

· 临床研究 ·

血管内皮生长因子受体 1 基因单核苷酸多态性及吸烟与宁夏地区汉族、回族年龄相关性黄斑变性的相关性

向伟 迟昊 薛中淇 张雯 盛迅伦 庄文娟

750004 银川,宁夏医科大学临床医学院(向伟、迟昊、薛中淇、张雯);750001 银川,宁夏回族自治区人民医院眼科 宁夏眼科医院(盛迅伦、庄文娟)

通信作者:庄文娟,Email:zh_wenj@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.012

【摘要】 **背景** 年龄相关性黄斑变性(AMD)是引起中心视力进行性退变的一类遗传病。研究证明,在不同群体中,血管内皮生长因子受体 1(VEGFR1)基因多态性和 AMD 的发生有关联,但这些结果在不同的种族和地区却不相同。**目的** 探讨 VEGFR1 基因单核苷酸多态性(SNPs)及吸烟与宁夏地区汉族、回族 AMD 的关联。**方法** 本研究采取病例对照关联分析的方法,收集 2011 年 3 月至 2015 年 6 月宁夏地区无亲缘关系的 AMD 患者 432 例作为 AMD 组,其中汉族 325 例,回族 107 例,并纳入同期中度年龄相关性白内障患者 906 例作为对照组,其中汉族 698 例,回族 208 例。采集所有受检者静脉血 5 ml,提取全基因组 DNA,筛选出 VEGFR1 基因上 rs2281827、rs3936415、rs7337610、rs7981680、rs9554320、rs9554322、rs9582036 和 rs9943922 共 8 个标签 SNPs,利用 MassARRAY™ 飞行时间质谱系统对受检者各 SNPs 基因型进行分型。采用卡方检验和多元 Logistic 回归分析法分析和比较汉族与回族 AMD 患者各位点等位基因频率及基因型频率分布情况。**结果** 宁夏地区汉族与回族 AMD 组与对照组间年龄比较差异均有统计学意义(汉族: $P=0.000$;回族: $P=0.009$);汉族 AMD 组与对照组间吸烟患者比例差异有统计学意义($P=0.000$),吸烟是宁夏地区汉族 AMD 发病的风险因素[优势比(OR)=2.622,95% 可信区间(CI):1.899~3.619]。汉族和回族间 AMD 患者各 SNPs 位点等位基因频率比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),各种族 AMD 组与对照组间 rs7337610 和 rs9554322 SNPs 基因型分布及等位基因频率的比较差异均有统计学意义(均 $P=0.00$),在汉族 AMD 组与对照组间 rs9582036 和 rs9943922 基因型分布比较差异均有统计学意义($P=0.002,0.00$)。回族 AMD 组与对照组间 rs7337610、rs9554322 基因型分布及等位基因频率分布差异均有统计学意义(均 $P=0.00$),其中 rs7337610 的 C 等位基因是汉族和回族 AMD 发病的保护因素($OR=0.354,95\% CI:0.288\sim 0.435$; $OR=0.446,95\% CI:0.315\sim 0.632$),而 rs9554322 位点的 C 等位基因是汉族和回族 AMD 发病的危险因素($OR=1.671,95\% CI:1.234\sim 2.262$; $OR=3.661,95\% CI:2.156\sim 6.218$),rs9582036 位点 A 等位基因是汉族 AMD 患病的危险因素($OR=1.477,95\% CI:1.124\sim 1.940$)。**结论** 吸烟是宁夏汉族人群 AMD 发病的独立环境危险因素。rs9554322 和 rs7337610 SNPs 与汉族和回族 AMD 发病有关联,而 rs9582036 及 rs9943922 SNPs 仅与汉族 AMD 发病有关联。

【关键词】 血管内皮生长因子受体 1/基因;年龄相关性黄斑变性/民族;单核苷酸多态性/基因;危险因素;优势比;遗传易感性疾病;等位基因;吸烟/不利影响;病例对照研究

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 973 课题项目(2011CB510200);国家自然科学基金项目(81460093);宁夏自治区对外科技合作项目(2014ZYH65)

Associations of single nucleotide polymorphisms of VEGFR1 and smoking with age-related macular degeneration in Hui and Han populations from Ningxia region in China Xiang Wei, Chi Hao, Xue Zhongqi, Zhang Wen, Sheng Xunlun, Zhuang Wenjuan

School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China (Xiang W, Chi H, Xue ZQ, Zhang W); Ningxia Eye Hospital, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750001, China (Sheng XL, Zhuang WJ)

Corresponding author: Zhuang Wenjuan, Email: zh_wenj@163.com

【Abstract】 **Background** Age-related macular degeneration (AMD) is a heritable, progressive degenerative disorder that triggers central visual impairment. Research demonstrated that the single nucleotide polymorphisms

(SNPs) of vascular endothelial growth factor 1 (*VEGFR1*) gene is associated with AMD in different population. However, the results varied among diversified ethnic origin composition and distinct regions. **Objective** This study was to investigate the associations between the SNPs of *VEGFR1* genetic variants along with smoking exposure and the risk of AMD in Hui and Han ethnics in the Ningxia population in China. **Methods** A case-control study was conducted. Four hundreds and thirty-two AMD patients including 325 Han ethnic patients and 107 Hui ethnic patients were recruited from March 2011 to June 2015, and 906 ethnicity-and gender-matched age-related cataract patients were contemporaneously recruited as control group, including 698 Han ethnic patients and 208 Hui ethnic patients. Periphery blood sample of 5 ml was collected from the subjects and genomic DNA was prepared. Eight tagging SNPs loci were acquired to cover rs2281827, rs3936415, rs7337610, rs7981680, rs9554320, rs9554322, rs9582036 and rs9943922, and the genotypes of SNPs were detected by using MassARRAY™ time-of-flight mass spectrometry system. Chi-square test and multi-factor Logistic regression analysis were utilized to estimate the discrepancy of allele frequency and genotype distribution in Hui and Han AMD patients. Moreover, the correlation of AMD with smoking and age statue were further analyzed. This study protocol complied with Helsinki Declaration and was approved by Ethic Committee of Ningxia Eye Hospital. Written informed consent was obtained before any relevant medical examination. **Results** There were significant differences in the age between AMD group and control group in both Han and Hui ethnicity (Han: $P=0.000$; Hui: $P=0.009$). The smoking exposure was significantly different between AMD group and control group in Han ethnicity ($P=0.000$), and smoking was the independent risk factor of AMD disease in Han ethnicity of Ningxia region (odds ratio [OR] = 2.622, 95% confidence interval [CI]: 1.899–3.619). The allele frequencies of SNPs were not significantly different in the AMD patients between Han and Hui ethnicity (all at $P>0.05$). However, the allele frequencies and genotype distribution of rs7337610 and rs9554322 SNPs were significantly different between the AMD group and control group in both Han and Hui ethnicity (all at $P=0.00$). The genotype distribution of rs9582036 and rs9943922 SNPs was significantly different between the AMD group and control group in Han ethnicity ($P=0.02, 0.00$). Allelic G of rs7337610 was the protective factor of AMD disease in Han and Hui ethnicity (OR = 0.354, 95% CI: 0.288–0.435; OR = 0.446, 95% CI: 0.315–0.632), while allelic C of rs9554322 was the risk factor of AMD disease in Han and Hui ethnicity (OR = 1.671, 95% CI: 1.234–2.262; OR = 3.661, 95% CI: 2.156–6.218). Allelic A of rs9582036 was the risk factor of AMD disease in Han ethnicity (OR = 1.477, 95% CI: 1.124–1.940). **Conclusions** Smoking is the independent risk component for Han population with AMD. Of the eight SNPs tagged, the genotypes and alleles of rs9554322 and rs7337610 seems to confer susceptibility to AMD in both Han and Hui ethnicity, the genotypes and alleles of rs9582036 and rs9943922 confer susceptibility to AMD in only Han ethnicity.

[Key words] Vascular endothelial growth factor receptor-1/genetics; Macular degeneration/ethnology; Polymorphism, single nucleotide/genetics; Risk factors; Odds ratio; Genetic predisposition to disease; Alleles; Smoking/adverse effect; Case-control studies

Fund program: National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (2011CB510200); National Natural Science Foundation of China (81460093); Foreign Science and Technology Exchange Projects of Ningxia Hui Autonomous Region (2014ZYH65)

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是发达国家老年人主要的致盲眼病^[1], 主要累及黄斑区, 视网膜色素上皮层与脉络膜之间可发现大量玻璃膜疣及新生血管。流行病学研究结果显示, 种族、年龄和吸烟是 AMD 的确定危险因素^[2]。AMD 是一种基因和环境危险因素共同作用的多基因遗传病, 其相关基因多态性在连锁分析及关联分析中取得了很大的进展^[3]。血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor, VEGF/VEGFR) 信号通路与 AMD 的发病过程密切相关。近年来, 随着抗 VEGF 药物在 AMD 治疗中的广泛应用, VEGF/VEGFR 通路相关基因多态性逐渐成为研究热点。VEGFR1 较其他受体有多个磷酸化结合位点, 其

不仅可通过 VEGF, 还可通过 VEGFR1 的特异性配体胎盘生长因子 (placenta growth factor, PlGF) 介导病理性血管的生成^[4]。更有学者认为, 新生血管性 AMD 的本质为非新生血管性 AMD 的晚期发展阶段^[5]。对 4 个不同种族 AMD 患者的多中心研究发现, *VEGFR1* 基因的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点和 AMD 存在显著的相关性^[6]。AMD 存在遗传异质性, 但目前相关研究较少。本研究中以宁夏地区汉族和回族 AMD 人群为研究对象, 通过标签 SNPs 的策略选取了 8 个 SNPs 位点进行基因分型研究, 探讨其与 AMD 的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用病例-对照关联研究的设计方法。按照国际上通用的年龄相关性研究 (Age-Related Eye Disease Study, AREDS) 分级标准^[7], 于 2011 年 3 月至 2015 年 6 月纳入在宁夏眼科医院就诊的 432 例 AMD 患者为 AMD 组, 其中汉族 325 例, 回族 107 例。AMD 组排除标准: 患超高度近视性黄斑出血、卵黄样黄斑变性、视网膜动静脉阻塞、特发性视网膜脉络膜炎、非增生性及增生性糖尿病视网膜病变、各种类型的青光眼及严重白内障等者。同时纳入同期在宁夏眼科医院治疗的中度年龄相关性白内障患者 906 例作为对照组, 其中汉族 698 例, 回族 208 例。对照组排除标准: 患高度近视、青光眼及其他眼部疾病者; 患全身血液系统疾患、肝肾功能不全、良性或恶性肿瘤及其他器官严重疾病者。本研究所有入选者均进行全面的眼科检查, 包括裸眼视力、最佳矫正视力 (best corrected visual acuity, BCVA)、眼压、裂隙灯显微镜检查、彩色眼底照相。彩色眼底照相提示疑似 AMD 的患者需进一步接受荧光素眼底血管造影、吲哚青绿血管造影及 OCT 检查, 并由 2 名以上眼底病医师分别进行诊断。本研究方案经宁夏眼科医院伦理委员会批准 (编号: 510200), 遵循赫尔辛基宣言, 受检者知晓本研究目的并签署知情同意书。

1.2 受检者 DNA 采集和 VEGFR1 基因多态位点的筛选及分型

采集所有受检者肘静脉血 5 ml, 采用 DNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 提取全部受检者基因组 DNA。依据国际人类基因组单体型图计划 (HapMap) 数据库中提供的中国汉族人群信息, 利用 Haploview 4.2 软件的 Tagger 功能对 VEGFR1 基因已知的编码区及启动子区进行 SNP 位点的筛选, 设定参数 r^2 阈值为 0.8, 最小等位基因频率阈值为 0.1, 最终筛选出 8 个 SNPs: rs2281827、rs3936415、rs7337610、rs7981680、rs9554320、rs9554322、rs9582036 和 rs9943922。由北京基因组研究所采用 MassARRAYTM 飞行时间质谱系统 (美国 Sequenom 公司) 对所有获得的 SNPs 进行分型检测, 并由 MassARRAY 的 Typer 软件完成最终基因分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件 (序列号 BE2G3NCDJ53 XKCMW3HWAN72MBGPSWEEVUFNAWVZG352OYD, 美国 IBM 公司) 对数据进行统计分析。采用拟合优度卡方检验分析 AMD 组与对照组各多态位点基因型是否符合 Hardy-Weinberg 平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE); 本研究中连续型计量数据经 Levene 检验呈正

态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 采用 Pearson 卡方检验分析各组间 SNPs 位点基因型分布和相应等位基因频率的差异; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用多因素 Logistic 回归模型在校正年龄和/或吸烟因素后进行关联研究, 分别计算各 SNPs 位点基因型和等位基因的优势比 (odds ratio, OR) 及 95% 可信区间 (confidence interval, CI); 多重比较采用 Bonferroni 检验, $P < 0.006$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

432 例 AMD 患者中, 汉族 325 例, 占 75.2%, 平均年龄 (70.34 ± 8.57) 岁; 回族 107 例, 占 24.8%, 平均年龄 (68.08 ± 8.79) 岁。汉族患者中男 166 例, 占 51.1%, 女 159 例, 占 48.9%; 回族患者中男 61 例, 占 57%, 女 46 例, 占 53%。对照组 906 例中汉族 698 例, 平均年龄 (72.67 ± 7.41) 岁; 回族 208 例, 平均年龄 (70.65 ± 6.96) 岁。汉族对照者中男 323 例, 占 46.3%, 女 375 例, 占 53.7%; 回族对照者中男 108 例, 占 51.9%, 女 100 例, 占 48.1%。

2.2 环境危险因素和 AMD 关联分析

汉族 AMD 组与对照组间患者不同性别比例差异无统计学意义 (均 $P = 0.152$), 但 AMD 组患者年龄低于对照组, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$), AMD 组吸烟的比例高于对照组, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$, OR = 2.622, 95% CI: 1.899 ~ 3.619) (表 1)。回族 AMD 患者的年龄低于其对照组, 差异有统计学意义 ($P = 0.009$), 而 2 个组间性别和吸烟患者的比例差异均无统计学意义 ($P = 0.391, 0.198$) (表 2)。

表 1 汉族 2 个组间受检者年龄、性别及吸烟比例的差异比较

组别	例数	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁) ^a	性别 [n(%)] ^b		是否吸烟 [n(%)] ^b	
			男	女	否	是
AMD 组	325	70.34 ± 8.57	166 (51.1)	159 (48.9)	230 (70.8)	95 (29.2)
对照组	698	72.67 ± 7.41	323 (46.3)	375 (53.7)	603 (86.4)	95 (13.6)
<i>P</i>		0.000	0.152		0.000	

注: AMD: 年龄相关性黄斑变性 (a: 独立样本 t 检验; b: χ^2 检验)

表 2 回族 2 个组间受检者年龄、性别及吸烟比例的差异比较

组别	例数	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁) ^a	性别 [n(%)] ^b		是否吸烟 [n(%)] ^b	
			男	女	否	是
AMD 组	107	68.08 ± 8.79	61 (57.0)	46 (43.0)	102 (95.3)	5 (4.7)
对照组	208	70.65 ± 6.96	108 (51.9)	100 (48.1)	190 (91.3)	18 (8.7)
<i>P</i>		0.009	0.391		0.198	

注: AMD: 年龄相关性黄斑变性 (a: 独立样本 t 检验; b: χ^2 检验)

2.3 各 SNPs 和 AMD 关联性分析

8 个 *VEGFRI* SNPs 中,所有研究对象基因型分布均符合 HWE。在分析受检者各 SNPs 位点与 AMD 的关联性时,年龄和/或吸烟因素被视为混杂因素进行校正。

不同种族 AMD 患者间等位基因频率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$) (表 3)。汉族 AMD 组与对照组间 rs7337610、rs9554322、rs9943922 及 rs9582036 基因型频率比较差异均有统计学意义 ($P = 0.00、0.00、0.00、0.02$), rs7337610、rs9554322 及 rs9582036 位点等位基因频率的比较差异均有统计学意义 ($P = 0.00、$

$0.00、0.02$)。rs7337610 位点 T 等位基因是 AMD 患病的保护因素 ($OR = 0.354, 95\% CI: 0.288 \sim 0.435$), rs9554322 位点 C 等位基因及 rs9582036 位点 A 等位基因是 AMD 患病的危险因素 ($OR = 1.671, 95\% CI: 1.234 \sim 2.262; OR = 1.477, 95\% CI: 1.124 \sim 1.940$)。回族 AMD 组与对照组间 rs7337610、rs9554322 基因型频率及等位基因频率分布差异均有统计学意义(均 $P = 0.00$),其中 rs7337610 的 T 等位基因是 AMD 发病的保护因素 ($OR = 0.446, 95\% CI: 0.315 \sim 0.632$), 而 rs9554322 位点的 C 等位基因是 AMD 发病的危险因素 ($OR = 3.661, 95\% CI: 2.156 \sim 6.218$) (表 4, 5)。

表 3 不同种族 AMD 患者间等位基因频率的比例 [n (%)]

组别	例数	rs2281827		rs3936415		rs7337610		rs7981680	
		G	A	A	G	T	C	G	C
回族	214	142 (67.6)	68 (32.4)	41 (19.3)	171 (80.7)	131 (63.0)	77 (37.0)	10 (4.8)	198 (95.2)
汉族	650	455 (72.7)	171 (27.3)	129 (20.4)	503 (79.6)	429 (67.9)	550 (42.0)	37 (5.8)	597 (94.2)
<i>P</i>		0.160		0.736		0.225		0.575	

组别	例数	rs9554320		rs9554322		rs9582036		rs9943922	
		A	C	G	C	A	C	T	C
回族	214	43 (21.3)	159 (78.7)	78 (23.5)	254 (76.5)	147 (81.7)	33 (18.3)	99 (46.3)	115 (53.7)
汉族	650	160 (25.5)	468 (74.5)	200 (24.4)	620 (75.6)	448 (81.2)	104 (18.8)	306 (47.2)	342 (52.8)
<i>P</i>		0.228		0.820		0.880		0.807	

注:AMD:年龄相关性黄斑变性 (Pearson χ^2 检验)

表 4 汉族 AMD 组和对照组各位点等位基因和基因型频率的分布 [n (%)]

组别	例数	rs2281827								
		基因型			<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> _{校正}
		GG	GA	AA	GA/AA vs. GG		G	A	A vs. G	
AMD 组	325	163 (52.1)	129 (41.2)	21 (6.7)	1.186 (0.885-1.589)	0.511	455 (72.7)	171 (27.3)	1.120 (0.896-1.400)	0.321
对照组	698	349 (55.2)	243 (38.4)	40 (6.3)	1.133 (0.635-2.019)		941 (74.4)	323 (25.6)	-	
χ^2					0.92				0.74	
<i>P</i>					0.63				0.39	

组别	例数	rs3936415								
		基因型			<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> _{校正}
		AA	AG	GG	AG/GG vs. AA		A	G	G vs. A	
AMD 组	325	12 (3.8)	105 (33.2)	199 (63.0)	1.683 (0.812-3.487)	0.374	129 (20.4)	503 (79.6)	1.058 (0.829-1.350)	0.652
对照组	698	33 (5.3)	197 (31.9)	387 (62.7)	1.566 (0.772-3.179)		263 (21.3)	971 (78.7)	-	
χ^2					1.18				0.14	
<i>P</i>					0.55				0.71	

组别	例数	rs7337610								
		基因型			<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> _{校正}
		TT	TC	CC	TC/CC vs. TT		T	C	C vs. T	
AMD 组	325	150 (47.5)	129 (40.8)	37 (11.7)	0.332 (0.240-0.460)	0.000	429 (67.9)	550 (42.0)	0.354 (0.288-0.435)	0.000
对照组	698	116 (17.7)	318 (48.5)	221 (33.7)	0.137 (0.089-0.212)		203 (32.1)	760 (58.0)	-	
χ^2					17.06				10.54	
<i>P</i>					0.00				0.00	

(续表 4)

		rs7981680								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	P _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	P _{校正}
		GG	GC	CC	GC/CC vs. GG		G	C	C vs. G	
AMD 组	325	0(0)	37(11.7)	280(88.3)	-	0.976	37(5.8)	597(94.2)	1.131(0.752-1.703)	0.554
对照组	698	5(0.7)	76(11.2)	597(88.1)	-		86(6.3)	1270(93.7)	-	
χ^2				2.36					0.23	
P				0.31					0.63	

		rs9554320								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	P _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	P _{校正}
		AA	AC	CC	AC/CC vs. AA		A	C	C vs. A	
AMD 组	325	24(7.6)	112(35.7)	178(56.7)	0.403(0.210-0.773)	0.010	160(25.5)	468(74.5)	0.770(0.611-0.971)	0.027
对照组	698	20(3.2)	224(35.8)	381(61.0)	0.374(0.198-0.704)		264(21.1)	986(78.9)	-	
χ^2				9.43					4.21	
P				0.01					0.04	

		rs9554322								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	P _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	P _{校正}
		GG	GC	CC	GC/CC vs. GG		G	C	C vs. G	
AMD 组	325	18(4.4)	164(40.0)	228(55.6)	5.190(2.318-11.618)	0.000	200(24.4)	620(75.6)	1.671(1.234-2.262)	0.001
对照组	698	88(17.9)	166(33.7)	238(48.4)	4.962(2.258-10.905)		342(34.8)	642(65.2)	-	
χ^2				88.94					11.16	
P				0.00					0.00	

		rs9582036								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	P _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	P _{校正}
		AA	AC	CC	AC/CC vs. AA		A	C	C vs. A	
AMD 组	325	186(67.4)	76(27.5)	14(5.1)	3.435(1.543-7.650)	0.006	448(81.2)	104(18.8)	1.477(1.124-1.940)	0.005
对照组	698	457(73.6)	152(24.5)	12(1.9)	1.251(0.897-1.745)		1066(85.8)	176(14.2)	-	
χ^2				7.97					5.79	
P				0.02					0.02	

		rs9943922								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	P _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	P _{校正}
		TT	TC	CC	TC/CC vs. TT		T	C	C vs. T	
AMD 组	325	89(27.5)	128(39.5)	107(33.0)	0.656(0.468-0.920)	0.001	306(47.2)	342(52.8)	1.114(0.919-1.350)	0.273
对照组	698	156(22.9)	360(52.9)	165(24.2)	1.189(0.824-1.716)		672(49.3)	690(50.7)	-	
χ^2				15.60					0.85	
P				0.00					0.36	

注: AMD: 年龄相关性黄斑变性; OR: 优势比; CI: 可信区间; -: 未进行统计分析; OR, 95% CI 及 P_{校正} 值均校正了年龄及吸烟因素(χ^2 检验, Logistic 回归)

表 5 回族 AMD 组和对照组各位点等位基因和基因型频率的分布 [n(%)]

		rs2281827								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	P _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	P _{校正}
		GG	GA	AA	GA/AA vs. GG		G	A	A vs. G	
AMD 组	107	47(44.8)	48(45.7)	10(9.5)	1.446(0.872-2.399)	0.342	142(67.6)	68(32.4)	1.275(0.880-1.847)	0.198
对照组	208	104(53.6)	76(39.2)	14(7.2)	1.373(0.560-3.364)		284(73.2)	104(26.8)	-	
χ^2				2.41					2.20	
P				0.30					0.14	

		rs3936415								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	P _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	P _{校正}
		AA	AG	GG	AG/GG vs. AA		A	G	G vs. A	
AMD 组	107	3(2.8)	35(33.0)	68(64.2)	1.402(0.334-5.894)	0.882	41(19.3)	171(80.7)	1.076(0.699-1.658)	0.738
对照组	208	7(4.0)	60(33.9)	110(62.1)	1.433(0.351-5.842)		74(20.9)	280(79.1)	-	
χ^2				0.27					0.13	
P				0.87					0.71	

(续表 5)

		rs7337610								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}
		TT	TC	CC	TC/CC vs. TT		T	C	C vs. T	
AMD 组	107	43 (41.3)	45 (43.3)	16 (15.4)	0.383(0.216-0.679)	0.000	131 (63.0)	77 (37.0)	0.446(0.315-0.632)	0.000
对照组	208	36 (18.1)	100(50.3)	63(31.7)	0.211(0.103-0.431)		172 (43.2)	226 (56.8)	-	
χ^2					11.43				13.58	
<i>P</i>					0.00				0.00	
		rs7981680								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}
		GG	GC	CC	GC/CC vs. GG		G	C	C vs. G	
AMD 组	107	0(0)	10(9.6)	94(90.4)	-	0.603	10(4.8)	198(95.2)	0.811(0.361-1.823)	0.612
对照组	208	0(0)	17(8.3)	189(91.7)	-		17(4.1)	395(95.9)	-	
χ^2					0.16				0.15	
<i>P</i>					0.69				0.70	
		rs9554320								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}
		AA	AC	CC	AC/CC vs. AA		A	C	C vs. A	
AMD 组	107	4(4.0)	35(34.7)	62(61.4)	1.684(0.478-5.927)	0.616	43(21.3)	159(78.7)	0.954(0.627-1.451)	0.826
对照组	208	11(5.3)	63(30.6)	132(64.1)	1.378(0.405-4.685)		85(20.6)	327(79.4)	-	
χ^2					0.14				0.14	
<i>P</i>					0.71				0.71	
		rs9554322								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}
		GG	GC	CC	GC/CC vs. GG		G	C	C vs. G	
AMD 组	107	6(3.6)	66(39.8)	94(56.6)	6.022(1.549-23.410)	0.000	78(23.5)	254(76.5)	3.661(2.156-6.218)	0.000
对照组	208	28(27.5)	52(51.0)	22(21.6)	20.424(4.908-83.484)		108(52.9)	96(47.1)	-	
χ^2					107.37				189.60	
<i>P</i>					0.00				0.00	
		rs9582036								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}
		AA	AC	CC	AC/CC vs. AA		A	C	C vs. A	
AMD 组	107	60(66.7)	27(30.0)	3(3.3)	1.919(0.339-10.867)	0.361	147(81.7)	33(18.3)	1.420(0.874-2.308)	0.157
对照组	208	139(73.2)	48(25.3)	3(1.6)	1.456(0.820-2.586)		326(85.8)	54(14.2)	-	
χ^2					1.62				1.45	
<i>P</i>					0.44				0.23	
		rs9943922								
组别	例数	基因型			OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}	等位基因		OR(95% CI)	<i>P</i> _{校正}
		TT	TC	CC	TC/CC vs. TT		T	C	T vs. C	
AMD 组	107	22(20.6)	55(51.4)	30(28.0)	1.346(0.737-2.458)	0.587	99(46.3)	115(53.7)	1.159(0.828-1.621)	0.390
对照组	208	53(26.0)	101(49.5)	50(24.5)	1.357(0.686-2.684)		207(50.7)	201(49.3)	-	
χ^2					1.30				1.11	
<i>P</i>					0.52				0.29	

注:AMD:年龄相关性黄斑变性;OR:优势比;CI:可信区间;-:未进行统计分析;OR、95% CI 及 *P*_{校正} 值均校正了年龄因素(χ^2 检验, Logistic 回归)

3 讨论

VEGFR1 是最早发现的 VEGF 受体,位于染色体的 13q. 12,相对分子质量为160 000 ~ 180 000,包括 32 个外显子。VEGFR1 与 VEGF 有很强的亲和力,调节血管渗透性并参与血管内皮细胞的增生和迁移,是促新生血管生成的重要因子^[8]。眼内注射抗 VEGF 药物可阻断 VEGF 下游的激活通路,从而抑制新生血管生

长,此外 VEGFR1 可以调节新生血管的形成,保护血管内皮细胞,并在 VEGF 家族内多个配体的作用下提高血管通透性,与 AMD 的发生和发展密切相关^[8-9]。

本研究结果表明,VEGFR1 基因在宁夏地区汉族与回族 AMD 患者中等位基因频率没有明显差异性。rs9554322、rs9582036 及 rs9943922 多态性与宁夏地区汉族人群 AMD 患病相关,但仅 rs9554322 和 rs7337610 的多态性与回族 AMD 有显著关联,在回族人群中 CC

基因型携带者患病风险是 GG 基因的 20.424 倍,携带该位点单拷贝危险等位基因 C 比 G 发病风险高 3.661 倍,因此该位点在回族人群中具有高度的易感性,而 SNPs 位点 rs7337610 的 C 等位基因是 AMD 发病的保护因素。rs9582036 和 rs9943922 的多态性则与回族 AMD 无明显关联,推测可能与不同民族的遗传背景不同或回族患者样本量较小有关。

本研究汉族人群中 rs9943922 携带 CC 纯合突变基因型是野生型 TT 基因型 AMD 患病的 1.189 倍,因此宁夏汉族人群 rs9943922 与 AMD 的发生有关联性,与 Owen 等^[6]对来自新英格兰、贝尔法斯特、希腊、韩国 4 个不同种族的多中心研究的结果相一致。rs9943922 可能与 VEGFR1 非编码区 RNA 的构象改变,进而触发编码区功能异常引起 AMD 的发生有关^[10]。

rs7337610 和 rs9582036 在功能上有多个结合的磷酸化位点,已被发现其多态性位点和结肠癌、胰腺癌、肾癌等预后相关^[11-13]。Slattery 等^[11]发现携带 rs7337610 CC 基因型的人群罹患结肠癌的风险是携带 TT 基因型人群的 1.84 倍,而本研究中发现 CC 基因型是宁夏地区汉族及回族人群 AMD 患病的保护因素,这可能是由于环境因素和多种遗传多态位点共同决定了不同疾病的表型差异。另外,rs9582036 基因型分布及等位基因频率在汉族人群具有显著差异,该位点的 AC 杂合突变使 AMD 患病风险提高到 3.435 倍,推测 rs9582036 的 SNPs 可能使密码子发生改变,进而激活 VEGF 信号通路,使 VEGFR1 的表达量增加,导致 AMD 发生^[14]。

AMD 的发病与遗传和环境因素均相关,吸烟已经被证明是 AMD 发病的一个独立的危险因素,吸烟可以增加氧化应激,进而引起 VEGF 表达并导致视网膜色素上皮层功能异常^[15-16]。本研究中宁夏地区汉族人群吸烟与 AMD 有明显关联,但是在回族人群中却未发现吸烟和罹患 AMD 存在相关性,可能是因为回族是遗传上相对封闭的族群,且生活方式较健康所致,其原因有待进一步研究证实。

本研究中对宁夏地区汉族和回族进行了分层研究并引入了吸烟这一环境危险因素,提高了群体遗传分析的效力和准确度,发现了宁夏地区汉族和回族 AMD 发病与 VEGFR1 特定 SNPs 的关联位点。但是本研究中纳入的回族 AMD 患者较少,其基因多态性位点还未在中国其他人中得到验证,缺少对 AMD 进行亚型的分层研究,因此我们计划在后续的研究中加大样本量进一步分析各 AMD 亚型与基因多态性位点的关系,并探讨基因与环境交互作用对 AMD 发病的影响,

以期深入阐释 AMD 的发病机制。

参考文献

- [1] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration[J]. *Lancet*, 2012, 379(9827): 1728-1738. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- [2] Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration; a case-control study in the Age-Related Eye Disease Study: Age-Related Eye Disease Study report number 3[J]. *Ophthalmology*, 2000, 107(12): 2224-2232.
- [3] Shahid H, Khan JC, Cipriani V, et al. Age-related macular degeneration; the importance of family history as a risk factor[J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(3): 427-431. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300193.
- [4] Bae DG, Kim TD, Li G, et al. Anti-flt1 peptide, a vascular endothelial growth factor receptor I-specific hexapeptide, inhibits tumor growth and metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(7): 2651-2661. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1564.
- [5] Penn JS, Madan A, Caldwell RB, et al. Vascular endothelial growth factor in eye disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(4): 331-371. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.05.001.
- [6] Owen LA, Morrison MA, Ahn J, et al. FLT1 genetic variation predisposes to neovascular AMD in ethnically diverse populations and alters systemic FLT1 expression[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(6): 3543-3554. DOI: 10.1167/iov.14-14047.
- [7] Hampton BM, Kovach JL, Schwartz SG. Pharmacogenetics and nutritional supplementation in age-related macular degeneration[J]. *Clin Ophthalmol*, 2015, 9: 873-876. DOI: 10.2147/OPHTH.S84155.
- [8] Kim H, Choi JS, Kim KS, et al. Flt1 peptide-hyaluronate conjugate micelle-like nanoparticles encapsulating genistein for the treatment of ocular neovascularization[J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(11): 3932-3940. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.07.016.
- [9] Dong Y, Li ZD, Fang XY, et al. Association between SERPING1 rs2511989 polymorphism and age-related macular degeneration: Meta-analysis[J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(2): 385-394. DOI: 10.3980/ij.issn.2222-3959.2015.02.31.
- [10] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(12): 861-874. DOI: 10.1038/nrg3074.
- [11] Slattery ML, Lundgreen A, Wolff RK. VEGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival[J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53 Suppl 1: E140-150. DOI: 10.1002/mc.22058.
- [12] Beuselinck B, Karadimou A, Lambrechts D, et al. VEGFR1 single nucleotide polymorphisms associated with outcome in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib-a multicentric retrospective analysis[J]. *Acta Oncol*, 2014, 53(1): 103-112. DOI: 10.3109/0284186X.2013.770600.
- [13] Huang CN, Huang SP, Pao JB, et al. Genetic polymorphisms in androgen receptor-binding sites predict survival in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(3): 707-713. DOI: 10.1093/annonc/mdr264.
- [14] Lambrechts D, Claes B, Delmar P, et al. VEGF pathway genetic variants as biomarkers of treatment outcome with bevacizumab; an analysis of data from the AVITA and AVOREN randomised trials[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(7): 724-733. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70231-0.
- [15] Bertram KM, Baglolle CJ, Phipps RP, et al. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells; implications for age-related macular degeneration[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(5): C1200-1210. DOI: 10.1152/ajpcell.00126.2009.
- [16] Chu YK, Lee SC, Byeon SH. VEGF rescues cigarette smoking-induced human RPE cell death by increasing autophagic flux; implications of the role of autophagy in advanced age-related macular degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(12): 7329-7337. DOI: 10.1167/iov.13-12149.

(收稿日期:2016-01-09)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)