

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : NLRP1 基因多形性與僵直性脊椎炎之相關 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 李亞庭
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-055-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 翁瑞宏

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 103年03月28日

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

** 計畫 *

* : NLRP1 基因多型性與僵直性脊椎炎之相關

** 名稱 *

執行計畫學生：李亞庭

學生計畫編號：NSC 102-2815-C-040-055-B

研究期間： 年7月1日至 年2月底止，計8個月

指導教授：翁瑞宏

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後
可公開查詢

執行單位：中山醫學大學公共衛生學系

中華民國 103 年 3 月 28 日

摘要

發炎體 (inflammasome) 在介白質素 (interleukin ; IL)-1 β 的生成過程中扮演重要的修飾者，並且可能會造成自體免疫疾病的發生；特別的是，IL-1 β 的高度表現已經被發現與僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis) 的發生具有相關性。當核區域化富含白氨酸重複蛋白1 (nuclear localization leucine-rich-repeat protein 1 ; NLRP1) 與凋亡相關似微粒蛋白含凋亡蛋白酶募集區域 (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain [CARD] ; ASC)、前凋亡蛋白酶 (pro-caspase)-1、以及pro-caspase-5形成多重蛋白複合體後，會形成成熟的caspase-1，進而修飾pro-IL-1 β 為成熟的IL-1 β ，導致發炎反應的產生。然而，NLRP1基因於僵直性脊椎炎的致病機轉之分子角色是不清楚的。我們設計一項以醫院為基礎的病例對照研究，以TaqMan方式來執行305名僵直性脊椎炎病患以及305名健康對照之NLRP1 rs878329與rs6502867基因多形性的判定，並評估NLRP1基因型在僵直性脊椎炎發生與疾病進展上的效應。我們的結果並未觀察到NLRP1 rs878329與rs6502867基因型與僵直性脊椎炎的發生具有統計顯著相關，然而，攜帶rs6502867 CT基因型者相於TT基因型者具有顯著較高的巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (Bath Ankylosing Spondylitis Global)。因此，NLRP1 rs6502867基因型可能藉由發炎而影響僵直性脊椎炎病患的疾病進展。

關鍵字:僵直性脊椎炎、核區域化富含白氨酸重複蛋白1、基因多形性

前言

僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis) 是血清陰性脊椎關節炎疾病 [1]，典

型症狀為下背痛、脊椎活動範圍受限、以及晨間僵硬 (stiffness) [2]，主要侵犯的部位包括脊椎與周邊關節，肌腱、韌帶、關節膜與骨骼交界點發炎 (enthesitis)；已被侵犯的關節起初為發炎，進而漸漸呈現不等的骨質破壞、鈣化、或者是纖維化 [3]。在僵直性脊椎炎病患中，有90%以上的病患為人類白血球抗原 (human leukocyte antigen ; HLA)-B27陽性 [4]；然而，HLA-B27陽性者並未全然發展成僵直性脊椎炎。

先天性免疫 (innate immunity) 是對抗外來抗原的第一線防禦，藉由模式識別接受器 (pattern-recognition receptors ; PRRs) 對抗原進行辨識 [5]。而發炎體 (inflammasome) 會藉由接合子 (adaptor) 蛋白與凋亡相關似微粒蛋白含凋亡蛋白酶募集區域 (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain [CARD] ; ASC)、CARD8、前凋亡蛋白酶 (pro-caspase)-8、神經凋亡抑制蛋白 (neuronal apoptosis inhibitory proteins ; NAIPs)、與pro-caspase-1形成成熟的caspase-1，進而誘發免疫反應 [6]，以及細胞核因子 κ B (nuclear factor kappa B ; NF- κ B) 轉錄作用後，caspase-1會活化進而產生介白質素 (interleukin ; IL)-1 β 和IL-18 [7]。

高度的 IL-1 β 表現與發炎體路徑產生的 caspase (cysteiny l aspartate-specific proteases)-1 具有相關 [8]，當外來抗原進入人體內被 PRRs 辨識後，首先會誘發類鐸接受器 (toll-like receptor ; TLRs) 與似核苷酸結合寡聚合結構區域接受器 (nucleotide-binding oligomerization domain [NOD]-like receptor ; NLR) 和細胞膜上的病原體相關分子型態 (pathogen-associated molecular patterns ; PAMPs) 與損傷相關分子型態 (damage-associated molecular patterns ; DAMPs) 結合，影響 NF- κ B 進入到細胞核內啟動 IL-1 β 的轉錄作用，導致 pro-IL-1 β 大量表現於細胞質 [9]。

而成熟的 IL-1 β 是由 caspase-1 修飾 pro-IL-1 β 所產生，活化的 caspase-1 表現分別受到核區域化富含白氨酸重複蛋白 3 (nuclear localization leucine-rich-repeat protein 3; NLRP3) inflammasome、NLRP1 inflammasome、NLRC4 inflammasome、與 AIM2 inflammasome 路徑所影響，而這四個發炎體路徑的活化，分別會形成 NLRP3、ASC、CARD8、與 pro-caspase-1 多重蛋白複合體；NLRP1、ASC、pro-caspase-1、與 pro-caspase-5 多重蛋白複合體；NLRC4、ASC、NAIPs、與 pro-caspase-1 多重蛋白複合體；以及 AIM2、ASC、與 pro-caspase-1 多重蛋白複合體，導致高度的 caspase-1 表現與 IL-1 β 表現 [10]。

NLRP1 inflammasome 相關基因已經被發現與類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis) [11]、第一型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus) [12]、以及與白斑 (vitiligo) [13] 的發生具有相關，而高度的 IL-1 β 表現可能與僵直性脊椎炎的發生也具有關連 [14]；因此，NLRP1 inflammasome 路徑可能與僵直性脊椎炎的發生具有相關。NLRP1 蛋白屬於 NLR 家族，當受到配位基刺激後，NLRP1 會發生構象改變，C 端的 caspase 募集區域 (CARD) 即能直接招募到 pro-caspase-1 [15]。NLRP1 包含了中央核苷酸結合區域 (central nucleotide-binding domain) 與由 C 端富含白氨酸重複 (C-terminal leucine-rich repeats; LRRs)、N 端凋亡聚集 (N-terminal CARD)、和匹林區域 (pyrin domain; PYD) 所形成的 NACHT 寡聚化結構區域 (NAIP、CIITA、HET-E、TP1)，而此區域藉由 ATP 來活化訊息傳遞複合物 [16]。特別的是，NLRP1 高度表現於 T 淋巴細胞、巨噬細胞、與樹突細胞；因此，NLRP1 的表現可能與免疫反應具有相關 [17]。NF- κ B 轉錄因子與 Srebp1a 基因啟動子區域的結合可以調控 NLRP1 的表現 [18]，並且 Bcl-2 和 Bcl-xL 會藉由與 NLRP1 的 LRR 區域的結合來抑制 NLRP1 的活化與寡聚化反應 (oligomerization) [19]。此外，NLRP1 在 NLRP1

inflammasome路徑中與ASC、pro-caspase-5、pro-caspase-1結合成多重蛋白複合體後，可形成成熟的caspase-1來修飾pro-IL-1 β [10]。

NLRP1 基因位於人類染色體 17p13.2 [20]，在啟動子位置上的 rs878329 單一核苷酸多形性 (single nucleotide polymorphism；SNP) 有一個 C 至 G 的鹼基置換，此置換導致 NLRP1 具有較高的 mRNA 表現 [11]。Sui 等人 [11] 指出，攜帶 NLRP1 rs878329 G 對偶基因者相較於攜帶 C 對偶基因者有顯著較高的類風濕性關節炎的發生危險，而 G 對偶基因可能會影響 runt 相關轉譯因子 1 (runt-related transcription factor 1) 結合區域，進而增加 NLRP1 基因轉錄活性。此單一核苷酸基因多形性在華人與日本人的 G 對偶基因頻率分別是 79.4% [11] 與 82.6% [20]。此外，在第 15 個內顯子 (intron) 上的 rs6502867 基因型有一個 C 至 T 的鹼基置換；然而，此基因型的功能性尚未被探討。此單一核苷酸基因多形性在華人與羅馬尼亞人的 T 對偶基因頻率分別是 96.0% [11] 與 70.4% [21]；Jin 等人 [21] 也發現，攜帶 NLRP1 rs6502867 T 對偶基因者相較 C 對偶基因者具有顯著較高的白斑發生危險。然而，NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因多形性與僵直性脊椎炎發生及疾病進展之相關則尚未被探討。因此，NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因多形性在僵直性脊椎炎發生與疾病進展上的效應是值得來加以探討。

材料與方法

研究對象與流行病學資訊

本研究經由中山醫學大學附設醫院倫理委員會的認可後執行。於中山醫學大學附設醫院免疫風濕科收集 305 名僵直性脊椎炎病患為病例組，病例需經由免疫風濕專科醫師確診及 X 光評估；並且進行指尖離地試驗 (finger to floor test)、腰

椎彎曲試驗 (Schober test)、以及評估關節疼痛程度及數目。若病患具有下列特徵：(1) 下背痛併晨間僵硬超過三個月，(2) 腰椎運動範圍受限 (Schober 試驗小於 5 公分)，(3) 擴胸運動範圍受限 (擴胸試驗小於 5 公分)，(4) X 光顯示有關節炎 (雙側皆第二級以上，或單側第三級以上)；而符合以上 1 至 3 點之任一點加上第 4 點 (1984 年 New York 標準)，即可確定為僵直性脊椎炎病例 [22]。所有的研究對象為 16 歲以上；在病患納入之初，醫師紀錄詳細的臨床病史，包括初次症狀的年齡、僵直性脊椎炎家族史、以及脊椎的異常症狀。疾病家族史的定義是具有僵直性脊椎炎之一等親親屬。初始症狀發病年齡被定義為首次症狀 (脊椎症狀 [axial symptom]、周邊關節炎、虹彩炎 [uveitis] 或接骨點發炎 [enthesitis]) 發病的時間。薦腸關節炎 (sacroiliitis) 將是由合格的放射科醫師來確診，周邊關節炎被定義為至少有一個腫脹關節之呈現，藥物史則定義為超過三個月的非類固醇抗發炎止痛劑 (non-steroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) 或免疫調節劑 (disease modifying anti-rheumatic drugs ; DMARDs) 之使用。虹彩炎被定義為眼睛的中介層 (middle layer) 具有發炎反應呈現，包括單眼或雙眼。發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease ; IBD) 被定義為結腸和小腸具有發炎反應呈現，包括潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis) 和克隆氏症 (Crohn's disease)。並且以上這些疾病將是經過免疫風濕科、眼科與腸胃科醫師確診，這些症狀也都記載在病歷資料中。本研究之病例與對照的配對比例為 1 : 1，健康對照是以病例之年齡 (\pm 5 歲) 與性別所配對；健康對照共計為 305 名。而對照是隨機地於選取於同一教學醫學中心執行健康檢查且無脊椎關節炎相關疾病之健康成人；他們與病例居住於相同地區，並且無明顯的疾病史或異常的實驗室檢查數值，對照若在健康檢查期間一週內具有懷孕、三個月內具有服藥情形、具有骨質疏鬆症、骨折、牛皮癬、

萊特氏症候群 (Reiter's syndrome)、心血管疾病、發炎性腸道疾病以及甲狀腺疾病者，則被排除於研究樣本外。一般健康問卷在樣本收集時被執行，以決定是否此研究對象可作為健康對照。在收集僵直性脊椎炎病患和健康對照的所有資料之前，知情同意書即被獲得。

臨床評估

本研究使用中文版巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index ; BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index ; BASFI)、巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (Bath Ankylosing Spondylitis Global ; BAS-G)，來評估僵直性脊椎炎病患的疾病活性與日常生活機能；這些中文版評估工具已被證實在評估臨床症狀的變化上具有良好的內部一致性 (Cronbach's α) 以及觀察者內信度 (intraclass correlation coefficient) [23]。

生化指標與 HLA-B27 基因

所有研究對象之靜脈血被收集在含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管中，並且被分離成為血漿、buffy coat、淋巴球和紅血球。這些樣本在同一天內被處理並儲存於-70°C 下。生化指標的測量，則包括紅血球沉降速率 (erythrocyte sedimentation rate ; ESR)、C-反應蛋白 (C-reactive protein ; CRP)、以及 A 型免疫球蛋白 (immunoglobulin A ; IgA)。HLA-B27 之檢測，是將 50 μ l 的血液與 30 μ l 以 FITC (fluorescein isothiocyanate) 標示的 anti-HLA-B27 (clone GS 145.2 [IgG1, Kappa]) 以慢速震盪混合 3 秒後，於暗處靜置於室溫下培養 15 分鐘。對於每個樣本再加入 2 ml 的溶解液後，慢速震盪混合 3 秒，並且培養 10 分鐘。隨後，以

200 xg 離心 5 分鐘，再以 PBS 沖洗兩次並除去上清液，然後以慢速震盪離心讓剩餘的細胞脆片回溶。最後，加入 0.25 ml 的 1% 三聚甲醛 (paraformaldehyde) 混合後以流式細胞儀 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 測定之。在本研究中，樣本之中位數螢光強度若大於或相等於標準標記 (decision marker)，即為 HLA-B27 陽性 [24]。

基因多形性分析

使用 AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific Corporation, Union City, CA) 從全血萃取基因體 DNA，並且將得到的 DNA 置於 -70°C 保存。接著進行 DNA 定量，使用分光光度計在 260 nm 與 280 nm 波長下測量 DNA 的濃度 (比值需大於 1.8)，吸光值即為 DNA 濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型是使用 StepOne Real-Time PCR System 與 SDS v3.0 software 以 TaqMan Assay 進行判定，每個反應的總體積是 5 μl ，包含 2.5 μl TaqMan Genotyping Master Mix、0.125 μl TaqMan probes mix、1 μl (10 ng) genomic DNA、與 1.375 μl 二次水。PCR 循環參數組成為 95°C 下 10 分鐘之先前培養，接續於 95°C 下 15 秒鐘與 60°C 下一分鐘，並且重複 40 次的循環後終止。

統計分析

病例與對照的年齡、性別、發病年齡、疾病持續時間、延遲診斷時間、併發症、生化指標、巴斯僵直性脊椎炎量表與 NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型頻率之比較，若是連續性變項是以 Student's *t*-test 檢定；若是類別性變項則以 χ^2 -test 或 Fisher's exact test 檢定。藉由適合度檢定 (goodness-of-fit) 來比較所觀察到的對照組中 NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型之頻率與期望值，以評定

是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)； χ^2 -test 也被執行以檢定在病例組與對照組中 NLRP1 rs878329 與 NLRP1 rs6502867 基因型的盛行率。隨後，使用多變項條件式邏輯斯迴歸模式 (multiple conditional logistic regression model) 來計算 NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型在病例組與對照組之間的配對相對危險性 (matched relative risk) 與 95% 信賴區間 (95% confidence interval；95% C.I.)。進一步地，以 χ^2 -test 或 Fisher's exact test 檢定以及 Student's *t*-test 檢定或變異數分析 (analysis of variance; ANOVA) 分別評估 NLRP1 rs878329 和 rs6502867 基因型與僵直性脊椎炎病患的臨床表徵與巴斯僵直性脊椎炎量表之比較。所有的 *P* 值是以雙尾檢定來計算，並且 *P* < 0.05 被視為統計顯著性，全部的分析是使用 SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC) 視窗軟體。

結果

本研究中，分別有 305 名經由年齡及性別配對之僵直性脊椎炎患者與健康對照被納入分析。病例與對照之基本特徵及臨床指標呈現於表一，病例及對照的平均年齡分別是 43.6 ± 0.6 (標準誤) 歲與 44.4 ± 0.6 歲；病例與對照之男性比例皆為 70.5%。僵直性脊椎炎病患的發病年齡是 31.4 ± 0.7 歲，疾病持續時間是 12.2 ± 0.6 年，疾病的延遲診斷時間是 68.1 ± 5.4 個月。此外，在僵直性脊椎炎病患中，138 名 (45.2%) 患者有周邊關節炎、83 名 (27.2%) 患者有虹彩炎以及 16 名 (5.2%) 患者有發炎性腸道疾病的症狀。此外，91.8% 病患攜帶 HLA-B27 陽性，ESR、CRP 與 IgA 分別為 25.5 ± 1.1 mm/h、 1.3 ± 0.1 mg/l 以及 325.4 ± 10.4 mg/dl；僵直性脊椎炎病患的巴斯僵直性脊椎炎活性指數 (BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI) 以及巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G) 分別為 4.1

± 0.1 、 2.4 ± 0.1 以及 4.5 ± 0.2 分。

NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型與對偶基因在病例及對照組間之分佈情形，呈現於表二。在我們的研究對象中，健康對照組之 rs878329 ($P = 0.94$) 以及 rs6502867 ($P = 0.36$) 基因型分佈符合哈溫平衡定律。NLRP1 rs878329 C 對偶基因及 G 對偶基因頻率在病例中分別為 18.7% 及 81.3%；在對照中分別為 20.7% 及 79.3%。進一步地以條件式對數迴歸模式進行分析，則未發現 NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型與僵直性脊椎炎發生危險之統計相關性。NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因對於僵直性脊椎炎發生之合併效應，呈現於表三。然而，結果也未呈現出 rs878329 與 rs6502867 基因型對於僵直性脊椎炎具有顯著的合併效應。

分析 ESR、CRP、IgA、巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI)、以及巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G) 於攜帶不同 NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型的僵直性脊椎炎病患之間的差異 (表四)，結果發現各項數值的差異在不同的 NLRP1 rs878329 基因型間皆未呈現統計顯著性。相較於攜帶 rs6502867 TT 基因型者，攜帶 CT 基因型者具有較高的巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (5.5 vs. 4.4, $P = 0.049$)。進一步地調整年齡、性別及疾病病程之效應後，BAS-G 在 rs6502867 CT 基因型及 TT 基因型間之差異亦達到統計顯著性 ($P = 0.048$)。此外，NLRP1 rs878329、rs6502867 基因型與僵直性脊椎炎病患的併發症之發展也未具有統計上的顯著相關性 (表五)。

討論

在本研究中，我們並未觀察到NLRP1 rs878329與rs6502867基因型與僵直性脊椎炎的發生具有統計顯著相關；然而，攜帶rs6502867 CT基因型者相於TT基因型者具有顯著較高的巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G)。

過去一項大規模研究指出 [11]，攜帶 NLRP1 rs878329 G 對偶基因者相較於攜帶 C 對偶基因者具有顯著較高的類風濕性關節炎的發生危險；而 G 對偶基因可能會影響 runt 相關轉譯因子 1 結合區域，進而增加 NLRP1 基因轉錄活性。在本研究中，攜帶 NLRP1 rs878329 GG 基因型者相較於攜帶 CC 基因型者具有較高的僵直性脊椎炎發生危險性，但是並未達到統計上的顯著差異；原因可能是我們的樣本數目不足以達到所需要的統計檢定力。此單一核苷酸基因多形性在華人与日本人的 G 對偶基因頻率分別是 79.4% [11] 與 82.6% [20]，而在我們的病例及健康對照中分別是 81.3%與 79.3%。此外，我們也未觀察到 NLRP1 rs6502867 基因多形性與僵直性脊椎炎發生之顯著相關。NLRP1 rs6502867 基因多形性其 T 對偶基因分別在病例及健康對照中之頻率皆為 95.1%，這是接近於過去報告華人的 T 對偶基因頻率 (96.0%) [11]，但此單一核苷酸多形性對於僵直性脊椎炎的發生危險也不具有統計顯著的關連。此外，我們健康對照的 NLRP1 rs878329 以及 rs6502867 基因頻率分布都是符合哈溫平衡定律，這結果更加以確認我們基因型分析的技術。

於本研究中，NLRP1 rs878329 及 rs6502867 基因型對於僵直性脊椎炎發生的合併效應也被考量；我們以同時攜帶 rs878329 GC 基因型與 rs6502867 CT 基因型者為參考組，同時攜帶 rs878329 GG 基因型者與 rs6502867 TT 基因型者具有 1.62 倍 (95% C.I. = 0.53-4.95) 的疾病發生危險，但仍未達到統計顯著相關性。如此的結果仍可能是與樣本的數目有關，而未來的研究需要擴大樣本數目，

並且須要針對 NLRP1 rs878329 與 rs6502867 與僵直性脊椎炎所相關之致病機制進行更進一步的功能性研究。

部分有效的工具已經被發展來評估僵直性脊椎炎患者的身心機能及殘疾，如巴斯僵直性脊椎炎疾病活動指標 (BASDAI) [25] 以及巴斯僵直性脊椎炎功能指標 (BASFI) [26]；此外，巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G) 也被建立來評估僵直性脊椎炎患者整體的身心舒適狀態 [27]。這些問卷均可以由患者快速且容易地完成，並且在評估臨床症狀的變化上具有很好的再現性 (reproducibility)、效度 (validity) 及敏感度 (sensitivity)，問卷內容也涵蓋了僵直性脊椎炎病患的整體症狀，如疲累、疼痛、腫脹、晨間僵硬的現象。在我們現今的研究中，ESR、CRP、IgA、BASDAI、BASFI 數值、以及併發症分別在不同的 NLRP1 rs6502867 與 rs878329 基因型之間並未具有統計顯著的差異。然而，攜帶 rs6502867 CT 基因型的僵直性脊椎炎患者相較於攜帶 TT 基因型的患者具有顯著較高的 BAS-G 數值，即使調整了性別、年齡、與疾病病程之共變項效應之後，差距仍然呈現統計顯著性。此結果可能是 NLRP1 相關的發炎機制與僵直性脊椎炎病患發病後呈現出不等的骨質破壞、鈣化、或者是纖維化有關，又或許是與病患的藥物順從性或反應性有關，因而反映出導致斷續性的身心舒適程度感受差異。如此的推論，也必須在日後由更多的研究來加以檢驗。

我們現今的研究仍然有一些限制，首先是我們的樣本數可能不足以檢定 NLRP1 rs6502867 與 rs878329 基因型對於僵直性脊椎炎發展的統計相關性。我們的研究資料是收集自單一醫學中心，可能會有引介偏差 (referral bias) 存在，建議未來可以從其他國家收集其他研究世代來加以驗證我們現今所觀察到的結果。此外，本研究對象的基因型判定都是在不知病例組與對照組的情況下進行，

在整個實驗過程中均是採用嚴格的品質控制程序，對於每一批次的 PCR 反應均包括一管不含 DNA 模板之陰性對照 (nontemplate control) 以確認 PCR 反應未被污染。每一個基因多形性的基因型判讀確認之後，在每一個基因型中，隨機選取大約 10% 的樣本進行重複實驗，加以確認基因型判定之結果。

我們現今的結果顯示，NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型無關於僵直性脊椎炎的發生，而 NLRP1 rs6502867 基因型可能相關於僵直性脊椎炎病患的疾病進展。

致謝：

本研究感謝行政院國家科學委員會的補助 (NSC 102-2815-C-040-055-B)，和魏正宗醫師以及研究室全體同學的幫助。

參考文獻

1. Masi AT, Walsh EG. Ankylosing spondylitis: integrated clinical and physiological perspectives. *Clin Exp Rheumatol*. 21(1):1-8, 2003.
2. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*. 61 Suppl 3:iii8-18, 2002.
3. Braun J, Bollow M, Sieper J. Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am*. 24(4):697-735, 1998.
4. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*. 1(7809):904-7, 1973.
5. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 30(1):16-34, 2011.
6. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold

- autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet.* 29(3):301-5, 2001.
7. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 10(12):826-37, 2010.
 8. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 10(2):417-26, 2002.
 9. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* 430(6996):213-8, 2004.
 10. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 28:137-61, 2012.
 11. Sui J, Li H, Fang Y, Liu Y, Li M, Zhong B, Yang F, Zou Q, Wu Y. NLRP1 gene polymorphism influences gene transcription and is a risk factor for rheumatoid arthritis in Han Chinese. *Arthritis Rheum.* 64(3):647-54, 2012.
 12. Magitta NF, Bøe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, Undlien DE, Joner G, Njølstad PR, Kvien TK, Førre Ø, Knappskog PM, Husebye ES. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun.* 10(2):120-4, 2009.
 13. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, McFann KK, Holland PJ, Fain PR, Dinarello CA, Spritz RA. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(8):2952-6, 2013.

14. Vazquez-Del Mercado M, Garcia-Gonzalez A, Muñoz-Valle JF, Garcia-Iglesias T, Martinez-Bonilla G, Bernard-Medina G, Sanchez-Ortiz A, Ornelas-Aguirre JM, Salazar-Paramo M, Gamez-Nava JI, Gonzalez-Lopez L. Interleukin 1beta (IL-1beta), IL-10, tumor necrosis factor-alpha, and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 29(3):522-6, 2002.
15. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I, Reed JC. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell.* 25(5):713-24, 2007.
16. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 140(6):821-32, 2010.
17. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, Tschopp J. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem.* 55(5):443-52, 2007.
18. Im SS, Yousef L, Blaschitz C, Liu JZ, Edwards RA, Young SG, Raffatellu M, Osborne TF. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 13(5):540-9, 2011.
19. Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C, Kress CL, Bailly-Maitre B, Li X, Osterman A, Matsuzawa S, Terskikh AV, Faustin B, Reed JC. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell.* 129(1):45-56, 2007.

20. Horie Y, Saito W, Kitaichi N, Miura T, Ishida S, Ohno S. Evaluation of NLRP1 gene polymorphisms in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Jpn J Ophthalmol.* 55(1):57-61, 2011.
21. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J Invest Dermatol.* 127(11):2558-62, 2007.
22. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 27(4):361-8, 1984.
23. Wei JC, Wong RH, Huang JH, Yu CT, Chou CT, Jan MS, Tsay GJ, Chou MC, Lee HS. Evaluation of internal consistency and re-test reliability of Bath ankylosing spondylitis indices in a large cohort of adult and juvenile spondylitis patients in Taiwan. *Clin Rheumatol.* 26(10):1685-91, 2007.
24. Chou CT, Tsai YF, Liu J, Wei JC, Liao TS, Chen ML, Liu LY. The detection of the HLA-B27 antigen by immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay-comparison with a flow cytometric procedure. *J Immunol Methods.* 255(1-2):15-22, 2001.
25. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 21(12):2286-91, 1994.
26. Calin A, Edmunds L, Kennedy LG. Fatigue in ankylosing spondylitis--why is it ignored? *J Rheumatol.* 20(6):991-5, 1993.
27. Jones SD, Steiner A, Garrett SL, Calin A. The Bath Ankylosing Spondylitis Patient Global Score (BAS-G). *Br J Rheumatol.* 35(1):66-71, 1996.

表一：僵直性脊椎炎病例及对照之基本特徵與臨床指標

	病例	对照
個數	305	305
年齡：歲	43.6 ± 0.6 ^a	44.4 ± 0.6 ^a
性別：男性	215 (70.5%)	215 (70.5%)
臨床特徵		
初始症狀發病年齡 (歲)	31.4 ± 0.7	
疾病持續時間 (年)	12.2 ± 0.6	
延遲診斷時間 (月)	68.1 ± 5.4	
併發症		
周邊關節炎	138 (45.2%)	
虹彩炎	83 (27.2%)	
發炎性腸道疾病	16 (5.2%)	
生化指標		
HLA- B27 ⁺	280 (91.8%)	
紅血球沉降速率 (ESR, mm/h)	25.5 ± 1.1	
C反應蛋白 (CRP, mg/l)	1.3 ± 0.1	
A型免疫球蛋白 (IgA, mg/dl)	325.4 ± 10.4	
巴斯僵直性脊椎炎活性指數 (BASDAI)	4.1 ± 0.1	
巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI)	2.4 ± 0.1	
巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G)	4.5 ± 0.2	

^a 平均值 ± 標準誤。

表二：NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型與對偶基因在病例及對照間之分佈

		病例 n (%)	對照 n (%)	相對危險性 (95% C.I.)
rs878329	CC	11 (3.6%)	13 (4.3%)	1.00 (reference)
	GC	92 (30.2%)	101 (33.1%)	1.08 (0.46-2.47)
	GG	202 (66.2%)	191 (62.6%)	1.25 (0.55-2.82)
對偶基因	C	114 (18.7%)	127 (20.8%)	1.00 (reference)
	G	496 (81.3%)	483 (79.2%)	1.13 (0.85-1.50)
rs6502867	CC	0 (0%)	0 (0%)	-
	CT	30 (9.8%)	30 (9.8%)	1.00 (reference)
	TT	275 (90.2%)	275 (90.2%)	1.00 (0.57-1.74)
對偶基因	C	30 (4.9%)	30 (4.9%)	1.00 (reference)
	T	580 (95.1%)	580 (95.1%)	1.00 (0.59-1.68)

表三：NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型與對偶基金對於僵直性脊椎炎發生之
合併效應

	rs878329/rs6502867	病例 n (%)	對照 n (%)	相對危險性 (95% C.I.)
對偶基因	C/C	0 (0.0%)	0(0.0%)	
	C/T	114 (18.7%)	126 (20.7%)	1.00 (reference)
	G/C	30 (4.9%)	30 (4.9%)	1.11 (0.63-1.96)
	G/T	466 (76.4%)	454 (74.4%)	1.13 (0.85-1.51)
基因型	CC/CC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
	GC/CC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
	GG/CC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
	CC/CT	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
	GC/CT	5 (1.7%)	8 (2.6%)	1.00 (reference)
	GG/CT	25 (8.2%)	22 (7.2%)	1.78 (0.50-6.30)
	CC/TT	11 (3.6%)	13 (4.3%)	1.31 (0.33-5.21)
	GC/TT	87 (28.5%)	93 (30.5%)	1.45 (0.46-4.62)
	GG/TT	177 (58.0%)	169 (55.4%)	1.62 (0.53-4.95)

表四：攜帶不同的 NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型之僵直性脊椎炎病患的 ESR、CRP、IgA、BASDAI、BASFI、BAS-G 之差異

基因型	個數	ESR	CRP	IgA	BASDAI	BASFI	BAS-G	
rs878329	CC	11	26.9 ± 24.1 ^a	1.5 ± 1.6	394.5 ± 239.3	3.8 ± 2.8	1.7 ± 1.7	4.5 ± 3.7
	GC	92	24.1 ± 19.0	1.1 ± 1.4	316.9 ± 142.3	4.2 ± 2.4	2.3 ± 2.3	4.7 ± 2.9
	GG	202	26.0 ± 19.6	1.3 ± 2.1	325.4 ± 191.3	4.0 ± 2.3	2.4 ± 2.3	4.4 ± 2.8
	<i>P</i> 值		0.710	0.733	0.401	0.809	0.631	0.759
	<i>P</i> 值 (調整後) ^b		0.805	0.807	0.750	0.827	0.828	0.425
rs6502867	CT	30	25.4 ± 21.4	1.4 ± 2.7	326.6 ± 159.6	4.4 ± 2.3	2.6 ± 2.5	5.5 ± 2.6
	TT	275	25.5 ± 19.4	1.2 ± 1.8	325.2 ± 182.0	4.1 ± 2.3	2.3 ± 2.3	4.4 ± 2.8
	<i>P</i> 值		0.997	0.641	0.969	0.389	0.499	0.049
	<i>P</i> 值 (調整後)		0.896	0.601	0.993	0.437	0.447	0.048

^a 平均值 ± 標準差。

^b 調整年齡、性別及病程之效應。

表五：在有無併發症的僵直性脊椎炎病患中，NLRP1 rs878329 與 rs6502867 基因型個數分布

	rs878329				rs6502867		
	CC n = 11	GC n = 92	GG n = 202	GG vs. CC + GC OR (95% C.I.)	CT n = 30	TT n = 275	TT vs. CT 勝算比
周邊關節炎							
有	6 (54.6%)	37 (40.2%)	95 (47.0%)	0.85 (0.50-1.40)	15 (50.0%)	123 (44.7%)	1.31 (0.59-2.93)
無	5 (45.4%)	55 (59.8%)	107 (53.0%)		15 (50.0%)	152 (55.3%)	
虹彩炎							
有	3 (27.3%)	24 (26.1%)	56 (27.7%)	0.88 (0.50-1.57)	5 (16.7%)	78 (28.4%)	0.46 (0.17-1.29)
無	8 (72.7%)	68 (73.9%)	146 (72.3%)		25 (83.3%)	197 (71.6%)	
發炎性腸道疾病							
有	0 (0.0%)	4 (4.4%)	12 (5.9%)	0.52 (0.10-1.95)	2 (6.7%)	14 (5.1%)	1.41 (0.29-6.75)
無	11 (100.0%)	88 (95.6%)	190 (94.1%)		28 (93.3%)	261 (94.9%)	