

· 论 著 ·

甘露糖结合凝集素基因多态性与肺结核的相关性研究*

孙冰, 崔秀琴[△], 郭玉凤, 李振魁, 韩伟

(新乡医学院第一附属医院结核科, 河南新乡 453100)

摘要:目的 探讨甘露糖结合凝集素(MBL)基因多态性与肺结核的相关性。方法 收集新乡医学院第一附属医院肺结核患者 158 例作为研究组,其生物学父母作为对照组。运用聚合酶链反应扩增及单核苷酸多态性的分子生物学技术,对 MBL 基因的 rs69287125、rs137824326 多态性分型,进行肺结核与甘露糖结合凝集素基因多态性的关联分析和单体型相对风险率分析。结果 rs69287125 等位基因与肺结核相关联($P=0.011$),其中等位基因 G 是保护因素($Z=-2.31$),A 为危险因素($Z=2.31$); rs137824326 等位基因与肺结核相关联($P=0.007$),其中等位基因 G 是保护因素($Z=-2.54$),A 为危险因素($Z=2.54$)。rs69287125-rs137824326 单型型的 A/A、G/G 与肺结核有关联($P=0.021, 0.015; Z=2.16, -1.85$)。结论 MBL 基因与肺结核相关联。

关键词: 结核,肺;甘露糖结合凝集素;多态性,单核苷酸;关联分析

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1917-03

Association study of gene polymorphism of mannanose binding lectin and pulmonary tuberculosis*

Sun Bing, Cui Xiuqin[△], Guo Yufeng, Li Zhenkui, Han Wei

(Department of Tuberculosis, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China)

Abstract: Objective To detect the association between pulmonary tuberculosis and gene polymorphism of mannanose binding lectin (MBL). Methods The study group included 158 patients with pulmonary tuberculosis and the control group were their parents. The polymorphism of rs69287125, rs137824326 of mannanose binding lectin gene was detected with PCR methods and SNP typing in all nucleus families to analyze the correlation and haplotype relative risk. Results The rs69287125 allele was connected with pulmonary tuberculosis ($P=0.011$). Allele G was protecting factor ($Z=-2.31$) and allele A was the hazard factor ($Z=2.31$). The rs137824326 allele was connected with pulmonary tuberculosis ($P=0.007$). Allele G was protecting factor ($Z=-2.54$) and allele A was the hazard factor ($Z=2.54$). The haplotypes of A/A and G/G in the rs69287125-rs137824326 were associated with pulmonary tuberculosis ($P=0.021, 0.015; Z=2.16, -1.85$). Conclusion It shows an association between pulmonary tuberculosis and the polymorphism at nucleotide of mannanose binding lectin gene in Chinese.

Key words: tuberculosis, pulmonary; mannanose-binding lectin; polymorphism, single nucleotide; association analysis

随着基因组学的发展,宿主遗传因素对结核病的发生发展过程成为学者的研究的热点^[1]。基因学病例对照研究的明显缺陷在于不同人群环境和暴露因素差异较大,采用家系资料的研究可以避免因为人群构成不同引起的研究误差^[2]。甘露糖结合凝集素(mannose binding lectin, MBL)是一种兼有调理素和直接激活补体功能的免疫因子,在肺结核基因学研究中 MBL 基因逐渐受到关注^[3]。为了解 MBL 基因与肺结核是否存在关联,本文采用肺结核核心家系资料进行研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究组来自 2008 年 2 月至 2011 年 4 月在新乡医学院第一附属医院住院及门诊治疗的肺结核患者。研究组纳入标准:(1)符合肺结核诊断标准(WS288-2008)中的各项要求;(2)痰菌阳性,胸部 X 线片提示有活动性肺结核特征病灶;(3)具有明显结核临床体征;(4)本人及其家属知情同意;(5)汉族人群,年龄大于或等于 18 岁。研究组排除标准:(1)严重躯体疾病或脑器质性疾病;(2)患有糖尿病、高血压、精神病等遗传性疾病。研究组共入组病例 158 例,其中男 71 例,女 87 例;年龄 18~46 岁,平均(26.58±8.75)岁;发病年龄 16~35 岁,平均(21.32±9.56)岁;病程 6 月至 15 年,平均(1.32±

0.74)年。对照组纳入标准:(1)为患者生物学父母;(2)汉族;(3)本人知情同意。对照组排除标准:(1)严重身体或大脑疾病;(2)患有精神病、糖尿病、高血压等遗传性疾病;(3)曾患肺结核。对照组共入组 316 名,男 158 名,女 158 名;平均年龄(59.4±15.6)岁。

1.2 方法

1.2.1 血样收集 所有受试者入组时抽取肘静脉血 10 mL,以 0.5 mol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA)(pH=8.0)100 μL 抗凝,室温放置 15~30 min 后,4 000 r/min,离心 15 min,分离血清和红细胞,-20℃冰箱冻存备用。

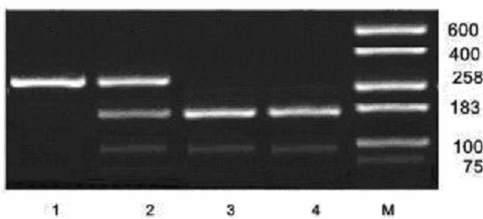
1.2.2 提取基因组 DNA 及其分型 在离心管中取 100 μL 静脉血,采用 Chelex100 法提取 DNA,用 0.8% 琼脂糖电泳检测提取的结果。对 rs69287125、rs137824326 两个单核苷酸多态性(SNP)位点参考文献资料并采用 Primer Premier 5.0 设计引物,rs69287125 上游引物为 5'-ACT CTA GCT GAT GTT CAG CTG GAG C-3',下游引物为 5'-TTC GGG GGC CTT TGT CAA AAT CAC C-3';rs137824326 上游引物为 5'-CTA AGT TTT TAG AAT TTG TTT ATT T-3',下游引物为 5'-CAC AAT ACT GTA AAG TAA TTA TCC T-3'。对所需基

因的特定片段采用 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25 μ L,该体系中含有 DNA 模板 4 μ L,上下游引物各 2 μ L,2 \times Tap PCR MasterMix 12 μ L,其余为双蒸水。PCR 预处理为 95 $^{\circ}$ C (5 min),结束后进入循环反应,其中热变性温度均为 95 $^{\circ}$ C (30 s),延伸温度均为 72 $^{\circ}$ C (30 s),退火温度均为 60 $^{\circ}$ C (30 s)。出循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。对 PCR 扩增产物采用限制性酶切,rs69287125 为 DdeI,rs137824326 为 SphI,酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离。根据酶切图谱判断基因型。

1.3 统计学处理 对各组基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡定律的吻合度检验。等位基因关联性分析和单体型相对风险率分析采用基于家系资料检验统计软件(FBAT1.7.3)进行统计。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

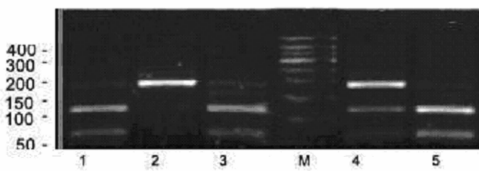
2 结果

2.1 甘露糖结合凝集素等位基因酶切结果 rs69287125 基因 SNP 位点 PCR 扩增片段长度为 263 bp,存在 A、G 二态性,酶切长度分别为 85 bp 和 178 bp;电泳显示 3 种基因型:A/A 纯合切开,A/G 杂合切开,G/G 纯合未切开,见图 1。rs137824326 基因 SNP 位点 PCR 扩增片段长度为 193 bp,酶切长度分别为 61 bp 和 132 bp;电泳显示 3 种基因型:A/A 纯合切开,A/G 杂合切开,G/G 纯合未切开,见图 2。



M:Marker;泳道 1 为 G/G 纯合未切开;泳道 2 为 A/G 杂合切开;泳道 3、4 为 A/A 纯合切开。

图 1 rs69287125 酶切结果



M:Marker;泳道 1、3、5 为 A/A 纯合切开;泳道 4 为 A/G 杂合切开;泳道 2 为 G/G 纯合未切开。

图 2 rs137824326 酶切结果

2.2 Hardy-Weinberg 平衡的吻合度检验 对两个 SNP 位点的基因型分别进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。研究组与对照组各基因型 Hardy-Weinberg 平衡吻合度良好 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 两组基因型 Hardy-Weinberg 平衡检验

SNP 位点	组别	χ^2	ν	P
rs69287125	研究组	0.87	2	>0.05
	对照组	0.95	2	>0.05
rs137824326	研究组	1.13	2	>0.05
	对照组	1.21	2	>0.05

2.3 MBL 基因 SNP 位点的等位基因关联性分析 rs69287125 等位基因与肺结核相关联 ($P = 0.011$),其中等位

基因 G 是保护因素 ($Z = -2.31$),A 为危险因素 ($Z = 2.31$);rs137824326 等位基因与肺结核相关联 ($P = 0.007$),其中等位基因 G 是保护因素 ($Z = -2.54$),A 为危险因素 ($Z = 2.54$)。见表 2。

表 2 MBL 基因各位点等位基因频率的相关分析

SNP 位点	等位基因	频率	家系数	Z	P
rs69287125	A	0.307	107	2.31	0.011
	G	0.693	107	-2.31	0.011
rs137824326	A	0.342	118	-2.54	0.007
	G	0.658	118	2.54	0.007

2.4 MBL 基因 SNP 位点的等位基因单体型相对风险率分析 rs69287125-rs137824326 单体型 A/A、G/G 与肺结核有关联 ($P = 0.021, 0.015$; $Z = 2.16, -1.85$)。A/G、G/A 单体型与肺结核无关联 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 MBL 基因各位点单体型相对风险率分析

rs69287125	rs137824326	基因频率	家系数	Z	P
G	A	0.167	57.9	-0.34	0.412
A	G	0.198	64.3	0.57	0.327
G	G	0.379	87.6	-1.85	0.021
A	A	0.106	35.2	2.16	0.015

3 讨论

遗传因素是影响机体对结核分枝杆菌自然抵抗力的重要因素之一。MBL 候选基因位于 10q11.2-q21^[4],MBL 基因表达可以提高机体免疫力,表达产物可以通过直接调理先天免疫介导的吞噬细胞功能或活化补体系统起间接调理作用^[5],属于天然抗感染免疫分子。MBL 基因 SNP 位点多态性会影响血清 MBL 结构和浓度,使机体对结核感染的抵抗力下降^[6]。

肺结核的发生发展是入侵结核杆菌和机体自身的免疫力复杂的相互作用的结果^[7-8],影响机体对结核杆菌的抵抗力包含遗传因素^[9]。MBL 识别入侵病原体是机体早期反应的关键。Cosar 等^[10]对 44 个结核病儿童和 99 个年龄匹配的健康对照儿童的研究中表明,低层次的 MBL 参与预防肺结核的保护。El Sahyl 等^[11]对 487 例结核患者和 232 例对照的研究表明非洲裔美国人结核患者 MBL 基因多态性与正常对照组比较,差异有统计学意义。Hellemann 等^[12]对 532 个重症监护室的患者和 533 个正常对照的比较中,MBL 基因多态性的杂合子对于抵抗革兰阳性细菌感染有一定的保护作用。

本研究发现 rs69287125 等位基因与肺结核相关联 ($P = 0.011$);rs137824326 等位基因与肺结核相关联 ($P = 0.007$),rs69287125-rs137824326 单体型 A/A、G/G 与肺结核有关联 ($P = 0.021, 0.015$),与国外学者的研究结论一致。国内方柱兴和银春莲^[13]研究认为 MBL 不是广西壮族人群肺结核病发病的遗传学危险因素,可能与本研究所采用的种族不同、研究方法不同有关。王墨等^[14]对重庆地区人群的研究发现甘露糖结合凝集素与呼吸道疾病的发生相关,冯福民等^[15]对河北唐山地区汉族人群的研究结果发现甘露糖结合蛋白基因突变与肺结核的危险因素,与本研究结论一致。

总之,MBL 基因通过吞噬细胞功能或活化补体系统起间接调理作用,参与肺结核的病理生理。但是本研究的样本还比

较少,还需要更多的大样本的重复实验来证实。

参考文献:

- [1] Thuong NT, Hawn TR, Thwaites GE, et al. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis[J]. *Genes Immun*, 2007, 8(5): 422-428.
- [2] 张丽, 陈元堂, 余冰, 等. 5-羟色胺转运体基因 rs9863857 与抑郁症及其临床特征的相关性研究[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2009, 18(5): 401-403.
- [3] 刘玮, 张芳, 赵秋敏, 等. 甘露糖结合凝集素基因多态性与肺结核易感性的研究[J]. *中国热带医学*, 2006, 6(3): 387-389.
- [4] Geijn FE, Man Y, Wuhner M, et al. Mannose-binding lectin does not explain the course and outcome of pregnancy in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(1): 2-7.
- [5] Elshimi MS, Khafagy SM, Abdel-al H, et al. Mannose-binding lectin deficiency in preterm neonates[J]. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol*, 2010, 8(2): 75-80.
- [6] Chang WC, White MR, Moyo P, et al. Lack of the pattern recognition molecule mannose-binding lectin increases susceptibility to influenza A virus infection[J]. *BMC Immunol*, 2010, 11(23): 64-75.
- [7] 金韬, 叶松. 结核分枝杆菌临床分离 RFP 耐药株 rpoB 基因突变研究[J]. *按摩与康复医学: 下旬刊*, 2010, 1(8): 7-8.
- [8] Ferwerda B, Kibiki GS, Netea MG, et al. The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania[J]. *AIDS*, 2007, 21(10): 1375-1377.
- [9] Ben-Selma W, Harizi H, Boukadida J. Association of TNF- α and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations[J]. *Microbes Infect*, 2011, 13(10): 837-843.
- [10] Cosar H, Ozkinay F, Onay H, et al. Low levels of mannose-binding lectin confers protection against tuberculosis in Turkish children[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008, 27(12): 1165-1169.
- [11] El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, et al. The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups[J]. *Scand J Infect Dis*, 2004, 36(2): 106-108.
- [12] Hellemann D, Larsson A, Madsen HO, et al. Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage(heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(24): 3071-3080.
- [13] 方桂兴, 银春莲. 甘露糖结合凝集素基因多态性与壮族人群肺结核易感性的关系研究[J]. *国际呼吸杂志*, 2011, 31(6): 428-430.
- [14] 王墨, 李秋, 王晓刚. 重庆地区人群血清甘露聚糖结合凝集素水平测定及意义[J]. *重庆医学*, 2005, 34(6): 864-865.
- [15] 冯福民, 郝金奇, 陈怡, 等. 河北唐山汉族人群 VDR 和 MBP 基因交互作用与肺结核发病的相关性[J]. *重庆医学*, 2010, 39(12): 1527-1529, 1532.

(收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2012-02-13)

(上接第 1916 页)

- 9(2): 92-93.
- [2] 朱庆磊, 吕欣然, 何爱霞. 葛根素对氧自由基的清除和抗氧化性损伤作用[J]. *解放军药学报*, 2001, 17(1): 1-3.
- [3] 卢金萍, 任江华, 姜黎. 葛根素对心肌缺血-再灌注损伤能量代谢的影响[J]. *山东中医杂志*, 2009, 28(12): 867-868.
- [4] 黄绵庆, 杨照新, 姚茂忠, 等. 预防性葛根素抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡[J]. *中国热带医学*, 2011, 11(11): 1379-1380.
- [5] Saitoh Y, Miyanishi A, Mizuno H, et al. Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS Generation and DNA damages[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2011, 102(1): 69-76.
- [6] Afaq F, Zaid MA, Khan N, et al. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin[J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(6): 553-561.
- [7] 王嵘, 苏晓灵, 周白丽. 葛根素对兔心肌缺血-再灌注损伤时 SOD、ANF 含量的变化[J]. *青海医学院学报*, 2005, 26(2): 102-104.
- [8] 李卫东, 刘顺英. 葛根素清除急性胰腺炎大鼠氧自由基作用的实验研究[J]. *江苏中医药*, 2007, 39(1): 55-56.
- [9] 李涛, 邹志森. 葛根素对大鼠肝缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2004, 20(4): 15-16.
- [10] 王玉, 朱慧渊, 郭莹, 等. 葛根素对局灶性脑缺血-再灌注模型大鼠脑组织水肿及神经细胞 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase 活性的影响[J]. *中国中医急症*, 2007, 16(1): 70-71.
- [11] 曹莉, 茅彩萍, 顾振纶. 葛根素对胰岛素抵抗大鼠糖耐量及胰腺组织形态学的影响[J]. *中国血液流变学杂志*, 2008, 18(1): 47-48, 95.
- [12] 赵敏, 杜艳秋, 李长喻. 葛根素对急性酒精中毒大鼠保护作用的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(17): 2610-2612, 2615.
- [13] 张海英, 胡海涛, 刘亦恒, 等. 葛根素对 A β_{25-35} 诱导 PC12 细胞凋亡的影响[J]. *中药材*, 2008, 31(4): 543-546.
- [14] Zhao M, Du YQ, Yuan L, et al. Protective effect of puerarin on acute alcoholic liver injury[J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(2): 241-249.
- [15] Wan H, Zhu H, Tian M, et al. Protective effect of chuanxiong-zine-puerarin in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia[J]. *Nucl Med Commun*, 2008, 29(12): 1113-1122.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2012-01-06)