

肺结核患者单核细胞趋化因子蛋白-1 基因多态性的检测

张宝秋 王雪玉 杨磊 尹颜军 刘继芬 荣长利 时广利

【摘要】 目的 探讨我国北方地区汉族人群单核细胞趋化因子蛋白(MCP-1)-2518位基因多态性与肺结核的相关性。方法 应用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法检测我国北方地区汉族136例肺结核患者和152例正常人对照的MCP-1基因-2518位基因多态性。结果 肺结核患者中GG基因型的频率明显高于对照组($P < 0.05$, $OR = 1.96$);AA和AG基因型的频率在两组间无统计学差异($P > 0.05$)。肺结核患者中等位基因G的频率明显高于对照组($P < 0.05$, $OR = 1.536$)。MCP-1基因多态性在初治与复治、耐药与无耐药患者中的频率分布无显著差异($P > 0.05$)。结论 中国北方地区汉族人群MCP-1基因-2518位点多态性与肺结核具有相关性,GG基因型可能是肺结核的易感因素。

【关键词】 结核,肺; 多态性,单核苷酸; MCP-1基因

Detection of genetic polymorphism of MCP-1 in pulmonary tuberculosis in Han nationality of North China

ZHANG Bao-qiu, WANG Xue-yu, YANG Lei, YIN Yan-jun, LIU Ji-fen, RONG Chang-li, SHI Guang-li. Department of Clinical Laboratory, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China

Corresponding author: SHI Guang-li, Email: shiguangli878@sina.com

【Abstract】 Objective To study the relationship between monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1)-2518A/G polymorphism and pulmonary tuberculosis(PTB) in Han nationality of North China. **Methods** 136 unrelated consecutive patients with PTB and 152 healthy individuals were studied. The polymorphisms of MCP-1-2518A/G were detected with polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). **Results** There was a significant increase in the frequency of the GG genotype in PTB patients compared to controls($P < 0.05$, $OR = 1.96$). The distribution of AA and AG genotypes of MCP-1-2518 was not significantly different in PTB patients compared with controls($P > 0.05$). There was a significant increase in the frequency of the G allele in PTB patients compared to controls($P < 0.05$, $OR = 1.536$). The gene polymorphism of MCP-1-2518 was not significantly different in PTB patients of initial treatment, retreatment, drug sensitive and drug resistant($P > 0.05$). **Conclusion** This preliminary study showed that MCP-1-2518A/G polymorphism was associated with PTB. MCP-1 GG genotype may be the susceptible factor of PTB.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary; Polymorphism, single nucleotide; MCP-1 gene

结核病严重威胁人类的健康,全球每年大约有一千万新发病例,每年大概有两百万人死于结核病^[1]。据估算,全世界大概30%的人口感染过结核分枝杆菌^[2],但是大部分人处于潜伏感染状态,只有5%~10%的人最终发展为结核病患者,预示宿主的遗传易感性在遏制结核分枝杆菌感染中起着非常重要的作用^[3-4]。单核细胞趋化因子蛋白-1(MCP-1)是一种重要的趋化因子,其基因位于17q11.2~12。有研究发现,活动性结核与人类17号染色体的特定区域相关联^[5]。本文对肺结核患者MCP-1基因2518位点多态性进行了检测,探讨

MCP-1基因多态性与肺结核的相关性。

对象与方法

1. 研究对象:首都医科大学附属北京胸科医院结核内科确诊住院治疗的肺结核患者136例,年龄18~56岁,其中男61例,女75例;排除其他传染病及慢性病,如支气管哮喘、慢性支气管炎、肺炎、肝肾疾病、尘肺、糖尿病、肿瘤、遗传性过敏性疾病和人类免疫缺陷病毒感染。对照组为健康体检者152名,年龄20~57岁,其中男62名,女90名,均排除结核病史。根据肺结核患者是否为复发以及是否对一线抗结核药物敏感情况,将肺结核组分为初治组(93例)和复治组(43例)、耐药组(48例)和无耐药组(88

例)。所有入选研究对象均为中国北方汉族人,彼此间无血缘关系。病例组和对照组之间年龄、性别差异无统计学意义。

2. 方法:应用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法。(1)基因组DNA提取:取研究对象外周静脉血3ml(DETA抗凝),应用EZ-10 spin column genomic DNA minipreps kit(BIO BASIC INC, Canada)按说明书提取全基因组DNA。(2)PCR扩增:应用北京赛百盛公司的50 μl PreMix体系进行扩增,上游引物序列为:5'-TTCTCTTCTACGGGATCTGGG-3';下游引物序列为:5'-GTCTCTCTGGCTTAGTCAT-3'(由上海生工生物工程技术有限公司合成)。反应体系中加入2 μl DNA模板,上下游引物各2 μl,纯净水30 ml。反应条件为:94 °C预变性3 min;以下温度35个循环:94 °C 40 s, 59 °C 40 s, 74 °C 40 s;最后72 °C延伸4 min。(3)限制性内切酶酶切:应用限制性内切酶 pvu II(购自北京赛百盛公司)对DNA扩增产物进行酶切,反应体系为20 μl:PCR产物10 μl, pvu II 2 μl, 10×缓冲液2 μl, 纯净水16 μl, 37 °C 16 h。(4)电泳分析:取酶切产物8 μl在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,紫外灯下观察电泳结果。

3. 统计学处理:基因型分布频率应用 arlequin 2.0 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验分析其是否具有群体代表性。病例组和对照组间的基因型频率差异应用 SPSS 13.0 进行卡方检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。频率差异有统计学意义的基因型进行比值比(OR)及

其95%可信区间(CI)的计算。

结 果

1. 基因型分析:MCP-1 基因-2518A/G 位点的PCR扩增产物片段为466 bp,酶切产物进行电泳后,AA基因型仅见一条466 bp的电泳带,GG基因型有两条电泳带分别为327 bp和139 bp,AG基因型可见3条电泳带,分别为466 bp、327 bp和139 bp(图1)。

2. MCP-1-2518 位点 A/G 多态性基因型分布在肺结核患者与对照组的比较:该基因型在肺结核患者与对照组中的分布频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($P > 0.05$),具有群体代表性。肺结核患者中 GG 基因型的频率明显高于对照组($P < 0.05$, $\chi^2 = 7.133$, $OR = 1.96$);AA 和 AG 基因型的频率在两组间无统计学差异($P > 0.05$)。肺结核患者中等位基因 G 的频率明显高于对照组($P < 0.05$, $\chi^2 = 6.428$, $OR = 1.536$);肺结核患者中等位基因 A 的频率明显低于对照组($P < 0.05$, $\chi^2 = 6.428$, $OR = 0.651$)。见表1。

3. MCP-1 基因多态性在结核病组中的频率分布情况:如表2,3所示,MCP-1 基因多态性在初治和复治患者中的频率分布无显著差异, P 均 > 0.05 ;MCP-1 基因多态性在耐药和无耐药患者中的频率分布无显著差异, P 均 > 0.05 。

讨 论

随着人类基因组计划和后基因组计划研究工作的进展,人类已经认识到基因多态性在阐明人体对疾病

表1 肺结核患者与对照组中 MCP-1-2518 位点 A/G 基因多态性分布情况 (%)

组别	AA	GG	AG	A	G
对照组	23.1 (35/152)	26.3 (40/152)	50.6 (77/152)	48.3 (147/304)	51.7 (157/304)
病例组	16.9 (23/136)	41.2 (56/136)	41.9 (57/136)	37.9 (103/272)	62.1 (169/272)
χ^2 值	1.669	7.133	2.207	6.428	6.428
P 值	0.196	0.008	0.137	0.011	0.011
OR (95% CI)		1.96 (1.192~3.222)		0.651 (0.467~0.908)	1.536 (1.102~2.142)

表2 MCP-1 基因多态性在初治和复治肺结核患者中的频率分布 (%)

组别	例数	AA	GG	AG	A	G
初治	93	18.3 (17/93)	39.8 (37/93)	41.9 (39/93)	33.9 (63/186)	66.1 (123/186)
复治	43	13.9 (6/43)	44.2 (19/43)	41.9 (18/43)	34.9 (30/86)	65.1 (56/86)
χ^2 值		0.392	0.235	0.000	0.027	0.027
P 值		0.531	0.628	0.993	0.870	0.870

表3 MCP-1 基因多态性在耐药和无耐药肺结核患者中的频率分布 (%)

组别	例数	AA	GG	AG	A	G
耐药	48	14.6 (7/48)	45.8 (22/48)	39.6 (19/48)	34.4 (33/96)	65.6 (63/96)
无耐药	88	18.2 (16/88)	38.6 (34/88)	43.2 (38/88)	39.8 (70/176)	60.2 (106/176)
χ^2 值		0.286	0.664	0.165	0.769	0.769
P 值		0.593	0.415	0.684	0.380	0.380

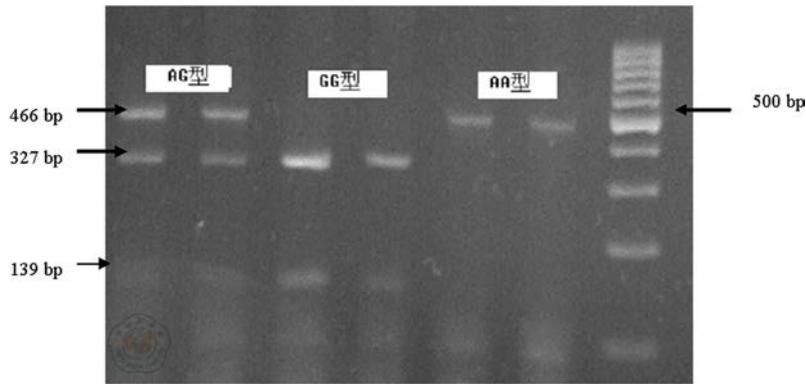


图1 MCP-1-2518位点PCR产物PvuII酶切后电泳图

易感性与耐受性、疾病临床表现的多样性以及对药物治疗的反应性上都起着重要的作用。通过建立基因多态性与临床表型、基因多态性与疾病风险之间的关系,可以对复杂疾病的诊断和治疗产生巨大的促进作用。随着结核病遗传易感基因研究的不断深入,已发现有大量的抗原基因多态性与结核病易感性存在关联^[6]。MCP-1 是趋化因子 CC 亚族成员,由单核细胞、巨噬细胞和成纤维细胞等分泌。MCP-1 对单核-巨噬细胞具有较强的趋化作用,可募集单核、巨噬细胞到炎症反应部位。在炎症反应中,MCP-1 对单核细胞的趋化作用是无可替代的。MCP-1 在结核免疫中有着重要的作用,能激活并趋化单核细胞、巨噬细胞等向感染部位聚集,以吞噬并杀灭结核分枝杆菌^[7]。

Ben-Selma 等^[8]的研究发现,MCP-1-2518 位点基因多态性与突尼斯人肺结核易感性密切相关。杨本付等^[9]的研究结果显示,中国汉族肺结核患者 MCP-1-2518 位点 GG 基因型与肺结核发病有显著性相关性 ($P < 0.05$, $OR = 1.989$); Flores-Villanueva 等^[10]的研究发现,携带 MCP-1-2518 位点 GG 基因型的墨西哥人和韩国人发展为结核病的概率分别是 AA 基因型的 5.4 和 6.9 倍。本研究结果显示,中国北方汉族肺结核患者中 MCP-1-2518 位点 GG 基因型的频率明显高于对照组 ($P < 0.05$, $OR = 1.96$), 等位基因 G 的频率明显高于对照组 ($P < 0.05$, $OR = 1.536$), 等位基因 A 的频率明显低于对照组 ($P < 0.05$, $OR = 0.651$)。说明 MCP-1-2518 位点 GG 基因型可能是肺结核发病的易感基因型,此结果与 Ben-Selma、杨本付、Flores-Villanueva 等^[8-10]的研究结果基本一致。但 Moller 等^[11]的研究发现,MCP-1-2518 位点单核苷酸的改变与南非人群对结核病的易感性无关。Velez 等^[12]的研究也发现,MCP-1-2518 位点单核苷酸多态性与西非人群、美国人群和阿根廷人群的结核易感性无关。原因可能是由于 MCP-1 基因多态性分布频率在不同种族和人群中具有差异,从而造成不同种族、不同人群

对结核分枝杆菌感染所启动的免疫应答产生差异。

结核病的发病是由病原菌、环境因素与免疫遗传因素三者交互作用的结果^[13],其中免疫遗传因素更是一个由多种细胞及细胞因子和多基因参与的复杂过程,况且不同人群之间还存在着遗传背景差异,因此要揭示各基因位点和炎症表现型之间的相互关系,还需要综合其他多个位点,进行大样本多中心的分析,并最终明确各等位基因的功能。

总之,本研究结果表明,MCP-1-2518 位点基因多态性与肺结核易感性具有一定的相关性,其 GG 基因型可增加我国北方汉族人群肺结核的易感性。但由于肺结核的发病是宿主基因调控免疫应答与细菌共同作用的复杂过程,MCP-1 基因参与肺结核发病的分子机制尚有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Elbam I. Susceptibility to and severity of tuberculosis is genetically controlled by human leukocyte antigens. Saudi Med J, 2008, 29: 1625-1629.
- [2] 顾玉虹, 马志明, 李德宪. 细胞因子基因多态性与结核遗传易感性关系的研究进展. 国际呼吸杂志, 2010, 30: 1266-1269.
- [3] Bellamy R. Genetics and pulmonary medicine. 3. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. Thorax, 1998, 53: 588-597.
- [4] Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, et al. Tuberculosis. Lancet, 2003, 362: 887-899.
- [5] Jamieson SE, Miller EN, Black GF, et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. Genes Immune, 2004, 5: 46-57.
- [6] Yim JJ, Selvaraj P. Genetic susceptibility in tuberculosis. Respirology, 2010, 15: 241-256.
- [7] 徐珍娥. 单核细胞趋化蛋白-1 在结核病免疫中的研究进展. 国际儿科学杂志, 2007, 34: 325-328.
- [8] Ben-Selma W, Harizi H, Boukadida J. MCP-1 -2518 A/G functional polymorphism is associated with increased susceptibility to active pulmonary tuberculosis in Tunisian patients. Mol Biol Rep, 2011, 38: 5413-5419.
- [9] 杨本付, 庄斌, 李芳, 等. 单核细胞趋化蛋白-1 基因多态性与肺结核易感性的关系. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32: 454-456.
- [10] Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, et al. A functional

- promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med*, 2005, 202: 1649-1658.
- [11] Moller M, Nebel A, Valentonyte R, et al. Investigation of chromosome 17 candidate genes in susceptibility to TB in a South African population. *Tuberculosis*, 2009, 89: 189-194.
- [12] Velez Edwards DR, Tacconelli A, Wejse C, et al. MCP1 SNPs and pulmonary tuberculosis in cohorts from West Africa, the USA and Argentina: lack of association or epistasis with IL12B polymorphisms. *PLoS One*, 2012, 7: e32275.
- [13] 丁光贵, 张国良, 陈心春, 等. 白细胞介素-22 基因单核苷酸多态性与肺结核易感性的相关性研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 8: 596-600.
(收稿日期: 2013-07-11)
(本文编辑: 戚红丹)

张宝秋, 王雪玉, 杨磊, 等. 肺结核患者单核细胞趋化因子蛋白-1 基因多态性的检测 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(17): 7705-7708.

