

· 论 著 ·

睡眠和昼夜节律基因及其累积效应与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的相关性

木叶斯尔·木合塔尔^{1,2}, 朱晴^{1,2}, 曹媛媛¹, 穆娅沙·塔衣尔^{1,2}, 胡君丽¹, 李南方¹

1. 新疆维吾尔自治区人民医院高血压中心 新疆高血压研究所 国家卫健委高血压诊疗研究重点实验室 新疆维吾尔自治区重点实验室“新疆高血压病研究实验室”新疆高血压(心脑血管)疾病临床医学研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆医科大学研究生院, 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要: **目的** 评估睡眠和昼夜节律基因多态性及其联合作用与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)的相关性。**方法** 利用公共数据库和已有文献收集与睡眠和昼夜节律相关基因,采用生物信息学分析方法探讨候选基因参与 OSAHS 的潜在机制,并在新疆维吾尔自治区人民医院选取的 50 例重度 OSAHS 和 50 例非 OSAHS 患者中进行目标区域二代测序,筛选出 OSAHS 的易感位点,建立加权遗传风险评分(GRS),分析 GRS 与 OSAHS 的关联,探讨 GRS 与传统因素的交互作用对 OSAHS 的预测能力。**结果** 本研究共纳入 44 个候选基因,进行生物信息学分析表明 44 个候选基因参与了睡眠与昼夜节律相关生物学过程和信号通路;对不同遗传模型下的变异进行 logistic 回归分析,调整了潜在的混杂因素后得到 KSR2、NPAS2、OXTR、GHRL 等 4 个基因与 OSAHS 仍有明显的相关性,对上述 4 个基因的 6 个位点(KSR2-rs2592290, rs1992750, rs66837180, NPAS2-rs2278727, OXTR-rs3806675, GHRL-rs10490816)进行 GRS,结果显示,高 GRS 组人群比低 GRS 组人群有更高的 OSAHS 风险($OR=2.901, 95\%CI:1.288-6.534, P=0.010$),此外将 GRS 加入到 OSAHS 传统风险因素(年龄、性别及 BMI)组成的回归模型后,其曲线下面积(AUC)值从 0.877 增加到 0.902。**结论** KSR2、NPAS2、OXTR、GHR 等睡眠与昼夜节律相关基因可能是 OSAHS 的遗传易感基因;基于上述 4 个基因的 6 个位点建立的 GRS 与传统因素的联合作用,更能提高 OSAHS 的预测效能。

关键词: 睡眠呼吸暂停低通气综合征, 阻塞性; 生物信息学; 遗传风险评分; 风险评估; 基因多态性; 昼夜节律

中图分类号: R56 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2022)10-1349-07

Associations of sleep, circadian rhythm genes and their cumulative effects with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome

Muyesier · Muhetaer*, ZHU Qing, CAO Yuan-yuan, Muyasha · Tayier, HU Jun-li, LI Nan-fang

* Hypertension Center, Xinjiang Uygur Municipal People's Hospital, Urumqi, Xinjiang 830001, China

Corresponding author: LI Nan-fang, E-mail: lnanfang2016@sina.com

Abstract: Objective To evaluate the associations of sleep, circadian rhythm gene polymorphisms and their combined effects with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS). **Methods** The sleep and circadian rhythm-related genes were collected from public databases and existing literatures to explore the potential mechanism of candidate genes participating in OSAHS by bioinformatics analysis. Fifty cases of severe OSAHS and 50 cases of non-OAHS were selected from the Xinjiang Uygur Municipal People's Hospital for second-generation sequencing of the target region to screen out the susceptibility loci of OSAHS, and establish a weighted genetic risk score(GRS) to analyze its correlation with OSAHS. The predictive effect of interaction between GRS and traditional factors on OSAHS was analyzed. **Results** Bioinformatics analysis indicated that 44 candidate genes were involved in biological processes and signal pathways

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2022.10.004

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C173)

通信作者: 李南方, E-mail: lnanfang2016@sina.com

出版日期: 2022-10-20

related to sleep and circadian rhythm. Logistic regression analysis was carried out for the variation under different genetic models. After adjusting for potential confounding factors, it was found that KSR2, NPAS2, OXTR and GHRL genes were significantly correlated with OSAHS. Six loci (KSR2-rs2592290, rs1992750, rs66837180, NPAS2-rs22787727, OXTR-rs3806675 and GHRL-rs10490816) of the four genes were analyzed using GRS. The high GRS group had a higher risk of OSAHS than the low GRS group ($OR=2.901$, $95\%CI: 1.288-6.534$, $P=0.010$). After adding GRS to the regression model composed of traditional risk factors (age, sex and BMI) of OSAHS, the area under the curve (AUC) value increased from 0.877 to 0.902. **Conclusion** The sleep and circadian rhythm-related genes such as KSR2, NPAS2, OXTR and GHRL may be the genetic susceptibility genes for OSAHS. The combination of GRS established based on the six loci of the four genes and traditional factors could improve the prediction model of OSAHS.

Keywords: Sleep apnea hypopnea syndrome, obstructive; Bioinformatics; Genetic risk score; Risk assessment; Gene polymorphism; Circadian rhythm

Fund program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region(2021D01C173)

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS) 是一种常见的慢性睡眠呼吸疾病,也是难治性继发性高血压的常见病因之一。以上呼吸道的部分或完全阻塞导致的呼吸暂停为特征,继而产生睡眠结构紊乱、高碳酸血症及间歇性低氧血症,并使机体出现一系列病理生理改变,同时被认为是心脑血管疾病的独立危险因素,严重危害患者日常生活^[1-2]。然而 OSAHS 的发病机制至今尚不明确,可能由多种相互作用的遗传和环境因素引起。研究显示,OSAHS 与多种遗传因素有关,具有家族聚集性和遗传倾向,同时有研究表明,基因可能通过睡眠和昼夜节律、颅面结构、肥胖、上呼吸道肌肉的神经调节等表型途径,间接影响 OSAHS 的易感性^[3]。最近一项 Meta 分析显示,OSAHS 患者中失眠、入睡困难、夜间多醒及早醒的发生率分别为 38%、18%、42% 和 21%^[4]。然而,慢性睡眠和昼夜节律紊乱促发了脂质代谢、炎症、血流动力学波动引起的自主神经系统的激活、下丘脑-垂体-肾上腺轴的激活等有害的病理生理机制^[5-6],可能与 OSAHS 的发病机制有关。睡眠和昼夜节律紊乱可能不仅是 OSAHS 的后果,也是 OSAHS 的危险因素。然而睡眠与昼夜节律相关基因及其多位点联合效应与 OSAHS 之间的关系尚不清楚。因此,本研究从现有文献和公共卫生基因组学知识数据库 (Public Health Genomics Knowledge Base, PHGKB) 中筛选出 44 个睡眠-昼夜节律相关基因,结合生物信息学分析方法探讨突变基因参与 OSAHS 的潜在机制,同时通过靶向测序分析在人群中的变异位点,分析睡眠节律紊乱相关基因与 OSAHS 的相关性。采用加权遗传风险评分 (genetic risk score, GRS) 法计算研究对象的 GRS,探讨其与 OSAHS 的关联,并分析传统危险因素与 GRS 对 OSAHS 的联合预测能力。

1 对象与方法

1.1 研究对象 连续纳入 2016 年 4 月至 12 月在新疆维吾尔自治区人民医院高血压中心就诊并疑诊 OSAHS (本人、同病房患者或家人述患者存在夜间打鼾;无法解释的口唇紫绀;无明显诱因发生的白天嗜睡、憋醒)的患者,接受并完成整夜多导睡眠监测 (PSG)。OSAHS 的诊断和严重程度基于个人病史和呼吸暂停低通气指数 (AHI)。按照本中心前期研究中详细说明书的纳入和排除标准^[7],在排除吸烟者的同时,50 例重度 OSAHS 患者 ($AHI \geq 50$ 次/h) 和 50 例非 OSAHS 患者 ($AHI < 5$ 次/h) 纳入,研究对象均了解并签署书面知情同意书。本研究经新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会同意并批准 (批件号:2011025)。

1.2 基线资料收集与检测 按照前面描述的标准程序^[7-8],对所有受试者进行过夜 PSG 监测、临床数据采集、血样采集和基因组 DNA 提取。基线资料包括:性别、年龄、身高、体重、腹围、颈围、个人/家族病史、生活习惯 (饮酒、吸烟状况)、收缩压 (SBP)、舒张压 (DBP) 及体质指数 (BMI)。PSG 检测指标包括: AHI、呼吸暂停指数 (AI)、低通气指数 (HI)、最低血氧饱和度 ($LSaO_2$)、平均血氧饱和度 ($MSaO_2$)、总睡眠时间、睡眠效率,睡眠 1 期、2 期、3 期、快速眼动 (REM) 期和非 REM 期。

1.3 血液采集和 DNA 提取 空腹抽取两组患者静脉全血,EDTA 抗凝,置入 -80 °C 冰箱冻存。DNA 提取和鉴定:将血样从 -80 °C 冰箱中拿出,室温放置 30~60 min 解冻。取 EP 管加入 20 μ l 蛋白酶 K,加入 200 μ l EDTA 抗凝全血和等体积缓冲液 BL,剧烈振荡混匀;放入预热至 56 °C 金属浴或水浴中反应 10 min 裂解细胞,待裂解物冷却后加入 200 μ l 无水乙醇,振荡混匀;将裂解物全部转移至已活化的吸附柱中,

12 000 r/min,离心半径 8.57 cm,离心1 min(以下离心方法均相同),更换新的收集管,加入 500 μ l BW1,离心 1 min,弃废液,再加入 500 μ l BW2,离心 1 min,弃废液;离心 1 min,将吸附柱插在洁净的 EP 管中,并加入 60 μ l 洗脱缓冲液 BE,离心 1 min,收集 DNA;测定 DNA 浓度,范围在 20~50 ng/ μ l,OD280/OD230>2.0,OD260/OD280 比值在 1.75~1.95。

1.4 候选基因的筛选 从现有文献和 PHGKB (<https://phgkb.cdc.gov/PHGKB/hNHome/actin>)数据库中收集与睡眠和昼夜节律相关的基因。PHGKB 是一个在线的、不断更新的和可搜索的数据库,包含已发表的科学文献和其他材料,可以搜索任何特定主题的基因组学和准确的健康相关信息。

1.5 生物学功能与途径富集分析 本研究用在线工具数据库 David (<https://david.ncifcrf.gov/>)对候选基因进行本体论(GO)和京都基因与基因百科全书(KEGG)富集分析,进一步阐明重度 OSAHS 和正常对照组间突变基因的生物学功能。并且只有用 Benjamini 和 Hochberg 错误发现率(FDR)法调整后的 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.6 二代靶向捕获测序 所有候选基因均用于以下靶点的测序。实验均由上海天昊生物技术有限公司实施。该测序采用多重 PCR 的方法及 Lumina 测序技术平台,对 100 个样本的目标序列即所选研究基因的全部外显子以及侧翼序列(质检合格)进行测序,要求测序深度达到 100 \times ,通过与大型的人类学数据库及千人组基因库的数据比对分析筛选特异性的突变体。对于发现的单核苷酸多态性(SNP)位点应在单核苷酸多态性(dbSNP)数据库中找到相应的 rs 号,对于发现的突变要确定其在互补脱氧核糖核酸(cDNA)中的位置。

1.7 加权 GRS 的计算 个体患病风险的评分采用加权 GRS 的方式来构建,即将每个易感 SNP 位点在 logistic 回归分析中的 β 值作为其权重,其次每个个体所具有的 SNP 位点等位基因个数通过 0、1、2 来表示。将每个 SNP 位点的等位基因个数乘以其权重可得到每个 SNP 的加权值,而每个个体的 GRS 等于这些 SNP 的加权值之和。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理与分析。分析前对所有数据进行方差齐性和正态性检验,若数据呈正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较应用 t 检验,多组间应用单因素方差分析;若数据不符合正态分布,以中位数(下四分位数,上四分位数) [$M(Q_L, Q_U)$] 表示,则应用秩和检验;计数资料以例

(%)表示,采用 χ^2 检验进行比较。两组基因型的分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律采用 χ^2 检验。分析候选基因对应的单个 SNP 位点、GRS 与 OSAHS 风险的关联以及 GRS 和传统因素联合作用对 OSAHS 的风险均应用非条件 logistic 回归模型。模型对 OSAHS 预测能力采用受试者工作特征曲线(ROC)的曲线下面积(AUC)值及其 95%CI 进行评估。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本特征 重度 OSAHS 组的男性比例、年龄、BMI、颈围、腹围、AHI、AI、HI、睡眠 1 期比例均高于非 OSAHS 组($P < 0.05, P < 0.01$),而 L SaO_2 、M SaO_2 、REM 期低于非 OSAHS 组($P < 0.01$)。两组间酒精史、SBP、DBP、睡眠效率、总睡眠时间、睡眠 2 期、睡眠 3 期差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 非 OSAHS 组与重度 OSAHS 组临床特征的比较
Tab. 1 Comparison of clinical characteristics between non OSAHS group and severe OSAHS group

项目	非 OSAHS ($n=50$)	重度 OSAHS ($n=50$)	$\chi^2 / t/u$ 值	P 值
男性 ^a	29(58.00)	40(80.00)	5.66	0.02
年龄(岁) ^b	44.96 \pm 11.44	51.20 \pm 10.53	2.84	0.01
BMI ^b	24.96(22.96, 26.66)	30.06(27.45, 31.68)	6.18	<0.01
颈围(cm) ^b	38.88 \pm 3.62	43.34 \pm 3.41	6.34	<0.01
腹围(cm) ^b	97.78 \pm 9.53	110.36 \pm 7.83	7.21	<0.01
酒精史 ^a	14(28.00)	7(14.00)	2.95	0.09
SBP(mm Hg) ^b	150.80 \pm 21.32	149.44 \pm 20.95	0.32	0.75
DBP(mm Hg) ^b	94.86 \pm 15.64	92.16 \pm 15.58	0.86	0.39
AHI(次/h) ^c	0.80(0.40, 2.13)	59.05(53.85, 70.60)	8.76	<0.01
AI(次/h) ^c	0.00(0.00, 0.30)	43.25(32.45, 57.90)	8.70	<0.01
HI(次/h) ^c	0.75(0.38, 1.90)	14.75(9.65, 27.70)	7.91	<0.01
L SaO_2 (%) ^c	89.00(87.00, 91.00)	68.00(61.00, 74.00)	8.63	<0.01
M SaO_2 (%) ^c	94.00(93.00, 95.25)	91.00(88.75, 92.00)	7.32	<0.01
睡眠效率(%) ^c	68.20(63.20, 74.75)	72.35(61.10, 78.18)	0.98	0.33
总睡眠时间(min) ^c	413.25(379.00, 449.13)	421.50(387.38, 453.38)	0.51	0.61
睡眠 1 期(%) ^c	6.45(4.20, 8.20)	10.20(7.10, 14.80)	5.13	<0.01
睡眠 2 期(%) ^c	62.05(56.50, 67.90)	63.7(52.60, 68.10)	0.06	0.89
睡眠 3 期(%) ^c	9.75(5.82, 18.83)	6.95(0.65, 13.63)	1.90	0.06
REM(%) ^b	19.33 \pm 4.57	16.26 \pm 5.76	2.96	0.01

注:^a表示数据为例(%);^b表示数据为 $\bar{x} \pm s$;^c表示数据为 $M(Q_L, Q_U)$ 。

2.2 候选基因的筛选及生物信息学分析 首先,通过公共数据库和现有文献收集了 44 个睡眠和昼夜节律表型或疾病相关的基因(表 2),并进行 GO 富集分析及 KEGG 通路分析,结果表明,上述基因可能参与了与睡眠和昼夜节律相关的生物学过程和信号通路(图 1)。

表 2 与睡眠和昼夜节律相关的疾病/表型和候选基因列表

Tab. 2 List of diseases/phenotypes and candidate genes related to sleep and circadian rhythm

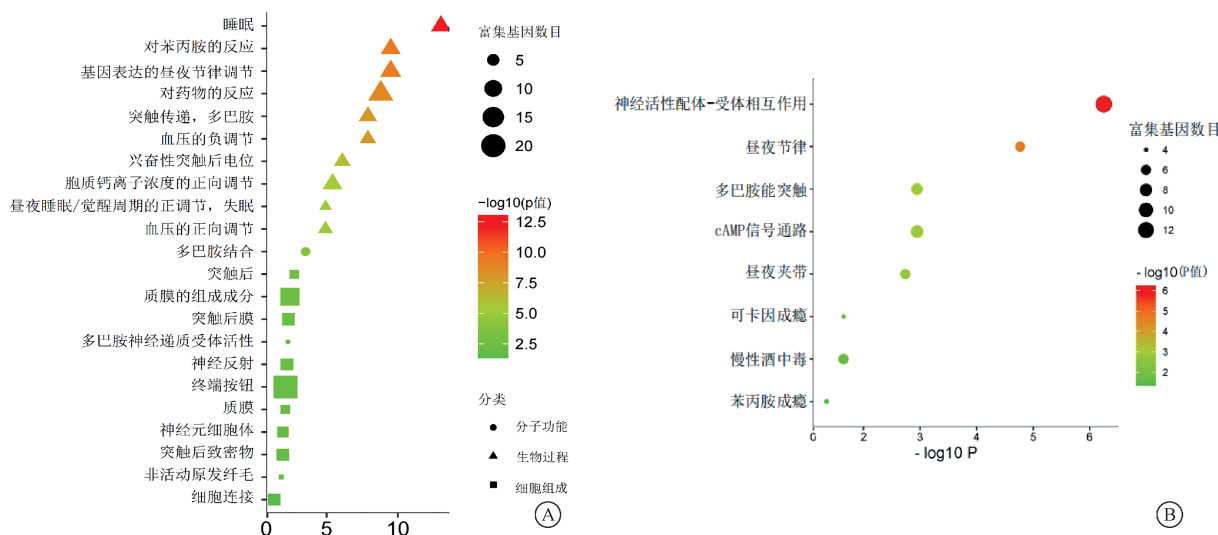
疾病/表型	睡眠;睡眠剥夺;睡眠障碍;睡眠阶段;睡眠,快速眼动
候选基因	KSR2, LMOD1, PLCL1, GABRA2, BTBD9, RAI1, ARNTL, RASD1, RORA, PPARGC1B, HLA-DQB1, CSNK1D, HCRT, CRY1, CACNA1H, CHRN2, DLAT, CRH, PER3, DRD1, CST3, DRD2, GHRL, DRD3, FOS, GRIN2A, PTGDS, MTNR1B, PTGDR, STAR, NLGN1, UTS2R, NPAS2, ADORA2A, NPY2R, UTS2, SLC29A1, ADA, TH, AHCY, ADORA1, OXTR, GHRH, OXT

2.3 SNP 检测及 OSAHS 风险的关系 对 44 个候选基因进行高通量二代测序,筛选高频 SNPs 位点,结果共发现 44 个基因的 2 171 个高频 SNPs 片段,并分析了重度 OSAHS 组和非 OSAHS 组的加性、显性、隐性模型的分布。所有 SNP 均符合 Hardy-Weinberg 平衡。筛选的原则是只要在一个遗传模型下有统计学意义即认为其为有意义的位点。单因素 logistic 回归分析显示,两组 12 个基因的 56 个 SNP 位点在任一遗传模型下差异有统计学意义(由于单因素回归分析有差异的位点较多,本文未列出结果)。在对性别、年龄和 BMI 等潜在混杂因素进行调整后,KSR2、NPAS2、OXTR 和 GHRL 等 4 个基因片段的 17 个 SNP 位点仍在任一遗传模型下与 OSAHS 风险相关,其中 KSR2 基因的

rs2723285、rs2723283、rs921063、rs2592290、rs1992750、rs1806599、rs1806598、rs66837180 位点,NPAS2 基因的 rs2278727 位点,OXTR 基因的 rs2228485、rs3806675、rs2268497、rs2268498 位点是 OSAHS 的保护因素 ($OR < 1, P < 0.05$);KSR2 基因的 rs816207、rs75212540 位点,GHRL 基因的 rs10490815、rs10490816 位点是 OSAHS 的危险因素 ($OR > 1, P < 0.05$)。见表 3。

2.4 GRS 与 OSAHS 风险的关联 对多因素 logistic 回归分析仍有意义 4 个基因中筛选出不存在连锁不平衡关系的 6 个 SNP 位点来构建加权 GRS(每个 SNP 及其相应的效应值 β 值见表 4),并采用二元 logistic 回归进一步分析 GRS 与 OSAHS 的风险关系,将 GRS 按中位数分为两组,结果显示高 GRS 组比低 GRS 组有着更高的 OSAHS 风险 ($OR = 2.901, 95\% CI: 1.288 \sim 6.534, P = 0.010$)。

考虑到 OSAHS 的发生发展与传统危险因素和遗传因素有关,将上述 6 个 SNP 构成的 GRS 加入到传统危险因素构成的预测模型中,评估 GRS 是否能够提高 OSAHS 的预测能力,结果显示,单独采用传统危险因素和 GRS 构建模型的 AUC 分别为 0.877 (95% CI: 0.810 ~ 0.944) 和 0.693 (95% CI: 0.590 ~ 0.796);而将 GRS(连续变量)加入到年龄、性别、BMI 等传统危险因素构建的模型后,其 AUC 为 0.902 (95% CI: 0.590 ~ 0.842),同时模型拟合效果 ($R^2 = 0.588$) 也较单独传统危险因素模型 ($R^2 = 0.528$) 提高,发现在本研究中年龄、性别、BMI、GRS(连续变量)的模型最优。见表 5。



注:A 为 GO 富集分析;B 为 KEGG 通路分析。

图 1 候选基因的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

Fig. 1 GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis of candidate genes

表3 17个SNP与OSAHS风险的多因素logistic回归分析
Tab. 3 Multivariate logistic regression analysis of 17 SNPs and OSAHS risks

基因	SNP	染色体号	等位基因	加性模型			显性模型			隐性模型		
				P值	P ^a 值	OR(95%CI)	P值	P ^a 值	OR(95%CI)	P值	P ^a 值	OR(95%CI)
KSR2	rs816207	chr12	T/C	0.022	0.085	1.93 (0.91,4.08)	0.780	0.680	1.32 (0.35,5.02)	0.060	0.025	3.75 (1.18,1.97)
	rs2723285	chr12	T/C	0.047	0.041	0.39 (0.16,0.96)	0.039	0.064	0.09 (0.01,1.15)	0.230	0.123	0.43 (0.14,1.26)
	rs2723283	chr12	T/C	0.047	0.041	0.39 (0.16,0.96)	0.039	0.064	0.09 (0.01,1.52)	0.230	0.123	0.43 (0.14,1.26)
	rs921063	chr12	T/C	0.060	0.150	0.55 (0.25,1.24)	0.007	0.033	0.14 (0.02,0.85)	0.677	0.724	0.82 (0.27,2.48)
	rs2592290	chr12	A/G	0.024	0.026	0.36 (0.15,0.89)	0.039	0.042	0.08 (0.01,0.92)	0.111	0.093	0.39 (0.13,1.17)
	rs1992750	chr12	G/C	0.038	0.059	0.44 (0.19,1.03)	0.027	0.039	0.07 (0.01,0.88)	0.231	0.247	0.53 (0.19,1.54)
	rs75212540	chr12	G/A	0.044	0.045	3.07 (1.03,9.18)	0.019	0.026	3.98 (1.18,13.44)	—	—	—
	rs1806599	chr12	G/A	0.051	0.110	0.47 (0.19,1.19)	0.230	0.322	0.58 (0.20,1.70)	0.039	0.045	0.05 (0.01,0.94)
	rs1806598	chr12	A/G	0.051	0.093	0.45 (0.18,1.14)	0.230	0.270	0.54 (0.18,1.61)	0.039	0.045	0.05 (0.01,0.94)
	rs66837180	chr12	G/C	0.028	0.060	0.40 (0.16,1.04)	0.162	0.174	0.47 (0.16,1.39)	0.027	0.045	0.05 (0.01,0.94)
NPAS2	rs2278727	chr2	C/T	0.028	0.033	0.37 (0.15,0.92)	0.162	0.052	0.33 (0.11,1.01)	0.027	0.170	0.22 (0.02,1.95)
OXTR	rs2228485	chr3	G/A	0.035	0.039	0.31 (0.10,0.94)	—	—	—	0.044	0.049	0.32 (0.10,0.99)
	rs3806675	chr3	G/A	0.023	0.016	0.32 (0.13,0.81)	0.111	0.041	0.32 (0.11,0.95)	0.039	0.062	0.08 (0.01,1.13)
	rs2268497	chr3	A/G	0.057	0.030	0.38 (0.16,0.91)	0.230	0.070	0.36 (0.12,1.09)	0.040	0.070	0.11 (0.01,1.19)
	rs2268498	chr3	T/C	0.057	0.030	0.38 (0.16,0.91)	0.231	0.070	0.36 (0.12,1.09)	0.040	0.069	0.16 (0.02,1.16)
GHRL	rs10490815	chr3	T/C	0.008	0.039	2.47 (1.04,5.84)	0.025	0.083	4.33 (0.83,22.77)	0.032	0.107	2.56 (0.82,8.02)
	rs10490816	chr3	G/C	0.009	0.049	2.36 (1.00,5.58)	0.044	0.084	4.32 (0.82,22.61)	0.023	0.145	2.35 (0.75,7.38)

注:P值未调整;P^a值调整性别、年龄、BMI;OR值调整性别、年龄、BMI。

表4 OSAHS遗传风险评分的SNP位点及相应的β值
Tab. 4 SNP loci of OSAHS genetic risk score and corresponding β value

基因	SNP位点	野生型基因 纯合子	β值	基因杂合子	β值	突变型基因 纯合子	β值	风险等位 基因	P值
KSR2	rs2592290	AA	0.372	AG	2.402	GG	0	A	0.024
KSR2	rs1992750	GG	0.141	GC	2.438	CC	0	G	0.038
KSR2	rs66837180	GG	2.251	GC	2.463	CC	0	G	0.028
NPAS2	rs2278727	CC	1.039	CT	1.715	TT	0	C	0.028
OXTR	rs3806675	GG	2.033	GA	2.416	AA	0	G	0.023
GHRL	rs10490816	GG	0	GC	0.828	CC	1.606	C	0.009

注:β值、P值为加性模型下目的基因单因素logistic回归分析结果。

表 5 三种模型与 OSAHS 的 logistic 回归分析

Tab. 5 Logistic regression analysis of three models and OSAHS

模型	AUC	P 值	OR(95%CI)		R ²
			下限	上限	
GRS	0.693	0.001	0.590	0.796	0.151
非遗传	0.877	<0.001	0.810	0.944	0.528
联合	0.902	<0.001	0.590	0.842	0.588

注:非遗传指传统危险因素;联合指传统+遗传风险评分。

3 讨论

OSAHS 作为一种睡眠节律紊乱为特征的疾病,研究显示 35%~40% 的 AHI 变异可以通过遗传因素来解释^[9]。尽管已有众多研究揭示了 OSAHS 与多种基因序列变异有关,由于该病遗传模式的复杂性,其治病基因的发现及确认仍处于初步阶段,尚未明确。同时有研究探讨了中间表型基因与 OSAHS 遗传易感性的关系,但有关睡眠与昼夜节律与 OSAHS 风险的相关性研究微乎其微。因此本研究对 44 个候选基因进行生物信息学分析,结果提示候选基因参与了一些睡眠与昼夜节律相关通路,同时 PPI 互作网络图显示 NPAS2、OXTR、GHRL 为关键基因,表明这些蛋白与其他节点蛋白有很强的相关性。其次通过高通量二代测序法评估睡眠和昼夜节律基因多态性与 OSAHS 的关系,发现一些睡眠和昼夜节律基因在 OSAHS 组和非 OSAHS 组中的分布存在差异,并在控制了性别、年龄和 BMI 等传统危险因素后,发现仍有 4 个基因(KSR2、NPAS2、OXTR 和 GHRL 的 17 个 SNP 位点)在任一遗传模型下与 OSAHS 风险相关。

KSR2 是一个与睡眠、代谢等多种生理途径相关的基因。有研究发现 KSR2 基因突变可能增加肥胖和脂代谢紊乱的风险,而肥胖是 OSAHS 的常见危险因素^[10]。此外,最近对睡眠障碍患者进行的一项全基因组关联分析(GWAS)研究发现,在 42 种睡眠障碍基因变体中,KSR2 基因变异与睡眠倾向特征(睡眠时间长、睡眠效率高、失眠症状和睡眠觉醒次数少)的相关性最为显著^[11]。本研究与其一致,本研究发现 KSR2 的多个 SNP 位点在任一遗传模型下与 OSAHS 的发病风险有关,提示 KSR2 可能通过代谢、睡眠节律参与 OSAHS 的发病机制,其在 OSAHS 中的潜在作用需要进一步验证。

NPAS2 是一种昼夜节律基因,编码神经元 PAS 结构域蛋白 2,又称 MOP4,位于 2 号染色体 2aq11.2 上,调节昼夜节律^[12]。本研究发现,在加性模型下 NPAS2 基因的 rs2278727 位点与 OSAHS 的风险显著相关。这与 Canales 等^[13]的研究一致,其发现睡眠呼

吸暂停相关的夜间低氧血症患者 NPAS2 表达水平降低,说明睡眠呼吸暂停与生物钟基因调控可能存在重要关系,值得进一步研究。

先前的研究显示 OXTR 基因与自闭症、认知和情绪识别等社会功能相关^[14-16]。同时也有研究证明,OXTR rs2268498 基因型与睡眠质量存在显著的交互作用^[17]。本研究也发现 OXTR rs2268498 加性模型下会增加 OSAHS 的发病风险,提示 OXTR 基因的异常表达可能参与了 OSAHS 的发生,但相关研究较少,其发生机制仍需进一步明确。

GHRL 基因位于常染色体 3p26-26 上,由 3 个内含子和 4 个外显子组成,长度为 5 199 bp。据报道,GHRL 会增加慢波睡眠和 2 期睡眠,减少 1 期睡眠和快速眼动睡眠,但不会影响老年女性的睡眠^[18]。这表明 GHRL 基因突变可能引起睡眠周期紊乱,间接参与 OSAHS 的发病机制,并进一步支持 OSAHS 以老年男性为主的临床特征。此外,也有多项研究报道 GHRL 与 OSAHS 关系,但这些研究主要是基于血清学,并存在一些争议^[19-21]。在本研究中,对混杂因素进行调整,最终确定 GHRL rs10490815、rs10490816 在加性模型下与 OSAHS 易感性具有一定相关性。

但单个 SNP 位点与疾病之间通常只能呈现比较弱的关联效应,此外上述 SNP 对 OSAHS 的作用并不一致,有些是危险因素,有的具有保护作用,为进一步探讨多个 SNP 的累积效应是否会更明显,本研究进行了 GRS 模型分析。GRS 作为评估基因联合效应的常用方法,可以整合多个 SNP 的综合信息,常用来评估基因序列变异与疾病之间的联系^[22],并已经广泛应用于各种复杂疾病的遗传学研究,为疾病的早期筛选提供基础^[23-25]。因此本研究除分析基因与 OSAHS 之间的关联外,探讨睡眠与昼夜节律相关的 6 个易感 SNP 位点加权计算得到的 GRS,并分析 GRS 不同分组情况下与 OSAHS 的关联,结果显示,相较于低 GRS 组人群,高 GRS 组人群具有更高的 OSAHS 患病风险。由于 OSAHS 是传统危险因素与遗传因素相互作用所引起的疾病,本研究在性别、年龄、BMI 等传统危险因素的基础上,加入 GRS,发现两者具有联合效应,可以显著改善 OSAHS 的预测效能。

本研究也有一些局限性。首先,样本量小,研究结果是否可用于临床仍有待进一步探讨。其次,本研究主要选取重度 OSAHS 人群作为研究对象,为提高研究对象的代表性,有必要扩大样本量,在不同严重程度 OSAHS 人群中对本研究结果进行验证。

尽管存在这些局限性,二代测序技术作为一种新的基因检测方法,在发现新致病基因或已知致病基因上的新致病高频特异位点和低频特异位点方面具有突出优势。因此本研究通过二代测序技术探讨睡眠与昼夜节律相关基因 SNP 位点与 OSAHS 风险,调整了混杂因素后仍发现 4 个睡眠节律相关基因多个位点在任一遗传模型下与 OSAHS 存在相关性,并发现上述 4 个基因构成的 6 个 SNPs 组成的 GRS 与 OSAHS 风险显著相关,未来需要大量的标准研究来进一步验证,以期为临床筛查和治疗 OSAHS 提供新的思路和实验依据。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Floras JS. Sleep apnea and cardiovascular disease: an enigmatic risk factor[J]. *Circ Res*, 2018, 122(12): 1741-1764.
- [2] Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, et al. Sleep apnea: types, mechanisms, and clinical cardiovascular consequences[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(7): 841-858.
- [3] Mukherjee S, Saxena R, Palmer LJ. The genetics of obstructive sleep apnea[J]. *Respirology*, 2018, 23(1): 18-27.
- [4] Zhang Y, Ren R, Lei F, et al. Worldwide and regional prevalence rates of co-occurrence of insomnia and insomnia symptoms with obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sleep Med Rev*, 2019, 45: 1-17.
- [5] Meyhöfer S, Wilms B, Oster H, et al. Importance of sleep and circadian rhythm for energy metabolism[J]. *Internist(Berl)*, 2019, 60(2): 122-127.
- [6] Atrooz F, Salim S. Sleep deprivation, oxidative stress and inflammation[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 119: 309-336.
- [7] Shi T, Yao XG, Li M, et al. Genetic variants of rs1275988 and rs2586886 in TWIK-related acid-sensitive K^+ channel-1 gene may be potential risk factors for obese patients with obstructive sleep apnea[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2019, 132(17): 2059-2065.
- [8] Liang S, Li NF, Heizhati M, et al. What do changes in concentrations of serum surfactant proteins A and D in OSA mean? [J]. *Sleep Breath*, 2015, 19(3): 955-962.
- [9] Zhang DM, Xiao Y, Luo JM. Genetics of obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2014, 127(17): 3135-3141.
- [10] Greenhill C. Genetics: KSR2 mutations affect energy balance, insulin sensitivity and cellular fuel oxidation[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(1): 1.
- [11] Wang HM, Lane JM, Jones SE, et al. Genome-wide association analysis of self-reported daytime sleepiness identifies 42 loci that suggest biological subtypes[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3503.
- [12] Peng L, Bai GG, Pang YX. Roles of NPAS2 in circadian rhythm and disease[J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2021, 53(10): 1257-1265.
- [13] Canales MT, Holzworth M, Bozorgmehri S, et al. Clock gene expression is altered in veterans with sleep apnea[J]. *Physiol Genomics*, 2019, 51(3): 77-82.
- [14] Melchers M, Montag C, Markett S, et al. Relationship between oxytocin receptor genotype and recognition of facial emotion[J]. *Behav Neurosci*, 2013, 127(5): 780-787.
- [15] Montag C, Sindermann C, Melchers M, et al. A functional polymorphism of the OXTR gene is associated with autistic traits in Caucasian and Asian populations[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2017, 174(8): 808-816.
- [16] Reuter M, Montag C, Altmann S, et al. Functional characterization of an oxytocin receptor gene variant (rs2268498) previously associated with social cognition by expression analysis in vitro and in human brain biopsy[J]. *Soc Neurosci*, 2017, 12(5): 604-611.
- [17] Wu J, Dong Y, Zhao XR, et al. Burnout in university faculty: an interaction between subjective sleep quality and the OXTR rs2268498 polymorphism [J]. *J Affect Disord*, 2020, 276: 927-935.
- [18] Kluge M, Gazea M, Schüssler P, et al. Ghrelin increases slow wave sleep and stage 2 sleep and decreases stage 1 sleep and REM sleep in elderly men but does not affect sleep in elderly women[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2010, 35(2): 297-304.
- [19] Treuer T. The potential role of ghrelin in the mechanism of sleep deprivation therapy for depression[J]. *Sleep Med Rev*, 2007, 11(6): 523-524.
- [20] Zhang DM, Pang XL, Huang R, et al. Adiponectin, omentin, ghrelin, and visfatin levels in obese patients with severe obstructive sleep apnea[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 3410135.
- [21] Sun ML, Niu X, Xiao XY, et al. The differences in plasma/serum ghrelin levels between obstructive sleep apnea-hypopnea patients and controls: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2021, 100(8): e24368.
- [22] 牛大彦,严卫丽.遗传风险评估在复杂疾病遗传学研究中的应用[J].*遗传*, 2015, 37(12): 1204-1210.
- [22] Niu DY, Yan WL. The application of genetic risk score in genetic studies of complex human diseases[J]. *Hereditas*, 2015, 37(12): 1204-1210.
- [23] Xin JY, Chu HY, Ben S, et al. Evaluating the effect of multiple genetic risk score models on colorectal cancer risk prediction [J]. *Gene*, 2018, 673: 174-180.
- [24] Wang XY, Chen HT, Na R, et al. Single-nucleotide polymorphisms based genetic risk score in the prediction of pancreatic cancer risk [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(22): 3076-3086.
- [25] Okubo Y, Nakano Y, Ochi H, et al. Predicting atrial fibrillation using a combination of genetic risk score and clinical risk factors[J]. *Heart Rhythm*, 2020, 17(5 Pt A): 699-705.

收稿日期:2022-03-25 修回日期:2022-05-11 编辑:王娜娜