XbaI 酶切多态性与 MS 无相关性.

[参考文献]

- [1] CONFAVREUX C, HUTCHINSON M, HOURS M M, et al. Rate of pregnancy related relapse in multiple sclerosis[J]. N Eng J Med, 1998, 339(5):285 - 291.
- [2] GREGORIO S P, MURY F B, OJOPI E B, et al. Nogo CAA 3 UTR Insertion polymorphism is not associated with Schizophrenia nor with bipolar disorder [J]. Schizophr Res, 2005, 75(1):5 - 9.
- [3] 梁军, 侯亚义. 雄激素对淋巴细胞的调节[J]. 现代免疫学, 2004, 24(3):259 - 261.
- [4] PERRY A B, FLANAGAN J G. Nogo domains and a nogo receptor; implications for axon regeneration [J]. Neuron, 2001, 30:11 - 14.
- [5] CZLONKOWSKA A, CIESIELSKA A, GROMADZKA G, et al. Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases[J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(8):1017 - 1030.
- [6] SICOTTE N L, LIVA S M, KLUTCH R, et al. 2002. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estradiol [J]. Ann Neurol, 2002, 52(4):421 - 428.

(2012-06-21 收稿)

更正

《昆明医科大学学报》2012 年 33 卷第 8 期第 98 页“结直肠癌各年龄段患者术后门诊随访率临床分析”一文的第三作者“彭子伟”应为“彭伟”, 特此更正。

昆明医科大学学报编辑部

2012 年 10 月 10 日