

· 论 著 ·

## I 型胶原蛋白多态性与脊柱融合的相关性分析

程中衡, 杨 芳, 柳青梅, 栾纯萍

(山东省日照市中医院骨二科 276800)

**摘要:**目的 研究 I 型胶原蛋白(COLIA1)基因的多态性与脊柱融合患者术后融合效果的相关性。方法 抽取需行脊柱融合患者外周静脉血 3 mL, 提取白细胞 DNA 并扩增目的基因所在的 DNA 片段; 用 PCR-RFLP 检测外周血白细胞基因组 COLIA1 基因 Pcol2 位点多态性, 扩增产物经限制性内切酶 Eco31 I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳观察; 对照术前及术后 3、6、12 个月的 X 线片, 观察植骨融合情况。结果 两组实验对象均存在 COLIA1 基因 Pcol2 位点 -1997G/T 多态性, GG 型 166 例, GT 型 232 例, TT 型 25 例。并发现 GG 基因型与颈椎融合有相关性( $P=0.004$ ), 而与腰椎后路横突间植骨融合无相关性( $P=0.831$ )。结论 COLIA1 Pcol2 位点 -1997G/T 单核苷酸多态性 GG 基因型可能是促进颈椎前路自体髂骨植骨融合的重要遗传基因。

**关键词:** 脊柱融合; I 型胶原蛋白基因; 多态性; PCR-RFLP

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.008

中图分类号: R681.502

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)24-3322-03

## Relationship between the polymorphism of the collagen I alpha 1 gene and the vertebral fusion rate

CHENG Zhong-heng, YANG Fang, LIU Qing-mei, et al.

(Department of orthopedics, Chinese medical hospital of Rizhao, Shandong 253024, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the polymorphism of the colial and explore their relationship with the spinal fusion rate of the postoperative in Shandong Peninsula Area. **Methods** 3 mL peripheral blood was drawn-off and genomic DNA was extracted from white blood cells; The specific fragment which includes the target gene was amplified by Polymerase chain reaction(PCR); the genotypes of Pcol2 site in COLIA1 were detected by Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)method. The PCR product was digested with restriction endonuclease Eco31 I and the result was observed by agarose gel electrophoresis. The G gene represents for the presence of the restriction endonuclease site, while the T gene for the absence of the restriction endonuclease site; To analyse the spinal fusion rate of the operational segment by comparing the x-ray film of preoperation and postoperation of 3, 6, 12 monthes. **Results** There were the -1997G/T polymorphisms of the COLIA1 gene in the 423 subjects, the amount of the genotype GG is 166, GT 232 and TT 25. there is some correlation between the GG genotype and the C-spine auto-iliun graft fusion ( $P=0.004$ ), but the GG genotype has no correlation with the bone graft fusions inter transverse process of lumbar vertebra ( $P=0.831$ ). **Conclusion** The GG genotype in the -1997G/T polymorphsim of the COLIA1 gene may be the essential factor which can promote the C-spine auto-iliun graft fusion.

**Key words:** spinal fusion; COLIA1 gene; polymorphism; PCR-RFLP

I 型胶原蛋白(collagen type I alphas colial, COLIA1)是细胞外基质(尤其是骨组织)的最主要组成成分, 该蛋白由 COLIA1 和 COLIA2 两种基因控制, 并编码产生两条  $\alpha 1$  和一条  $\alpha 2$  肽链, 由三条肽链组合形成三螺旋结构。当基因突变会导致两者比例失衡, 影响软骨及骨形成。有研究表明由 COLIA1 合成的有序排列的胶原纤维数量与其形成骨的强度呈正相关<sup>[1]</sup>。目前国内外对于 COLIA1 基因的多态性进行了大量的研究, 结果表明其与骨质疏松<sup>[2]</sup>及成骨功能障碍等关系密切, 但综合各项研究发现对该基因多态性与脊柱融合的关系鲜有报道, 本实验旨在通过对山东半岛地区的脊柱融合患者该基因多态性的研究, 探讨 COLIA1 基因多态性与脊柱融合之间的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究分两组, 实验组来源于 2005 年 1 月至 2008 年 6 月在本院行颈腰椎融合手术的部分患者, 临床随访资料较完整, 其中男性 118 例, 女性 82 例, 年龄 24~75 岁, 平均 46.2 岁。所有患者均接受 3 个月的正规保守治疗, 效果不佳而要求行手术治疗。术前均行颈腰椎正侧位 X 线片、动力位片及颈腰椎 MRI 检查, 临床症状体征及影像学资料均符合手术标准, 其中行颈椎前路椎体次全切除减压自体髂骨植骨融合钛板内固定 102 例, 腰椎后路椎板切除减压横突间植骨融合

内固定 98 例, 并于术后 3、6、12 个月进行随访, 给予颈椎或腰椎正侧位及伸屈动力位 X 线片检查以确定脊柱融合情况。对照组来自山东青岛大学附属医院健康体检中心体检者, 共取 223 名正常人外周血。均获参试者知情同意。

**1.2 判断融合与否的标准** 腰椎后路横突间植骨融合标准采用 lenke 的标准判断: (1) 确实牢固, 双侧、体积大、有小梁结构的融合骨块; (2) 可能牢固, 单侧较大的融合块, 对侧融合块较小; (3) 可能不牢固, 双侧小而薄的融合块, 伴有明显裂缝; (4) 确实不牢固, 双侧植骨被吸收或双侧融合块有明显假关节。颈椎前路融合标准: (1) 植骨块与上下椎体间有骨桥形成; (2) 植骨块组织密度增加或不变; (3) 椎间高度维持; (4) 过伸过屈动态 X 线片示椎间相对运动小于  $5^\circ$ 。反之则未融合。如难以确定则根据 lee 等的标准, 融合节段在伸屈动力位上出现大于 4 mm 位移及大于  $10^\circ$  成角者作为不融合的标准。分别将于术后 3、6、12 个月内达到脊柱融合标准者定义为快、中、慢组。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本采集** 抽取 10 mL 外周静脉血并置于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱冻存。

**1.3.2 DNA 提取** 用 DNA 提取试剂盒(W6531)按步骤分别提取实验组和对照组 DNA, 提取后置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱冻存。

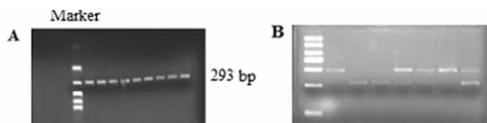
**1.3.3 目的基因片段扩增** 引物由上海生工生物合成公司合成,上游引物 5'-CAC CCT GCC CTA GAC CAC-3',下游引物 5'-GAA AAT ATA GAG TTT CCA GAG-3'。反应体系在 PE9700 thermocyclers (Gene Amp PCR9700, Applied Biosystems) 上进行,总反应体系体积为 25  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,基因组 DNA 2  $\mu$ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L,灭菌双蒸水 16.2  $\mu$ L。PCR 反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,72  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min,经 30 个循环,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶并 1 $\times$ TBE 电泳液,电压 120 v,电泳时间 30 min。然后经溴化乙锭核酸染料染色,在紫外凝胶成像系统下拍摄电泳图片,片段长度为 293 bp。

**1.3.4 扩增片段酶切** PCR 产物经限制性核酸内切酶 Eco31 I (MBIFermentas,Lithuania) 于 37  $^{\circ}$ C 水浴箱中酶切 12 h,经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳并行溴化乙锭核酸染料染色,在紫外凝胶成像系统下,因该基因-1997G/T 单点突变,可见电泳图片中有 3 种基因型条带:GG/GT/TT。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,实验数据均采用  $\chi^2$  检验及 Hardy-Weinberg 平衡差异的检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 基因扩增与酶切** 用 DNA 提取试剂盒 (W6531) 按步骤分别提取两组的 DNA,扩增后见明显目的片段,长度为 293 bp (图 1A)。对目的片段酶切,因该基因-1997G/T 单点突变,可见电泳图片中有 3 种基因型条带:GG/GT/TT(图 1B)。



A:PCR 特异性扩增片段;B:特异性酶切电泳图。

**图 1 基因扩增与酶切**

**2.2 COLIA1 基因-1997G/T 多态性分布频率** 见表 1。本实验组与对照组均符合 Hardy-Weinberg 定律,-1997G/T 多态性分布无统计学意义( $P = 0.745$ )。

**表 1 实验组与对照组基因型分布**

组别	基因型(n)			P
	GG	GT	TT	
实验组	80	110	10	0.745
对照组	86	122	15	

**2.3 实验组中-1997G/T 多态性与脊柱融合的关系** 见表 2、3。结果发现-1997G/T 多态性与颈椎前路自体髂骨椎间植骨融合之间有相关性( $P = 0.004$ ),但与腰椎后路横突间植骨融合之间无相关性( $P = 0.831$ )。

**表 2 实验组 3 种基因型在颈椎前路自体髂骨椎间植骨融合中的分布**

组别	基因型(n)			P
	GG	GT	TT	
快组	18	12	6	0.004
中组	10	23	8	
慢组	5	8	12	

**表 3 实验组 3 种基因型在腰椎后路横突间植骨融合中的分布**

组别	基因型(n)			P
	GG	GT	TT	
快组	12	14	7	0.831
中组	18	14	8	
慢组	12	7	6	
总计	42	35	21	

**3 讨 论**

脊柱融合术是治疗脊柱疾患最常用的手术方法之一,骨性融合重建脊柱稳定性是此类手术治疗远期疗效的保障,随着内固定材料的发展和各类手术方式的改进创新,现已完全能够实现内固定,但是无论术中采用何种内固定系统,如果术后未能达到有效的骨性融合,均可能出现内固定松动、移位甚至出现断钉短棒等临床并发症,最终会导致手术节段失稳。脊柱融合过程复杂,其中的各种机制尚未完全阐明。但可以肯定的是脊柱融合除了依靠坚强的内固定器械以外,还要依靠植骨材料及植骨部位共同参与来调控植骨融合部位以达到完全的骨性融合<sup>[3]</sup>。

有研究认为,BMP-2、GDF-5、COLIA1 等因子是调节骨生成和骨诱导的重要因子,同时参与骨融合过程,任何基因的异常均有可能影响脊柱融合的质量,其中 BMP-2 及 GDF-5 经国内研究表明其基因突变与脊柱融合存在相关性<sup>[4-5]</sup>,胶原蛋白为生物体提供机械支撑,其中 COLIA1 在骨骼的有机质中的比例超过了 80%,是骨基质中含量最高的蛋白,其主要生理功能为形成和保持骨架的完整性。I 型胶原编码区的基因突变会产生常染色体遗传病即成骨不全症。而现阶段对 COLIA1 的研究多是关于其与骨质疏松、成骨不全及骨折<sup>[6]</sup>等的关系,国外报道 COLIA1 基因内含子 1 的 G/T(sp1)单基因多态性与腰椎及股骨颈的骨密度相关<sup>[7-9]</sup>。Zhang 等<sup>[10]</sup>发现 COLIA1 sp1 TT 基因型的绝经后妇女骨折率是其他基因型的 4.8 倍。在亚洲地区(中国的大部分地区、韩国及日本)对大量人群的试验研究尚未发现该多态性位点的基因多态性<sup>[11-12]</sup>。而国内 Lind 等<sup>[13]</sup>和 Cook 等<sup>[14]</sup>2004 年报道 1 例 sp1GT 外,尚未发现该位点突变报道,由此可以推断 COLIA1 基因 sp1 位点多态性存在地区或种族差异,而在亚洲罕见或不存在。2002 年,在西班牙有 265 名绝经妇女接受研究表明,在 COLIA1 基因的启动子存在单基因(-1997G/T)多态性,且与腰椎的骨密度之间存在高度相关性,TT 基因型者较其他基因型者腰椎密度显著减少。2004 年,在我国湖南对 1 263 名受试者研究显示,-1997G/T 多态性与股骨颈密度显著相关( $P = 0.036$ ),GG 基因型受试者骨密度较 GT、TT 基因型者平均高 2.41%。现尚未有涉及 COLIA1 基因多态性与脊柱融合关系的研究,因其可调节骨生成和骨诱导,并参与骨融合过程,其基因发生异常改变可能会影响脊柱融合的质量。

本研究结果显示,COLIA1 基因-1997G/T 单核苷酸多态性与脊柱融合之间存在相关性,在实验组与对照组中都存在-1997G/T 单核苷酸多态性的 3 种基因型即 GG、GT、TT,但在两组中的分布差别无统计学意义( $P = 0.745$ ),实验组多态性分布差异与颈椎前路自体髂骨椎间植骨融合有相关性( $P = 0.004$ ),GG 基因型占快组的一半,因此 GG 可能是促进颈椎融

合的重要遗传因子。而多态性分布与腰椎后路横突间植骨融合之间无相关性( $P=0.831$ ),因为影响腰椎后路横突间植骨融合的因素较多,脊柱后外侧横突间融合具有独特的局部微环境,横突细小,去皮质后对移植物的血液供应小,特别是移植物的中央部位,需要血管再生;横突间融合是在椎体旁肌肉间的大段异位成骨,其融合的机制和所受的力学环境比较复杂,影响因素较多。

骨融合是一个涉及多因子的复杂过程,包括骨生成、骨诱导和骨传导三个环节直至成骨和破骨间达到动态平衡,随着内固定器械的进步,骨融合率得到了巨大提高,但却依然不能避免融合失败的发生,据报道,脊柱植骨融合术后,无骨融合率为 5%~30%,非优良骨融合率高达 40%,因此对影响植骨融合的影响因子的研究变得尤为重要,本实验通过对 COL1A1 基因 -1997G/T 多态性的研究发现,该基因多态性与颈椎前路自体髂骨椎间植骨融合有相关性,可能是促进脊柱融合的关键因子。由于该实验仅限于山东半岛地区,病例数量相对不足,还需要继续加大样本量研究。

目前对于进行脊柱融合的患者而言,选择自体髂骨植骨融合仍然是临床的常规治疗方法,但基因治疗在国内外研究中日渐广泛,动物试验研究表明局部基因治疗可以促进脊柱融合<sup>[1]</sup>。根据本实验研究结果,可尝试将 COL1A1 基因 GG 型种子细胞导入需行融合的脊柱节段的特定解剖部位,以期促进局部脊柱融合。由于该实验尚未成熟,需要进行大规模的临床研究,基因治疗技术有望成为促进脊柱融合的常规手段。

#### 参考文献:

- [1] Tao J, Xu YW, Zheng X, et al. Relationship between the polymorphism of collagen 1 alpha 1 gene and primary osteoporosis[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2004, 10(1):42.
- [2] Garcia-Giralt N, Nogue X, Enjuanes A, et al. 2002 Two new single nucleotide polymorphisms in the COL1A1 upstream regulatory region and their relationship with bone mineral density[J]. J Bone Miner Res, 2007, 17:384.
- [3] Hubacek JA, Weichetova M, Bohuslavova R, et al. No associations between genetic polymorphisms of TGF-beta, PAI-1, and COL1A1, and bone mineral density in Caucasian females[J]. Endocr Regul, 2006, 40:107.
- [4] 周传利,陈晓亮. 骨形态发生蛋白 2 基因表达异常与脊柱融合的相关性研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(3):45.
- [5] 袁百胜,陈晓亮. TGF-β1 基因单核苷酸多态性与脊柱融合[J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 25:612.
- [6] Nguyen TV, Esteban LM, White CP, et al. Contribution of the collagen I alpha1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(12):6575.
- [7] Braga V, Mottes M, Mirandola S, et al. Association of CTR and COL1A1 alleles with BMD values in peri- and postmenopausal women[J]. Calcif Tissue Int, 2000, 67:361.
- [8] Harris SS, Patel MS, Cole DE, et al. Associations of the collagen type I alpha 1 Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults[J]. Calcif Tissue Int, 2000, 66:268.
- [9] Macdonald HM, Mcguigan FA, New SA, et al. COL1A1 Sp1 polymorphism predicts perimenopausal and early postmenopausal spinal bone loss[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16:1634.
- [10] Zhang YY, Lei SF, Mo XY, et al. 2005 The -1997 G/T polymorphism in the COL1A1 upstream regulatory region is associated with hip bone mineral density (BMD) in Chinese nuclear families[J]. Calcif Tissue Int, 2002, 76:107.
- [11] Hall KO, Moon IG, Hwang CS, et al. Lack of an intronic Sp1 binding site polymorphism at the collagen type I alpha 1 gene in healthy Korean women[J]. Bone, 1999, 24:135.
- [12] Lambrinoudaki I, Kung AW. Absence of high-risk "s" allele associated with osteoporosis at the intronic sp1 binding-site of collagen I alpha gene in Southern Chinese[J]. J Endocrinol invest, 2001, 24:499.
- [13] Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, et al. Chemotaxis of human osterblasts effects of osteotropic growth factors[J]. APMS, 1995, 103(2):140.
- [14] Cook SD, Salkeld SL, Brinker MR, et al. Use of an osteoinductive biomaterial (rhOP-1) in heal large segmental long bone defects [J]. J Orauma, 1998, 12(6):407.

(收稿日期:2010-06-13 修回日期:2010-07-05)

(上接第 3321 页)

- in head and neck squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9):3110.
- [11] Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, et al. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis[J]. Neuro Oncol, 2005, 7(2):134.
  - [12] Sun MH, Han XC, Jia MK, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(38):

5931.

- [13] Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis[J]. Cancer Treat Res, 2004, 117:155.
- [14] Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 1997, 272(8):4959.
- [15] 叶君,孙红. 1400W 对宫颈癌 Hela 细胞株生长的抑制作用[J]. 复旦学报:医学版, 2009, 36(2):177.

(收稿日期:2010-06-28 修回日期:2010-07-11)