

炎症性肠病易感基因研究进展

肖玉良, 缪应雷

肖玉良, 缪应雷, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 本文写作由肖玉良完成; 缪应雷审阅。

通讯作者: 缪应雷, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院消化内科, 511121x@163.com

电话: 0871-5324888-2532

收稿日期: 2008-04-18 修回日期: 2008-05-18

接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-18

Research progress in susceptibility genes of inflammatory bowel disease

Yu-Liang Xiao, Ying-Lei Miao

Yu-Liang Xiao, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. 511121x@163.com

Received: 2008-04-18 Revised: 2008-05-18

Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-18

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, is a group of non-specific chronic inflammatory conditions of the gastrointestinal tract with unknown complex etiology. Epidemiologic data indicate genetic contribution to IBD pathogenesis, which include familial aggregation, twin studies, racial and ethnic differences in disease prevalence. The most widely adopted approaches to identifying susceptibility genes in IBD include linkage studies, genome-wide association (GWA) studies and microarray. The first two technologies have confirmed NOD2, IL23R and other genes implicated in IBD pathogenesis and advances in microarray technology makes it possible to diagnose IBD at gene expression level. This article reviewed IBD related genes and introduced application of microarray to IBD research.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Crohn's disease; Ulcerative colitis; Susceptibility; Microarray

Xiao YL, Miao YL. Research progress in susceptibility genes of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2259-2266

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因未明的非特异性慢性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 发病机制复杂, 其单卵双生子的高共患率、发病的家族聚集现象和种族差异, 提示遗传易感性在其发病中的重要作用。对IBD易感基因研究技术包括连锁分析、全基因组关联分析和迅速发展并展现广阔应用前景的基因芯片等。运用前两项技术已在世界范围内大量人群中确认NOD2、IL23R等IBD相关基因, 基因芯片技术的发展使得在基因表达水平诊断IBD成为可能。本文就此对IBD相关基因作一综述, 并介绍基因芯片在IBD研究中的应用。

关键词: 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 易感基因; 基因芯片

肖玉良, 缪应雷. 炎症性肠病易感基因研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(20): 2259-2266

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2259.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD), 在不同人群中其发病率变异较大, 欧洲及北美地区较高, 其UC和CD每年发病率约分别10-20/10⁵和5-10/10⁵患病率100-200/10⁵和50-100/10⁵^[1], 目前美国和欧洲分别有1.4×10⁶及2.2×10⁶人忍受着IBD的折磨^[2], 以往发病率较低的东方国家, 近年也呈现增高趋势。我国1981-2000年间共计报道UC病例10218, 近10年该病报道数上升3.1倍; 2003年总住院患者中CD患者构成比为1990年的2.8倍^[3]。我国目前暂缺乏大规模的流行病学调查, 但粗略估计UC发病率为11.6/10⁵^[4] CD为1.4/10⁵^[5]。而且25%的IBD患者在青少年时期发病^[6]严重影响了青少年生长发育和身心健康。为此, 各国学者在阐明IBD病因、发病机制方面做着不泄努力。在对瑞典^[7], 丹麦^[8]和英国^[9]双生子流行病学调查发现, 单卵双生子具有高共患病率, 加之IBD的家

■背景资料

炎症性肠病(IBD)在我国已非少见, 其发病率和患病率的上升趋势已引起国内医学界的重视, 但对其病因、发病机制、诊断及治疗等的研究相比西方国家仍比较滞后。近年, 欧美学者围绕IBD的遗传易感性进行了大量研究, 揭示出大批致病相关基因。了解西方研究成果及现状, 对认识我国IBD病因及相关研究具有指导意义。

■同行评议者

程斌, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科; 郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

■ 研发前沿

目前具有高通量、高集成、微型化、自动化的基因芯片能在一次试验中间平行分析成千上万个基因,大大提高了检测速度.但要使基因芯片技术走出实验室成为常规检测手段,还需降低芯片成本和在世界范围内进行大量多中心研究,以发现特异性、标志性分子标志.

族聚集现象^[10],证明基因因素在IBD发病中具有重要作用.为此各国学者展开了对IBD致病基因的研究.自1996年, Hugot *et al*^[11]采用连锁分析法,首次定位IBD易感基因位点于16号染色体着丝点周围(16q12)后,对IBD易感基因的研究如雨后春笋般涌现出来,研究手段也是日新月异,从连锁分析(linkage studies)、全基因组关联分析(genome-wide association, GWA)到基因芯片(microarray)的运用,取得一系列瞩目的成绩,本文就此作一综述.

1 连锁分析

基于大量患病家系为基础的连锁分析,只能确定疾病相关基因于染色体10 Mb左右的范围内,要确定具体的致病基因或位点仍然需要大量后续的,如定位克隆等工作.连锁分析大都假定疾病性状只受单个基因的控制,仅能发现致病主效基因,对于受多基因控制的复杂疾病相关基因研究收效甚微,对于复杂疾病的易感基因定位已被GWA等手段取代,但通过该手段发现的CD特异性易感基因座位IBD1和共同易感基因座位IBD3中NOD2、HLA基因,至今仍在世界范围内进行大量相关性和功能研究,故本文对此两基因作一概述.

1.1 CARD15/NOD2 位于16号染色体IBD1位点的胱冬酶吸引域家族成员15(caspase recruitment domain family, member 15, CARD15)/核苷酸结合寡聚域2(nucleotide-binding oligomerization domains, NOD2)基因是第一个被发现的CD易感基因^[12-13]其基本功能为介导细胞凋亡和诱导核因子- κ B(NF- κ B)的活化^[14-15]当NOD2突变,导致的2个氨基酸互换(Arg702Trp, Gly908Arg)和一个因胞嘧啶插入导致的移码突变(3020insC)使第十个C末端富含色氨酸的重复序列构成的区域发生Leu1007Pro氨基酸改换,终止密码子提前,使其蛋白丢失最后33个氨基酸导致NF- κ B活性的降低,机体先天性低反应,从而诱导机体对肠道细菌异常强烈的继发免疫反应而引起CD^[16]虽然NOD2基因突变已证明与CD有关,但在不同人种中,其出现频率及与疾病相关程度不同.德裔和西班牙裔犹太人及荷兰CD患者中3种主要突变频率均显著增高^[17-19]瑞典人群中CD发病与Arg702Trp和Gly908Arg突变有关,而与Leu1007fs无关^[20]相反在丹麦人群中Leu1007fs则为主要突变型^[21]对国人的研究^[22-23]并未发现NOD2突变与CD的关系.目前对CARD15/NOD2基因结构、功

能及其在CD发病机制中的作用有一定了解后,其与其他细胞因子的相互作用也逐渐受到关注, Linderson *et al*^[24]研究发现CARD15/NOD2与另一个重要的易感基因TNF- α 的基因多态性间存在相互作用,并在一定程度上影响人群易感性和CD的表现形式. Gazouli *et al*^[25]认为CARD15/NOD2和TLR4或CD14之间的相互作用可增加IBD,尤其是CD的发病危险性.在今后研究中弄清CARD15/NOD2与其他因子相互作用机制,及证实与其突变相互作用的可能因子,包括环境及细菌等因素是非常重要的.

1.2 HLA 连锁分析和候选基因研究都证实位于6号染色体短臂(6p13)的IBD3区域的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)又称人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)与UC及CD均有关. HLA基因包括HLA-I、HLA-II及HLA-III,具高度多态性.近年发现位于HLA-B端粒46 kb处的非经典I类基因,如MHCI类相关基因A(MHC class I chain-related gene A, MICA)和MHCI类相关基因B(MHC class I chain-related gene B, MICB),与IBD存在关联. MICA和MICB分子与其表达于NK细胞、T细胞和巨嗜细胞上的受体NKG2D结合,共同激发上述细胞的活性,当细菌或病毒感染时表达增加.两者部分等位基因的突变,改变与受体NKG2D的结合力可能影响免疫系统的活性.在对国人的研究^[26-27]已证实MICA-A51和MICB-CA18与国人UC有相关性.

与HLA-I类基因相比,HLA-II类基因与IBD关系更为密切. HLA-II属于免疫球蛋白超基因家族,对T细胞免疫应答及B细胞产生抗体均有重要作用.目前研究多提示HLA-II类基因区三个与IBD相关的位点中,UC与DR2、DR9相关而与DR4无明显相关性,CD与DR7、DQ4相关,而与DR2、DR3无明显相关性,但HLA-II类基因区DR、DP和DQ 3个与IBD相关的位点,在HLA-II类基因上紧密连锁,而非独立存在,哪个亚区为初级,哪个为次级相关尚待进一步研究.

HLA-III区域编码肿瘤坏死因子TNF- α 而受到广泛关注, TNF- α 是一种具有多种生物活性的促炎细胞因子和免疫调节剂. TNF基因启动区域的6个单核苷酸多态性(TNF-1031T/C, -863C/A, -857C/T, -380G/A, -308G/A, -238G/A)与IBD遗传易感性在不同人群中报道不一. Cucchiara *et al*^[28]在意大利IBD患者中发现TNF-308A与CD及UC均显著相关,而与TNF-C857T

无相关性. 捷克人群研究^[29]揭示TNF-308A与CD表现型有关, 而部分人群, 如土耳其^[30]及印度人群^[31]中研究提示TNF- α 基因多态性与IBD并无明确关联. 姒健敏 *et al*^[32]对国人的研究发现TNF2308A等位基因频率在UC患者中为14.6%, 而在健康对照者中为8.9%, 两者之间有显著差异, 提示TNF-308A可能与国人UC遗传易感性相关.

2 全基因组关联分析

关联分析是比较病例组与对照组个体在某个遗传标记位点等位基因出现的频率, 即如果一种疾病的易感变异体位于基因组中的某个地方, 通过他们与基因型芯片中标签单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP), 之间的连锁不平衡关系可以对其进行检测. 该方法无需采集家系资料, 样本较易获得. 近年快速发展的SNP芯片, 可扫描个体DNA样本的上百万个单基突变. 较之连锁分析在IBD等多基因疾病易感基因的研究中展现强大的优势. 至目前, 运用GWA技术不仅肯定了前有的部分基因(如NOD2、IBD5)与IBD的关联性, 而且还发现了如白介素-23受体(interleukin-23 receptor, IL23R)基因、ATG16L1等新的致病基因.

2.1 IL23R 美国的IBD多中心协作研究组^[35], 在2006年运用GWA技术检测IBD易感基因时, 不但再次肯定了NOD2基因与IBD关联的同时, 而且还在1号染色体(1q31)区域新发现了此后得到大量验证实验所支持的IL23R基因. IL23R基因与IBD关系密切的是氨基酸Arg381Gln的多态性, 该等位基因在非犹太裔欧洲CD患者和健康对照人群中出现频率分别为1.9%和7.0%^[35], 提示Arg381Gln基因对IBD易感性具保护作用. IL23R基因区除Arg381Gln外, 介于IL23R基因和其紧靠着丝粒的同源基因IL2RB2基因之间的5-11个编码序列多态性也证明与IBD显著相关^[33]. 最近, 世界各研究中心进行的验证实验中, 在欧洲儿童^[34-36]和成人CD^[37-38]及UC^[39]患者中均验证了IL23R与IBD的相关性. IL23是一个由亚单位p19和白介素12(IL12)的p40通过二硫键形成的异源二聚体分子, 是IL12细胞因子家族的新成员. IL23除了与IL12共用受体亚单位白介素12R β 1外, 还有一个自身特有的受体亚单位即IL23R. IL23是辅助性T细胞(helper T cells, Th)分化, 尤其是分化为Th17时的关键因子, 能通过IL-1的协同作用, 直接刺激成熟Th17释放细胞

因子, 致使Th17在不需要任何抗原刺激的情况下增强组织炎症反应和适应性免疫应答. 动物实验^[40]已证明Th17在调节慢性自发性炎症反应时的关键作用也就是说IL23间接的增强组织炎症反应. 鉴于IL23在炎症反应中的重要作用, 有学者在运用阻断其和IL12共同亚单位p40作位治疗靶点时, 发现具有一定作用^[41], 但IL23R在IBD中的作用可能不仅是功能缺失突变, 今后的研究中, 应在阐明Arg381Gln发挥保护作用的机制方面进一步研究以指导临床治疗.

2.2 ATG16L1 自噬相关16样1(芽殖酵母)(autophagy-related 16-like-1, ATG16L1)基因位于2号染色体长臂(2q37.1), ATG16L1蛋白包括N末端的APG16卷曲螺旋和C末端的8个色氨酸-天冬氨酸重复序列(W-D repeats), 主要表达于肠上皮细胞和CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺淋巴细胞, 是一种涉及处理细胞内细菌的自噬小体代谢途径的蛋白. 在处理细胞内细菌感染, 如抑制巨噬细胞内结核分支杆菌发挥重要作用. 敲除ATG16L1基因会降低HeLa细胞对沙门氏菌吞噬作用^[42]. Hampe *et al*^[43]研究发现, 位于ATG16L1蛋白N末端WD重复结构域的Ala197Thr氨基酸多态性与CD显著相关, 而与UC无相关性. 该结果随后被英国的病例对照研究所证实. 此后进行的验证实验^[44-46]也支持了ATG16L1与CD的相关性. 由此可见, 宿主细胞对胞内细菌反应在CD发病中可能发挥作用.

3 基因芯片在IBD中的应用

尽管易感基因的染色体定位, 对在染色体水平上鉴定IBD的易感位点是十分重要的, 但是这些基因都是通过其编码的蛋白质或转录因子行使功能的, 因此从基因的表达水平进行候选基因的分析同等重要. 运用基因芯片在基因组范围内筛查可发现疾病特异性的功能和表达改变, 发现疾病治疗靶点和早期标志. 基因芯片技术是近年来出现的一种高通量的分子生物学技术, 他能够在同一时间内分析大量的基因, 实现生物基因信息的大规模检测. 通过比较正常和疾病状态下的基因转录及其表达的差异, 寻找和发现该疾病相关的候选基因, 为疾病的诊断和治疗提供分子生物学方面的依据. 其工作原理是: 经过标记的待测样本DNA通过与芯片上特定位置的探针杂交, 可根据碱基互补配对的原则确定靶DNA序列, 经激光共聚焦显微镜扫描, 以计算机系统对荧光信号进行比较和检测, 并

■ 相关报道

由于基因芯片高昂的价格, 目前运用基因芯片在基因表达水平上寻找IBD相关基因的报道不多, 多数为针对既往的如NOD2、HLA等连锁分析发现的IBD相关基因多态性与IBD相关性展开的研究.

■创新盘点

本文就近年来NOD2、HLA基因多态性与IBD关系研究进展综述的同时,介绍了迅速发展的全基因组关联分析和基因芯片技术在IBD易感基因研究的最新成果,并且从不同技术角度总结了研究成果。

迅速得出所需的信息. 他最显著的特点是高通量、高集成、微型化、多样化和自动化, 比常规方法效率高几十到几千倍, 可在一次试验中间平行分析成千上万个基因, 是一种进行DNA序列分析及基因表达信息分析的强有力工具自1995年问世以来, 短短十年间得到了迅速的发展和运用, 展现了广阔的应用前景。

基因芯片技术最初运用于IBD领域始于1996年Heller *et al*^[47]运用基因芯片检测重度类风湿关节炎患者滑液组织和接受手术治疗的CD患者切除病变组织基因表达, 尽管该小组所运用的cDNA芯片仅能检测96个基因, 但仍在两者中检测出共同表达的炎症疾病诱导基因, 如IL-1, IL8, TNF和粒细胞集落刺激因子等, 并首次报道了以前未发现的基因如HME和黑色素瘤生长刺激因子. 该研究受检测基因数量的限制未发现CD特异性相关基因, 但推动了基因芯片在IBD等多基因疾病中的运用. 此后研究人员分别采用手术切除标本、内镜下钳取黏膜标本, 和外周血等提取RNA对IBD患者肠道病变及正常组织和健康对照人群分别比较, 以期发现在疾病发生、发展中潜在或致病的基因. 但因为运用芯片类型、标本选择的不同, 以及人群自然差异等, 目前为止未发现被多数基因芯片实验共同支持的基因, 本文就此介绍其中几项典型研究。

3.1 组织标本 在早期进行的实验中, 由于芯片高昂的价格, 在使用芯片数目较少的情况下, 一些研究者倾向于把经过同一种处理的多个个体的RNA进行混合^[48-51], 希望能消除个体差异, 如Lawrance *et al*^[48]将分别取自UC, CD和正常对照各6例的结肠切除标本提取的RNA分别按UC, CD和正常对照组分别混合. 结果和健康对照人群相比在UC和CD各自有108个和29个不同表达的基因, 值得注意的是在IBD2区域发现ATPase2B1和CRADD在CD、UC均表达下调, 以及此后被证实的MDR1在CD和UC中表达下调和HLA在UC中的表达上调, 可能受检测基因数量的限制在其他IBD位点未发现IBD相关基因. 在UC中表达异常基因中最值得注意的为DD96基因, DD96为正常上皮中低表达而在肺癌、乳腺癌和结肠癌中大量表达的肿瘤相关基因, 其在UC中表达, 在基因层面揭示了临床中UC具有癌变倾向的分子机制. 该研究结果显示CD与UC相比最大的区别是自然的抗微生物防御素DEFA5和DEFA6的高表达, 抗菌肽在CD中的高表达, 提示了细菌感染在CD发病中可能具

有重要作用. Dieckgraefe *et al*^[52]运用相同的芯片报道的UC表达上调的74个基因中, 21个被该研究所验证. 在这两项试验都同时明显表达上调的UC相关基因有REG家族、MMPs、钙结合蛋白S100.

随着人类基因芯片技术的不断进步, 一次检测基因数量大大增加. Langmann *et al*^[51]运用IBD患者和结肠和直肠的非病变部位提取标本后按UC、CD各自结、直肠组分别混合RNA. 在检测22 283个基因中, 最显著的是MDR1和PXR在UC中的表达下调. 证实了基因组扫描和定位克隆发现的MDR1在UC中的表达下调. PXR作为核受体在解毒作用的转录调节中具有重要作用, PXR能被糖皮质激素, 如地塞米松; 抗菌素, 如利福平等激活, 从而激发编码解毒酶基因的表达发挥对结肠上皮细胞的保护作用^[53]. PXR在UC患者中的表达下调甚至却失, 可能为结肠上皮损伤的机制之一. 但该研究报道的UC和CD患者在结肠和直肠不同取材部位异常表达基因数量不同的结果, 被后续实验^[54-55]和动物实验^[56]所否定。

上述早期试验中具有两个明显缺陷, 其一采用的手术切除组织做标本, 只有少部分到疾病末期, 病情严重患者才需要接受手术治疗, 这样不仅限制了研究对象的范围, 且疾病不同阶段基因表达可能具有差异, 采用手术患者为研究对象可能会掩盖影响疾病早期发生发展的基因. 另外一个重要缺陷是, 混合患者RNA在一定程度上掩盖了疾病多样性, 对发现IBD患者基因亚型不利. Costello *et al*^[54]和Wu *et al*^[55]在此以后以内镜下取材, 分别对UC、CD的RNA非混合与健康对照人群比较, 前者在UC和CD中分别发现272个和500个异常表达的基因, 而后者发现131和77个异常表达基因. 遗憾的是前者报道的异常表达基因中, 仅有4个基因与后者重复(在UC表达上调基因中的BF, NOS2A, TIMP1, 和表达下调基因SLC26A2)Costello *et al*报道表达异常基因于其他试验重复率也低, 其原因可能为其试验采用cDNA芯片的缘故, 而其他研究多采用高密度寡核苷酸芯片. 在Feng *et al*的研究中, 与其研究小组早期报道相比, 该研究发现CD表达上调基因大大增加, 这可能证实了手术切除标本为疾病末期, 部分基因已不表达, 而内镜取材标本病变于早期, 参与调节基因较多. 此两项研究与其他相比, 重复率较高的基因有UC中PXR、MDR的表达下调, CD中HLA、LCN2表

达上调. 另外Feng *et al*报道的在CD中表达上调的基因IFITM1, IFITM3, STST1, STAT3是IL23参与调节的TH1通道激活的标志. 而IL23如前所述具有间接增强组织炎症反应的作用, 基因芯片研究支持了关联分析成果, IL23可作为IBD患者一个重要的治疗靶点.

3.2 外周血标本 与通过手术或内镜获取肠道组织相比, 外周血是一个更容易获取的检查标本, 这种无创性的检查可以得以在大量人群中展开. 外周血中单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)负责全身的免疫监视和作为感染等疾病的标志, 因此可以用其代替肠道组织标本作为发现疾病导致的基因表达标志和评价疾病状态、严重性等^[57]. Maas *et al*^[58]首先运用基因芯片检测自身免疫性关节炎, 系统性红斑狼疮, 多发性硬化, 和 I 型糖尿病患者PBMCs基因表达. 目前IBD领域运用PBMCs提取RNA进行芯片检测的两项试验都在美国人群中进行. Mannick *et al*^[59]运用cDNA芯片检测7名CD患者和5名UC患者和10名非IBD肠道炎症患者及6名健康对照人群PBMCs基因表达差异, 结果在检测的2400个基因中CD与其他炎症性肠道疾病相比分别有24个基因表达上调和28个表达下调, 而UC则分别有12个表达上调和7个表达下调. 因为目前研究显示IBD患者在治疗前后基因芯片检测具有明显基因表达差异^[60-61]所以该研究纳入新发未接受治疗IBD患者, 对发现具有早期诊断意义的基因标志更具合理性. Burczynski *et al*^[61]开展了迄今为止最大规模研究, 纳入了59名CD和26名UC患者及42名健康对照. 所采用的寡核苷酸芯片能一次检测22 000个基因序列. 结果发现, 在CD与正常人相比异常表达的220个基因中, 67个在UC中与正常人比较无明显差异, 而在UC中表达差异的120个基因中, 20个在CD中无异常表达, 可能这分别仅在CD和UC中表达的部分基因因其各自特异性标志. 与Mannick *et al*的研究比较, 两者报道CD表达上调的基因几乎没有重复. 唯一具有相似性的是Mannick *et al*发现的CD表达上调基因多为TGF- β 激发的转录产物, 而本研究中报答的TSC-22即为典型的TGF- β 激发的转录产物, 这两项研究提示, TGF- β 表达上调在CD发病的免疫反应中具有一定的作用. CD特异性表达上调的多为前列腺素代谢酶, 趋化激素, 转录调节因子等致炎症基因, 例如: 环加氧酶在CD中表达明显上调, 而前列腺素D2合酶却表达下调. 这可能会导致花生四烯酸选择

性的合成某些前列腺素增加. UC中特异性明显表达上调的为编码免疫球蛋白序列, 如IgHG3. 这与UC患者血清检测出免疫球蛋白升高所吻合^[62]. IBD中都明显表达上调的是2型纤维蛋白溶酶原活化抑制因子. PAI-2对u-PA和t-TA激活具有酶特异性, 此前在风湿性关节炎患者滑液中检测出PAI-2增高^[63], 这个研究表面, 血液纤溶和凝血系统的改变, 在IBD患者肠道出血作用中具有一定作用.

尽管该研究研究为目前为止最大样本量的研究, 但要确认出具有分子诊断意义的特异性基因表达, 还需要更大人群的研究. 随着芯片技术的不断进步和成本下降, 在不久的将来采用外周血对IBD患者迅速作出分子学诊断已成为可能. 如最近生物科技公司Progenika日前研制开发一种新型DNA基因芯片EBDChip, 这种芯片被用来提高IBD包括CD和UC的诊断、判断预后以及治疗. EBDChip能够分析与IBD相关的46种突变, 计划不久就开始临床试验. IBDChip分析多种基因多态性以帮助确定IBD的危险、判断疾病预后以及患者对治疗出现的反应. 这种芯片不仅可以帮助临床选择最合适的治疗方法, 还能够帮助确定受测试家庭成员易感性程度.

4 结论

目前, 对IBD的治疗包括糖皮质激素, 氨基水杨酸制剂和免疫抑制剂等. 这些药物能控制许多患者疾病的严重性, 但是副作用严重以及一些症状用药无效也显著降低了这些患者的生活质量. 因此, 急需相应的特异性治疗如生物制剂的免疫调节, 基因治疗等. 但这些治疗措施是必须建立在明确该疾病的病因和发病机理基础之上的. 因此, 在基因水平上进行IBD发病机理的研究是十分迫切需要的. 随着基因芯片技术的不断进步, 这已成为可能. 但尽管基因芯片技术取得了长足的发展, 但仍主要应用于实验室的基础研究中. 要想作为一种常规的快速、准确的方法应用到临床IBD的诊断、疗效观察和预后判断中, 还有很多的问题需要解决. 首先是成本的问题, 由于芯片制作的工艺复杂, 信号检测也需专门的仪器设备, 一般实验室难以承担其高昂的费用, 其次在芯片实验技术上还有多个环节尚待提高, 如在探针合成方面, 如何进一步提高合成效率及芯片的集成程度是研究的焦点. 而样品制备的简单化与标准化则芯片应用进一步普及的前提. 再者, 在研究对象选择上应该建

■应用要点

随着芯片技术的不断进步和成本下降, 运用该先进技术手段在基因表达水平上寻找IBD等多基因疾病的特异性、标志性分子标志, 可能会成为致病基因研究的高效手段.

■名词解释

1 连锁分析: 基本原理是通过分析两个遗传位点在家系中的共分离性来确定控制疾病表型变异的基因位点, 主要有参数和非参数两类方法。参数方法需要假定性状的遗传模式以及有关参数的值, 如外显值、重组率等, 然而对大多数疾病, 很难估计其孟德尔遗传的有关参数。非参数方法不需要假设性状遗传的模式, 但完全依赖于已知标记的遗传模式。连锁分析的功效又与个体疾病表型的正确诊断有关。因此, 特别适用于受单基因控制和表型存在明显差异的简单孟德尔疾病。

2 全基因组关联分析: GWA的设计基本原理同经典的病例对照研究相同, 即假设某个SNP与疾病发生关联, 则理论上病例(患有该疾病)中该SNP的等位基因频率应当高于对照组(未患有该疾病)。然后通过假设检验来检验该假设。GWA研究的特点是不再选择候选基因或者候选染色体区域, 而是针对基因组所有的SNPs。

立规范纳入标准, 在IBD不同疾病阶段, 治疗与否及治疗前后都会造成基因表达的差异。在今后的研究中应分别采用大样本的, 处于疾病各阶段的病人, 以期发现在疾病个阶段发生发展都发挥作用的共同基因标志, 为在基因诊断、治疗、药物筛选上发现共同的靶点。

5 参考文献

- 1 Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 Suppl 5: V1-V16
- 2 Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517
- 3 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 4 中国炎症性肠病协作组, 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 368-372
- 5 Retrospective analysis of 515 cases of Crohn's disease hospitalization in China: nationwide study from 1990 to 2003. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1009-1015
- 6 Rubin GP, Hungin AP, Kelly PJ, Ling J. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1553-1559
- 7 Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003; 124: 1767-1773
- 8 Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1075-1081
- 9 Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996; 312: 95-96
- 10 Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3668-3672
- 11 Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823
- 12 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
- 13 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas

R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606

- 14 Eckmann L, Karin M. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity* 2005; 22: 661-667
- 15 Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* 2004; 14: 2217-2227
- 16 Zhou Z, Lin XY, Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Levine J, Katz S, Silver J. Variation at NOD2/CARD15 in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 3095-3101
- 17 Karban A, Waterman M, Panhuysen CI, Pollak RD, Nesher S, Datta L, Weiss B, Suissa A, Shamir R, Brant SR, Eliakim R. NOD2/CARD15 genotype and phenotype differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1134-1140
- 18 Tukel T, Shalata A, Present D, Rachmilewitz D, Mayer L, Grant D, Risch N, Desnick RJ. Crohn disease: frequency and nature of CARD15 mutations in Ashkenazi and Sephardi/Oriental Jewish families. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 623-636
- 19 van der Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ, Crusius BJ, Wilson PJ, Kuipers EJ, de Rooij FW. CARD15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel disease and an overview of European studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 449-459
- 20 Törkvist L, Noble CL, Lördal M, Sjöqvist U, Lindfors U, Nimmo ER, Russell RK, Löfberg R, Satsangi J. Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to Crohn's disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 700-705
- 21 Ernst A, Jacobsen B, Ostergaard M, Okkels H, Andersen V, Dagilene E, Pedersen IS, Thorsgaard N, Drewes AM, Krarup HB. Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1445-1451
- 22 Gao M, Cao Q, Luo LH, Wu ML, Hu WL, Si JM. [NOD2/CARD15 gene polymorphisms and susceptibility to Crohn's disease in Chinese Han population] *Zhonghua Neike Zazhi* 2005; 44: 210-212
- 23 Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1069-1071
- 24 Linderson Y, Bresso F, Buentke E, Pettersson S, D'Amato M. Functional interaction of CARD15/NOD2 and Crohn's disease-associated TNFalpha polymorphisms. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 305-311
- 25 Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 681-685
- 26 Ding Y, Xia B, Lü M, Zhang Y, Li J, Ye M, Luo H, Yu J, Zhang X, Tan J. MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:

- 193-198
- 27 Lu M, Xia B, Li J, Ye M, Zhang X, Tan Q. MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Immunol* 2006; 120: 199-204
 - 28 Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, De Venuto D, Riegler G, De'Angelis GL, Guagnozzi D, Bascietto C, Miele E, Valvano MR, Bossa F, Annese V. Polymorphisms of tumor necrosis factor- α but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 171-179
 - 29 Sýkora J, Subrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalová V, Varvarovská J, Pazdiora P, Pozler O, Stozický F. Cytokine tumor necrosis factor- α A promoter gene polymorphism at position -308 G \rightarrow A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 479-487
 - 30 Celik Y, Dagli U, Kiliç MY, Törtüner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 559-565
 - 31 Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC. Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor- α and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 920-924
 - 32 姒健敏, 朱琴. 炎症性肠病的遗传学研究若干进展. 国际消化病杂志 2006; 26: 75-77
 - 33 Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhardt AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JL, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-1463
 - 34 Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 972-976
 - 35 Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JL. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 511-515
 - 36 Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Davies G, Anderson NH, Gillett PM, McGrogan P, Hassan K, Weaver L, Bisset WM, Mahdi G, Wilson DC, Satsangi J. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut* 2007; 56: 1173-1174
 - 37 Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, Timms KM, Gutin A, Lanchbury JS, Merriman TR, Barclay ML, Kennedy MA. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2754-2761
 - 38 Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, Pathan S, Guo C, Cardon LR, Jewell DP. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1063-1068
 - 39 Büning C, Schmidt HH, Molnar T, De Jong DJ, Fiedler T, Bühner S, Sturm A, Baumgart DC, Nagy F, Lonovics J, Drenth JP, Landt O, Nickel R, Büttner J, Lochs H, Witt H. Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers a protective effect not only against Crohn's disease but also ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1025-1033
 - 40 Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203: 2473-2483
 - 41 Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezada M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2069-2079
 - 42 Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JL, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 596-604
 - 43 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, DeLa Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häslar R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39: 207-211
 - 44 Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 1171-1173
 - 45 Cummings JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barrett JC, Beckly J, Geremia A, Hancock L, Guo C, Ahmad T, Cardon LR, Jewell DP. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 941-946
 - 46 Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007; 132: 1665-1671
 - 47 Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*

同行评价

本文选题较新颖, 表述清晰, 逻辑性强, 对IBD临床及科研工作均具有指导意义。

- 1997; 94: 2150-2155
- 48 Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 445-456
- 49 Uthoff SM, Eichenberger MR, Lewis RK, Fox MP, Hamilton CJ, McAuliffe TL, Grimes HL, Galandiuk S. Identification of candidate genes in ulcerative colitis and Crohn's disease using cDNA array technology. *Int J Oncol* 2001; 19: 803-810
- 50 Dooley TP, Curto EV, Reddy SP, Davis RL, Lambert GW, Wilborn TW, Elson CO. Regulation of gene expression in inflammatory bowel disease and correlation with IBD drugs: screening by DNA microarrays. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 1-14
- 51 Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* 2004; 127: 26-40
- 52 Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, Swanson PE, Harrington CA. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2000; 4: 1-11
- 53 Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619: 243-253
- 54 Costello CM, Mah N, Häsler R, Rosenstiel P, Waetzig GH, Hahn A, Lu T, Gurbuz Y, Nikolaus S, Albrecht M, Hampe J, Lucius R, Klöppel G, Eickhoff H, Lehrach H, Lengauer T, Schreiber S. Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Med* 2005; 2: e199
- 55 Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, Bayless TM, Parmigiani G, Chakravarti S. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 807-821
- 56 Bates MD, Erwin CR, Sanford LP, Wiginton D, Bezerra JA, Schatzman LC, Jegga AG, Ley-Ebert C, Williams SS, Steinbrecher KA, Warner BW, Cohen MB, Aronow BJ. Novel genes and functional relationships in the adult mouse gastrointestinal tract identified by microarray analysis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1467-1482
- 57 Rockett JC, Burczynski ME, Fornace AJ, Herrmann PC, Krawetz SA, Dix DJ. Surrogate tissue analysis: monitoring toxicant exposure and health status of inaccessible tissues through the analysis of accessible tissues and cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 194: 189-199
- 58 Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* 2002; 169: 5-9
- 59 Mannick EE, Bonomolo JC, Horswell R, Lentz JJ, Serrano MS, Zapata-Velandia A, Gastanaduy M, Himel JL, Rose SL, Udall JN Jr, Hornick CA, Liu Z. Gene expression in mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2004; 112: 247-257
- 60 Yagi Y, Andoh A, Ogawa A, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Mitsuyama K, Fujiyama Y. Microarray analysis of leukocytapheresis-induced changes in gene expression patterns of peripheral blood mononuclear cells in patients with ulcerative colitis. *Ther Apher Dial* 2007; 11: 331-336
- 61 Burczynski ME, Peterson RL, Twine NC, Zuberek KA, Brodeur BJ, Casciotti L, Maganti V, Reddy PS, Strahs A, Immermann F, Spinelli W, Schwertschlag U, Slager AM, Cotreau MM, Dorner AJ. Molecular classification of Crohn's disease and ulcerative colitis patients using transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Diagn* 2006; 8: 51-61
- 62 Winther KV, Føgh P, Thomsen OØ, Brynkskov J. Inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease): diagnostic criteria and differential diagnosis. *Drugs Today (Barc)* 1998; 34: 935-942
- 63 Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995; 86: 4007-4024

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。(常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)