

# AF4/FMR2、IL-10 基因多态性与强直性脊柱炎的遗传易感性和免疫浸润相关

穆杰,徐永申,朱辉

河南科技大学第二附属医院骨科,河南 洛阳 471000

**摘要:**目的 探索AF4/FMR2、IL-10基因与强直性脊柱炎(AS)的遗传易感性,发现高危因素及筛选高危人群。方法 共纳入207例AS患者和321例对照者。选择AF4/FMR2家族基因以及IL-10基因的标签SNP(rs340630、rs241084、rs10865035、rs1698105、rs1800896),提取DNA后进行基因分型,分析其基因型、等位基因分布频率,分析不同遗传模型与AS发病的关系,并进行基因-基因、基因-环境的交互作用分析。结果 AS组和对照组在性别、吸烟史、饮酒史、高血压、血沉、C反应蛋白在病例组和对照组均有差异( $P<0.05$ )。AFF1 rs340630的显性模型和隐性模型、AFF3 rs10865035的隐性模型、IL-10 rs1800896的隐性模型在AS组与对照组之间有显著性差异(分别为 $P=0.031$ 、 $P=0.010$ 、 $P=0.031$ 、 $P=0.019$ )。基因环境交互分析发现AFF1 rs340630、AFF2 rs241084、AFF3 rs10865035、AFF4 rs1698105、IL-10 rs1800896,吸烟史、饮酒史相互作用模型为最佳模型。AF4/FMR2、IL-10相关基因在AFF4超级延伸复合物、白细胞介素家族信号转导、细胞因子刺激、凋亡等过程富集。免疫相关性分析发现AF4/FMR2、IL-10的表达水平与免疫浸润呈正相关( $r>0$ )。结论 AF4/FMR2和IL-10基因多态性与AS的易感性相关,AF4/FMR2和IL-10基因与环境交互引起AS,并通过免疫浸润影响AS的进程。

**关键词:**AF4/FMR2;IL-10;单核苷酸多态性;强直性脊柱炎

## AF4/FMR2 and IL-10 gene single nucleotide polymorphisms are correlated with disease susceptibility and immune infiltration in ankylosing spondylitis

MU Jie, XU Yongshen, ZHU Hui

Second Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

**Abstract: Objective** To explore the correlation of polymorphisms of AF4/FMR2 family genes and IL-10 gene with genetic susceptibility to ankylosing spondylitis (AS) and identify the high-risk factors of AS. **Methods** This case-control study was conducted among 207 AS patients and 321 healthy individuals. The tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs340630, rs241084, rs10865035, rs1698105, and rs1800896 of the AF4/FMR2 family gene and IL-10 gene of the AS patients were genotyped, and the distribution frequencies of the genotypes and alleles were analyzed to explore the relationship between different genetic models and AS and the gene-gene and gene-environment interactions. **Results** Gender ratio, smoking history, drinking history, hypertension, erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein differed significantly between the case group and the control group ( $P<0.05$ ). The dominant model and recessive model of AFF1 rs340630, the recessive model of AFF3 rs10865035, and the recessive model of IL-10 rs1800896 were significantly different between the two groups ( $P=0.031$ , 0.010, 0.031, and 0.019, respectively). Gene-environment interaction analysis suggested that the interaction model incorporating AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF3 rs10865035, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896, smoking history and drinking history was the best model. The genes related with AF4/FMR2 and IL-10 were enriched in the biological processes of AF4 super extension complex, interleukin family signal transduction, cytokine stimulation and apoptosis. The expression levels of AF4/FMR2 and IL-10 were positively correlated with immune infiltration ( $r>0$ ). **Conclusion** The SNPs of AF4/FMR2 and IL-10 genes are associated with the susceptibility to AS, and the interactions of AF4/FMR2 and IL-10 genes with the environmental factors contributes causes AS through immune infiltration.

**Keywords:** AF4/FMR2; IL-10; gene polymorphism; ankylosing spondylitis

强直性脊柱炎(AS)是一种主要侵犯骶髂关节和脊柱,并累及周围关节的慢性进展性炎性疾病,主要病理表现为附着点炎<sup>[1]</sup>。该病多发于青壮年男性,病程长易发展成残疾<sup>[2]</sup>,且本病的发病机制仍不明确,因此,对AS的发病机制研究十分重要。流行病学调查发现,AS的易感性与遗传有较强相关性,且遗传同时影响环境

因素<sup>[3,4]</sup>。家系研究发现,在AS患者的直系亲属中AS的患病率比正常人高20~40倍,对孪生人群的研究结果更支持该观点<sup>[5]</sup>。单卵孪生人群中AS患病的一致率超过50%,HLA-B27阳性的双卵双生双胞胎的AS一致性率超过20%。然而,HLA-B27阳性与AS并非绝对相关,HLA-B27阴性者也可发生AS,而脊柱关节病人的HLA-B27检测可为阴性<sup>[6,7]</sup>。在HLA-B27阳性个体中只有5%最终会发展为AS,提示AS的发病除了HLA-B27外,还存在其他易感基因参与。

AF4/FMR2家族基因编码一类转录因子,该转录因子优先在淋巴样细胞(ILC)上表达,与淋巴系统的功能

收稿日期:2022-08-18

基金项目:河南省科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20200597);洛阳市科技计划医疗卫生项目(1814004A)

作者简介/通信作者:穆杰,副主任医师,E-mail: mujiely@yeah.net

有关,参与多种炎症、免疫相关疾病的发生发展<sup>[8,9]</sup>。Barton等<sup>[10]</sup>2009年首次报道AFF3基因单核苷酸多态性(SNP)与类风湿关节炎(RA)的易感性。研究发现RA患者外周血AFF3的表达明显下调,差异基因富集分析发现,AFF3位于机体对刺激的反应通路。AS与RA病理改变有部分相似,如AS也有滑膜炎改变,病理表现为滑膜细胞肥大和滑膜增生,有明显的淋巴细胞和浆细胞浸润,以及自身抗体的产生。Hinks等<sup>[11]</sup>报道在幼年特发性关节炎中AFF3与IL2、IL21基因区域相关。Zhou等<sup>[12]</sup>研究表明AFF1和AFF4对人骨髓间充质干细胞成骨分化有不同的调节作用。

IL-10是由染色体1q31-32上的IL-10基因编码的一种免疫调节细胞因子,IL-10基因有四个内含子和五个外显子,其中,位于5'端的多态性-1082A>G,-819T>C,-592A>C,尤其是-1082A>G,参与调节IL-10的生成<sup>[13]</sup>。IL-10具有抗炎特性,通过限制对病原体的免疫反应,从而防止对宿主的损害。Braga<sup>[14]</sup>分析了IL-10基因启动子区域-1082A/G与AS的易感性,发现显性模型中的AG基因型与AS风险相关。不同人群来源的AS易感性结果不尽相同,IL10-1082A>G对AS遗传易感性没有显著影响<sup>[15]</sup>。但是,基因相互作用分析发现,TNF- $\alpha$ -308(GA/AA)/IL-10-1082AA基因型对AS具有协同保护作用。虽然上述研究提供了AF4/FMR2和IL-10在慢性炎症性疾病发病机制中的重要性,但AF4/FMR2和IL-10基因与环境之间是否存在相互作用,共同引起AS。目前未发现AF4/FMR2家族基因多态性与AS的相关研究。我们通过本病例对照研究,探讨AF4/FMR2家族基因与AS的遗传易感性,以及基因-基因,基因-环境交互作用与AS的相关性。并对AF4/FMR2和IL-10互作关系的基因进行信号通路及基因富集分析。同时对AF4/FMR2和IL-10基因进行免疫相关性分析,进一步评估潜在的发病机制。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

该研究为病例对照研究,共纳入了207例AS患者和321例对照者。病例组来自于2015年1月~2019年12月期间就诊于我院的AS患者。选择同时期来自于健康体检中心的人群为对照组。所有参与者全部进行了脊柱和骨盆CT检查。AS诊断按照1984年修订的AS诊断标准<sup>[16]</sup>,及ESSG诊断标准<sup>[17]</sup>。所有诊断AS的患者都有相关检查并符合AS的诊断。既往有腰椎感染、腰部外伤、结缔组织疾病史者不纳入本研究,对照组同时排除AS及其他风湿免疫性疾病。收集参与者的性别、发病年龄、血沉、C-反应蛋白、HLA-B27阳/阴性、吸烟史、饮酒史、临床症状和计算机断层扫描结果等信

息。本研究经过医院伦理委员会批准,所有受试者都签署了知情同意书。

### 1.2 SNP选择

通过检索NCBI的SNP数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>),应用Haploview软件选择,参照标准为北京汉族人群,以最小等位基因频率 $\geq 0.05$ 和 $R^2 \geq 0.8$ ,选取AF4/FMR2家族基因的tag SNP(AFF1基因rs340630、AFF2基因rs241084、AFF3基因rs10865035、AFF4基因rs1698105、IL-10 rs1800896)。

### 1.3 DNA提取与基因分型

抽取受试者的外周血,经EDTA抗凝,提取DNA后保存在-20℃冰箱。应用SeCore试剂盒(Life Technologies)中提供的引物进行等位基因PCR,然后对目标基因进行测序。

### 1.4 统计分析

本研究数据分析应用软件SPSS 22.0版本(USA, SPSS)。测量数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用独立样本 $t$ 检验评价AD患者与对照组之间的差异。用 $\chi^2$ 检验分析人群是否符合Hardy-Weinberg平衡。AS和对照组的基因型和等位基因频率分布差异用 $\chi^2$ 检验比较分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

发病风险用比值比(OR)和95%置信区间(CI)表示。基因-基因和基因-环境的相互作用通过GMDR进行分析。交叉验证一致性(CVC)和符号检验最大值的模型为最佳模型, $P < 0.05$ 。

功能富集分析方法:通过GeneMANIA工具分析各基因的交互网络。通过metascape进行信号通路和基因本体(GO)富集分析, $P$ 值 $< 0.01$ 、最小计数为3、富集因子 $> 1.5$ 。

免疫相关性分析方法:通过秩和检验检测两组数据的差异,使用R软件v4.0.3进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计意义。

## 2 结果

### 2.1 研究对象

研究参与者的一般特征(表1)。本研究共纳入207例AS患者和321例正常对照。AS组采血时平均年龄 $51.75 \pm 11.33$ 岁,男性131例。对照组采血时平均年龄 $52.37 \pm 10.87$ 岁,男性233例。病例组与对照组的年龄无统计差异( $P = 0.082$ )。性别、吸烟、血沉、C反应蛋白,在AS组与对照组有统计学差异( $P < 0.05$ )。

### 2.2 基因型和等位基因分布

AS组和对照组基因标签SNP的基因型和等位基因分布特征(表2)。目标基因SNP的基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡。AFF1基因rs340630基因型和等位基因分布频率在AS组和对照组之间存在差异(分

表1 病例组与对照组的一般特征

Tab.1 General characteristics of case group and control group

Characteristics	AS (n=207)	Control (n=321)	P
Age (year)	53.6±11.63	55.34±10.81	0.082
Male	161 (77.8%)	177 (55.1%)	<0.001
Smoking	124 (59.9%)	115 (35.8%)	0.036
Drinking	133 (64.3%)	160 (49.8%)	0.045
Erythrocyte sedimentation rate (mm/h)	25.1±11.2	23.4±10.5	0.025
CRP (mg/L)	20.9±10.2	18.9±9.8	0.003

别为 $P=0.003$ 、 $P=0.001$ )。IL-10 基因 rs1800896 的等位基因频率分布在 AS 组和对对照组之间的存在差异

( $P=0.026$ )。其余基因的标签 SNP 基因型和等位基因病例组和对对照组的分布无统计学差异( $P$ 均 $>0.05$ )。

表2 病例组和对对照组的 SNP 基因型和等位基因分布情况

Tab.2 Distribution of SNP genotypes and alleles in case group and control group

SNP	Genotype/Allele	AS (n)	Control (n)	$\chi^2$	P			
AFF1 rs340630	Genotype	GG	93	175	11.467	0.003		
		GA	80	122				
		AA	34	24				
	Allele	G	266	472			10.275	0.001
		A	148	170				
AFF2rs241084	Genotype	AA	152	258	3.865	0.145		
		AG	46	50				
		GG	9	13				
	Allele	A	350	566			2.870	0.090
		G	64	76				
AFF3 rs10865035	Genotype	AA	107	178	4.667	0.097		
		AG	67	112				
		GG	33	31				
	Allele	A	281	468			3.079	0.079
		G	133	174				
AFF4 rs1698105	Genotype	GG	123	181	1.073	0.585		
		GA	49	89				
		AA	35	51				
	Allele	G	295	451			0.123	0.726
		A	119	191				
IL-10 rs1800896	Genotype	AA	93	164	5.777	0.056		
		AG	79	125				
		GG	35	32				
	Allele	A	265	453			4.963	0.026
		G	149	189				

### 2.3 目标基因的基因模型分析结果

目标基因的基因模型分析结果(表3), AFF1 rs340630 的显性模型、隐性模型在 AS 组与对照组之间有显著性差异(分别为 $P=0.031$ 、 $P=0.010$ )。AFF3 rs10865035、IL-10 rs1800896 的隐性模型 A 在 S 组与对照组有显著性差异(分别为 $P=0.031$ 、 $P=0.019$ )。rs241084、rs1698105 在 AS 组与对照组的基因模型分析均未发现统计学差异( $P$ 均 $>0.05$ )。

### 2.4 基因-基因相互作用分析

GMDR 用于分析六个 SNP 的相互作用(表4)。最

佳模型是 AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF3 rs10865035, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896 五因素相互作用模型, 经过 1000 次排列测试后, 其最大 CVC (10/10), 且该模型有最大 Sign Test 值(10)和最大的检验精准度(0.5935),  $P=0.0025$ 。

### 2.5 基因-环境相互作用

GMDR 用于分析基因-环境的相互作用与 AD 风险之间的关联(表5)。该模型中考虑了 5 个 SNP 和潜在的 AS 的危险因素, 包括吸烟, 饮酒, 性别。分析结果提示: 最佳模型是 AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF3

表3 目标基因SNP不同遗传模型在AS和对照组的对比分析结果

Tab.3 Genotyping models in patients with AS and control subjects

SNP	Genetic model		AS, <i>n</i>	Control, <i>n</i>	OR	$\chi^2$	<i>P</i>
AFF1 rs340630	Dominant model	AA+GA	114	146	1.469 (1.034-2.087)	4.630	0.031
		GG	93	175			
	Recessive model	AA	34	24	2.432 (1.396-4.237)	10.306	0.010
		GG+GA	173	297			
	Additive model	GA	80	122	1.027 (0.717-1.472)	0.022	0.882
		GG+AA	127	199			
AFF2 rs241084	Dominant model	AG+GG	55	63	1.482 (0.980-2.241)	3.497	0.061
		AA	152	258			
	Recessive model	GG	9	13	1.077 (0.452-2.567)	0.028	0.867
		AA+AG	198	308			
	Additive model	AG	46	50	1.549 (0.992-2.417)	3.736	0.053
		AA+GG	161	271			
AFF3 rs10865035	Dominant model	AG+GG	100	143	1.163 (0.819-1.651)	0.717	0.397
		AA	107	178			
	Recessive model	GG	33	31	1.774 (1.050-2.999)	4.666	0.031
		AA+AG	174	290			
	Additive model	AG	67	112	0.893 (0.616-1.294)	0.358	0.550
		AA+GG	140	209			
AFF4 rs1698105	Dominant model	GA+AA	84	140	0.883 (0.619-1.259)	0.474	0.491
		GG	123	181			
	Recessive model	AA	35	51	1.077 (0.673-1.725)	0.096	0.757
		GA+GG	172	270			
	Additive model	GA	49	89	0.808 (0.540-1.210)	1.072	0.301
		GG+AA	158	232			
IL-10 rs1800896	Dominant model	AG+GG	114	157	1.280 (0.902-1.818)	1.913	0.167
		AA	93	164			
	Recessive model	GG	35	32	1.838 (1.098-3.076)	5.470	0.019
		AA+AG	172	289			
	Additive model	AG	79	125	0.968 (0.676-1.386)	0.032	0.858
		AA+GG	128	196			

表4 广义多因子降维法分析基因-基因交互作用与AS的发病风险

Tab.4 Generalized multifactor dimensionality reduction analysis of gene-gene interactions and AS risk

Model	Training Bal. Acc	Testing Bal. Acc	Sign test (p)	CV Consistency
AFF1 rs340630, AFF2 rs241084	0.5876	0.4801	5 (0.6230)	3/10
AFF1 rs340630, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896	0.6311	0.5517	7 (0.1719)	7/10
AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896	0.6801	0.5683	8 (0.0547)	6/10
AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF3 rs10865035, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896	0.7336	0.5935	10 (0.0205)	10/10

rs10865035, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896, 吸烟史, 饮酒史的七因素相互作用模型, 该模型经过 1000 次排列测试后交叉验证一致性为 10/10, 且该模型有最大 Sign Test 值(10)和最大的检验精准度(0.7081),  $P=0.0010$ 。

### 2.6 基因功能富集分析

与 AF4/FMR2、IL-10 有交互作用的基因, 共 25 个

(图 1A)。为了进一步分析 25 个基因相关信号通路及生物学过程富集情况, 如 KEGG 通路、GO 生物过程、标准通路等。结果发现: 以上基因在 AFF4 超级延伸复合物、白细胞介素家族信号转导、细胞因子刺激反应、凋亡过程的正调控、对糖皮质激素的反应、染色质重塑、细胞对应激反应的调节等(图 1B, 表 6)。此外, 还参与了白血病、脊柱关节炎等疾病的生物进程(图 1C)。

表5 广义多因子降维法分析基因-环境交互作用与AS的发病风险

Tab.5 Generalized multifactor dimensionality reduction analysis of gene-environment interactions and AS risk

Model	Training Bal. Acc	Testing Bal. Acc	Sign test (p)	CV Consistency
Smoking, drinking	0.7080	0.6668	10 (0.0010)	10/10
AFF4 rs1698105, smoking, drinking	0.7116	0.6645	10 (0.0010)	4/10
AFF1 rs340630, AFF3 rs10865035, AFF4 rs1698105, smoking	0.7434	0.6895	10 (0.0010)	9/10
AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896, smoking	0.7762	0.6434	10 (0.0107)	5/10
AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF3 rs10865035, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896, drinking	0.8115	0.6460	9 (0.0010)	9/10
AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF3 rs10865035, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896, smoking, drinking	0.9640	0.7081	10 (0.0010)	10/10
AFF1 rs340630, AFF2 rs241084, AFF3 rs10865035, AFF4 rs1698105, IL-10 rs1800896, age, smoking, drinking	0.8671	0.6451	8 (0.0547)	10/10

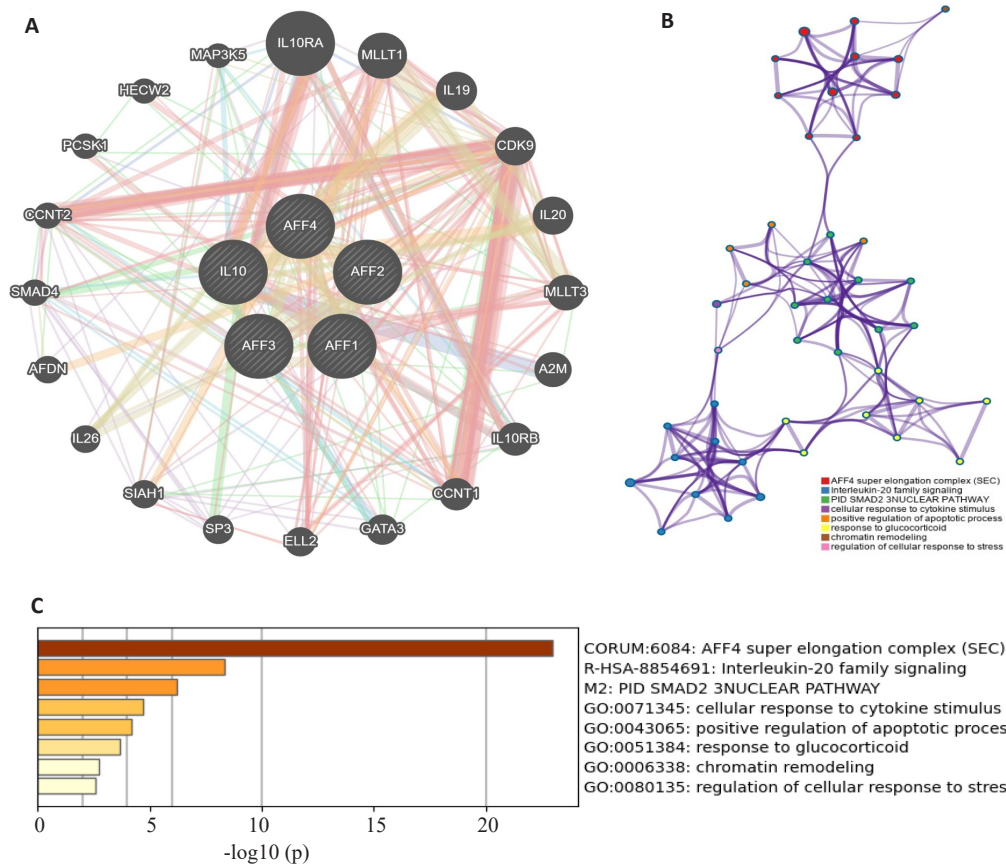


图1 基因功能富集分析

Fig.1 Gene function enrichment analysis. A: The genes that interact with AF4/FMR2 and IL-10. B: Signal pathway enrichment network diagram. Different colors represent different signal pathways. C: GO enrichment analysis.

2.7 免疫相关性分析(TIMER)

基因表达水平在多个肿瘤组织中的免疫浸润评分的 spearman 相关分析热图(图2)。其中横坐标代表不同的免疫浸润评分,纵坐标代表不同细胞类型。相关系数  $r > 0$  代表正相关,  $< 0$  代表负相关,颜色越深相关性越

强。结果提示:AF4/FMR2 家族(尤其是 AFF3)、IL-10 基因表达水平与多种类型免疫浸润成正相关( $r > 0$ )。

3 讨论

强直性脊柱炎的主要病理过程是以关节囊、肌腱、

表6 最具有代表性且最显著的GO富集分类

Tab.6 Top clusters with their representative enriched terms

GO	Category	Description	Count	%	Log10 (P)	Log10 (q)
CORUM:6084	CORUM	AFF4 super elongation complex	8	32	-22.98	-18.63
R-HSA-8854691	Reactome gene sets	Interleukin-20 family signaling	4	16	-8.34	-4.77
M2	Canonical pathways	PID SMAD2 3NUCLEAR PATHWAY	4	16	-6.21	-3.17
GO:0071345	Go biological processes	Cellular response to cytokine stimulus	6	24	-4.7	-1.95
GO:0043065	Go biological processes	Positive regulation of apoptotic process	5	20	-4.19	-1.52
GO:0051384	Go biological processes	Response to glucocorticoid	3	12	-3.69	-1.09
GO:0006338	Go biological processes	Chromatin remodeling	3	12	-2.73	-0.34
GO:0080135	Go biological processes	Regulation of cellular response to stress	4	16	-2.56	-0.23

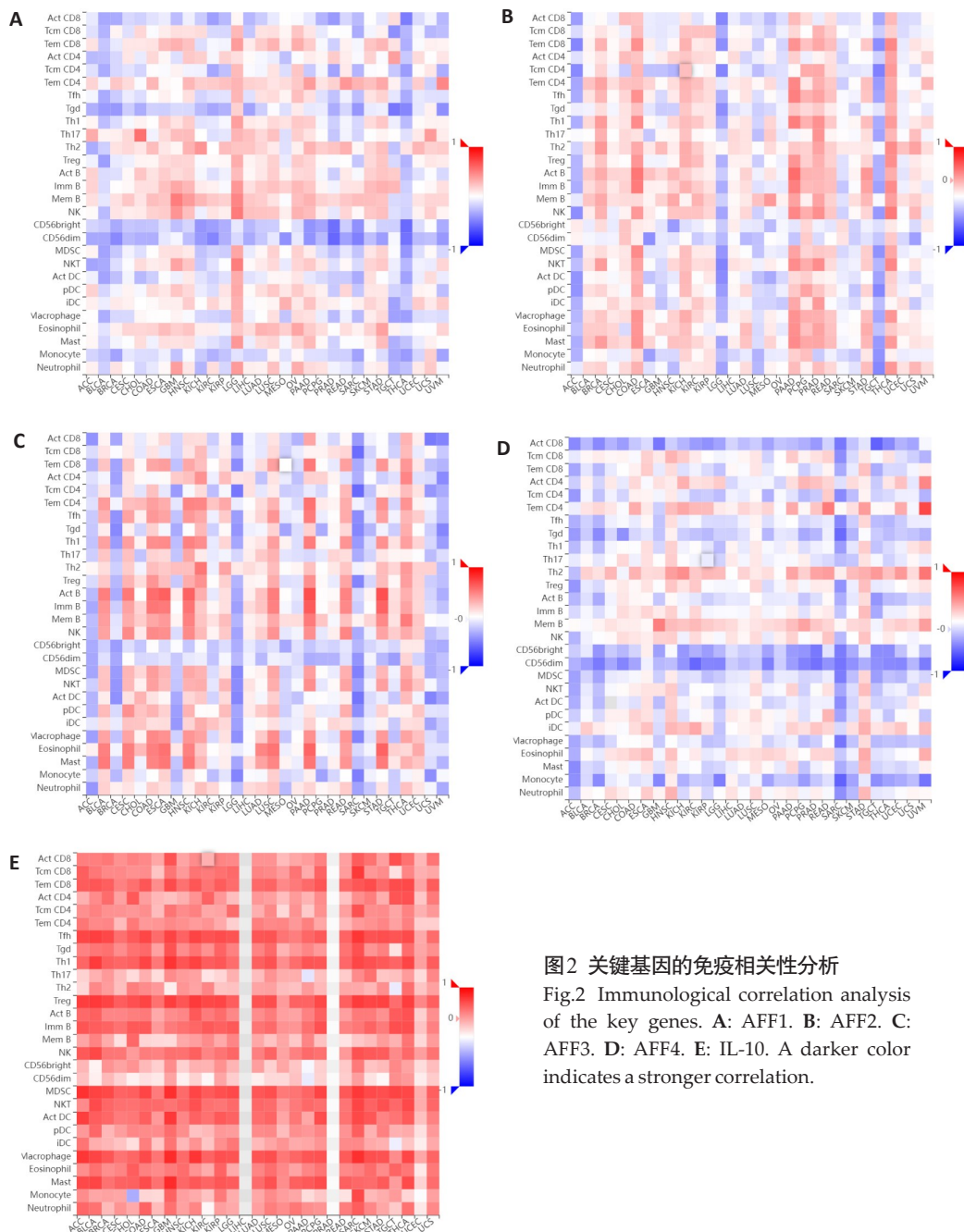


图2 关键基因的免疫相关性分析

Fig.2 Immunological correlation analysis of the key genes. A: AFF1. B: AFF2. C: AFF3. D: AFF4. E: IL-10. A darker color indicates a stronger correlation.

韧带的骨附着点为中心的慢性炎症<sup>[18]</sup>。AF4/FMR2家族基因编码的蛋白属于转录激活因子,定位于细胞核,对RNA的转录具有促进作用,参与多种疾病的炎症与免疫反应的过程<sup>[19]</sup>。本研究通过对AF4/FMR2家族基因单核苷酸多态性与AS易感性的关联分析,发现AFF1、AFF3基因多态性与AS的遗传易感性相关。AFF1基因rs340630的AA基因型、AFF3基因rs10865035的GG基因型、IL-10基因rs1800896的GG基因型发生AS的风险增加,吸烟、饮酒为AS发病的危险因素。

多项研究报道AFF3与炎症及自身免疫疾病,如RA<sup>[20]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[21]</sup>和青少年特发性关节炎<sup>[22]</sup>的遗传易感性有关。在欧洲和亚洲裔等多个种族,AFF3基因多个位点SNP与RA的遗传易感性研究发现,rs10865035、rs9653442、rs7608424、rs6712515、rs11681966多态性影响AFF3的表达水平,但未发现与RA的相关性<sup>[20]</sup>。有研究报道AFF3基因多态性与RA患者应用肿瘤坏死因子- $\alpha$ 抑制剂的治疗效果有关<sup>[23]</sup>。Hinks等<sup>[11]</sup>报道AFF3与青少年特发性关节炎相关<sup>[23]</sup>。研究发现,欧洲人中AFF3基因rs10865035与RA遗传易感性有关。本研究发现AFF3基因rs10865035位点的基因型频率和等位基因频率在AS病例组与对照组间均无统计学差异,但该位点风险等位基因在隐性遗传模型下与AS的遗传易感性有关。AFF3基因是AF4/FMR2家族的核转录因子成员,编码包含转录激活结构域的核因子,优先选择在淋巴样细胞中表达。rs10865035位于AFF3基因上游的5'启动子区域,它编码可与DNA相互作用的核因子。AFF3的遗传变异导致淋巴细胞炎症反应异常激活,从而导致更多的促炎分子的表达。

本研究发现,AFF1基因rs340630 GA和AA基因型与AS增加风险有关。由于AFF1主要表达于外周血CD4<sup>+</sup>与CD19<sup>+</sup>淋巴细胞中<sup>[24,25]</sup>,在辅助性T细胞与B细胞中发挥重要作用,AFF1的上调可能导致这些淋巴细胞的生物学功能异常,从而参与AS发病。本研究中,rs340630的显性遗传模型与AS遗传易感性无明显关系。Okada等2012<sup>[24]</sup>的全基因组关联研究确定AFF1是日本人SLE的易感基因。Cen等<sup>[21]</sup>研究AFF1基因rs340630和AFF3基因rs10865035多态性与中国人群SLE的易感性,结果提示,AFF1基因rs340630与SLE未发现明显关联。Sun等<sup>[25]</sup>关于AFF1基因rs340630多态性与中国人群类风湿关节炎遗传易感性的研究,结果表明无论是基因型频率分布还是等位基因频率分布均未发现统计学差异。Zhou等<sup>[12]</sup>的研究表明AFF1和AFF4对人骨髓间充质干细胞成骨分化有不同的调节作用。AFF1和AFF4通过延伸和染色质重塑调节转录,AFF1沉默导致碱性磷酸酶活性增加,骨化增强和成骨相关基因表达上调,AFF1和AFF4的过表达影响体外

成骨分化和体内间充质干细胞介导的骨形成。AFF4是转录延伸因子,是连接转录因子并通过延伸和染色质重塑促进基因转录的支架蛋白。Xiao等<sup>[26]</sup>通过分析AFF4对人牙囊细胞成骨分化的影响,发现AFF4沉默导致ALP降低和矿化受损,与成骨相关的基因表达明显下调,相反AFF4过表达显著增强人牙囊细胞的成骨潜能,上调关键调节因子的mRNA和蛋白质水平,促进人牙囊细胞的成骨分化。

IL-10基因rs1800896隐性模型GG与AS的易感性相关。另一项来自欧洲的研究也发现IL-10基因rs1800896(-1082A>G)多态性和AS相关,其中,AG和GG基因型携带者更可能发展为AS<sup>[14]</sup>。IL-10是主要的免疫调节细胞因子,作用于免疫系统的多种细胞,具有抗炎功能,能够限制炎症引起的组织损伤。然而,AS患者的血清IL-10水平更高。可能的机制是IL-10通过M2巨噬细胞作用引起AS。研究发现,在AS患者的滑膜活检组织、炎症性肠道中M2 CD163<sup>+</sup>的表达增加,并且CD163滑膜过度表达与AS相关,IL-10可以将巨噬细胞的表型从M1改变为M2<sup>[27,28]</sup>。此外,IL-10基因rs1800896(-1082A>G)被报道与多种肿瘤疾病有关<sup>[29]</sup>。我们在免疫相关性分析中也发现,IL-10与免疫相关的多种炎症的正相关关系。

AS发病受遗传和环境影响,本研究发现,吸烟和饮酒增加AS的患病风险,性别、年龄对发病风险未见显著影响。Doran等<sup>[4]</sup>的研究发现,吸烟为影响AS功能状态的独立危险因素,这同我们的研究结果一致。吸烟导致的炎症反应可能会加重关节炎和关节损害<sup>[30]</sup>。Roseman等<sup>[31]</sup>研究发现,吸烟者患有关节炎时其炎症标记物含量较高,吸烟导致甲氨蝶呤治疗的RA患者免疫异常,炎症标志物CRP、ESR升高,IgG水平降低,饮酒未发现明确影响。Lu等<sup>[32]</sup>发现,每周喝啤酒2~4次的女性患RA的风险降低了31%,但目前未见到关于饮酒与AS发病风险的相关研究。

本研究存在以下不足:(1)分析了AF4/FMR2、IL-10基因单核苷酸多态性与AS的遗传易感性,但是未进行转录、调控等相关研究;(2)可进行细胞或动物研究进一步验证突变位点是否引起AS,及致病机制;(3)进行多中心的更大样本的研究也是有必要的。强直性脊柱炎的表现复杂多样,纳入这些(如外周关节炎等)因素会引起统计量增加,同时样本量要增加,考虑到统计分析对于样本量的严格要求,分组太多则不利于SNP数据的分析及GMDR分析,因此,没有按照外周关节炎等因素单独分组。综上,AFF1 rs340630、AFF3 rs10865035、IL-10 rs1800896与AS的遗传易感性有关。AF4/FMR2、IL-10、吸烟史、饮酒史的相互作用参与AS。AF4/FMR2、IL-10通过多个信号通路引起AS,且与免疫浸润有关。

## 参考文献:

- [1] van der Heijde D, Song IH, Pangan AL, et al. Efficacy and safety of upadacitinib in patients with active ankylosing spondylitis (SELECT-AXIS 1): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2/3 trial [J]. *Lancet*, 2019, 394(10214): 2108-17.
- [2] Haroon NN, Paterson JM, Li P, et al. Increasing proportion of female patients with ankylosing spondylitis: a population-based study of trends in the incidence and prevalence of AS [J]. *BMJ Open*, 2014, 4(12): e006634.
- [3] Hanson A, Brown MA. Genetics and the causes of ankylosing spondylitis [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2017, 43(3): 401-14.
- [4] Doran MF, Brophy S, MacKay K, et al. Predictors of longterm outcome in ankylosing spondylitis [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(2): 316-20.
- [5] Zhou XD, Wang JC, Zou HJ, et al. MICA, a gene contributing strong susceptibility to ankylosing spondylitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(8): 1552-7.
- [6] Kuijpers TW, Vendelbosch S, Berg MV, et al. Killer immunoglobulin receptor genes in spondyloarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2016, 28(4): 368-75.
- [7] Díaz-Peña R, López-Vázquez A, López-Larrea C. Old and new HLA associations with ankylosing spondylitis [J]. *Tissue Antigens*, 2012, 80(3): 205-13.
- [8] Chen Y, Cramer P. Structure of the super-elongation complex subunit AFF4 C-terminal homology domain reveals requirements for AFF homo- and heterodimerization [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(27): 10663-73.
- [9] Shi YW, Zhao Y, Zhang YJ, et al. AFF3 upregulation mediates tamoxifen resistance in breast cancers [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 254.
- [10] Barton A, Eyre S, Ke XY, et al. Identification of AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(13): 2518-22.
- [11] Hinks A, Eyre S, Ke X, et al. Association of the AFF3 gene and IL2/IL21 gene region with juvenile idiopathic arthritis [J]. *Genes Immun*, 2010, 11(2): 194-8.
- [12] Zhou CC, Xiong QC, Zhu XX, et al. AFF1 and AFF4 differentially regulate the osteogenic differentiation of human MSCs [J]. *Bone Res*, 2017, 5: 17044.
- [13] Saxton RA, Tsutsumi N, Su LL, et al. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10 [J]. *Science*, 2021, 371(6535): eabc8433.
- [14] Braga M, Lara-Armi FF, Neves JSF, et al. Influence of IL10 (rs1800896) polymorphism and TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-17A, and IL-17F serum levels in ankylosing spondylitis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 653611.
- [15] Ivanova M, Manolova I, Stoilov R, et al. The synergistic role of TNFA-308G/A and IL10-1082A/G polymorphisms in ankylosing spondylitis [J]. *Rheumatol Int*, 2021, 41(12): 2215-24.
- [16] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria [J]. *Arthritis Rheum*, 1984, 27(4): 361-8.
- [17] Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy [J]. *Arthritis Rheum*, 1991, 34(10): 1218-27.
- [18] Qian BP, Ji ML, Qiu Y, et al. Is there any correlation between pathological profile of facet joints and clinical feature in patients with thoracolumbar kyphosis secondary to ankylosing spondylitis? an immunohistochemical investigation [J]. *Spine: Phila Pa* 1976, 2016, 41(9): E512-8.
- [19] Krasnopolsky S, Marom L, Victor RA, et al. Fused in sarcoma silences HIV gene transcription and maintains viral latency through suppressing AFF4 gene activation [J]. *Retrovirology*, 2019, 16(1): 16.
- [20] Danila MI, Laufer VA, Reynolds RJ, et al. Dense genotyping of immune-related regions identifies loci for rheumatoid arthritis risk and damage in African Americans [J]. *Mol Med*, 2017, 23: 177-87.
- [21] Cen H, Leng RX, Wang W, et al. Association of AFF1 rs340630 and AFF3 rs10865035 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Chinese population [J]. *Immunogenetics*, 2012, 64(12): 935-8.
- [22] Ellis JA, Chavez RA, Pezic A, et al. Independent replication analysis of genetic loci with previous evidence of association with juvenile idiopathic arthritis [J]. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2013, 11(1): 12.
- [23] Tan RJL, Gibbons LJ, Potter C, et al. Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility genes identifies association of AFF3 and CD226 variants with response to anti-tumour necrosis factor treatment [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(6): 1029-35.
- [24] Okada Y, Shimane K, Kochi Y, et al. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(1): e1002455.
- [25] Sun QQ, Hua DJ, Huang SC, et al. Association study of AFF1 rs340630 polymorphism with genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Chinese population [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(7): e7126.
- [26] Xiao QY, Zhang YN, Qi XY, et al. AFF4 regulates osteogenic differentiation of human dental follicle cells [J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 20.
- [27] Ciccio F, Alessandro R, Rizzo A, et al. Macrophage phenotype in the subclinical gut inflammation of patients with ankylosing spondylitis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(1): 104-13.
- [28] Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, et al. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration [J]. *J Immunol*, 2012, 189(7): 3669-80.
- [29] Li CX, Tong WD, Liu BH, et al. The-1082A>G polymorphism in promoter region of interleukin-10 and risk of digestive cancer: a meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2015, 4: 5335.
- [30] Harrison BJ, Silman AJ, Wiles NJ, et al. The association of cigarette smoking with disease outcome in patients with early inflammatory polyarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(2): 323-30.
- [31] Roseman C, Truedsson L, Kapetanovic MC. The effect of smoking and alcohol consumption on markers of systemic inflammation, immunoglobulin levels and immune response following pneumococcal vaccination in patients with arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(4): R170.
- [32] Lu B, Solomon DH, Costenbader KH, et al. Alcohol consumption and risk of incident rheumatoid arthritis in women: a prospective study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(8): 1998-2005.