

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.26.040

用于人患布鲁菌病 PCR 诊断方法的研究进展*

姜海蓉¹综述,崔玉花¹,彭方毅^{2△}审校

(1. 重庆市公共卫生医疗救治中心检验科 400036; 2. 重庆市垫江县中医院 408300)

[关键词] 布鲁菌病; PCR; 诊断; 分型

[中图分类号] R516.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)26-3722-04

布鲁菌病是由胞内寄生菌布鲁杆菌感染人体后产生的一种传染-变态反应性疾病。家畜是首要宿主,并可通过生殖黏膜、呼吸、消化道黏膜、蚊虫叮咬等传播。家畜患布鲁菌病后会有不孕不育、流产、胎盘滞留、产奶量下降等临床症状。而当人摄入布鲁菌污染的鲜奶,处理患畜生鲜肉,为患畜接生,处理流产胎仔时,被感染的风险会很大。人感染布鲁菌后的临床症状主要是发热、多汗、关节疼痛、肌肉痉挛、睾丸发炎等,甚至还会导致不孕不育^[1]。人患布鲁菌病有急性期和慢性期之分。当急性患者转为慢性时会反复发作长期不愈,少数患者会导致死亡。

布鲁菌是一种革兰阴性菌,属于 α -变形菌群,从 1886 年 Bruce 发现布鲁菌至今已有约 100 多年的历史。目前,布鲁菌有 6 个经典种:牛种、羊种、猪种、犬种、绵羊附睾种、沙林鼠种,两种新发现的种:田鼠种和 *B. inopinata*,还有两种从海洋哺乳动物中分离的布鲁菌^[2]。而羊种、牛种、猪种布鲁菌是公认的使人体致病的 3 种布鲁菌,也有犬种布鲁菌感染人的案例,但这种情况较少发生。

虽然细菌分离培养是诊断布鲁菌的金标准,但这一方法要接触活菌进行研究分析,对研究人员也具有潜在的感染隐患,而且还有实验周期长,对实验人员技术及实验设备要求高等缺点,使其不能被推广使用。因此安全有效、简单快速的 PCR 检测方法用于布鲁菌病的检测更受人们期待。科学家们也已经报道了至少 400 多篇关于将 PCR 方法用于检测布鲁菌的文章^[3]。而利用血液、组织标本、体液等各种临床样品进行 PCR 检测的技术方法也已经在世界上各实验室中开展研究,并取得了一定的成果。应用 PCR 方法检测各组织标本中的布鲁菌前,第一步是 DNA 的提取,提得的 DNA 质量是影响 PCR 检测成功与否的关键步骤。在本综述中,讨论了布鲁菌 DNA 的提取方法和用于检测的各种 PCR 技术。

1 布鲁菌 DNA 的提取

目前细菌 DNA 的提取方法已经有标准化提取步骤,如氯仿抽提法(蛋白酶 K 法)、碘化钠(NaI)提取法。也有应用于纯菌、组织、血样等临床标本 DNA 提取的商业化试剂盒,如 QIAGEN 的 QIAamp DNA blood mini kit、天根的血液/组织 DNA 提取试剂盒、Progama 的 Blood gDNA Miniprep System 等。

Lusk 等^[4]曾经用 6 种细菌 DNA 提取试剂盒提取不同奶制品样品中的布鲁菌 DNA,并用实时荧光 PCR 来对比不同试剂盒提取的 DNA 质量。结果显示,QIAGEN 的液体中 DNA 提取步骤对布鲁菌的提取效果最好,而 PrepSEQ 和 MagMAX kit 的布鲁菌 DNA 提取效果最差。Piranfar 等^[5]也曾经用 4 种不同的 DNA 提取试剂盒提取纯菌和血样中的布鲁菌 DNA,

并证明 MagNA Pure LC 对纯菌及血样中的 DNA 提取更灵敏。这些研究结果表明,不同的 DNA 提取试剂盒提取的 DNA 产物的质量是有差异的。

血液通常是人患布鲁菌病的 PCR 诊断所利用的临床标本,而血样 DNA 提取产物中可能存在的乙二胺四乙酸(EDTA)、血红素、核糖核酸酶、肝素等成分都会抑制 PCR 反应^[6]。而在提取 DNA 之前,将血液用水或裂解缓冲液反复清洗几遍直到去除所有血红蛋白,会大大增加 PCR 检测的灵敏度^[3]。所以在提取血样 DNA 之前,待检血样的预处理及合适的提取方法决定了后续 PCR 检测样品的灵敏性。

2 单引物 PCR 技术

至今,已有多篇报道将单引物 PCR 技术应用于人类布鲁菌病的诊断。有研究称,PCR 检测方法比细菌分离培养方法更灵敏,而且可以用于初次感染的诊断,也可用于复发的早期诊断。用于检测布鲁菌的单引物 PCR 技术针对的目的基因有表达外膜蛋白的布鲁菌外膜蛋白 31 基因(BCSP31),且该引物(B4/B5)已被多次证明具有高特异性^[7],并沿用至今。还有一些其他的属特异引物如 omp2(JPF/JPR)、per(bruc1/bruc5)、插入序列 IS711 等^[8]。

不同引物之间的灵敏度和特异度都有很大差异,Piranfar 等^[5]用 B4/B5、插入序列 IS711 的引物 ISP1/ISP2、引物 F4-R2 和 JPF/JPR 检测人血样中的布鲁菌,并对比这 4 对针对不同目的基因的引物灵敏度。实验结果显示,3 对引物 B4/B5、ISP1/ISP2、F4/R2 的检测最低限分别为 100、200、800 CFU/mL,引物 JPF/JPR 不能从血液中检测出布鲁菌。目的基因 BCSP31 的引物 B4/B5 敏感性最好。也很多研究报道对比过 B4/B5、F4/R5 和 JPF/JPR 这 3 对引物的 PCR 方法。多次实验证明,这些常用的 PCR 引物在检测人体中的布鲁菌基因组 DNA 时的扩增灵敏度是存在差异的。质量好的引物除了特异性好,不形成引物二聚体以外,扩增灵敏度高也是必要条件,所以在建立 PCR 检测方法时,对其特异性引物的要求就比较高。

3 多重 PCR 技术

多重 PCR 方法是一种在同一管中可以在检测布鲁菌的同时区分不同的种型的技术,也可用于同时检测不同的病原体。它的优点是省时、高效,大大降低了试剂的用量和成本。多重 PCR 方法是由传统 PCR 方法演变而来的,可根据布鲁菌基因中不同种之间基因多态性而选择出种型特异性基因靶点,设计出一系列引物,从而以扩增片段的大小区分不同的种型。也可根据布鲁菌不同目的基因,通过目的基因扩增产物的组合来判断布鲁菌不同的种型。

布鲁菌中插入序列 IS711 是一种多拷贝基因,在基因中的

* 基金项目:重庆市卫生局科研项目(2012-2-383)。 作者简介:姜海蓉(1970—),讲师,硕士,主要从事疫苗与诊断技术研究。 △ 通讯作者,E-mail:362505110@qq.com。

位置也十分稳定。不同种布鲁菌中 IS711 的拷贝数不同,一般是 6、7 个拷贝,如羊种、牛种、犬种,绵羊种拷贝数较多,为 38 个^[9]。有研究人员根据插入序列 IS711 在布鲁菌不同种之间的特异性,设计出特异性引物,即以 IS711 基因特异上游序列为基础设计公共上游引物,以其基因下游种特异性位点设计特异性下游引物,然后根据扩增产物大小来区分不同种和生物型。这一多重 PCR 检测方法为 AMOS-PCR,能够区分牛种 1、2、4 型,羊种 1、2、3 型,猪种 1 型及绵羊附睾种。也有研究者将多重 PCR 应用于几种病原菌的同时检测,Batra 等^[10]建立了一种在同一反应体系中能够检测出炭疽杆菌、鼠疫菌、类鼻疽伯克菌和布鲁菌 4 种病原菌的多重 PCR 方法,大大减少了人力、物力的消耗。随着 PCR 技术的发展,研究者们不断地追求更简单高效的 PCR 检测方法,Bruce ladder 就是 AMOS PCR 的一种延伸,它可以混合引物单管区分出布鲁菌 6 个经典的亚种,海洋种布鲁菌及疫苗株 S19、RB51 和 Rev1,能够高效低耗地进行分型鉴定。

2013 年,Sanjuan-Jimenez 等^[11]报道过一种应用多种不同引物组合同时检测出结合分枝杆菌和布鲁菌的方法,应用的目的是布鲁菌 BCSP31 和 IS711 及结核分枝杆菌的 senX3-regx3 和 IS6110,组成 3 对不同的引物。也有一些其他的报道应用该方法同时检测布鲁菌及结核分枝杆菌,利用的靶基因分别是布鲁菌 BCSP31、IS711、omp2a 和结核分枝杆菌的 regx3、cfp31 及 IS6110^[12-13]。诸多的此类报道证明,多重 PCR 技术因其省时、省力、低成本等优点,应用于布鲁菌及结核分枝杆菌的鉴别与诊断具有一定的实用性及良好的应用前景。

多重 PCR 技术应用于布鲁菌的种型分析的方法研究已日渐完善,除了新发现的两个布鲁菌种,其他都可以鉴别出,Bruce ladder 用于鉴别布鲁菌亚种的方法也已经被世界动物卫生组织(OIE)手册收录。近几年研究者们更热衷于将多重 PCR 技术应用于同时检测不同病原的研究。

4 荧光 PCR 技术

实时荧光 PCR 技术最初是由美国 ABI 公司研制出的,并在最近几年得到发展。2001 年,Redkar 等^[14]将荧光 PCR 应用于布鲁菌检测并在物种水平上分出牛种、羊种和猪 1 型布鲁菌,他们借鉴 AMOS PCR 的原理,利用插入序列 IS711 在布鲁菌不同种之间的多态性构建共用上游引物及种特异性下游引物。之后 Piranfar 等^[5]将 Redkar 文章中报道的羊种引物及探针用于荧光 PCR 并与传统 PCR 进行对比。实验结果显示,荧光 PCR 检测样品 DNA 的灵敏度明显高于传统 PCR。这些研究中应用于荧光 PCR 的染料多是探针类染料,其他还有荧光类染料作为荧光 PCR 的荧光信号。但曾有研究报道,将荧光 PCR 水解型探针和荧光染料进行对比,结果显示应用水解型探针的荧光 PCR 实验特异性更好。

实时荧光 PCR 技术因其操作更简单、快速、灵敏度及特异性更高等特点,更适于布鲁菌病的检测。而且,这一实验技术易于标准化,且对实验室工作人员的感染风险极低。据报道,将荧光 PCR 技术、间接酶联免疫吸附试验(IELISA)、竞争酶联免疫吸附试验(CELISA)、虎红平板凝集试验(RBT)、细菌分离培养技术分别用于血液、组织等临床标本的检测,结果证实荧光 PCR 检测技术最灵敏。Probert 等^[15]还将荧光定量 PCR 应用于人患布鲁菌病的诊断治疗和愈后跟踪调查,实验结果显示该方法对人体内布鲁菌菌量的变化是一种有效可信的检测方法。在进行布鲁菌病的防控过程中,区分出疫苗株与野毒株感染也是预防疾病传染的有效手段。Kaynak-Onurdag 等^[16]建立了一种用于区分布鲁菌疫苗株与野毒株的荧光定量 PCR

方法,用于有效地区分疫苗株与野毒株感染。

也有研究建立了一种鉴别猪种布鲁菌的荧光定量 PCR 方法,并报道是检测布鲁菌样品的荧光定量 PCR 方法中灵敏度最高的^[17]。Sidor 等^[18]也将 William 等设计的布鲁菌属特异性引物及探针应用于组织、血液等临床标本的布鲁菌检测,并加入了用于质量控制的两种内参基因,组成了多重荧光定量 PCR 检测布鲁菌属的试验方法。该试验方法可以监控组织样品中 DNA 是否提取成功及提取的 DNA 产物的质量,从而保证了后续荧光 PCR 方法检测结果的有效性。也有研究报道表明,将荧光定量 PCR 技术应用于布鲁菌病、钩端螺旋体和胎儿弯曲杆菌的检测,该实验建立了一种多重荧光定量 PCR 检测方法,在 1 个反应体系中可同时检测出 3 种疾病^[19],充分显示了荧光定量 PCR 方法的高特异性及高灵敏度。而特异性好,灵敏度高的实时荧光 PCR 技术在应用于人布鲁菌病诊断方面具有很大的前景,它的实时定量功能可以在治疗过程中追踪患者的病情变化,也可以用于复发诊断。

近两年来,依据单核苷酸多态性(SNP)位点建立的高分辨率熔点曲线分析法,用于检测布鲁菌和基因分型是科学家们的研究热点。如 Gopaul 等^[20]建立的高分辨率熔点曲线分析法,可将布鲁菌各经典种与其他种属细菌分辨开。之后 Mohamed Zahidi 等^[21]也根据 SNP 位点建立的高分辨率熔点曲线分析法用于布鲁菌亚种之间的分析,并在 41 株样品的检测中得到 40 株为羊种布鲁菌,1 株为猪种布鲁菌。高分辨率溶解曲线是一种新型的基因分析技术,具有极高的敏感度和准确度,并且这种技术速度快、成本低、通量高,且不受检测位点的局限,实现了真正的闭管操作。在基因的分型、SNP 分析、突变扫描、序列匹配等方面,高分辨溶解曲线分析技术发挥着重要作用。

与常规 PCR 相比,荧光定量 PCR 技术因其更高的特异性、灵敏度,耗时短,不需要进行电泳分析,避免了 DNA 污染等优点,更适用于人类布鲁菌病的检测工作。而且 PCR 实验技术本身比其他血清学或细菌分离培养等检验方法更简单安全,灵敏且高效。所以荧光定量 PCR 检测技术用于人布鲁菌病的检测更受人们期待。

5 其他 PCR 方法

应用于布鲁菌检测研究的 PCR 方法,除了标准 PCR 方法及其衍生物多重 PCR 方法和荧光定量 PCR 方法外,还有其他各种基于 PCR 的检测方法。如用 BCSP31 和 IS711 两种特异性基因建立半巢氏 PCR,并通过对人全血的布鲁菌检测评价该方法的检测性能。也曾有报道利用 IS711 属特异性基因设计两对套嵌式引物,构建了巢氏 PCR 方法并应用于人患布鲁菌病的检测,增加了检测的灵敏性和特异性。巢氏、半巢氏 PCR 方法的建立,在一定程度上提高了 PCR 检测的灵敏度和特异性。

用多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)方法建立种系关系进化树,此方法可以用于流行病的追踪调查及确定分离株的亲缘关系。2015 年有报道过,用 16 位点的可变数目串联重复序列(VNTR)方法将布鲁菌进行基因分型,并建立了一定的进化树分析^[22]。之后又有报道,从人或动物体内分离出了布鲁菌,通过进化树关系分析,人感染的多为人兽共患的菌株,我国多个地区也通过 MLVA 方法分析出本地区布鲁菌来源及地区之间的进化关系^[23-24]。在我国,Jiang 等^[25]用 MLVA 检测方法从人体中分离鉴定出了羊种 1、2、3 型,之后他们又从人和动物中分离出羊种、牛种布鲁菌及猪种 S2 疫苗株,并指出应用猪种 S2 疫苗对动物和人类都存在较大的感染风险。另外,随机引物扩增多态性 DNA 的 PCR 技术(RAPD)是利用不

同的随机排列碱基顺序的短寡聚核苷酸单链为引物,对靶 DNA 进行 PCR 扩增后进行多态性分析。RAPD 技术现在已经广泛应用于生物的品种鉴定、系谱分析及进化关系的研究上。

中国布鲁菌病的日益严重,使得对其防控与诊断技术的要求越来越高。而防控技术属国家层面的政策支持,布鲁菌病诊断技术的重要性也就尤为突出。大量的报道结果已经证明,PCR 技术用于布鲁菌的检测具有很好的利用价值,而且 PCR 方法已应用于人类布鲁菌病的检测研究,它表现出的高效、安全、灵敏度高、特异度好等优点将是用于临床检测的有利因素,也可以作为细菌分离培养和血清学检测方法的补充诊断。但是,作为一种正处在开发试用阶段的新型检测方法,PCR 并没有一个标准的检测方案,而且 DNA 的质量、PCR 反应管、反应试剂的质量等都会影响检测结果的有效性。因此,标准阴阳性样品的建立或内(外)源性内参基因的设计等都要应用于 PCR 检测方法中,来提高检测方法的可靠性。

参考文献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 5 版. 北京:中国农业出版社, 2013.
- [2] Wang Y, Wang Z, Zhang Y, et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2014, 13(31): 1-8.
- [3] Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species[J]. *Rev Sci Tech*, 2013, 32(1): 149-162.
- [4] Lusk TS, Strain E, Kase JA. Comparison of six commercial DNA extraction kits for detection of *Brucella neotomae* in Mexican and Central American-style cheese and other milk products [J]. *Food Microbiol*, 2013, 34(1): 100-105.
- [5] Piranfar V, Sharif M, Hashemi M, et al. Detection and discrimination of two *Brucella* species by multiplex real-time PCR and high-resolution melt analysis curve from human blood and comparison of results using RFLP[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(9): 909-914.
- [6] Al-Ajlan HH, Ibrahim AS, Al-Salamah AA. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples[J]. *POL J Microbiol*, 2011, 60(1): 27-33.
- [7] Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, et al. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran[J]. *Braz J Microbiol*, 2014, 29, 45(2): 533-538.
- [8] Zamanian M, Hashemi Tabar GR, Rad M, et al. Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method[J]. *Arch Iran Med*, 2015, 18(1): 44-50.
- [9] 莫莎. 家畜布鲁菌病流行病学调查及布鲁菌单核甘酸多态分子分型研究[D]. 南京:南京农业大学, 2011.
- [10] Batra SA, Krupanidhi S, Tuteja U. A sensitive & specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei* & *Brucella* species[J]. *Indian J Med Res*, 2013(138): 111-116.
- [11] Sanjuan-Jimenez R, Morata P, Bermúdez P, et al. Comparative clinical study of different multiplex real time PCR strategies for the simultaneous differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(12): e2593.
- [12] Colmenero JD, Morata P, Ruiz-Mesa JD, et al. Multiplex real-time polymerase chain reaction; a practical approach for rapid diagnosis of tuberculous and brucellar vertebral osteomyelitis[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35(24): E1392-E1396.
- [13] Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Bermúdez P, et al. Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of *Brucella* spp and *Mycobacterium tuberculosis* complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58353.
- [14] Redkar R, Rose S, Bricker B, et al. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* [J]. *Mol Cell Probes*, 2001, 15(1): 43-52.
- [15] Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp. , *B. abortus*, and *B. melitensis*[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3): 1290-1293.
- [16] Kaynak-Onurdag F, Okten S, Sen B, et al. Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey[J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(5): 3351-3357.
- [17] Hänsel C, Mertens K, Elschner MC, et al. Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis*[J]. *Vet Rec Open*, 2015, 2(1): e000084.
- [18] Sidor IF, Dunn JL, Tsongalis GJ, et al. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from Marine mammals[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2013, 25(1): 72-81.
- [19] Selim AM, Elhaig MM, Gaede W. Development of multiplex real-time PCR assay for the detection of *Brucella* spp, *Leptospira* spp. and *Campylobacter foetus* [J]. *Vet Ital*, 2014, 50(4): 269-275.
- [20] Gopaul KK, Sells J, Lee R, et al. Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 903.
- [21] Mohamed Zahidi J, Bee Yong T, Hashim R, et al. Identification of *Brucella* spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015, 81(4): 227-233.
- [22] Garofolo G. Multiple-locus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis: application to the genotyping of *Brucella* species[J]. *Methods Mol Biol*, 2015(1247): 335-347.
- [23] Ma JY, Wang H, Zhang XF, et al. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China[J]. *Infect Dis Pover-*

ty. 2016,5;26.

[24] Zhang F, Li Z, La X, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of Brucella isolates from patients in Xinjiang China[J]. Int J Clin Exp Med. 2015, 8(9): 15716-15723.

[25] Jiang H, Wang H, Xu L, et al. MLVA genotyping of Bru-

cella melitensis and Brucella abortus isolates from different animal species and humans and identification of Brucella suis vaccine strain S2 from cattle in China[J]. PLoS One. 2013, 8(10): e76332.

(收稿日期:2016-03-02 修回日期:2016-05-15)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.26.041

银屑病全基因组关联的易感基因和信号通路的研究进展*

徐可佳¹综述,史丙俊²,熊霞¹,刁庆春^{2△}审校

(1. 泸州医学院,四川泸州 646000;2. 重庆市中医院/重庆市第一人民医院皮肤科 400011)

[关键词] 银屑病;全基因组关联分析;易感基因;信号通路

[中图分类号] R758.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)26-3725-03

银屑病是一种多基因参与、与环境及免疫因素有关的慢性复发性疾病,其发病机制不清。近 10 余年来,国内外全基因组关联研究迅速发展,人们发现众多银屑病的易感基因和相关的信号通路,如人类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)区域、LCE 基因簇、Th17/23、核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)、白细胞介素(IL)-4/IL-13、Janus 激酶/信号转导子和转录激活子(JAK-STAT)等,进一步揭示银屑病的发病可能与固有免疫、获得性免疫、皮肤屏障功能失调有关。

1 银屑病的流行病学及相关临床特征

银屑病是一种病理上以表皮角质形成细胞过度增殖、异常分化为特点,临床表现为红斑、鳞屑的慢性炎症性皮肤病,约 30% 的患者伴关节损伤,如果不积极治疗,约 5% 的患者可能并发严重的关节残毁^[1]。通过流行病学调查发现,银屑病发病率无性别差异,但存在地区差异,如在北欧发病率最高,而在南美土著居民中几乎未发现患病,提示该病可能与种族、地理位置和生活环境等有关^[2]。我国银屑病发病率较低,据目前调查,患病率为 0.4%,约有患者 513 万。近 30 年没有全国流行病学调查的相关数据,依据 2008 年 6 个城市的调查结果(患病率为 0.47%)推算,我国现有患者 624 万^[3]。目前国际公认有 2 种银屑病的分型方式,依据分别是发病年龄和临床表现。前者指以 40 岁为界,分为 I 型(早发型年龄小于 40 岁),多具有遗传倾向,易发展为严重型银屑病,反之为 II 型(晚发型)^[4]。按临床表现分型分为寻常型、关节病型、脓疱型和红皮病型,其中寻常型约占 90%。早期通过双生子、系谱及患者亲属等的研究均提示银屑病发病与遗传显著相关。国内学者曾对 1 043 例寻常型银屑病患者及其家族成员进行遗传流行病学调查,发现该病发生率与一般人群相比,1、2 级亲属发病率明显增高,且发病率随亲缘系数的增加呈现递减趋势,提示其显著的家族聚集倾向^[2]。目前认为,银屑病是在环境因素的诱导下,由遗传控制(多个位点或基因的微效作用综合、基因-基因交互作用)的免疫失衡性(包括人体的固有及获得性免疫功能紊乱)疾病^[5]。

2 GWAS 的发展

人类基因组 0.1% 序列单核苷酸多态性(SNPs)决定复杂

疾病的遗传多态性和表型的复杂性。全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)即以“常见疾病和变异”为原理,在全基因组的遗传变异(尤其 SNPs)中,比较对照和病例之间等位基因频率的差异,筛选与疾病性状关联的 SNPs,再依据其在基因组中的位置和连锁的不平衡原理,推测出可能的疾病易感基因,并验证这些基因与疾病的关联性,进一步对易感基因进行功能研究。GWAS 克服复杂疾病的遗传与表型的异质性和复杂性等特点,发现疾病相关基因的效力与以往的遗传研究方法相比显著增强。2008 年, Capon 等^[6]利用 GWAS 技术开展银屑病易感基因的研究,发现 rs495337 标记的 ZNF313 与银屑病显著关联。随后在国内外人群中开展的多项 GWAS 研究(多是以寻常型为研究对象)表明 MHC 区域和非 MHC 区域的某些易感基因与银屑病相关。迄今,在 GWAS 官网中共收录 50 余个与银屑病相关的易感基因,为阐明银屑病的病因及发病机制提供了理论基础。

3 银屑病主要的易感基因和相关信号通路

随着 GWAS 在银屑病的广泛应用,近年发现众多该病的易感基因/位点,它们表明该病的发生可能与 3 种生物学机制有关:固有免疫(NF- κ B 等),获得性免疫[MHC 基因、IL-23/辅助性 T 细胞 17(Th17)等]以及皮肤屏障功能失调(LCE 基因簇),进一步提示银屑病是一种受免疫调节的多基因参与、多因素调节的复杂性疾病^[7]。

3.1 获得性免疫

3.1.1 MHC 区域 MHC 又称人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA),该区域是银屑病最主要的易感位点,其包括的基因约 40% 编码免疫防御相关蛋白^[8]。通过对欧亚人群进行的多项 GWAS 均发现位于 MHC-I 区域的 SNPs 与银屑病显著相关,尤其在编码 HLA-C 基因附近。HLA-C 基因主要调节自然杀伤细胞和抗原呈递参与免疫应答。有研究发现,HLA-C 也是银屑病性关节炎的易感位点,并得到了 meta 分析的证实^[9]。与银屑病关联最强的是 HLA-Cw*0602,它作为 HLA-C 的变体,和 I 型银屑病、点滴型银屑病密切相关^[10]。2008 年, Capon 等^[6]通过 GWAS 在全基因组关联水平上证实 HLA-C 为银屑病的易感位点,发现该区域的

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会(西医重点)项目(20141015)。 作者简介:徐可佳(1988-),在读硕士,主要从事遗传性皮肤病的研究。 △ 通讯作者, E-mail: qchdiao@vip.sina.com。