

二肽基肽酶 9 基因单核苷酸多态性与煤工尘肺的相关性

袁宝军, 李保林, 李超, 崔晶晶

(开滦总医院检验科, 河北 唐山 063000)

摘要: **目的** 探讨二肽基肽酶 9 基因 (*DPP9*) rs12610495 位点单核苷酸多态性 (SNP) 与唐山地区汉族人群煤工尘肺 (CWP) 的相关性。**方法** 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS) 对 652 例 CWP 患者和 648 例接尘健康对照者 *DPP9* 基因的 rs12610495 位点分型, 采用 PLINK 1.07 软件对 SNP 位点基因型和等位基因频率及遗传模型进行分析。**结果** 与对照组比较, CWP 组 *DPP9* 基因 rs12610495 位点的基因型和等位基因频率均无明显变化, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.731$ 、 0.565 , $P > 0.05$)。遗传模型分析显示, *DPP9* 基因 rs12610495 位点在相加、显性及隐性三种遗传模型下的基因型分布比较, 差异均无统计学意义 ($OR = 1.087$ 、 0.987 、 1.964 , $95\% CI = 0.870 \sim 1.358$ 、 $0.659 \sim 1.478$ 、 $0.527 \sim 7.314$, P 均 > 0.05)。**结论** *DPP9* 基因 rs12610495 位点单核苷酸多态性可能与唐山地区汉族人群 CWP 的易感性无关。

关键词: 煤工尘肺 (CWP); 二肽基肽酶 9 (*DPP9*) 基因; 单核苷酸多态性 (SNP); 相关性

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2018)02-0087-03 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2018.02.002

Correlation between single nucleotide polymorphisms of *DPP9* gene and coal workers' pneumoconiosis

YUAN Bao-jun, LI Bao-lin, LI-Chao, CUI Jing-jing

(Department of Laboratory, Kailuan General Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the association between single nucleotide polymorphism (SNP) of dipeptidyl-peptidase 9 (*DPP9*) rs12610495 loci and coal workers' pneumoconiosis (CWP) of Han nationality in Tangshan area. **Methods** The genotyping for SNP rs12610495 loci of *DPP9* gene from 652 CWP patients (CWP group) and 648 dust-exposed workers (control group) were made using matrix associated laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), the genotype, allele frequency and genetic model were analyzed with PLINK 1.07 software. **Results** There was no significant difference found in genotype and allele frequency of *DPP9* gene rs12610495 between CWP group and control group ($\chi^2 = 1.731$ and 0.565 respectively, both $P > 0.05$). The genetic model test also showed that in genotypes distribution comparisons none of any three genetic models of additive, dominant and recessive showed significant difference with controls ($OR = 1.087$, 0.987 and 1.964 respectively, all $P > 0.05$). **Conclusion** The results suggested that SNP of *DPP9* gene rs12610495 loci may not be associated with CWP susceptibility in Han workers of Tangshan area.

Key words: coal workers' pneumoconiosis (CWP); dipeptidyl-peptidase 9 (*DPP9*); single nucleotide polymorphisms (SNP); correlation

煤工尘肺 (coal workers' pneumoconiosis, CWP) 是因长时间吸入生产环境中的粉尘颗粒所引起的一种以肺部炎症反应、成纤维细胞聚集和细胞外基质中胶原成分异常沉积, 最终导致肺纤维化的严重慢性肺部疾病^[1]。其发病特点具有进展缓慢和不可逆性, 严重影响煤矿作业人群的身体健康。虽然 CWP 的病因明确, 但截至目前, 其确切发病机制尚未完全清楚, 且无有效的治疗手段, 早期预防、筛查和定期随访仍是控制发病的关键。研究表明, 除环境因素外, 个体的遗传易感性也与 CWP 的发病风险相关^[2]。单核苷

酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 作为遗传学的分子标记, 可通过调控相关基因 mRNA 及蛋白质的表达水平参与肺纤维化发生过程^[3], 也可反映疾病的预后^[4]。在对非西班牙裔白种人开展的全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 中发现, 二肽基肽酶 9 (dipeptidyl-peptidase 9, *DPP9*) 基因 rs12610495 位点与肺纤维化的发生相关^[5]。但在中国汉族人群中, 尚未见对该基因相关位点与 CWP 的相关性研究。本研究通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix associated laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 检测唐山地区汉族 CWP 人群中 *DPP9* 基因 rs12610495 位点多态性, 探讨其与 CWP 的相关性。

收稿日期: 2017-12-08; 修回日期: 2018-01-19

作者简介: 袁宝军 (1966—), 男, 教授, 主任技师, 主要从事临床免疫学及免疫遗传学实验研究。

1 对象与方法

1.1 对象

选择来自开滦职业病防治院收治入院的壹期 CWP 患者 652 例 (CWP 组), 诊断均依据国家《尘肺病诊断标准》(GBZ70—2009) 执行。CWP 组年龄 49~83 岁, 平均 (63.3±3.4) 岁; 接尘年限 13~33 年, 平均 (23.2±3.7) 年; 其中掘砌工、采煤工和混合工分别为 274 例、263 例和 115 例。同时选择与 CWP 组具有相似工作环境和接尘史而无尘肺发病的井下工人 648 例作为对照组, 年龄 49~79 岁, 平均 (62.8±3.2) 岁; 接尘年限 12~38 年, 平均 (23.6±4.1) 年; 其中掘砌工、采煤工和混杂工分别为 280 例、246 例和 122 例。CWP 组与接尘对照组的工种分布、年龄和接尘年限比较均具有可比性 ($P>0.05$)。所有研究对象均为无血缘关系的汉族男性, 并排除自身免疫性疾病、接受免疫或放射性治疗者。均签署知情同意书, 并经开滦总医院伦理委员会批准。

1.2 标本采集及 DNA 提取

采集研究对象静脉全血标本 3 ml, 用乙二胺四乙酸二钾 (EDTA- K_2) 抗凝。选用北京天根生化科技有限公司的血液基因组提取试剂盒, 并按照说明书操作提取 DNA, 提取的 DNA 标本置于-80℃ 保存。

1.3 引物合成

通过 MsaaARRAY Assay Design 3.1 在线软件对选取的 *DPP9* 基因 rs12610495 位点进行引物设计, 由北京擎科新业生物技术有限公司进行引物合成, 包括一对 PCR 扩增引物和一条延伸引物。见表 1。

表 1 *DPP9* 基因 rs12610495 位点的引物序列

条目	序列
扩增引物 1st	ACGTTGGATGCTCTGATCACCAGTATAGC
扩增引物 2nd	ACGTTGGATGGATTCTCTGGAAGTTCTCGC
延伸引物	ATGTTTCATTTTCATTCTCATC

1.4 基因分型

将质量检测合格的 DNA 标本 (OD260/280=1.7~1.9) 浓度稀释至 15 ng/μl。具体反应过程为 (1) 多重 PCR 反应扩增条件: 95℃ 2 min (预变性); 95℃ 30 s (变性), 56℃ 30 s (退火), 72℃ 60 s (延伸), 共 45 个循环, 最后 72℃ 5 min (末端延伸)。(2) SAP 酶消化反应条件: 37℃ 40 min, 85℃ 5min。(3) 单碱基延伸反应条件: 94℃ 30 s (预变性); 94℃ 5 s (变性), 52℃ 5 s (退火), 80℃ 5 s (延伸), 共 45 个循环, 最后 72℃ 3 min (末端延伸)。(4) 反应产物的树脂纯化。将分析物点样到 SpectroCHIP II-384 芯片上, 用 Sequenom MassARRAY 质谱仪进行 SNP 位点分型, 分型

结果采用 MassARRAY Typer 4.0 软件进行整理分析。

1.5 统计学分析

使用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以构成比表示, 组间比较采用 χ^2 检验。Hardy-Weinberg 平衡定律检测所选 SNP 位点分型数据是否具有人群代表性。采用 PLink 1.07 软件统计 SNP 位点的基因型、等位基因频率及遗传模型分析。计算比值比 (OR) 和 95% 可信区间 (95% CI)。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验

CWP 组和接尘对照组中 rs12610495 位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P>0.05$), 表明所选取的样本具有人群代表性。

2.2 基因型及等位基因频率分析

CWP 组中 *DPP9* 基因 rs12610495 位点的 AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 75.2%、22.1% 和 2.8%, 在接尘对照组中相应的频率为 76.1%、22.2% 和 1.7%, 两组基因型分布比较差异无统计学意义 ($\chi^2=1.731$, $P=0.421$)。CWP 组中 A 和 G 等位基因频率分别为 86.2% 和 13.8%, 在接尘对照组中相应的频率为 87.2% 和 12.8%, 两组等位基因分布比较差异无统计学意义 ($\chi^2=0.565$, $OR=0.917$, 95% $CI=0.731\sim1.150$, $P=0.452$)。见表 2。

表 2 rs12610495 位点的基因型和等位基因分布 例 (%)

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
CWP 组	652	487(75.2%)	143(22.1%)	18(2.8%)	1117(86.2%)	179(13.8%)
对照组	648	493(76.1%)	144(22.2%)	11(1.7%)	1130(87.2%)	166(12.8%)
χ^2 值			1.731			0.565
P 值			0.421			0.452
$OR(95\%CI)$						0.917(0.73~1.150)

2.3 遗传模型分析

遗传模型分析显示, CWP 与接尘对照组的 rs12610495 位点在相加模型 ($OR=1.087$, 95% $CI=0.870\sim1.358$, $P=0.461$)、显性模型 ($OR=0.987$, 95% $CI=0.659\sim1.478$, $P=0.950$) 和隐性模型 ($OR=1.964$, 95% $CI=0.527\sim7.314$, $P=0.148$) 中的基因型分布比较差异均无统计学意义。见表 3。

3 讨论

煤工尘肺是由多种因素及调控机制参与的一种慢性进行性肺部疾病。多年来, 遗传因素与 CWP 发病的相关性研究一直受到广大学者的关注。尽管遗传因素不足以直接导致尘肺病的发生, 但遗传因素与环

表 3 rs12610495 位点在各遗传模型下与 CWP 的风险相关性 例

组别	例数	相加模型	显性模型	隐性模型
		(G/A)	(GG+AG) / AA	GG/ (AG+AA)
CWP 组	652	179/1 117	161/487	18/630
对照组	648	166/1 130	155/493	11/637
χ^2 值		0.565	0.151	1.745
P 值		0.461	0.950	0.148
OR (95%CI)		1.087 (0.870~1.358)	0.987 (0.659~1.478)	1.964 (0.527~7.314)

境因素之间的相互作用，可以改变个体对外界粉尘暴露的反应性，从而使机体的易感性增加，导致疾病发生^[6]。

DPP9 属于丝氨酸蛋白酶 DPP4 家族成员之一，编码基因位于 19p13.3，全长 48.7 kb，由 22 个外显子和 21 个内含子组成。DPP9 表达于脑细胞、上皮细胞、大多数淋巴细胞和部分内皮细胞^[7]，可通过调节 EGF/PI3K/Akt 信号通路参与上皮细胞的凋亡和增殖^[8]。DPP9 还参与细胞粘附和迁移、调控气道炎症反应过程^[9,10]。在 CCl₄ 诱导大鼠肝组织纤维化模型中，DPP9 mRNA 和蛋白表达上调，并且可以调节淋巴细胞活化、增殖和凋亡过程^[11]。

Fingerlin 等^[5]在非西班牙裔白种人中开展的 GWAS 研究中发现，位于 DPP9 基因内含子区的 SNP 位点 rs12610495G 等位基因是肺纤维化发生的高风险因素（OR=1.29，P=9.57×10⁻⁹）。而对欧洲人群特发性肺纤维化（IPF）候选基因的关联分析中发现，rs12610495 位点在捷克、德国、希腊和法国人群中与 IPF 均不相关^[12]。在墨西哥和韩国人群的队列研究中也发现，rs1260495 位点与 IPF 无相关性^[13]。本研究通过对唐山地区汉族煤矿工人 CWP 患者中 DPP9 基因分析发现，rs12610495 位点的基因型及等位基因频率在 CWP 组和接尘对照组中的分布差异均无统计学意义（P 值分别为 0.421、0.452），遗传模型分析也发现该 SNP 位点与 CWP 无关（P 值分别为 0.461、0.950、0.148），认为该位点可能与唐山地区汉族人群 CWP 的发生无相关性。该基因位点出现不一致结果的原因可能是由于不同人种或不同疾病之间的遗传背景的异质性引起。本研究只对 DPP9 基因的 rs12610495 位点与 CWP 的相关性进行了分析验证，CWP 是否与 DPP9 基因的其他 SNP 位点相关尚需进一步研究。

参考文献：

[1] Barber C, Fishwick D. Pneumoconiosis [J]. Medicine, 2016, 44 (6): 355-358.

[2] Yang JJ, Wang LY, Wang T, et al. Associations of MMP-7 and OPN gene polymorphisms with risk of coal workers' pneumoconiosis in a Chinese population: a case-control study [J]. Inhal Toxicol, 2015, 27 (12): 641-648.

[3] Seibold MA, Wise AL, Speer MC, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis [J]. N Eng J Med, 2011, 364 (16): 1503-1512.

[4] Noth I, Zhang YZ, Ma SF, et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study [J]. Lancet Respir Med, 2013, 1 (4): 309-317.

[5] Fingerlin TE, Murphy E, Zhang WM, et al. Genome-wide association study identifies multiples susceptibility loci for pulmonary fibrosis [J]. Nat Genet, 2013, 45 (6): 613-620.

[6] Gaffney A, Christiani DC. Gene-environment interaction from international cohorts: impact on development and evolution of occupational and environmental lung and airway disease [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2015, 36 (3): 347-357.

[7] Yu DM, Ajami K, Gall MG, et al. The in vivo expression of dipeptidyl peptidases 8 and 9 [J]. J Histochem Cytochem, 2009, 57 (11): 1025-1040.

[8] Yao TW, Kim WS, Yu DM, et al. A novel role of dipeptidyl peptidase 9 in epidermal growth factor signaling [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9 (7): 948-959.

[9] Zhang H, Chen Y, Wadham C, et al. Dipeptidyl peptidase 9 subcellular localization and a role in cell adhesion involving focal adhesion kinase and paxillin [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853 (2): 470-480.

[10] Schade J, Stephan M, Schmiedl A, et al. Regulation of expression and function of dipeptidyl peptidase 4 (DP4), DP8/9, and DP10 in allergic responses of the lung in rats [J]. J Histochem Cytoche, 2008, 56 (2): 147-155.

[11] Chowdhury S, Chen Y, Yao TW, et al. Regulation of dipeptidyl peptidase 8 and 9 expression in activated lymphocytes and injured liver [J]. World J Gastroentero, 2013, 19 (19): 2883-2893.

[12] Kishore A, Žižková V, Kocourková L, et al. Association study for 26 candidate loci in idiopathic pulmonary fibrosis patients from four European populations [J]. Front Immuno, 2016, 7 (4): 1-8.

[13] Mushiroda T, Wattanapokayakit S, Takahashi A, et al. A genome-wide association study identifies an association of a common variant in TERT with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Med Genet, 2008, 45 (10): 654-656.

• 声 明 •

关于网络上出现假冒“中国工业医学杂志网站”及在线投稿的声明

《中国工业医学杂志》官网地址 <http://zggyyx.ijournals.cn>，作者注册登录后可在线投稿。目前，网络上出现的假冒“中国工业医学杂志网站”及在线投稿系统与本刊无关，望广大作者和读者认真鉴别，谨防受骗。

本刊编辑部