

维生素 D 受体基因多态性与肺结核易感性的病例对照研究

刘玮 张翠英 吴晓明 田磊 李春芝 赵秋敏 张泮河
杨淑梅 杨红 张习坦 曹务春

【摘要】 目的 探讨维生素 D 受体(VDR)基因多态性与中国汉族人群肺结核发病间的关系。方法 采用病例对照研究设计,用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)检测 VDR 基因中 T/C 多态性位点,对肺结核相关的环境因素进行问卷调查,并进行单因素分析和多因素 logistic 回归分析。结果 对 76 例病例和 171 名对照进行了 VDR 的基因分型,VDR-FF、VDR-Ff 与 VDR-ff 三种基因型在病例组和对照组中的分布频率分别为 38.2%、44.7%、17.1% 和 52.6%、40.9%、6.4%,其中 ff 基因型在病例组中的频率显著高于对照组,OR 值 95% CI: 3.668(1.483~9.071);在多因素分析中调整卡介苗接种史和吸烟状况后,VDR-ff 基因型与肺结核发病仍有显著性关联,调整 OR 值 95% CI 3.036(1.117~8.253)。结论 VDR-ff 基因型可能是中国汉族人群肺结核病的易感基因型。

【关键词】 结核 肺;维生素 D 受体基因;病例对照研究

A case-control study on the vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis LIU Wei*, ZHANG Cui-ying, WU Xiao-ming, TIAN Lei, LI Chun-zhi, ZHAO Qiu-min, ZHANG Pan-he, YANG Shu-mei, YANG Hong, ZHANG Xi-tan, CAO Wu-chun. *Epidemiological Department of Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

【Abstract】 Objective To investigate the association between the genetic polymorphisms of VDR gene and susceptibility to pulmonary tuberculosis. **Methods** Case-control study was conducted. PCR-RFLP technique was used to detect the C/T polymorphism in VDR gene. Information on related factors of tuberculosis was collected using a pre-tested questionnaire. Univariate and multivariate logistic analyses were conducted with SPSS software package. **Results** A sample of 76 cases and 171 controls was studied. The genotype frequencies of VDR-FF, VDR-Ff and VDR-ff were 38.2%, 44.7%, 17.1% and 52.6%, 40.9%, 6.4% respectively. VDR-ff was significantly overrepresented in case group, the OR(95% CI) was 3.668(1.483-9.071) when comparing with FF genotype. The significant association remained after adjusting BCG immunization and smoking, the OR(95% CI) was 3.036(1.117-8.253). **Conclusion** The VDR-ff genotype might be associated with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in Chinese Han population.

【Key words】 Tuberculosis pulmonary; Vitamin D receptor gene; Case-control study

大量遗传学研究表明肺结核发病是多基因与环境因素共同作用的结果。目前已发现的肺结核易感基因有 HLA(human leucocyte antigen)基因及非 HLA 基因两大类,国内外曾进行过 HLA 基因的研究^[1,2],但因 HLA 基因的非特异性及复杂的连锁不

平衡性而不易确定基因与疾病的真正联系,近年来,结核病易感基因的研究热点主要在非 HLA 类候选易感基因上,如维生素 D 受体(VDR)基因^[3],自然抗性相关巨噬细胞蛋白 1(natural resistance associated macrophage protein 1, NRAMP1)基因^[4],甘露糖结合蛋白(mannose binding protein, MBP)基因^[5]等。其中的 VDR 基因位于人类第 12 条染色体长臂上,包括多个基因多态性位点,其第二外显子处的 C/T 转换可能造成一个潜在的 ATG 起始位点,使编码的 VDR 多 3 个氨基酸,转录效率降低 1.7 倍^[6],这样 VDR 便不能有效地结合维生素 D 的活性形式,从而发挥其协助单核巨噬细胞抑制结核分支杆菌胞内生长的作

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271144)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所
流行病学研究室(刘玮、吴晓明、赵秋敏、张泮河、杨红、张习坦、曹务春)
解放军第三〇九医院(张翠英)、解放军第九一医院(田磊)、解放军总参三部防疫队(李春芝、杨淑梅)

通讯作者:曹务春

用。本研究即选取这一 C/T 多态性位点,探索中国汉族人群中肺结核发病是否与 VDR 基因多态性有关。

对象与方法

1. 研究对象的选择:

(1) 病例组:按国家统一诊断标准选取解放军第三〇九和第九一医院的男性、汉族新发肺结核病例,全部病例均经痰菌培养、结核菌素试验和临床 X 线检查确诊,其中痰菌培养阳性者确诊为菌阳肺结核,痰菌培养阴性但 PPD 试验、X 线胸透及临床表现与肺结核相符者确诊为菌阴肺结核。排除了肺炎、肺癌等具有相似病症的患者。

(2) 对照组:在部队人员中选择无血缘关系的男性汉族健康者,所有对照经胸透排除结核病史。

2. 方法:

(1) 问卷调查:设计调查问卷,内容包括一般情况(年龄、婚姻状况、经济收入、居住环境等)与肺结核有关的危险因素(吸烟饮酒状况、营养状况、肺结核接触史及卡介苗接种史等)及以往病史(糖尿病、肿瘤、艾滋病病毒(HIV)感染等影响机体免疫功能的疾病),对所有研究对象进行现场问卷询问和填写,由专业人员检查卡痕。同时抽取 5 ml 血标本用柠檬酸钠抗凝常温保存,并在 24 h 内提取白细胞。

(2) 基因组 DNA 的提取:用淋巴细胞分离液从抗凝血中分离白细胞,使用博大公司的全血基因组快速提取试剂盒提取白细胞中的基因组 DNA 用于扩增。

(3) 聚合酶链反应(PCR):参照文献[3]合成以下引物:P1:AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTC, P2:ATGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC。PCR 反应体系:100 ng 模板 DNA, 2.5 mmol/L MgCl₂, 1 U Taq I DNA 聚合酶,上游引物与下游引物各 0.5 μmol/L,总反应体积为 30 μl。在 2400PCR 仪上进行热循环,循环条件为:96℃ 预变性 1 min, 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环。在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,以 DGL-2000 为标准分子量对照,鉴定 PCR 扩增产物,选取一个样品进行克隆测序,确证扩增片段是正确的。

(4) 基因多态性分析:用博大公司的玻璃奶纯化试剂盒回收 PCR 产物,用于酶切。酶切体系为:纯化产物约 200 ng, FoK I 酶(TaKaRa 公司)10 U, 0.1%

BSA 2 μl, 10 × M buffer 2 μl, 补水至 20 μl, 37℃ 酶切 4 ~ 6 h。将酶切产物在 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 180 V 电压分离酶切片段。0.5 μg/μl 溴化乙锭染色后,在紫外灯下观察。酶切结果显示,VDR 基因中 T/C 多态性位点处如果是 T,就能构成 FoK I 的识别位点,被酶切得到 197 bp 与 70 bp 2 个片段(等位基因型 f),多态性位点是 C,则不能构成 FoK I 的识别位点,不能被酶切,只有 267 bp 1 个片段(等位基因型 F),从而产生三种基因型 ff(197 bp 与 70 bp 2 个片段),Ff(197 bp, 70 bp 与 267 bp 3 个片段),FF(267 bp 1 个片段)(图 1)。以上基因多态性检测均用盲法即在实验室人员不知标本性质的前提下进行。

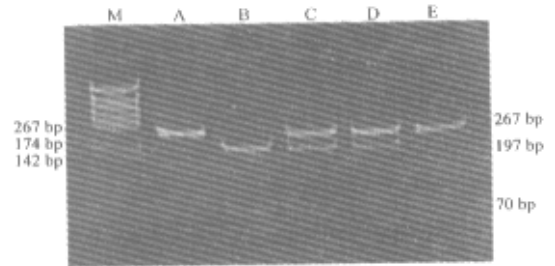


图1 VDR 基因 PCR-RFLP 产物 12% PAGE 电泳结果
M: pGEM-7Z Marker; A、E: FF 型; C、D: ff 型; B: Ff 型

(5) 统计学分析:将资料录入计算机进行整理,首先进行病例对照一般情况的均衡性比较,然后对各基因型频率及各潜在危险因素与肺结核发病的关系分别进行单因素分析,计算 OR 值及 95% CI。将是否发病作为因变量,各基因型别作为自变量,单因素分析中有显著意义的相关危险因素作为协变量,进行多因素非条件 logistic 回归分析,计算调整 OR 值及 95% CI。以上所有统计过程均由 SPSS 软件完成,以 $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义。

结果

1. 一般情况比较:按照病例组与对照组的纳入标准共调查 76 例患者,平均年龄 28.26 岁,其中菌阳肺结核患者 23 例。对照 171 名,平均年龄 27.23 岁。经 χ^2 检验,两组在年龄、文化程度和婚姻状况等一般情况中的差异无显著统计学意义($P > 0.05$),说明病例与对照两组具有良好的可比性(表 1)。

2. 对各自变量进行单因素分析:对各危险因素与肺结核的关系进行单因素分析,经 χ^2 检验,家族史、健身活动、蔬菜摄入量、居住面积、籍贯等因素在两组中的分布差异无显著统计学意义($P > 0.05$),

吸烟状况与卡介苗接种史在病例组和对照组中的分布差异有显著统计学意义(OR 值分别为2.853和0.420),吸烟是危险因素,而接种卡介苗是肺结核发病的保护因素(表2)。

表1 肺结核病例组与对照组基线调查情况

| 变 量 | 病例数 | 人数* | 对照人数 | 人数* | P 值 |
|--------|-----|-----|------|-----|-------|
| 文化程度 | | | | | 0.276 |
| 大专以上 | 22 | 76 | 36 | 161 | |
| 中专/高中 | 29 | 76 | 71 | 161 | |
| 初中 | 25 | 76 | 54 | 161 | |
| 婚姻状况 | | | | | 0.645 |
| 已婚 | 45 | 74 | 108 | 165 | |
| 未婚 | 28 | 74 | 56 | 165 | |
| 丧偶或离婚 | 1 | 74 | 1 | 165 | |
| 年龄组(岁) | | | | | 0.113 |
| 10~ | 16 | 75 | 36 | 171 | |
| 20~ | 39 | 75 | 98 | 171 | |
| 31~ | 11 | 75 | 17 | 171 | |
| 41~ | 9 | 75 | 14 | 171 | |
| 50~60 | 3 | 75 | 6 | 171 | |
| 籍贯 | | | | | 0.058 |
| 东北 | 4 | 73 | 9 | 170 | |
| 华北 | 23 | 73 | 40 | 170 | |
| 华东 | 9 | 73 | 28 | 170 | |
| 西北 | 11 | 73 | 40 | 170 | |
| 西南 | 12 | 73 | 10 | 170 | |
| 华南 | 14 | 73 | 43 | 170 | |

* 回答该项问题的总人数

表2 各环境因素与肺结核关系的单因素分析结果

| 变 量 | 病例数 | 人数* | 对照人数 | 人数* | P 值 |
|-----------------------|-----|-----|------|-----|-------|
| 吸烟状况 | | | | | 0.001 |
| 吸 | 52 | 76 | 93 | 162 | |
| 否 | 14 | 76 | 69 | 162 | |
| 卡痕 | | | | | 0.004 |
| 有 | 26 | 63 | 92 | 147 | |
| 无 | 37 | 63 | 55 | 147 | |
| 家族史 | | | | | 0.161 |
| 有 | 7 | 72 | 6 | 129 | |
| 无 | 65 | 72 | 123 | 129 | |
| 健身活动 | | | | | 0.248 |
| 极少参加 | 2 | 71 | 37 | 149 | |
| 每周1~2次 | 32 | 71 | 89 | 149 | |
| 每周3次以上 | 32 | 71 | 14 | 149 | |
| 每天参加 | 5 | 71 | 9 | 149 | |
| 蔬菜摄入 | | | | | 0.664 |
| 每天有 | 45 | 73 | 91 | 157 | |
| 经常有 | 24 | 73 | 60 | 157 | |
| 很少有 | 4 | 73 | 6 | 157 | |
| 居住面积(m ²) | | | | | 0.117 |
| <20 | 10 | 60 | 20 | 117 | |
| 21~40 | 25 | 60 | 58 | 117 | |
| 40~80 | 18 | 60 | 29 | 117 | |
| >80 | 7 | 60 | 10 | 117 | |

* 同表1

3. VDR 各基因型与肺结核关系的单因素分析:

VDR 各基因型在病例和对照组中的分布差异具有显著统计学意义($P < 0.05$),病例组中 ff 基因型的

频率(17.1%)显著高于对照组中频率(6.4%), $OR = 3.668$,95%CI:1.483~9.071(表3)。

表3 VDR 各基因型与肺结核的单因素非条件 logistic 回归分析结果

| 基因型 | 病例数 (%) | 对照人数 (%) | OR 值(95% CI) | P 值 |
|--------|----------|----------|--------------------|-------|
| VDR-FF | 29(38.2) | 9(52.7) | 1.000 | 0.005 |
| VDR-Ff | 34(44.7) | 7(40.9) | 1.057(0.839~2.708) | 0.053 |
| VDR-ff | 13(17.1) | 1(6.4) | 3.668(1.483~9.071) | 0.017 |

注:括号内为基因型频率

4. VDR 各基因型与肺结核关系的多因素分析:以是否发病作为因变量,VDR 各基因型为自变量,吸烟状况与卡介苗接种史为协变量,进行多因素 logistic 回归分析,结果显示调整了两个因素后,VDR-ff 基因型仍与肺结核发病有关,调整 $OR = 3.036$,95%CI:1.117~8.253(表4)。

表4 VDR 基因型与肺结核的多因素非条件 logistic 回归分析结果

| 变 量 | OR 值(95% CI) | P 值 |
|--------|--------------------|-------|
| 卡 痕 | 0.433(0.232~0.816) | 0.010 |
| 吸烟状况 | 2.347(1.160~4.749) | 0.018 |
| VDR-FF | 1.000 | 0.142 |
| VDR-Ff | 2.670(0.984~7.247) | 0.054 |
| VDR-ff | 3.036(1.117~8.253) | 0.030 |

讨 论

据统计,全世界有1/3的人感染了结核杆菌,其中只有1/10的感染者发展为临床患者。结核病的发病受许多因素影响,除各种遗传的易感基因外,HIV 感染、免疫抑制治疗、营养不良、吸烟以及接种卡介苗等外界环境因素均影响到感染者的临床表现。本研究中为了考察 VDR 基因是否与肺结核发病相关联,必须尽可能将外部混杂因素的影响调整到最低,为此在试验设计以及统计学分析过程中采取了如下措施:①已有研究表明 X 染色体上可能存在着与肺结核发病密切相关的等位基因,所以将研究对象限制为男性,以排除性别这个混杂因素的影响;②在对研究对象进行的问卷调查中包括一些结核病的危险因素,如生活饮食习惯、家族史、疾病暴露史、疫苗接种史等;③统计学分析中,在单因素分析的基础上进行多因素 logistic 回归分析,进一步调整混杂因素影响。

在排除了可能存在的混杂因素后,经多因素 logistic 回归分析发现,VDR 基因中 C/T 多态性位点

处的 ff 基因型与肺结核发病有显著性关联,可能是结核的易感基因型。这与牛津大学学者在伦敦进行的病例对照研究得出的结论是一致的^[3],但 VDR-FF、VDR-Ff 与 VDR-ff 的三种基因型在两种对照人群中的分布经统计学检验差异有显著性(64%、34%、2% vs 52.6%、40.9%、6.4%),说明 VDR 基因多态性在一定程度上存在人种间的差异。我国是一个人口丰富的多民族国家,可以利用这一优势在不同民族间开展类似研究。

与病例对照研究结论相反,Bellamy 等^[7]对患者进行全基因组扫描却未在 VDR 基因中发现结核病的相关基因。分析两者差异的原因可能在于:①结核病在遗传上属于典型的多基因作用疾病,与其他结核病易感基因相比,VDR 基因的微效作用太小无法在全基因组扫描中检测出;②VDR 基因多态性在不同种族间差异造成;③VDR 基因可能与别的易感基因存在连锁不平衡而造成的假关联。VDR 基因在肺结核发病中所起的真正作用及其与环境、其他

易感基因间的交互作用还需进一步研究确定。

参 考 文 献

- 1 Singh SP, Mehra NK, Dingley HB, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLA-DR types. *J Infect Dis*, 1983, 148:676-681.
- 2 刘忠泉,宋长兴,胡秀龄,等. HLA-DR.DQ 基因与骨关节结核的易感性研究. *中国防痨杂志* 2000 22:130-132.
- 3 Wilkinson RJ, Liewelyn M, Toossi Z, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 2000, 355: 618-621.
- 4 Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al. Variation in the NRAMPI gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med*, 1998, 338:640-644.
- 5 Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India. *Tuber Lung Dis*, 1999, 74:221-227.
- 6 Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12:915-921.
- 7 Bellamy R, Beyers N, Mead KP, et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *PANS*, 2000, 97:8005-8009.

(收稿日期 2002-07-30)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

逆转录聚合酶链反应在轮状病毒肠炎诊断中的应用研究

童美琴 陈俭 陈黎勤 赵正言

1. 材料与方法:150 份粪便标本于 1999 年 11 月至 2000 年 2 月取自本院住院的急性腹泻患儿。150 例患儿年龄为 40 天龄~2 岁,病程 1~14 天。收集每例腹泻患儿的新鲜粪便标本 2 份,1 份立即进行乳胶凝集试验,1 份置于 -20℃ 冰箱待行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测。RT-PCR 参照 Taniguchi 等^[1]的方法抽提 RNA 并做 HRV RT-PCR 反应,引物由上海生工合成。DNA 聚合酶由美国 Promega 公司生产。扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果并照相。乳胶凝集试验以英国 Microgen Bioproduct Ltd 公司的 Rotascreen 试剂测定。具体操作按试剂盒说明书要求进行。统计学处理采用 χ^2 检验。

2. 结果:150 份粪便标本,RT-PCR 方法检出 HRV RNA 87 份,检出率 58.0%。乳胶凝集试验检测轮状病毒抗原阳性 53 份,检出率 35.3%。两者检出率差异有显著性($\chi^2 = 15.01$, $P < 0.001$)。病程 > 4 天的患儿粪便标本有 47 份,RT-PCR 方法检出 HRV RNA 29 份,检出率 61.7%。乳胶凝集试验检测轮状病毒抗原阳性 3 份,检出率 6.4%。两者检出率差异有显著性($\chi^2 = 51.94$, $P < 0.001$)。病程 ≤ 4 天的

患儿粪便标本有 103 份,RT-PCR 方法检出 HRV RNA 58 份,检出率 56.3%。乳胶凝集试验检测轮状病毒抗原阳性 50 份,检出率 48.5%。两者检出率差异无显著性($\chi^2 = 1.26$, $P > 0.05$)。

3. 结论:从粪便标本中检出轮状病毒是确诊轮状病毒感染的主要方法。乳胶凝集试验通过抗 HRV 抗原抗体包被的乳胶颗粒与粪便中的 HRV 抗原发生抗原抗体反应,具有简单、快速、敏感等优点,是早期诊断轮状病毒肠炎病原的较实用的方法之一。但在病程后期粪便病毒排出量少时,乳胶凝集试验的 HRV 检出率就大大低于 RT-PCR 方法。RT-PCR 所需要的浓度明显低(1 000 倍)于免疫分析及电镜检测,即使在病程后期(最长病程达 12 天)粪便病毒排出量极少时,HRV 的检出率仍较高,且 PCR 扩增的 DNA 稳定。因此 RT-PCR 较以上方法更灵敏,需要的标本很少,能及早检测出病毒,且检测持续时间长。

参 考 文 献

- 1 Taniguchi K, Wakasugi F, Pongsuwanna Y, et al. Identifications of human and bovine rotavirus serotypes by polymerases chain reaction. *Epidemiol Infection*, 1992, 109:303-312.

(收稿日期 2002-07-30)

(本文编辑:尹廉)