

中国汉族人群 NR3C1 MTHFR 和 IGFBP3 基因多态性及 DNA 甲基化与激素性股骨头坏死风险的相关分析

倪 琼 詹庆昊 黄荣兰 胡文彬 杨任民 程 楠 韩永升

【摘要】目的 探究 NR3C1、MTHFR 和 IGFBP3 基因多态性及 DNA 甲基化状态与激素性股骨头坏死 (SONFH) 之间的关系。**方法** 本病例对照研究中,选自合肥及周边地区包括 79 例短期冲击或长期口服糖皮质激素治疗 SONFH 的患者为病例组,114 例服用糖皮质激素但未发生 SONFH 的患者为对照组。评估两组 NR3C1、MTHFR 和 IGFBP3 基因中的 5 个单核苷酸多态性 (SNPs), 这些 SNPs 由 iMLDR 进行基因分型。采用 MethylTarget 技术检测阳性位点 (CpG 位点) 的甲基化水平,利用 e QTLT 技术分析以上 3 个基因的 SNPs 与甲基化水平的相互作用。**结果** 病例组与对照组相比,rs3110697 A/G 基因型携带者患病风险低;在隐性遗传模型下,rs3110697 A 等位基因携带者患病风险低;CpG 位点 *IGFBP3_2-143*、*MTHFR_1-36*、*MTHFR_1-77*、*MTHFR_1-139*、*MTHFR_2-42*、*NR3C1_2-163*、*NR3C1_4-47* 甲基化水平差异显著,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);共有 10 对 SNPs 与甲基化位点线性回归检验差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** SONFH 是一种多基因病,其 3 个关联基因 NR3C1、MTHFR 和 IGFBP3 中的 SNPs 与 DNA 甲基化水平均存在广泛交互作用,有助于进一步建立 SONFH 基因调控模型指导临床诊疗。

【关键词】 糖皮质激素受体基因;亚甲基四氢叶酸还原酶;胰岛素样生长因子结合蛋白-3;激素性股骨头坏死;基因多态性;DNA 甲基化

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2022.11.001

Association analysis of NR3C1, MTHFR, IGFBP3 gene polymorphisms and DNA methylation with SONFH risk in Chinese Han population

NI Qiong¹, ZHAN Qinghao¹, HUANG Ronglan¹, HU Wenbin², YANG Renmin², CHENG nan², HAN Yongsheng²

1. Department of Graduate School, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Clinical Specialty of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hefei 230038, China

2. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Institute of Neurology, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230061, China

Corresponding Author: HU Wenbin, hwbzhx@163.com

【Abstract】Objective To explore the relationship between gene polymorphisms of NR3C1, MTHFR, IGFBP3 and DNA methylation status with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH). **Methods** We selected 79 patients with SONFH and 114 patients who took glucocorticoids but no SONFH occurred from Hefei and surrounding areas in this case-control study. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in NR3C1, MTHFR and IGFBP3 genes were evaluated in Chinese Han population. These SNPs were genotyped by iMLDR method. MethylTarget technique was used to detect the methylation level of positive sites (CpG sites), and eQTLT technique was used to analyze the interactions between SNPs of the above three genes and methylation level. **Results** The genotype frequency of rs3110697 A/G genotype carriers in the case group was lower than that in the control group. Under the recessive genetic model, the risk of rs3110697 A allele carriers was low. The methylation level of the screened CpG sites as *IGFBP3_2-143*, *MTHFR_1-36*, *MTHFR_1-77*, *MTHFR_1-139*, *MTHFR_2-42*, *NR3C1_2-163*, *NR3C1_4-47* was significantly different compared with the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There were 10 pairs of SNPs and methylation sites with statistical significance. **Conclusions** SONFH is a polygenic disease. The SNPs in NR3C1, MTHFR and IGFBP3 have extensive interaction with DNA methylation levels, which helps to further establish the model of SONFH gene regulatory network to dominate the disease process.

【Key words】 NR3C1; MTHFR; IGFBP3; Steroid-induced osteonecrosis of femoral head; Gene polymorphism; DNA methylation

基金项目: 安徽中医药大学临床科研基金重点项目(项目编号:2020sjzd06, 2018sylvz04)

作者单位: 230038 安徽合肥 安徽中医药大学研究生院中西医结合临床专业(倪琼, 詹庆昊, 黄荣兰)

230061 安徽合肥 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院神经内科(胡文彬, 杨任民, 程楠, 韩永升)

通信作者: 胡文彬, hwbzhx@163.com

股骨头坏死是由于股骨头血供中断引起骨细胞的凋亡和股骨头内微结构的改变,出现股骨头区域疼痛并进行性加重的一种疾病。大多数患者最终需要进行人工关节置换,长期效果难以预测^[1]。研究^[2]已确定过度饮酒和服用大剂量糖皮质激素药物是发生非创伤性股骨头坏死的 2 个最重要的诱因。因此,激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head,SONFH)的早期检测、有效治疗尤为重要。近年来,基于候选基因的关联研究成功地定位了许多复杂疾病的易感性^[3-4],也有研究^[5]将特定基因与股骨头坏死联系起来,表明遗传因素可能与股骨头坏死的发生有关。

糖皮质激素受体基因 NR3C1 是介导糖皮质激素发挥作用的重要转录调控因子,存在较多的突变及多态性,影响个体对外源性糖皮质激素的敏感性^[6]。NR3C1 BclI (rs41423247) 基因多态性是一种比较常见的多态性变异,并已报告与高血压和糖皮质激素敏感性增加有关^[7-8]。NR3C1 rs6196 A 等位基因携带者与 G 等位基因携带者相比,有更高的糖皮质激素耐药风险。与 G 等位基因相比,rs10052957 和 rs258751 A 等位基因的存在可以降低糖皮质激素耐药的发生率^[9]。NR3C1 DNA 甲基化与抑郁、焦虑、创伤后心理压力紧张综合征、神经性贪食症和边缘性人格障碍有关^[10-13]。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase,MTHFR)基因可编码 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶,MTHFR 的基因突变会显著降低酶的活性,导致血浆同型半胱氨酸水平升高,从而增强了破骨细胞活力对骨组织产生直接的损害作用^[14]。MTHFR 基因的 677C>T(rs1801133) 变体与血浆同型半胱氨酸水平升高有密切的联系^[15]。较高的同型半胱氨酸浓度可能会阻碍胶原的合成,进而导致骨质量的下降和股骨头坏死风险的增加^[16]。同型半胱氨酸升高与 rs1801133 多态性和低甲基化之间有相关联系^[17]。胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin like growth factor bind protein 3,IGFBP3)是血清 IGF1 的主要载体,通过与配体竞争性结合抑制 IGF1。IGF1 通过自分泌和旁分泌调节成骨细胞的增殖和分化^[18]。IGFBP3 基因的 DNA 甲基化能通过神经体液、炎症、氧化应激等机制来调控基因表达和影响疾病发生发展。有研究^[19-20]证明影响血管的 IGFBP3 基因的 SNPs 与多个 CpG 位点的甲基化有关。

DNA 甲基化是目前研究最为深入的一种表观遗传修饰,可对转座子和基因表达产生抑制,也可激活一

些基因的转录。笔者先前已证实基因 CYP450 的 rs2242480 T 等位基因与 SONFH 发生风险降低相关^[21]。目前,只有少数研究探讨 NR3C1, MTHFR 和 IGFBP3 基因多态性和甲基化与 SONFH 的关系。本研究对上述 3 个基因的 SNP 位点及阳性位点的 DNA 甲基化水平进行测定,以期进一步了解 SONFH 的生物学和生理学机制,为该病的个体化治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2018-2021 年共招募了来自安徽中医药大学神经病学研究所附属医院、安徽中医药大学第一附属医院、安徽医科大学第一附属医院和宿州医院、合肥市第八人民医院、中山大学第三附属医院和南昌大学医学院第二附属医院等共 82 例股骨头坏死患者。其中 79 例患者有在患视神经脊髓炎病、多发性硬化、重症肌无力、急性淋巴细胞白血病或系统性红斑狼疮等疾病接受短期冲击或长期口服糖皮质激素治疗史,为本研究的病例组,均符合 SONFH 的诊断标准^[22]。3 例患者因其他非糖皮质激素原因造成的股骨头坏死被排除在外。根据安徽中医药大学神经病学研究所附属医院的医学检查,招募了口服糖皮质激素(强的松>30 mg/d)治疗 3 个月后,临床观察 3 年以上未发生股骨头坏死的 114 例患者作为对照组,所有参与者为在合肥及周边地区居住或住院就诊的中国汉族人口。每位参与者均签署一份知情同意书。安徽中医药大学神经病学研究所附属医院伦理委员会批准了该研究[伦理批号:2018 伦字(07)号]。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:①长期口服或短期冲击使用糖皮质激素,累计相当于强的松>30 mg/d 超过 3 个月;②采用《中国成人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)》^[23]确诊为 SONFH 的患者;③均摄双侧髋关节正、蛙位片和双髋磁共振检查;④签署知情同意书。排除标准:①未获得知情同意者;②创伤性股骨头坏死及其他非糖皮质激素原因造成股骨头坏死;③病史不全或严重缺陷影响观察者。

1.3 提取基因及基因分型 基因组 DNA 提取使用 DNA 纯化试剂盒(Promega, Madison, Wisconsin, USA),按照产品说明书进行。目标基因 SNP 位点采用 Genesky 生物技术公司(上海,中国)开发改良的 iMLDR 技术进行分型。采用多重聚合酶链式反应(PCR)检测进行 iMLDR 的研究。对每个单核苷酸多态性,用不同的荧光标记来区分等位基因特异性寡核苷酸探针。不同的 SNP 在 3 端被进一步区分为不同

的延长长度。设置两组阴性对照:一组以双蒸馏水为模板,另一组为不加引物的 DNA 样品,其他条件保持不变。采用 ABI3730XL 自动测序仪 (Applied Biosystems) 对占总 DNA 样品约 5% ($n=20$) 的随机样本进行直接测序,以确认 iMLDR 的结果。

1.4 CpG 岛选择 选取位于 NR3C1、MTHFR 和 IGFBP3 基因近端启动子的 CpG 岛,按照以下标准进行测量:①最小长度为 200 bp;②GC 含量在 50% 以上;③0.60 或更高的观察/预期二核苷酸 CpG 比值。

1.5 亚硫酸氢盐转换和多重放大 DNA 甲基化水平采用甲基化靶 (MethylTargetTM, Genesky Biotechnologies Inc, Shanghai, China) 分析,这是一种基于 NGS 的多靶点 CpG 甲基化分析方法。利用基因 CpG 软件对感兴趣的基因组区域进行分析,并将其转化为 bisulfite-convert 序列。利用硫酸氢盐转化 DNA 的甲基化引物软件设计 PCR 引物。使用 EZ DNA 甲基化 ■ -GOLD 试剂盒 (Zymo Research) 按照制造商协议对基因组 DNA (400 ng) 进行亚硫酸钠处理。用优化的引物组合进行多重 PCR。

1.6 测序 将来自不同样本的库进行量化并汇集在一起,在 Illumina NextSeq 平台上进行排序。测序采用

2 × 150 bp 双端模式。
1.7 统计学方法 采用 SPSS 24.0、Plink、Haploview、PRSee、FLASH、e QTL 等软件进行统计分析。计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用独立样本 t 检验;影响因素分析采用 logistic 线性回归关联分析;计数资料以百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较 病例组 79 例,其中女性 45 例,男性 34 例,平均年龄 (50.65 ± 13.95) 岁;对照组 114 例,其中女性 65,男性 49 例,平均年龄 (42.63 ± 19.27) 岁。病例组与对照组相比,年龄差异有统计学意义 ($t=3.331, P=0.001$),性别差异无统计学意义 ($t=0.127, P=0.899$)。
2.2 SNP 位点信息及 Hardy - Weinberg 平衡检验 选择了 5 个 SNP 位点 (NR3C1 基因的 rs10052957、rs41423247 位点;MTHFR 基因的 rs1801133 位点;IGFBP3 基因的 rs2453839、rs3110697 位点),对所有样本采用 iMLDR 技术进行基因分型并做 HWE 检验质控,所有位点的 P 值均 >0.05 ,符合平衡,数据可用。见表 1。

表 1 SNP 位点信息与 Hardy - Weinberg 平衡检验

SNP 位点	基因	染色体位置	基因型 (1/2)	MAF (1 000 g - CHBS_)	HWE P 值
rs10052957	NR3C1	chr5:142786701	A/G	0.115 385	1
rs41423247	NR3C1	chr5:142778575	C/G	0.237 981	0.2351
rs1801133	MTHFR	chr1:11856378	G/A	0.375	0.5665
rs2453839	IGFBP3	chr7:45953573	C/T	0.216 346	0.4604
rs3110697	IGFBP3	chr7:45955029	A/G	0.747 596	0.2785

注:MAF (1000g - CHBS) 指在 1000 genome 中 CHB 和 CHS 中国人群中的频率。

2.3 SNP 位点等位基因及基因型频率与 SONFH 的关联分析 病例组与对照组中的 5 个 SNP 位点的 2 个等位基因频率在 logistic 回归分析中发现,rs3110697 位

点与 SONFH 有关联,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。rs3110697 位点的基因型频率分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 对照组和病例组等位基因和基因型频率与 SONFH 风险的相关性分析

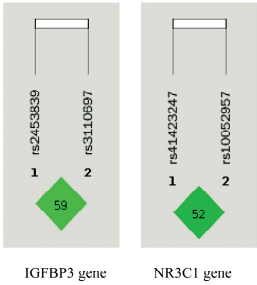
SNP 位点	等位基因	病例组	对照组	OR (95% CI) 值	P 值	基因型	病例组	对照组	OR (95% CI) 值	P 值
rs10052957	A	25	48	1.486 (0.880 ~ 2.508)	0.138	AA	2	1	1.458 (0.802 ~ 2.652)	0.377
	G	129	368			AG	21	25		
						GG	54	88		
rs41423247	C	36	99	0.944 (0.611 ~ 1.463)	0.798	CC	2	9	0.913 (0.577 ~ 1.446)	0.946
	G	122	317			CG	26	38		
						GG	48	67		
rs1801133	G	83	156	1.506 (1.04 ~ 2.18)	0.030	GG	20	25	1.243 (0.818 ~ 1.888)	0.524
	A	75	260			GA	43	58		
						AA	16	31		
rs2453839	C	36	90	1.069 (0.689 ~ 1.658)	0.766	CC	3	8	0.715 (0.439 ~ 1.165)	0.428
	T	122	326			CT	30	49		
						TT	46	56		
rs3110697	A	38	105	0.937 (0.612 ~ 1.437)	0.768	AA	0	11	0.741 (0.456 ~ 1.205)	0.008
	G	120	311			AG	38	45		
						GG	41	58		

2.4 SNP 位点与 SONFH 的遗传模型关联分析 遗传模型分析发现,IGFBP3 基因的 rs3110697 位点,在隐性遗传模型下,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 病例组与对照组遗传模型分析

SNP	隐性遗传模型	病例组	对照组	OR(95% CI)值	P 值	显性遗传模型	病例组	对照组	OR(95% CI)值	P 值
rs10052957	AA	2	1	3.013(0.268 ~ 33.820)	0.566	AA + AG	22	26	1.281(0.645 ~ 2.543)	0.480
	AG + GG	75	113			GG	52	82		
rs41423247	CC	5	9	0.788(0.254 ~ 2.448)	0.783	CC + CG	29	46	0.745(0.400 ~ 1.388)	0.354
	CG + GG	74	105			GG	47	62		
rs1801133	GG	20	25	1.207(0.615 ~ 2.367)	0.607	GG + GA	60	79	1.420(0.692 ~ 2.914)	0.339
	GA + AA	59	89			AA	16	29		
rs2453839	CC	3	8	0.518(0.133 ~ 2.017)	0.530	CC + CT	32	54	0.717(0.39 ~ 1.319)	0.285
	CT + TT	76	105			TT	44	53		
rs3110697	AA	0	11	NA(NA ~ NA)	0.003	AA + AG	36	52	1.056(0.576 ~ 1.936)	0.861
	AG + GG	79	103			GG	40	56		

2.5 连锁不平衡分析 对 NR3C1 及 IGFBP3 的 SNP 位点使用 haploview 软件进行连锁不平衡分析存在关联的单倍型,发现 SNP 位点间均不具有较强的连锁关系。见图 1。



注:方框中的颜色与数字均表示 SNP 之间的连锁程度强弱,数字越大,表示 SNP 之间关联性越强。

图 1 连锁不平衡单倍型图

2.6 甲基化数据分析

2.6.1 甲基化检测片段信息 采用 Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) 软件对亚硫酸氢盐处理之后的序列进行引物设计。见表 4。

2.6.2 CpG 位点甲基化水平差异 本研究共检测 CpG 位点 164 个,对每个 CpG 位点甲基化水平进行差异显著性检验,筛选具有显著甲基化水平差异的 CpG 位点。病例组与对照组相比,CpG 位点 IGFBP3_2 - 143, MTHFR_1 - 36、- 77、- 139, MTHFR_2 - 42, NR3C1_2 - 163, NR3C1_4 - 47 逻辑回归检验 $P < 0.05$,差异有统计学意义。见表 5。

表 4 甲基化检测片段引物序列信息

目标片段	染色体位置	长度(bp)	引物序列(5' ~ 3')
IGFBP3_1	chr7:45961336 ~ 45961138	199	GGAATTAAATTTTAGAAAGTTTAYGAGGT CACTCCAAACCACCTCAACAC TYGGTTGGGGAGGGTTTTT
IGFBP3_2	chr7:45960153 ~ 45960353	201	AACRCCRCCAACCTCAAATAAAC GGGGTAYGTTGTTTGGTAGGTT CCTAAACCACCCCRACCTCT
IGFBP3_3	chr7:45960753 ~ 45960920	168	GGATTGAGATTAGGAGTGGTTGT TCCAATCCCRAATAACTCAAAAC ATTTAGTGATTTGGTGATTGGATTTT
MTHFR_1	chr1:11866211 ~ 11865947	265	TCTCTCAAAATAAACCTCTACCACCTT GYGAATTTTGTGAAGATGGTGGT CCACAACCACCTCTCTCACCTC
MTHFR_2	chr1:11865629 ~ 11865376	254	TTTTTATTTTGYGAGTTTGTTGTG AATCTCCCATTACCCAATAACAAAC ATTYGGGAGTTTGTTTGTGTTTTT
NR3C1_1	chr5:142785050 ~ 142784881	170	CAACCCCRTAACCCCTTTC GGAGGGAGAGGAAGAGGTTAG AAATACCRCTAAACCRAAAACAACCTC
NR3C1_2	chr5:142783157 ~ 142782953	205	
NR3C1_3	chr5:142783652 ~ 142783828	177	
NR3C1_4	chr5:142782574 ~ 142782730	157	

表 5 CpG 位点甲基化水平显著差异信息

片段	位置	类型	病例组	对照组	OR(95% CI) 值	P 值
IGFBP3_2	143	CG	6.2 ± 2.5	5.3 ± 1.8	1.207 (1.024 ~ 1.423)	0.025
MTHFR_1	36	CG	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.260 (0.077 ~ 0.879)	0.030
MTHFR_1	77	CG	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.257 (0.068 ~ 0.963)	0.044
MTHFR_1	139	CG	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.286 (0.108 ~ 0.759)	0.012
MTHFR_2	42	CG	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.3	3.679 (1.00 ~ 13.511)	0.049
NR3C1_2	163	CG	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.265 (0.078 ~ 0.895)	0.032
NR3C1_4	47	CG	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.140 (0.024 ~ 0.813)	0.028

2.6.3 SNP 位点与甲基化交互作用分析 通过基因表达数量性状定位 (expression quantitative trait loci, eQTL) 作图方法将所有 SNP 分型结果与对应位点基因甲基化水平交互作用进行线性回归分析。共 10 对 SNP 与甲基化位点之间的线性回归检验 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。见表 6。

表 6 SNP 和 CpG 位点间交互作用的 meQTL 分析

SNP	gene	beta	t - stat	P 值
rs3110697	IGFBP3_2 - 106	0.003685037	2.691716501	0.008
rs2453839	IGFBP3_2 - 171	0.007416736	2.601485177	0.010
rs10052957	NR3C1_1 - 68	-0.000705172	-2.220407393	0.028
rs10052957	NR3C1_1 - 144	-0.000943779	-2.241099197	0.027
rs10052957	NR3C1_3 - 65	-0.000817371	-2.916176834	0.004
rs10052957	NR3C1_3 - 51	0.00057689	2.47573142	0.014
rs10052957	NR3C1_4 - 32	-0.001172311	-2.38633154	0.018
rs10052957	NR3C1_4 - 91	0.000697272	2.100263333	0.037
rs1801133	MTHFR_1 - 202	0.000965155	2.077630625	0.040
rs1801133	MTHFR_2 - 85	-0.000579351	-2.660524526	0.009

3 讨论

近年来,糖皮质激素已被认为是引起非创伤性股骨头坏死的首要致病因素^[24]。既往研究^[25]证实,大多数糖皮质激素的作用是由糖皮质激素受体介导的。糖皮质激素受体由激素结合域、DNA 结合结构域和氨基末端区域组成,在糖皮质激素敏感性中起决定作用^[26],其作用的分子机制的改变能改变组织对糖皮质激素的敏感性从而导致耐药或过敏,并引起严重的并发症。股骨头坏死(osteno narosis of the femoral head, ONFH)和低纤维蛋白溶解或血栓形成倾向之间的遗传联系已经被报道过^[27],MTHFR 和血浆纤溶酶原激活抑制剂-1(PAI-1)等凝血相关因子与 ONFH 的发生有关。因此,凝血和血管生成机制也被认为是影响 ONFH 的主要因素。本研究希望通过对 SONFH 相关基因 NR3C1、MTHFR 和 IGFBP3 多态性及 DNA 甲基化水平交互作用的遗传结构研究,探讨该病的发病机理,以期为疾病的诊疗提供依据。

NR3C1 的 rs41423247 多态性是糖皮质激素受体基因外显子 2 内含子 2 连接区下游的 C→G 核苷酸发生变化^[28],与类风湿性关节炎和健康人对外源性糖皮

质激素敏感性的变化有关^[29-30]。本研究中,首次筛选出了 NR3C1_2 - 163 和 NR3C1_4 - 47 2 个显著甲基化水平差异的 CpG 位点,发现 NR3C1 基因 SNPs 与 DNA 甲基化之间具有相关性,表明 NR3C1 基因的表观遗传修饰可与基因多态性产生交互作用,为 SONFH 的发病机制研究提供了新的视角。但没有发现 NR3C1 基因型频率与 SONFH 的易感性关系,这可能与本研究选择的研究对象有关,本研究招募的对照组人员来自同一所医院,但是 SONFH 患者血液标本却是从不同医院获取,在关联分析中受人口混杂因素影响。进一步研究,需要控制地区差异对研究结果的干扰。

MTHFR 的 rs1801133 多态性是由第 677 位点突变导致的,突变导致的酶活性下降可引起同型半胱氨酸水平增高^[31]。同型半胱氨酸会影响创伤愈合、骨骼重塑。Zalavras 等^[32]在 66 例患者的对照研究中报道了非创伤性股骨头坏死的发生率与 rs1801133 基因突变有显著的统计学差异。有研究不支持此结果,韩国的一项包含 443 例 ONFH 患者和 273 名健康受试者的病例对照研究对 15 个 SNPs 进行了基因分析,发现 MTHFR 基因的 rs1801133 多态性与非创伤性股骨头坏死基因易感性之间并没有明显的联系,但作者认为地区和

种族的不同可能影响了个体间的 MTHFR 基因多态性^[33]。Shang 等^[34]对 MTHFR 基因 rs1801133 多态性与 ONFH 的相关性研究进行了进一步的 Meta 分析,发现在亚洲人群中找不到 rs1801133 多态性与 ONFH 的相关性,但是在非洲人群中可以找到与 ONFH 的重要联系,认为 MTHFR 基因的 rs1801133 多态性是非洲人群 ONFH 的主要危险因素。Chai 等^[35]的 Meta 分析对种族进行分层,结果显示 ONFH 易感性和 rs1801133 多态性之间没有直接联系。基于以上研究结果,课题组把 rs1801133 纳入本研究中,单独分析了 ONFH 中的 SONFH,希望可以解释文献报道的 MTHFR 基因与 SONFH 的各种关联。但是本研究结果也与多数研究结果一致,并没有发现 rs1801133 多态性与 SONFH 的显著相关性。需注意,本研究不包括对止血机制的评估,此外,本研究也没有测量同型半胱氨酸水平,rs1801133 多态性可能通过促进血管内凝血导致 SONFH 的假设仍有待证实。但本研究在分析 SNPs 与甲基化水平交互作用时,得出 *MTHFR* 1-36、*MTHFR* 1-77、*MTHFR* 1-139、*MTHFR* 2-42 等位点的甲基化水平差异存在统计学意义。说明在 SONFH 的发生发展中,MTHFR 的表观遗传学可能是连接环境因素和 SONFH 基因相互作用的重要桥梁。

IGFBP3 是 IGF1 在血循环中的主要载体,能够延长 IGF1 在血液循环中的半衰期。IGF1 能够促进骨骼细胞增殖,增加骨骼长度,参与了蛋白质代谢调节,诱导维生素 D 活化^[36]。IGFBP3 在缺氧诱导的血管生成中发挥作用^[37],并且与动脉粥样硬化有关^[38]。有研究观察 IGFBP3 rs2453839 与子宫内膜癌风险关系时,证实 IGFBP3 的遗传变异可能影响白种人的子宫内膜癌风险^[39],涉及到了种族因素。Hong 等^[40]采用 Affymetrix 靶向基因分型 3K 芯片阵列对 460 例 ONFH 患者和 300 例对照者进行了相关研究,发现韩国人群中 IGFBP3 基因的 SNPs 与 ONFH 风险增加有关;rs2453839 在隐性模型中与酒精诱发的 ONFH 和特发性 ONFH 有显著相关性;携带 rs2453839 的小纯合子等位基因(CC)的受试者有较高的 ONFH 发病风险。Song 等^[41]纳入 ONFH 临床分期,得出与正常对照组相比,SONFH 组 IGFBP3 rs2453839 TT 和 CT 频率分别呈上升和下降趋势;多态性与临床表型的关联分析表明 IGFBP3 基因 rs2453839 TT 型 SONFH 患者的病程明显短于 CT+CC 携带者。Ⅲ/Ⅳ期双侧髋部病变组 CT+CC 基因型频率显著高于Ⅲ/Ⅳ期单侧病变组和Ⅱ/Ⅲ期双侧病变组。另一项对照研究中,IGFBP3 基因

rs3110697 和 rs2453839 的主要模型与 ONFH 的风险增加显著相关,rs2453839 的基因型也与临床分期密切相关;与对照组相比,ONFH 组中 IGF1 的统计量增加了,血清三酰甘油和低密度脂蛋白胆固醇水平相较于对照组明显升高,但血清高密度脂蛋白胆固醇水平相较于对照组则明显降低^[42]。因此,本研究认为 IGFBP3 基因多态性可能影响血液循环,损害股骨头,进一步导致 SONFH。在本研究中,证实了 IGFBP3 基因的 rs3110697 多态性与中国汉族人群 SONFH 的发生有关。与对照组相比,rs3110697 的 A/G 基因型携带者患病风险较低;在隐性遗传模型中,rs3110697 的 A 等位基因携带者的患病风险也较低。本研究发现 CpG 位点 *IGFBP3* 2-143 可能与 IGFBP3 基因多态性有相互作用,从而影响 SONFH 的发生;但没有发现 rs2453839 多态性与 SONFH 的相关性。

综上所述,SONFH 是一个多基因遗传病,涉及激素受体、代谢转运、氧化应激、遗传、神经突触、脂质及骨代谢等多种机制,本研究首次证实了在中国汉族人群中 NR3C1、MTHFR 和 IGFBP3 基因的表观遗传修饰可与遗传基因多态性产生交互作用影响 SONFH,基于对该病的遗传结构特征的研究可以准确把握该疾病的发展规律。

本研究也存在一些局限性。首先,本研究不包括生物学功能的分析,这对阐明 NR3C1、MTHFR 和 IGFBP3 基因在 SONFH 的作用至关重要。另外,糖皮质激素治疗病例中的骨坏死并不意味着单纯的糖皮质激素可能导致它。应考虑所有可能的风险因素,如基础疾病,因为在大多数情况下,这是导致 SONFH 的累积效应^[43]。其次,SONFH 还需要分为不同的临床分期进行进一步分析。再次,本研究的病例组与对照组人员都是自合肥及周边地区招募的汉族人口,这可能存在区域选择偏差。最后,本研究纳入的病例组与对照组平均年龄差异较明显,可能存在结果误差。进一步的功能性研究和更大规模的病例对照研究有望避免这些问题,使本研究的结论更具有说服力。

参考文献

[1] CHANG C, GREENSPAN A, GERSHWIN M E. The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis [J]. J Autoimmun, 2020(110): 102460.
[2] CUI L, ZHUANG Q, LIN J, et al. Multicentric epidemiologic study on six thousand three hundred and ninety five cases of femoral head osteonecrosis in China [J]. Int Orthop, 2016, 40(2): 267-276.

- [3] UITTO J. Genetic susceptibility to alopecia[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(9): 873–876.
- [4] WAN E S. Examining genetic susceptibility in acute exacerbations of COPD[J]. *Thorax*, 2018, 73(6): 507–509.
- [5] HADJIGEORGIOU G, DARDIOTIS E, DARDIOTI M, et al. Genetic association studies in osteonecrosis of the femoral head: mini review of the literature [J]. *Skeletal Radiol*, 2008, 37(1): 1–7.
- [6] NORDKAP L, ALMSTRUP K, NIELSEN J E, et al. Possible involvement of the glucocorticoid receptor (NR3C1) and selected NR3C1 gene variants in regulation of human testicular function[J]. *Andrology*, 2017, 5(6): 1105–1114.
- [7] UKKOLA O, PÉRUSSE L, CHAGNON Y C, et al. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Québec Family Study[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001, 25(9): 1332–1339.
- [8] ROSMOND R, CHAGNON Y C, HOLM G, et al. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis[J]. *Obes Res*, 2000, 8(3): 211–218.
- [9] LIU J, WAN Z, SONG Q, et al. NR3C1 gene polymorphisms are associated with steroid resistance in patients with primary nephrotic syndrome[J]. *Pharmacogenomics*, 2018, 19(1): 45–60.
- [10] MONK C, FENG T, LEE S, et al. Distress during pregnancy: epigenetic regulation of placenta glucocorticoid–related genes and fetal neurobehavior[J]. *Am J Psychiatry*. 2016, 173(7): 705–713.
- [11] YEHUDA R, DASKALAKIS N P, LEHRNER A, et al. Influences of maternal and paternal PTSD on epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor gene in Holocaust survivor offspring[J]. *Am J Psychiatry*, 2014, 171(8): 872–880.
- [12] STEIGER H, LABONTÉ B, GROLEAU P, et al. Methylation of the glucocorticoid receptor gene promoter in bulimic women: associations with borderline personality disorder, suicidality, and exposure to childhood abuse[J]. *Int J Eat Disord*, 2013, 46(3): 246–255.
- [13] DAMMANN G, TESCHLER S, HAAG T, et al. Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(12): 1454–1462.
- [14] KOH J M, LEE Y S, KIM Y S, et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7): 1003–1011.
- [15] WANG L, YANG B, ZHOU S, et al. Risk factors and methylenetetrahydrofolate reductase gene in congenital heart disease[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(1): 441–447.
- [16] FROEET P, BLOM H J, MILOS R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[J]. *Nat Genet*, 1995, 10(1): 111–113.
- [17] MANDAVIYA P R, STOLK L, HEIL S G. Homocysteine and DNA methylation: a review of animal and human literature[J]. *Mol Genet Metab*, 2014, 113(4): 243–252.
- [18] FENG X, HUANG D, LU X, et al. Insulin–like growth factor 1 can promote proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via mTOR pathway[J]. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(9): 615–624.
- [19] MOHANRAJ L, KIM H S, LI W, et al. IGFBP–3 inhibits cytokine–induced insulin resistance and early manifestations of atherosclerosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55084.
- [20] KATO N, LOH M, TAKEUCHI F, et al. Trans–ancestry genome–wide association study identifies 12 genetic loci influencing blood pressure and implicates a role for DNA methylation[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(11): 1282–1293.
- [21] HUANG R, ZHAN Q, HU W, et al. Association of ABCB1 and CYP450 gene polymorphisms and their DNA methylation status with steroid–induced osteonecrosis of the femoral head in the Chinese population [J]. *Genet Test Mol Biomark*, 2020, 24(12): 789–797.
- [22] ROTH A, BECKMANN J, BOHNDORF, et al. S3–Guideline non–traumatic adult femoral head necrosis [J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2016, 136: 165–174.
- [23] 中国医师协会, 骨科医师分会肾循环与骨坏死专业委员会, 中华医学会骨科学分会肾显微修复学组, 等. 《中国成人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)》[J]. *中华骨科杂志*, 2020(20): 1365–1376.
- [24] KERACHIAN M A, SÉGUIN C, HARVEY E J. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 114(3/5): 121–128.
- [25] NICOLAIDES N C, GALATA Z, KINO T, et al. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function[J]. *Steroids*, 2010, 75(1): 1–12.
- [26] BAMBERGER C M, BAMBERGER A M, D E CASTRO M, et al. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(6): 2435–2441.
- [27] GAGALA J, BURACZYNSKA M, MAZURKIEWICZ T, et al. Prevalence of genetic risk factors related with thrombophilia and hypofibrinolysis in patients with osteonecrosis of the femoral head in Poland[J]. *BMC Musculoskelet Disord*,

- 2013, 14: 264.
- [28] VAN ROSSUM E F, LAMBERTS S W. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition[J]. *Recent Prog Horm Res*, 2004, 59: 333 – 357.
- [29] VAN ROSSUM E F, KOPER J W, VAN DEN BELD A W, et al. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 59(5): 585 – 592.
- [30] DERIJK R H, SCHAAF M J, TURNER G, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta – isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2001, 28(11): 2383 – 2388.
- [31] ZHU X Y, HOU R Y, PAN X D, et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and ischemic stroke in the Chinese population: a meta – analysis [J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(12): 885 – 894.
- [32] ZALAVRAS C G, MALIZOS K N, DOKOU E, et al. The 677C – >T mutation of the methylene – tetrahydrofolate reductase gene in the pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head[J]. *Haematologica*, 2002, 87(1): 111 – 112.
- [33] KIM T H, HONG J M, KIM H J, et al. Lack of association of MTHFR gene polymorphisms with the risk of osteonecrosis of the femoral head in a Korean population[J]. *Mol Cells*, 2010, 29(4): 343 – 348.
- [34] SHANG X F, SU H, CHANG W W, et al. Association between MTHFR C677T polymorphism and osteonecrosis of the femoral head: a meta – analysis[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(6): 7089 – 7094.
- [35] CHAI W, ZHANG Z, NI M, et al. Genetic association between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 196495.
- [36] DUCHÉN K, LINDBERG A, KIPLOK K, et al. Using a spontaneous profile rather than stimulation test makes the KIGS idiopathic growth hormone deficiency model more accessible for clinicians[J]. *Acta Paediatr*, 2017, 106(9): 1481 – 1486.
- [37] GRANATA R, TROVATO L, LUPIA E, et al. Insulin – like growth factor binding protein – 3 induces angiogenesis through IGF – I – and SphK1 – dependent mechanisms[J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(4): 835 – 845.
- [38] JONES J I, CLEMMONS D R. Insulin – like growth factors and their binding proteins: biological actions [J]. *Endocr Rev*, 1995, 16(1): 3 – 34.
- [39] MCGRATH M, LEE I M, BURING J, et al. Common genetic variation within IGFI, IGFII, IGFBP – 1, and IGFBP – 3 and endometrial cancer risk[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 120(2): 174 – 178.
- [40] HONG J M, KIM T H, KIM H J, et al. Genetic association of angiogenesis – and hypoxia – related gene polymorphisms with osteonecrosis of the femoral head[J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42(5): 376 – 385.
- [41] SONG Y, DU Z W, LI Q J, et al. Association of sterol regulatory element binding protein 2 and insulin – like growth factor binding protein 3 genetic polymorphisms with avascular necrosis of the femoral head in the Chinese population[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(22): 4037 – 4043.
- [42] SONG Y, DU Z, YANG Q, et al. Associations of IGFBP3 Gene Polymorphism and Gene Expression with the Risk of Osteonecrosis of the Femoral Head in a Han Population in Northern China[J]. *DNA Cell Biol*, 2016, 35(12): 836 – 844.
- [43] BIRLA V, VAISH A, VAISHYA R. Risk factors and pathogenesis of steroid – induced osteonecrosis of femoral head – a scoping review[J]. *Clin Orthop Trauma*, 2021(23): 101643.

(2022 – 07 – 18 收稿)

(本文编校:张迪,崔月婷)