

# ARMD 与转铁蛋白受体基因单核苷酸多态性相关性研究

陈海霞<sup>1</sup>, 张璐<sup>2</sup>

引用:陈海霞,张璐. ARMD 与转铁蛋白受体基因单核苷酸多态性相关性研究.国际眼科杂志 2019;19(6):964-967

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81200722);哈尔滨市科技局杰青项目(No.2014RFYXJ008)

作者单位:<sup>1</sup>(024000)中国内蒙古自治区赤峰市医院眼科;  
<sup>2</sup>(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介:陈海霞,女,毕业于哈尔滨医科大学,医学硕士,住院医师,研究方向:白内障、青光眼及各种遗传性眼病发病机制。

通讯作者:张璐,女,医学博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,博士后,美国国际视觉与眼科学研究学会(ARVO)会员,中华医学会眼科专业委员会会员,黑龙江省老年眼病专业委员会委员,黑龙江省医学会眼科专业委员会白内障学组委员,黑龙江省医学会眼遗传学组委员,研究方向:白内障、青光眼、各种遗传性眼病的发病机制.13796089809@163.com

收稿日期:2018-12-11 修回日期:2019-04-29

## 摘要

目的:探讨中国东北地区汉族人群中年龄相关性黄斑变性(ARMD)与转铁蛋白受体2(TFR2)基因单核苷酸多态性的相关性。

方法:选取200例ARMD患者(干性100例,湿性100例)和100名健康志愿者(对照组),采集所有研究对象的外周静脉血并以EDTA抗凝处理,提取基因组DNA,根据相关文献提供的引物序列,扩增TFR2基因多态性位点rs2075674,进行聚合酶链式反应(PCR)。比较各组间的基因型频率,并按照Hardy-Weinberg平衡原理确定样本的群体代表性。

结果:TFR2基因的多态性位点rs2075674 ARMD组与对照组比较有差异( $\chi^2 = 6.494, P = 0.011$ );湿性ARMD组与对照组比较有差异( $\chi^2 = 11.054, P = 0.001$ ),而干性ARMD组与对照组无差异( $\chi^2 = 1.418, P = 0.234$ )。

结论:中国东北地区汉族人群中TFR2基因多态性rs2075674与ARMD具有相关性,且与湿性ARMD相关性较大。

关键词:年龄相关性黄斑变性;转铁蛋白受体基因;单核苷酸多态性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.6.16

## Study on the association of transferrin receptor gene polymorphism with age related macular degeneration

Hai-Xia Chen<sup>1</sup>, Lu Zhang<sup>2</sup>

Foundation items: Natural Science Foundation of China (No.

81200722); the Harbin Science and Technology Bureau Foundation for Distinguished Young Scholars (No.2014RFYXJ008)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Chifeng City Hospital, Chifeng 024000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Lu Zhang. Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. 13796089809@163.com

Received:2018-12-11 Accepted:2019-04-29

## Abstract

• AIM: To develop the correlation of patients in age-related macular degeneration and TFR2 gene polymorphism in the Han people of northeast China.

• METHODS: Totally 200 patients with ARMD (dry-ARMD 100 individuals and wet-ARMD 100 individuals) and 100 healthy control people were chosen as the experiment team and control team. Peripheral venous blood were collected and anticoagulated dealt with EDTA. Then we extracted genome DNA and amplify rs2075674, which was the polymorphic locus of TFR2 gene according to the primer sequences provided by references, for polymerase chain reaction (PCR). The group representativeness of samples is identified according to Hardy Weinberg equilibrium principle.

• RESULTS: We found that the difference between ARMD group and control group in the polymorphism of TFR2 gene rs2075674 is statistically significant ( $\chi^2 = 6.494, P = 0.011$ ). There was significant difference between the wet ARMD group and control group ( $\chi^2 = 11.054, P = 0.001$ ). There had no significant differences when it comes to the dry ARMD group and the control group ( $\chi^2 = 1.418, P = 0.234$ ).

• CONCLUSION: The above findings indicate that polymorphism of TFR2 gene increases the risk of ARMD in the Han population of Northeast China. It is concluded that rs2075674 is significantly correlated with wet-ARMD.

• KEYWORDS: age-related macular degeneration; transferrin receptor gene; gene polymorphism

Citation: Chen HX, Zhang L. Study on the association of transferrin receptor gene polymorphism with age related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(6): 964-967

## 0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 是发达国家老年人致盲的首要疾病<sup>[1]</sup>。ARMD 主要损害视网膜的黄斑区, 疾病早期的病理学特点是蛋白质、脂质和炎症介质等细胞外沉积物在视网膜形成玻璃膜疣<sup>[2]</sup>。ARMD 分为两型: 干性 ARMD 和湿性 ARMD。干性 ARMD 的特点是视网膜色素上皮 (RPE) 细胞的衰老和地图样缺失, 而湿性 ARMD 的特点是 RPE 和脉络膜血管的异常生长。ARMD 患者视网膜分析显示, 脂质沉积在 Bruch 膜和 RPE 细胞导致细胞凋亡<sup>[3]</sup>。

ARMD 是一种多因素疾病, 其发病受非遗传因素和遗传因素影响。非遗传因素中主要与年龄、环境、饮食等相关<sup>[4-5]</sup>。许多研究证明, 在老化的视网膜中氧化应激和活性氧在疾病的病理学中发挥了重要作用<sup>[6]</sup>。视网膜对氧化应激高度敏感, 因为视网膜具有氧消耗量大、代谢活性高并且直接暴露于光等特点。过量的活性氧可以损害视网膜脂质、蛋白质和核酸, 随后导致视网膜细胞死亡。研究发现, 在 ARMD 患者视网膜中氧化损伤增加, 玻璃膜疣中的氧化蛋白含量也增加<sup>[7]</sup>。大量证据表明, 氧自由基的损害与包含 ARMD 在内的年龄相关的神经退行性疾病相关<sup>[8-9]</sup>。然而, 当体内各种原因导致氧自由基的清除失衡, 从而出现毒性蛋白 (包括脂褐素) 的积累, 导致细胞外玻璃膜疣出现。所有这些机制均会导致 RPE 功能障碍或 RPE 细胞的死亡, 从而导致 ARMD 的发生<sup>[10]</sup>。

在细胞膜中许多酶的激活需要铁的辅助<sup>[11]</sup>。血液循环中的铁和转铁蛋白结合形成配体与细胞膜表面的转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR) 结合, 通过血-视网膜屏障进入细胞内发挥作用。因此, 当 TFR 功能异常时会影响体内铁的平衡, 导致氧自由基产生增多, 当氧自由基含量超过视网膜自身清除能力时, 会导致视网膜的凋亡, 最终导致患者视力下降。TFR 有很多种类, 其中作用最重要的受体之一就是 TFR2。TFR2 基因定位于 7q22.1, 其编码的蛋白质是单通道 II 型膜蛋白, 介导细胞摄取铁、结合铁。TFR2 基因单核苷酸多态性包括 rs2075674、rs41295942、rs527374887 等。而 TFR2 基因多态性与 ARMD 是否相关, 这个问题一直是近年来国内外研究的热点。相关的研究也已经在白种人和日本人中有过类似的探讨。白种人中 TFR2 基因 rs2075674 是 ARMD 的危险因素, 其与干性 ARMD 相关性更大<sup>[12]</sup>。而在日本人中研究得到的结果是 TFR2 基因多态性与 ARMD 无相关性。国内没有相关的研究, 所以我们选择了 ARMD 患者与正常人分别作为病例组与对照组, 应用限制性片段长度多态性-聚合酶链式反应法 (restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction, RFLP-PCR) 对 TFR2 基因的多态性与 ARMD 的相关性进行了分析。

### 1 对象和方法

1.1 对象 病例组: 选取 2014-06/2016-06 哈尔滨医科大学附属第一医院确诊为 ARMD (无影响视力的其他眼部疾病) 的患者 200 例, 均无血缘关系, 其中干性 ARMD 患者 100 例, 湿性 ARMD 患者 100 例, 平均年龄 65±15 岁, 男 120 例, 女 80 例。ARMD 的诊断和分型原则: 45 岁以上患

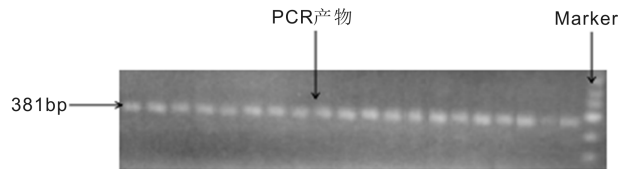


图 1 TFR2 基因 PCR 产物电泳图。

者双眼渐进性视力减退, 眼底散在玻璃膜疣, 或后极部视网膜脉络膜萎缩病灶, 排除其它眼病者, 即可诊断为干性 ARMD; 突然严重视力障碍, 后极部深、浅层出血伴有新生血管和玻璃膜疣或黄斑区盘状瘢痕, 并排除其它眼病者, 即可诊断为湿性 ARMD。对照组: 选取 2014-06/2016-06 哈尔滨医科大学附属第一医院体检中心健康志愿者 100 名, 直接检眼镜未检出眼底病变, 平均年龄 55±5 岁, 男 55 名, 女 45 名。所有选择的患者和健康志愿者均了解试验目的和意义, 并签署知情同意书, 已获得哈尔滨医科大学附属第一医院伦理委员会批准。

1.2 方法 提取人类基因组 DNA, 根据相关文献设计 TFR2 基因多态性位点 rs2075674 PCR 引物: TFR2-forward: 5'-ACTCCCTGCCGTCGAGTTCT-3'; TFR2-reverse: 5'-ACTCCCAGAGACCAAGAGCG-3'。PCR 仪扩增, 94℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 30s, 56℃ 变性 30s, 72℃ 变性 1min, 共 29 次循环, 72℃ 延伸 1min。制备 20g/L 琼脂糖凝胶, 60V 恒压电泳 1.5h, 取出凝胶。限制性核酸内切酶酶切, 取 PCR 产物 2μL, 加入 MsPA1 I 内切酶 0.3μL, CutSmart 缓冲液 1μL, 并加入超纯水使溶液体积达到 10μL。置于 36℃ 水浴锅恒温水浴 4h, 待下一步试验使用。取 8μL 酶切后产物加入到胶孔中, 最后一孔中加入 250bp-II DNA 梯形标记物 5μL。60V 恒压电泳 1.5h, 取出凝胶。将琼脂糖凝胶置于 CDD 凝胶成像分析系统配套软件中进行观察处理。比较各组间的基因型频率, 并按照 Hardy-Weinberg 平衡原理确定样本的群体代表性。

统计学分析: 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。采用  $\chi^2$  检验比较各组间的基因型频率, 并按照 Hardy-Weinberg 平衡原理确定样本的群体代表性。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 TFR2 聚合酶链反应产物电泳结果 PCR 产物扩增后 TFR2 可见 381bp 的电泳条带 (图 1)。

### 2.2 TFR2 基因限制性核酸内切酶酶切后产物电泳结果

PCR 产物经过限制性核酸内切酶酶切后 TFR2 可表现为 CC、CT 两种基因型。CT 基因型可被切开, 表现为两条条带, 一条 381bp, 一条 198bp; CC 基因型不可被限制性核酸内切酶切开, 表现为一条 381bp 的条带 (图 2~3)。

2.3 基因型频率结果 经  $\chi^2$  检验, TFR2 (rs2075674) 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。rs2075674 基因型频率分布: ARMD 组与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 6.494, P = 0.011$ , 表 1); 湿性 ARMD 组与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 11.054, P = 0.001$ ); 干性 ARMD 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1.418, P = 0.234$ , 表 2)。

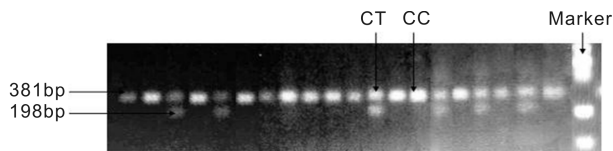


图2 湿性 ARMD TFR2 基因单核苷酸多态性 (rs2075674) 代表图。

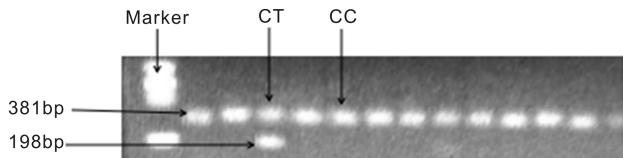


图3 干性 ARMD TFR2 基因单核苷酸多态性 (rs2075674) 代表图。

表1 ARMD 组与对照组 TFR2 基因型频率 例(%)

组别	例数	CC	TC
ARMD 组	200	173(57.6)	27(9.0)
对照组	100	96(32.0)	4(1.3)
合计	300	269(89.7)	31(10.3)

注:对照组:健康志愿者。

表2 ARMD 亚组与对照组 TFR2 基因型频率 例(%)

组别	例数	CC	TC
湿性 ARMD 组	100	81(40.5)	19(9.5)
干性 ARMD 组	100	92(46.0)	8(4.0)
对照组	100	96(48.0)	4(2.0)

注:对照组:健康志愿者。

### 3 讨论

本研究中我们首次发现,TFR2 基因多态性 rs2075674 与中国东北地区人群 ARMD 的发病具有相关性 ( $P = 0.011$ )。rs2075674 与中国东北地区人群中湿性 ARMD 的发生有很强的相关性 ( $P = 0.001$ )。此外,本次研究还发现 TFR2 基因多态性 rs2075674 与中国东北地区干性 ARMD 的发生无相关性 ( $P = 0.234$ )。本次试验结果得出,rs2075674 与中国东北地区人群中干性 ARMD 无相关性。但是这一结果并不能证明该单核苷酸多态性与 ARMD 无关,却从侧面反映出该基因对中国东北地区干性 ARMD 的发病没有起到至关重要的作用。

关于 TFR2 基因多态性是否与 ARMD 的发病相关,一直以来是国内外研究的热点。Imamura 等<sup>[11]</sup>研究发现,在日本人中 TFR2 基因多态性与 ARMD 的发生无相关性。而我们的试验首次应用 RFLP-PCR 法发现了 TFR2 基因单核苷酸多态性 rs2075674 与 ARMD 发病有相关性,其中 CT 基因型与 ARMD 发病相关性较高。Imamura 等研究着重于视网膜在光暴露后感光细胞中亚铁离子的代谢过程,而且该研究的基因扩增于 ARMD 小鼠模型,这可能是其未发现 TFR2 基因单核苷酸多态性与 ARMD 发病相关的主要原因。本研究发现,CT 基因型会增加 ARMD 患者的发病风险,后续试验可以通过检

测 CT 基因型患者的感光细胞外液中亚铁离子、活性氧、羟自由基等浓度来丰富本项课题。

基于 ARMD 有干性和湿性两种分型,且这两种分型的临床表现和治疗方法不尽相同,本试验在 ARMD 组与对照组进行比较分析的基础上,将干性、湿性 ARMD 与对照组分别进行了对照分析。本研究发现 rs2075674 与湿性 ARMD 相关性更大,而与干性 ARMD 无相关性。湿性 ARMD 的病理学特点为视网膜血管的异常生长,干性 ARMD 的病理学特点为脂质的沉积导致视网膜 RPE 的缺失。根据 ARMD 的病理学特点,我们有理由相信 rs2075674 参与了湿性 ARMD 形成过程中视网膜新生血管的形成。但是 Daniel 等通过对白种人研究发现,rs2075674 与干性 ARMD 具有较高的相关性,而与湿性 ARMD 的相关性则较低。Daniel 等研究结果与本次研究结果具有差异性,可能说明白种人与黄种人具有遗传差异性。未来我们可以扩大样本量,将不同种族人群的 ARMD 患者进行基因层面的对比分析,这可能会为 ARMD 发病机制的研究开辟新的道路。

本研究中,ARMD 试验组和对照组中均未发现 TT 基因型,这可能说明中国东北地区人群的 TFR2 基因不存在 TT 基因型。而 Daniel 等基于白种人 ARMD 患者的 rs2074674 研究均存在 TT 基因型。造成以上试验结论差异性的原因可能是由于白种人与黄种人具有不同的遗传特性,也有可能是本次试验的样本量较少,所得结论并不能代表中国东北地区所有人群,以后我们可以通过扩大样本量进一步验证。

随着全世界学者对 ARMD 发病机制的关注度越来越高,许多学者认为 ARMD 的发病机制可能是多种机制共同作用的结果,不可否认的是遗传易感性是 ARMD 不可忽视的一种发病途径。因此不同人种对于 ARMD 的发展进程也存在较大的差异。目前 ARMD 的发展与不健康的饮食结构、吸烟等不良环境关系密切。中国汉族人与日本人和白种人的种族、饮食、生活习俗、文化背景等方面均有不同,导致 ARMD 遗传易感性在不同人群中较大的差距。这可能是本次课题研究结果与欧洲、日本有差别的原因之一。

我们的研究发现也许会在今后人们对 ARMD 发病机制的探索提供新的思路。后续试验也可建立 ARMD 的动物模型,检测动物模型眼中 TFR2 基因的表达水平,用以研究 TFR2 基因表达水平在 ARMD 时是否有变化,若有条件也可收集相关患者眼内部分玻璃体检测其 TFR2 表达水平,进一步行相关试验。另外,本试验病例组与对照组样本数量均停留在 100 数量级上,如果将样本量扩大至 1000 级,可能会出现更有意义的结果。

#### 参考文献

- 1 Pennington KL, DeAngelis MM. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis (Lond)* 2016;3:34
- 2 Donoso LA, Kim D, Frost A, et al. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2006;51(2):137-152



3 Ambreen F, Ismail M, Qureshi LZ, *et al.* Association of gene polymorphism with serum levels of inflammatory and angiogenic factors in Pakistani patients with age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2015; 21:985-999

4 Cascella R, Ragazzo M, Strafella C, *et al.* Age-related macular degenerations: insights into inflammatory genes. *J Ophthalmol* 2014; 2014:582842

5 DeAngelis MM, Silveira AC, Carret EA, *et al.* Genetics of Age-Related Macular Degeneration: Current Concepts, Future Directions. *Semin Ophthalmol* 2011;26(3):77-93

6 Yildirim Z, Ucun NI, Yildirim F. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66(5):743-746

7 Decanini A, Nordgaard CL, Feng X, *et al.* Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2007;143(4):607-615

8 Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, *et al.* Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000;14(7):835-846

9 María LF, Germán OL. Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:7420637

10 Mitter SK, Rao HV, Qi X, *et al.* Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration in Retinal Degenerative Diseases. *Adv Exp Med Biol* 2012;723:83-90

11 Imamura T, Hirayama T, Tsuruma K, *et al.* Hydroxyl radicals cause fluctuation in intracellular ferrous ion levels upon light exposure during photoreceptor cell death. *Exp Eye Res* 2014; 129:24-30

12 Daniel W, Katarzyna D, Elzbieta P, *et al.* Transferrin receptor levels and polymorphism of its gene in age-related macular degeneration. *Biochimic Polonica* 2015;62(2):177-184