

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000660

KCNJ2 基因下游 rs312691、rs623011 位点多态性与甲状腺毒症周期性瘫痪的关系

唐紫薇,姚 渝,田浩明

(四川大学华西医院内分泌与代谢科,成都 610041)

【摘要】目的:探讨 *KCNJ2* 基因下游 rs312691 与 rs623011 这 2 位点是否为中国大陆甲状腺毒症周期性瘫痪(thyrotoxic periodic paralysis, TPP)患者可疑致病位点。**方法:**对 TPP 组 112 人,不伴低钾周瘫的 Graves' 甲亢(GD 组)127 人,正常对照组(NC 组)94 人提取全基因组 DNA 以及 PCR 扩增,于目标位点进行单向测序。**结果:**rs312691 等位基因 C 在 TPP 组的基因频率为 0.674,显著高于 GD 组 0.40 和 NC 组 0.463,CC 基因型的甲亢男性和正常男性相较 CT 和 TT 基因型发生 TPP 的风险分别为 5.390 倍和 2.481 倍;rs623011 等位基因 A 在 TPP 组的基因频率也为 0.674,显著高于 GD 组 0.386 和 NC 组 0.431,AA 基因型的甲亢男性和正常男性相较 AG 基因型和 GG 基因型发生 TPP 的风险分别为 5.292 倍和 3.236 倍。**结论:**rs312691 与 rs623011 均与大陆 TPP 显著相关,可能为 TPP 致病位点。

【关键词】甲状腺毒症周期性瘫痪;*KCNJ2*;单核苷酸多态性

【中图分类号】R581.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-03-15

Association between *KCNJ2* downstream rs312691,rs623011 polymorphism and thyrotoxic periodic paralysis

Tang Ziwei, Yao Yu, Tian Haoming

(Department of Endocrinology and Metabolism, West China Hospital, Sichuan University)

【Abstract】Objective: To verify the relationship between the polymorphism of rs312691,rs623011 and thyrotoxic periodic paralysis (TPP). **Methods:** Totally 112 male TPP patients were recruited and taken as experimental group, 127 male patients with Graves' disease but without periodic paralysis were taken as GD group and 94 normal male individuals were taken as control (NC group). Whole genome was extracted from each participant's peripheral blood and the target region was amplified and sequenced. **Results:** The risk allele frequency of rs312691 in TPP group was 0.674, significantly higher than that in GD group and NC group. The odds ratio of genotype CC in TPP group was 5.390 times higher than that in GD group and 2.481 times higher than that in NC group. The risk allele frequency of rs623011 in TPP group was also 0.674, significantly higher than that in GD group and NC group. The odds ratio of genotype AA in TPP group was 5.292 times higher than that in GD group and 3.226 times higher than that in NC group. **Conclusion:** The *KCNJ2* related rs312691 and rs623011 are significantly related to Chinese TPP.

【Key words】thyrotoxic periodic paralysis; *KCNJ2*; single nucleotide polymorphism

甲状腺毒症性周期性瘫痪(thyrotoxic periodic paralysis, TPP)是甲状腺功能亢进症的非常见并发症之一,具有潜在的致命危险。其主要表现为单次或反复发作性的肌肉瘫痪伴有不同程度的钾离子快速向细胞内转移所导致的低钾血症。TPP 为条件

性发病,即只在甲状腺毒症的状态下才会发生,其发病机制相对复杂,既涉及骨骼肌 Na-K-ATP 酶^[1]活性增高,又包含了钾离子外流功能的受限^[2]。研究证明,骨骼肌上存在大量整流钾离子通道 Kir^[3],这种钾离子通道实为双向通道,既促进钾离子的胞内转移,也调控其外流。Kir 家族中,目前只有 Kir2.6 与 Kir2.1 与 TPP 关系最紧密。Kir2.6 由美国研究者 Ryan 等^[4]发现,其编码基因 *KCNJ18* 的突变在 33% 的高加索人群、26% 的新加坡人群以及 1.2% 的香港

作者介绍:唐紫薇,Email:eyrevivi@gmail.com,

研究方向:内分泌与代谢疾病。

通信作者:田浩明,Email:ccazb0127@foxmail.com。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150603.1244.002.html

(2015-06-03)

人群中均有所探及,由此被认为与 TPP 发病相关。但因为 *KCNJ18* 的突变主要集中于非亚裔人群中,且经台湾 TPP 人群验证后,并未发现已报道的突变类型,因此 Kir2.6 是否为亚洲 TPP 患者致病基因仍尚无定论。Kir2.1 为基因 *KCNJ2* 编码,其可疑位点 rs312691 和 rs623011 分别由香港研究者 Cheung 等^[5]和泰国研究者 Jongjaroenprasert 等^[6]于 2 年前同时发现。虽然这 2 位点均位于非编码区,但与 *KCNJ2* 基因编码区内的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)存在显著的连锁不平衡关系,可能参与 *KCNJ2* 基因调控。于是 rs312691 和 rs623011 也被认为是潜在的 TPP 致病位点。为了验证上述 2 位点是否为中国大陆 TPP 人群的致病位点,特此开展了以下试验。

1 资料与方法

1.1 试验设计

病例对照研究。

1.2 病史采集、纳入排除标准

自 2010 年起,开始收集来自四川大学华西医院内分泌科、急诊科、内分泌门诊的男性甲状腺毒症患者临床资料,以入院登记内容为主,结合后期电话核实,采用如下的纳入和排除标准进行筛选。(1)纳入标准:a. 四川地区汉族男性;b. 甲状腺毒症表现为低促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH),高游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)、游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3);c. 临床诊断的 Graves' 病,表现为阳性 TRAb、弥漫性甲状腺肿、甲状腺相关性眼病、胫前黏液水肿等;d. 甲状腺毒症期间若存在周期性瘫痪症状,同步血钾水平需低于 3.5 mmol/L。(2)排除标准:a. 非 Graves' 病甲亢,包括甲状腺腺瘤、亚甲炎、继发性甲亢等;b. 颈部 B 超查见甲状腺多结节(数量大于 2 个)或单个结节直径大于 5 mm;c. 甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)或甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TgAb)超过 200 IU/ml;d. 怀疑或证实伴随其他原因所致的低钾血症,如肾小管酸中毒、Batter's/Gitelman 综合征、原发性醛固酮增多症以及消化道失钾等。符合纳入标准、不满足排除标准者,根据既往是否存在低钾周瘫痪病史,分为 2 组,阳性患者纳入 TPP+GD 组(组 1)共 112 人,单纯 Graves' 病不伴周瘫痪病史的患者纳入 GD 组共 127 人(组 2),正常男性作为另一对照,纳入 NC 组(组 3)共 94 人。

1.3 试验方法

1.3.1 血液全基因组 DNA 提取 因考虑到甲状腺毒症患者自身白细胞数目偏少,且反复冻融更会使得 DNA 含量急剧

下降,因此本试验所用标本一经采集(2~4 ml 新鲜血液)后,只能放入 4℃ 冰箱保存,且 5 日之内完成基因组提取。由四川大学华西医院内分泌与代谢病实验室提供场地和仪器,采用 TIGEN(天根生化科技有限公司)血液基因组提取试剂盒 RelaxGene Blood DNA System(0.1~20 ml)DP319 提取基因组标本。

1.3.2 基因多态性分析 首先进行目标片段扩增,PCR 反应体系如下:(1)建立 PCR 体系共 25 μ l,其中包含基因组 Template 模板 1 μ l,上游引物 Primer up(10 μ mol/L)0.5 μ l,下游引物 Primer down(10 μ mol/L)0.5 μ l,dNTP 混合物 0.5 μ l,10 x Taq 反应缓冲液 Reaction Buffer 2.5 μ l,Taq 酶(5 U/ μ l)0.2 μ l,最后加水至 25 μ l。(2)扩增。首先将 DNA 进行 4 min 95℃ 预变性,然后进行 35 个循环扩增,每个循环要包含 30 s 94℃ 变性、30 s 60℃ 退火以及 1 min 72℃ 延伸,循环完毕后进行 7 min 继续延伸,最后在 4℃ 下完成 10 min 的冷却。扩增引物 rs312691 3' 端:AAAACTAGCTTGCATCTGTCTC,5' 端:TCTTGTGTTGTTGTTCTTGACC;rs623011 3' 端:ACAGAGTTATGTGGAGAGATGGG,5' 端:TGTATTTTGTGGAGA-CAGGGTTT。(3)测序。采用 Sanger 测序法,送上海生工(Sangon)生物有限公司进行单向测序,测序仪型号 ABI 3730,测序引物 rs312691:TCTTGTGTTGTTGTTCTTGACC,rs623011:ACA-TTT-CAGTCAACCACAAACC。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0(SPSS, Inc., Chicago, Illinois)进行统计学分析。利用卡方分析(Pearson Chi-Square test)对可疑位点的等位基因和基因型进行分析,判断 *KCNJ2* 基因相关的 rs312691 和 rs623011 是否为 TPP 致病位点;采用比值比(odds ratio, OR)分析及 95% 置信区间表示可疑基因型的相对危险性。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 rs312691 的测序情况

rs312691 是香港研究者在 2012 年由全基因组关联分析分析法得出的,虽然没有位于编码区,但可能潜在调控其相邻基因 *KCNJ2*,该位点原始等位基因为 T,最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)C=0.283 1,该位点存在 3 种基因型即 TT,TC,CC,其测序峰图见图 1。

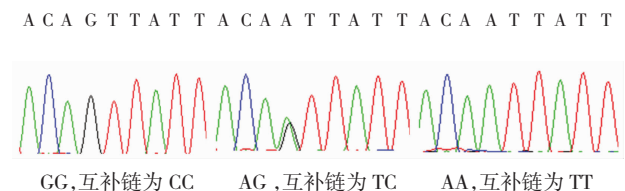


图 1 rs312691 测序基因型

Fig.1 genotype of rs312691

3组各基因型的分布如表1。TPP组超过半数均为CC基因型,而该基因型在GD组则最少,仅为15.7%。3组之间各基因型分布呈现统计学差异($\chi^2=37.530, P<0.001$)。进一步分析发现等位基因C在TPP组的基因频率为0.674,而在GD组和NC组仅为0.406和0.463,差异有统计学意义($\chi^2=171.219, P<0.001$)。就表2而言,相对于CT基因型和TT基因型,CC基因型的甲亢男性和正常男性发生TPP的风险分别为5.390倍和2.481倍。

表1 rs312691 各基因型在3组中的分布

Tab.1 Genotype distribution of rs312691 in 3 groups

基因型	TPP组(n=112)	GD组(n=127)	NC组(n=94)
CC	56(50.0%)	20(15.7%)	27(28.7%)
TC	39(34.8%)	63(49.6%)	33(35.1%)
TT	17(15.2%)	44(34.7%)	34(36.2%)

表2 rs312691 基因频率以及CC基因型相关风险

Tab.2 Allele frequency and CC genotype odds ratio of rs312691

基因型	TPP组	GD组	NC组
致病基因C频率	0.674	0.406	0.463
等位基因T频率	0.326	0.594	0.537
TPP组相对各组的比值比	-	5.350	2.481
95%置信区间	-	2.924~9.790	1.389~4.434

注: -, 不做比较

2.2 rs623011 的测序情况

rs623011是泰国研究者在2012年由GWAS分析法得出的,虽然也没有位于编码区,但可能潜在调控其相邻基因KCNJ2,该位点位于KCNJ2基因下游75 kb处,原始等位基因为G,最小等位基因频率MAF A=0.300 1,该位点存在3种基因型即AA,AG,GG,其测序峰图见图2。

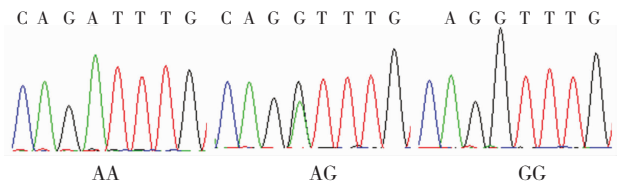


图2 rs623011 测序基因型

Fig.2 Genotype of rs623011

3组各基因型的分布如表3。TPP组接近半数均为AA基因型,而该基因型仍在GD组则最少,仅为15.0%。3组之间各基因型分布呈现统计学差异($\chi^2=40.452, P<0.001$)。进一步分析发现等位基因A在TPP组的基因频率也为0.674,而在GD组和NC组仅为0.386和0.431,差异有统计学意义($\chi^2=181.109, P<0.001$)。就表4而言,相对于AG基因型和GG基因型,AA基因型的甲亢男性和正常男性发生TPP的风险分别为5.292倍和3.236倍。

表3 rs623011 各基因型在3组中的分布

Tab.3 Genotype distribution of rs623011 in 3 groups

基因型	TPP组(n=112)	GD组(n=127)	NC组(n=94)
AA	54(48.2%)	19(15.0%)	21(22.3%)
AG	43(38.4%)	60(47.2%)	39(41.5%)
GG	15(13.4%)	48(37.8%)	34(36.2%)

表4 rs623011 基因频率以及AA基因型相关风险

Tab.4 Allele frequency and CC genotype odds ratio of rs623011

基因型	TPP组	GD组	NC组
致病基因A频率	0.674	0.386	0.431
等位基因G频率	0.326	0.614	0.569
TPP组相对各组的比值比	-	5.292	3.236
95%置信区间	-	2.868~9.764	1.757~5.960

注: -, 不做比较

3 讨论

rs312691位于KCNJ2基因下游150 kb处,位于非编码区。该位点存在2个等位基因,C和T,其中T为其原始基因。2年前,香港研究者^[9]通过GWAS的方法,对比70名TPP合并GD患者和800名正常香港人的SNP数据,最后发现rs312691具有P值最小的最小等位基因频率。然后,他们又在台湾的54名中国人TPP和400名正常人中进行了验证^[7],所得结果仍然支持其作为TPP的可疑致病基因。关于rs623011,也是靠近KCNJ2基因的SNP,由泰国研究者^[6]通过同样的方式(GWAS)获得。不同的是,泰国方面在做全基因组相关性研究时,对照采取的是GD患者,但芯片覆盖率和测量准确率却不及香港研究者的那份。随后泰国地区又就rs623011在小样本(28名TPP患者和48名GD患者)中做了验证。虽然也发现rs623011与TPP的关联密切,但由于验证人群样本太小,且人种遗传背景较为复杂,于是,台湾研究者^[8]在此基础之上扩大了样本,在90名TPP患者,61名SPP患者以及正常人中进行了验证,发现该位点的AA基因型使得人群中患TPP的风险增长了2.426倍,支持rs623011作为TPP致病基因。

虽然这2个位点都经历了大样本人群验证,但每个研究都存在显著的缺陷。香港人的研究芯片覆盖率较广,分析方法较为缜密,最初并不只发现了rs312691这一个位点,而是通过分析彼此间的裙带

联系以及连锁不平衡现象逐一排除才得到的 rs312691 这个位点,但遗憾的是,他们采取的对照是正常人群,这样一来即使分析出了可疑位点,也不能说明就是 TPP 的致病基因,也可能是甲亢的致病基因,同时由于 rs312691 这一位点离 KCNJ2 基因的编码区较远,位于下游的 150 kb 处,同时也是另一基因 KCNJ16 的下游 195 kb 处,其对 KCNJ2 基因的调控作用可能便不及 rs623011;泰国人的研究虽然将对照组设为了 GD 患者,但其 TPP 组患者的人种背景较为复杂,且验证的样本过小,其后的表达数量性状位点分析也没发现 rs623011 与 KCNJ2 基因 mRNA 表达调控的直接关系。虽然台湾研究者在后续研究中弥补了这一缺陷,但台湾研究者的 TPP 组病因背景仍不统一,在实验过程中又将对照组换成了正常人群,并且发现,该位点 AA 基因型造成散发性低钾周瘫(sporadic periodic paralysis,SPP)的风险更高,是正常人群的 4.488 倍。由此,才重新考虑要继续验证这 2 个位点:一来是为中国大陆人群的相关遗传学分析提供有力数据;二来则是为了判断,在纠正了前人实验缺陷的基础上,这 2 个位点是否仍然能成为 TPP 的可疑致病位点。

在试验中,采取的 3 组人群同时对比,既包含了 GD 组,也包含了正常人群,且标本来源均为四川地区男性,保证了其宏观遗传背景的相似性。再者,本实验中纳入的 TPP 患者,其甲状腺毒症病因皆为 Graves'病,并且在纳入之初还分析了患者的 TPOAb, TgAb 以及颈部 B 超的情况,这样一来对可能造成后期分析偏倚的桥本式甲状腺炎等疾病的混入从病因学层面进行了严格控制。112 例 TPP 患者是目前在该类研究中标本量最大的,避免了由标本量过小造成的系统偏倚。之所以要同时分析两个位点,是因为想明确谁才是与 TPP 发病关联更紧密的,以此作为 TPP 可疑致病位点的可能性更大。经过严密的筛选和测序后,发现 rs312691 和 rs623011 各自致病的等位基因频率相同,基因型 CC 和 AA 所占的比例也相似,各自相对 GD 组和正常人群的风险比值在统计学上并无差异。

4 结 论

本试验通过大样本验证,首次在中国大陆地区筛查人群中 rs312691 和 rs623011 的分布情况,并严格做到大遗传背景、病因双一致的实验条件,得出这 2 个位点均同等效力地与 TPP 相关。虽然这 2 个位点均位于非编码区,但和 KCNJ2 基因内的 SNP 位点存在显著的连锁不平衡关系,不排除两位点均参与 KCNJ2 基因表达的调控,尤其在甲状腺毒症的状态下。因此,rs312691 和 rs623011 均为 TPP 的可疑致病位点,其上游的 KCNJ2 基因或许是 TPP 的致病基因。

参 考 文 献

- [1] Chan A, Shinde R, Chow CC, et al. In vivo and in vitro sodium pump activity in subjects with thyrotoxic periodic paralysis[J]. BMJ, 1991, 303 (6810): 1096-1099.
- [2] Puwanant A, Ruff RL. INa and IKir are reduced in Type 1 hypokalemic and thyrotoxic periodic paralysis[J]. Muscle Nerve, 2010, 42 (3): 315-327.
- [3] Kristensen M, Juel C. Potassium-transporting proteins in skeletal muscle: cellular location and fibre-type differences[J]. Acta Physiol (Oxf), 2010, 198(2): 105-123.
- [4] Ryan DP, Da SM, Soong TW, et al. Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis[J]. Cell, 2010, 140(1): 88-98.
- [5] Cheung CL, Lau KS, Ho AY, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thyrotoxic periodic paralysis at 17q24.3[J]. Nat Genet, 2012, 44(9): 1026-1029.
- [6] Jongjaroenprasert W, Phusantisampan T, Mahasirimongkol S, et al. A genome-wide association study identifies novel susceptibility genetic variation for thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis[J]. J Hum Genet, 2012, 57(5): 301-304.
- [7] Wang X, Chow CC, Yao X, et al. The predisposition to thyrotoxic periodic paralysis (TPP) is due to a genetic variant in the inward-rectifying potassium channel, KCNJ2[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2014, 80(5): 770-771.
- [8] Chu PY, Cheng CJ, Tseng MH, et al. Genetic variant rs623011 (17q24.3) associates with non-familial thyrotoxic and sporadic hypokalemic paralysis[J]. Clin Chim Acta, 2012(414): 105-108.

(责任编辑:关蕴良)