

MAPK/ERK 通路基因遗传变异和膝关节骨性关节炎遗传易感性的关联研究

王珂杰,许晨阳,张益舸,陈海峰,丁文鹤,戴小宇*

常州市第一人民医院骨科,江苏 常州 213003

[摘要] 目的:探讨丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶(MAPK/ERK)通路基因遗传变异与中国汉族人群膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)发病风险的相关性。方法:采用病例对照研究设计,纳入278例膝关节骨性关节炎和年龄、性别匹配的289例健康对照,应用RegulomeDB数据库筛选MAPK/ERK通路4个基因(MEK1/2和ERK1/2)的潜在功能位点,使用SequenomMassARRAY平台对得到的5个位点进行基因分型。随后使用单因素和多因素Logistic回归模型分析遗传变异与骨性关节炎之间的关联及其强度。结果:单因素分析结果显示,丝裂原活化蛋白激酶2(mitogen-activated protein kinase kinase 2, MEK2)基因的多态性位点rs350911与KOA发病风险在隐性模型(TT vs. TC+CC)中具有统计学关联(OR=2.62, 95% CI: 1.70~4.02, $P < 0.01$)。基于多因素模型调整年龄、性别、体重指数(body mass index, BMI)等因素后,rs350911仍与KOA发病风险相关联(OR=2.72, 95% CI: 1.75~4.22, $P < 0.01$)。分层分析显示MEK2的rs350911等位基因效应在男性, BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$, 低K-L分级(1-2级)组中显著关联($P < 0.05$),且在性别分层时异质性检验有统计学意义($P=0.01$),提示该位点对KOA的作用存在性别差异,与性别存在基因环境交互作用。结论:MEK2 rs350911与中国汉族人群膝关节骨性关节炎发病风险增加有关,有望为膝关节骨性关节炎的诊断和治疗提供新靶点。

[关键词] 膝关节骨性关节炎;丝裂原活化蛋白激酶;细胞外信号调节蛋白激酶;遗传变异;多态性

[中图分类号] R584.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)06-781-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180612

Putative functional variants of MAPK/ERK identified by RegulomeDB were associated with knee osteoarthritis susceptibility

Wang Kejie, Xu Chenyang, Zhang Yige, Chen Haifeng, Ding Wenge, Dai Xiaoyu*

Department of Orthopaedics, Changzhou No.1 People's Hospital, Changzhou 213003, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship of genetic variations in MAPK/ERK pathway with knee osteoarthritis risk. **Methods:** A case-control study was conducted including 278 patients with knee osteoarthritis and 289 age and sex matched healthy controls. A total of 5 potentially functional variations in MAPK/ERK pathway (MEK1, MEK2, ERK1 and ERK2) selected by RegulomeDB were genotyped by using SequenomMassARRAY. Univariate and multivariate logistic regression models were used to evaluate the association and its strength. **Results:** In univariate analysis, rs350911 of MEK2 was significantly associated with knee osteoarthritis in recessive model(TT vs. TC+CC)(OR=2.62, 95% CI: 1.70~4.02, $P < 0.01$). After adjustment for age, gender and BMI, the associations remain significant(OR=2.72, 95% CI: 1.75~4.22, $P < 0.01$). The stratification analyses revealed that the effect of rs350911 on knee osteoarthritis was significant in male, lower BMI($< 25 \text{ kg/m}^2$), and lower Kellgren-Lawrence grade(1-2)(all $P < 0.05$). P value for heterogeneity test was 0.01 in different gender group. **Conclusion:** The results indicate that potential functional genetic variation in MAPK/ERK plays an important role in the pathogenesis of knee osteoarthritis.

[Key words] knee osteoarthritis; MAPK/ERK; genetic variation; polymorphism

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06): 781-785]

[基金项目] 国家自然科学基金(81272017);常州市卫计委指导性课题(wz201514)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 403647115@qq.com

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是当今世界上最常见的骨关节疾病之一,其病理特点为关节软骨退变,软骨下骨硬化,滑膜增生及骨赘形成^[1]。膝关节骨性关节炎的临床症状表现为严重的膝关节疼痛以及活动受限,从而大大降低患者的生活质量^[2]。目前膝关节骨性关节炎的发病率仍然在逐年增加,60岁以上男性中有约10%的人发病,而60岁以上女性的发病率则高达18%^[3]。尽管有大量关于膝关节骨性关节炎的研究,其确切的病因及病理至今仍未完全明了,双生子研究提示遗传因素在骨性关节炎的发病中起重要作用^[4]。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞增殖、生长、凋亡及细胞间功能同步化过程中发挥着关键性作用。研究表明,MAPKs信号转导通路在细胞内具有生物进化的高度保守性,在低等原核细胞和高等哺乳类细胞内,目前均已发现存在着多条并行的MAPKs信号通路,通过其相互调控而介导不同的细胞生物学反应。细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)为脯氨酸导向的丝/苏氨酸激酶,可以磷酸化与脯氨酸相邻的丝/苏氨酸。在丝裂原刺激后,ERK接受上游的级联反应信号,转位进入细胞核,从而参与细胞增殖与分化的调控。哺乳类动物细胞中,与ERK相关的细胞内信号转导途径被认为是经典MAPK信号转导途径^[5]。

白细胞介素1作为重要的细胞因子参与了膝关节骨性关节炎软骨细胞退变的病理过程。白细胞介素1 β (interleukin, IL-1 β)通过MAPK/ERK通路增加软骨细胞中基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinase, MMP)的表达,进而减少II型胶原纤维和聚集蛋白聚糖的表达^[6]。还有研究发现抑制MAPK/ERK通路能够延缓膝关节骨性关节炎的病变进展^[7]。综上所述,MAPK/ERK通路影响了膝关节骨性关节炎患者软骨细胞的代谢调节,进而参与了膝关节骨性关节炎发生发展。丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)是ERK通路的关键蛋白,存在MEK1和MEK2两种亚型,表示为MEK1/2。MEK1和MEK2在激酶功能域中有80%氨基酸组成相似,共同维持下游ERK1/2的活化、调控细胞周期。然而,目前尚没有关于MAPK/ERK基因遗传变异对膝关节骨关节遗传易感性的研究报道。本研究拟采用较大样本的病例对照研究方法,对MAPK/ERK通路的MEK1/2和ERK1/2基因的潜在功能遗传变异位点

进行基因分型,探讨其与骨性关节炎的关联。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究经过苏州大学伦理委员会批准,285例KOA病例来自于2013年6月—2016年8月在常州市第一人民医院门诊诊断的膝关节骨性关节炎患者,诊断标准为美国风湿协会的膝关节骨关节炎诊断标准。所有患者均拍摄站立位负重膝关节正侧位X线片。2位医生独立对患者的膝关节X线评估并进行Kellgren-Lawrence(KL)分级。有类风湿性关节炎、感染性关节炎、创伤性关节炎及其他免疫系统疾病的患者均排除在外。选择同期在本院体检中心进行体检的人群为对照,以性别和年龄进行匹配选择295例对照,对照否认有任何骨关节炎或者类风湿性关节炎病史。所有研究对象均为无亲缘关系的中国汉族人群,经签署知情同意后,使用统一设计的健康问卷表进行流行病学调查,调查后使用真空抗凝(EDTA)采血管采集研究对象静脉血5 mL,并测量体重和身高用以计算体重指数(BMI)。

1.2 方法

1.2.1 SNP位点筛选纳入标准

RegulomeDB数据库(<http://www.regulomedb.org/>)纳入MEK1/2和ERK1/2共4个基因区域内所有单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点。纳入标准为评分1的多态性位点,即有实验数据结果支持所选SNP具有表达数量性状基因座(expression quantitative trait loci, eQTL)调节基因的功能;基于1 000 Genomes Phase III的中国汉族人群数据挑选中国人群最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) ≥ 0.05 ,排除中国人群高连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)的遗传变异($r^2 > 0.8$)(<http://grch37.ensembl.org/index.html>)。优先纳入评分高的位点,共6个位点满足上述要求。

1.2.2 基因分型和质量控制

采用传统酚氯仿抽提法获得外周血DNA,应用SequenomMassARRAY平台进行基因分型检测,其中1个位点由于引物设计失败而排除,最终5个SNP位点完成检测。每个96孔平板设置1个空白对照。对实验数据进行质量控制,剔除基因分型成功率在90%以下的样本,最终纳入278病例和289对照的5个SNP数据进行后续分析。

1.3 统计学方法

以 χ^2 检验(定性资料)和 t 检验(连续型变量)比

较人口学特征及各基因型在组间的频率分布差异;单因素和多因素 Logistic 回归计算 OR 值及其 95% CI,调整变量为性别(二分类变量)、年龄(连续性变量)和 BMI(连续性变量)。拟合优度 χ^2 比较对照组中观察到的基因型频率与期望频率,从而检验哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE);应用基于 χ^2 的 Q 检验评估亚组间的异质性。统计学检验均为双侧概率检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。数据分析使用 SPSS 17.0 或 PLINK 软件(<http://www.cog-genomics.org/plink2/>)。

2 结果

2.1 研究对象一般特征

一般资料比较见表 1。病例组和对照组的年龄及性别分布没有差异。

表 1 膝关节骨性关节炎病例组和对照组的一般基础情况
Table 1 Distributions of select variables in OA cases and controls

指标	骨关节炎组 (n=278)	对照组 (n=289)	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	62.00 \pm 10.55	61.13 \pm 10.92	0.34
性别[n(%)]			0.87
男	82(29.5)	87(30.1)	
女	196(70.5)	202(69.9)	
BMI(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	24.97 \pm 3.26	23.84 \pm 2.96	<0.01
< 25	150(54.0)	189(66.5)	<0.01
≥ 25	128(46.0)	95(33.5)	
KL 分级(n)			
1~2	133		
3~4	141		

2.2 MAPK/ERK 遗传变异与 KOA 的关联分析

6 个 SNP 中,除 rs16949879 由于引物设计失败而未能纳入研究外,其余 5 个 SNP 均成功分型(表 2),所有位点均符合哈迪-温伯格平衡。MEK2 基因的多态性位点 rs350911 与 KOA 发病风险在隐性模型(TT vs. TC+ CC)中具有统计学关联性(OR=2.62, 95% CI: 1.70~4.02, $P < 0.01$)。基于多因素 Logistic 模型调整年龄、性别和 BMI 等因素后,rs350911 仍与 KOA 发病风险相关联(OR=2.72, 95% CI: 1.75~4.22, $P < 0.01$)。

进一步对 rs350911 与 KOA 的关联进行分层分析(表 3),结果显示,rs350911 等位基因效应在男性, BMI<25 kg/m², K-L 分级为 1~2 级组(以所有对照人群为对照)中显著($P < 0.05$, 表 3),且在性别分层

时异质性检验有统计学意义($P=0.01$),提示该位点对 KOA 的影响作用存在性别差异,即与性别存在基因环境交互作用。

3 讨论

本研究采用病例对照研究,经 RegulomeDB 筛选 MAPK/ERK 通路基因的候选 SNPs 位点,来评估其与中国汉族人群 KOA 发病风险。研究发现 MEK2 的 rs350911 与 KOA 发病风险存在关联,进一步的分层分析显示 rs350911 对 KOA 的影响在男性中效果更明显,具有基因-环境交互作用。

研究认为 IL-1 β 可通过 MAPK/ERK 通路,使得关节软骨细胞分解代谢加强,合成代谢减弱,打破软骨细胞的合成分解代谢平衡,最终加剧了软骨细胞退变和损伤^[8]。除此之外,研究显示磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1)和细胞液泡分选蛋白 4B(vacuolar protein sorting 4B, VPS4B)可通过 MAPK 通路转导信号介导软骨细胞凋亡,促进 KOA 的病程进展^[9-10]。而天然环烯醚萜(oleuropein)、迷迭香酸(rosmarinic acid)和 KOA 常用治疗药物鳄梨大豆皂化物(avocado soybean unsaponifiables, ASU)则可以通过抑制 MAPK 通路来阻断软骨细胞的凋亡,进而缓解 KOA 的病理进展,缓解患者症状^[11-12]。由此可以证明, MAPK/ERK 为促进软骨细胞凋亡和加剧软骨损伤的重要细胞信号转导通路,对 KOA 的发生起到关键作用。

rs350911 位于 19 号染色体 MEK2 基因的内含子区域,已有研究证实该位点可以 Cis-eQTLs 调节 MEK2 本体基因和激活状态信号转导和转录激活子 4 蛋白抑制剂(protein inhibitor of activated STAT 4, PIAS4)基因(<https://molgenis58.target.rug.nl/blood-eqtlbrowser/>)。MEK2 作为丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路中的重要激酶分子,参与调控多种细胞生理学功能,包括细胞增殖、分化,细胞分裂,应激和凋亡。MEK 抑制剂可以激活 IL-1 β 的功能^[13],关节软骨细胞中加入 IL-1 β 能增加软骨细胞 MMP3 和 MMP13 的表达,同时降低 II 型胶原和蛋白聚糖的表达,而 MMP13 自身也能降解 II 型胶原纤维, MMP3 则能降解纤维蛋白和层黏连蛋白等其他软骨细胞外基质必需蛋白,最终导致软骨细胞外基质的降解^[14]。PIAS4 是信号转导和转录激活子 4(signal transducer and activator of transcription 4, STAT4)激活的蛋白抑制剂, STAT4 通过 JAK-STAT 途径参与免疫细胞的信号转导,外周血 T 淋巴细胞中 STAT4 分子易于

表2 MAPK/ERK 遗传变异与膝关节骨关节炎发病风险的关联

Table 2 Logistic regression analysis of associations between selected polymorphisms of MAPK/ERK and KOA risk

位点	基因型	n	对照	P值 ^a	OR(95%CI)	P值	OR(95%CI) ^b	P值 ^b
ERK2 rs9607272	TT	222	226	0.95	1		1	
	GT	55	59		0.95(0.63~1.43)	0.80	0.91(0.60~1.39)	0.68
	GG	1	4		0.25(0.03~2.30)	0.22	0.29(0.03~2.63)	0.27
	GT+GG vs. TT				0.90(0.60~1.36)	0.63	0.88(0.58~1.33)	0.53
	GG vs. TT+GT				0.26(0.03~2.32)	0.23	0.29(0.03~2.66)	0.27
	相加模型				0.87(0.59~1.27)	0.46	0.85(0.57~1.25)	0.40
MEK1 rs1347069	CC	211	226	0.20	1		1	
	CT	61	54		1.21(0.80~1.83)	0.36	1.12(0.74~1.71)	0.59
	TT	6	6		1.07(0.34~3.37)	0.91	1.23(0.38~3.95)	0.73
	TT+CT vs. CC				1.20(0.81~1.78)	0.38	1.13(0.76~1.70)	0.55
	TT vs. CT+CC				1.03(0.33~3.23)	0.96	1.20(0.37~3.85)	0.76
	相加模型				1.15(0.81~1.63)	0.43	1.12(0.79~1.59)	0.54
MEK1 rs7166547	CC	100	94	0.37	1		1	
	CT	132	148		0.84(0.58~1.21)	0.35	0.85(0.58~1.23)	0.39
	TT	45	47		0.90(0.55~1.48)	0.68	0.82(0.49~1.36)	0.44
	TT+CT vs. CC				0.85(0.60~1.21)	0.37	0.84(0.59~1.20)	0.34
	TT vs. CT+CC				1.00(0.64~1.56)	0.99	0.90(0.57~1.43)	0.66
	相加模型				0.93(0.73~1.18)	0.53	0.89(0.70~1.14)	0.37
MEK1 rs4255740	CC	128	143	0.67	1		1	
	TC	126	122		1.15(0.82~1.63)	0.42	1.14(0.80~1.62)	0.47
	TT	24	23		1.17(0.63~2.17)	0.63	1.14(0.61~2.13)	0.69
	TT+TC vs. CC				1.16(0.83~1.61)	0.39	1.14(0.81~1.60)	0.45
	TT vs. TC+CC				1.09(0.60~1.98)	0.78	1.07(0.58~1.96)	0.83
	相加模型				1.11(0.86~1.44)	0.43	1.10(0.84~1.43)	0.50
MEK2 rs350911	CC	138	133	0.10	1		1	
	TC	59	115		0.49(0.33~0.73)	<0.01	0.47(0.32~0.71)	<0.01
	TT	81	38		2.05(1.31~3.23)	<0.01	2.01(1.26~3.20)	<0.01
	TT+TC vs. CC				0.88(0.63~1.23)	0.46	0.87(0.62~1.22)	0.40
	TT vs. TC+CC				2.62(1.70~4.02)	<0.01	2.72(1.75~4.22)	<0.01
	相加模型				1.23(1.00~1.52)	0.06	1.23(0.99~1.53)	0.06

a: 对照组HWE的P值; b: 调整后P值, 调整变量为性别(二分类变量)、年龄(连续性变量)和BMI(连续性变量)。

在 IL1/2 作用下活化, 可进一步引起下游分子的转录和表达, 调节 T 细胞分化状态, 参与 KOA 自身免疫病理发生的进程。

综上所述, 本研究首次发现 MEK2 的 SNP 位点 rs350911 显著增加中国汉族人群 KOA 的发病风险。后续有必要在不同人群中开展大样本研究进行验证, 并通过功能学研究进一步阐明上述遗传变异参与 KOA 发生的分子机制。

[参考文献]

[1] Liu Q, Hu X, Zhang X, et al. The TMSB4 pseudogene lncRNA functions as a competing endogenous RNA to promote cartilage degradation in human osteoarthritis [J].

Mol Ther, 2016, 24(10):1726-1733
 [2] Bellavia D, Veronesi F, Carina V, et al. Gene therapy for chondral and osteochondral regeneration: is the future now?[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(4):649-667
 [3] Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2015, 386(9991):376-387
 [4] Loughlin J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2001, 13(2):111-116
 [5] Lake D, Correa SA, Muller J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(23):4397-4413
 [6] Zhao L, Chang Q, Huang T, et al. Paeoniflorin inhibits IL1betainduced expression of inflammatory mediators in

表3 rs350911和膝关节骨性关节炎关联分层分析

Table 3 Stratified analyses of rs350911 genotypes associated with patients of kOA by selected variables

	TT/(TC+CC)		OR(95%CI) ^a	P ^a	P ^b
	病例	对照			
年龄(岁)					0.32
< 60	26/86	17/122	1.98(0.99~3.94)	0.05	
≥ 60	55/111	21/126	3.14(1.75~5.66)	<0.01	
性别					0.01
男	23/59	2/85	14.47(3.26~64.17)	<0.01	
女	58/138	36/163	1.97(1.21~3.21)	0.01	
BMI(kg/m ²)					0.53
BMI<25	50/100	27/161	3.11(1.81~5.35)	<0.01	
BMI≥25	31/970	11/82	2.31(1.09~4.91)	0.03	
KL分级 ^c					0.26
KL1~2级	43/90	38/248	3.46(2.06~5.81)	<0.01	
KL3~4级	38/103		2.25(1.31~3.86)	<0.01	

a:调整了年龄、性别和BMI后的P值;b:分层分析的异质性检验P值;c:以总对照人群为对照组。

- human osteoarthritic chondrocyte [J]. Mol Med Rep, 2018,17(2):3306-3311
- [7] Thiel MJ, Schaefer CJ, Lesch ME, et al. Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(10):3347-3357
- [8] Mononen ME, Tanska P, Isaksson H, et al. New algorithm for simulation of proteoglycan loss and collagen degeneration in the knee joint: Data from the osteoarthritis initiative [J]. J Orthop Res, 2017, doi: 10.1002/jor. 23811. [Epub ahead of print]
- [9] Ge Q, Wang H, Xu X, et al. PDK1 promotes apoptosis of chondrocytes via modulating MAPK pathway in osteoarthritis[J]. Tissue Cell, 2017, 49(6):719-725
- [10] Xu L, Zhai L, Ge Q, et al. Vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) regulates apoptosis of chondrocytes via p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in osteoarthritis [J]. Inflammation, 2017, 40(6):1924-1932
- [11] Feng Z, Li X, Lin J, et al. Oleuropein inhibits the IL-1beta-induced expression of inflammatory mediators by suppressing the activation of NF-kappaB and MAPKs in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Food Funct, 2017, 8(10):3737-3744
- [12] Chen WP, Jin GJ, Xiong Y, et al. Rosmarinic acid down-regulates NO and PGE2 expression via MAPK pathway in rat chondrocytes [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(1):346-353
- [13] Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, et al. An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition [J]. J Exp Med, 2017, 214(6):1691-1710
- [14] Ma CH, Wu CH, Jou IM, et al. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes [J]. Redox Biol, 2018, 14(1):72-81

[收稿日期] 2018-01-27

欢迎投稿 欢迎订閱