

与麻风病相关的人体易感基因多态性及研究进展

翁小满 王福生

麻风病是由细胞内寄生的麻风分支杆菌引起的慢性传染病。现认为除了环境因素之外,麻风病的发病和临床结局主要取决于机体免疫反应能力及个体的遗传易感性。国内外已经对细菌本身和宿主免疫反应等方面开展了较多的研究,但对宿主遗传易感性方面的研究刚开始。早已观察到下列现象与宿主的遗传易感性有密切的关系。如:大多数感染麻风菌的人并非患病;麻风患者亲属的发病率高;同一地区不同种族人群的患病率不等;家庭分离被证实,即子代患病并非是随机的,在患病子代中,麻风两级(LL、TT)分布也并非是随机的,患者不可能因环境因素从一极转变为另一极,如从TT-LL或LL-TT等。在印度对患有麻风病的35对孪生子调查,发现在23对同卵双生子中,多数患者患同型别的麻风(17/19),而在12对异卵双生子中,患麻风病少,仅两对,而且型别各异^[1]。这提示麻风病具有遗传易感性。换言之,这种差异可能在较大程度上,由宿主遗传因素决定的,但相关的机理至今不完全清楚。近年来,麻风病免疫遗传学已从组织相容性抗原(HLA)与疾病相关性研究,发展至多学科的、采用全基因组扫描及基因多态性分析^[2-4]。虽目前未发现有对麻风病特异性基因,但发现有对麻风病菌有抵抗/易感性的、与调控免疫反应相关的易感基因,如天然抗性的巨噬细胞蛋白1(natural resistant associated macrophage protein 1, NRAMP1)基因^[5]、肿瘤坏死因子(TNF)启动子的多态位点2(TNF2)^[6]、干扰素- γ 受体(IFNGR)基因^[7]、10P13等^[8]。上述基因可能单独或同时发挥作用,致麻风病的临床表现为多样性。此外由于人类种族的遗传背景不同,有可能在一个种族或人群中表现为易感基因,但在另一种族或人群中则可能是抗性基因。以下就与麻风病易感性相关的基因及研究状况分别概述如下。

1. 人类 NRAMP1 基因:目前在结核病和麻风病易感性研究中,有关 NRAMP1 基因研究最多。但是在不同地区的研究,却往往得出了完全不同的结果^[9-11]。无论结核病或麻风病,宿主的天然抵抗力与巨噬细胞功能有关。对小鼠 1 号染色体 Bcg(Lsh/Ity)基因的研究显示,该基因控制细胞内分支杆菌,包括结核菌、鼠麻风菌在小鼠体内的增殖。该基因有两个等位基因型与抵御和易感相关,分别命名 Bagr 和 Bags,后命名为 NRAMP1 基因。与人类同源的 NRAMP1 位于人的第 2 号染色体长臂(p)35。人类 NRAMP1 基因全

长 14 kb (13 500 bp), cDNA 长度为 -2 kb。至少有 15 个外显子,编码 550 个氨基酸,具有 10~12 假定的转膜功能区的膜蛋白。

该基因在人、鼠(人类 NRAMP1, 小鼠 NRAMP1)之间有很高的保守性,在一级核苷酸上有 92% 的同源性,推导的氨基酸序列有 89% 的相似。因发现小鼠 NRAMP1 基因单个核苷酸的改变影响分支杆菌生长。因此推测,与人类同源的这个基因多态性可能与分支杆菌感染的易感性有关^[12, 13]。该基因编码巨噬细胞吞噬体膜蛋白,具有巨噬细胞吞噬溶酶体传递功能,参与一氧化氮(NO)代谢。该蛋白介入巨噬细胞活化后的信号传递,并能增强胞内的杀菌作用。但是,这个基因所控制的、与杀菌活性相关的特异性产物并未得到证实。

(1) NRAMP1 基因多态性:Liu 等^[14]对 80 人的 NRAMP1 克隆发现,该基因内有 9 个序列变异位点及基因附近有四个微卫星标记物。其中,四个序列变异位点在编码区,两个为错义突变,预测可导致氨基酸的改变;两个为碱基置换产生了无义突变。有三个序列变异位点在内含子。作者根据各变异位点,选择相应的限制性内切酶,采用限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析等位基因型。此外,在基因启动子区内有(GT)_n微卫星。此外,根据(GT)_n短重复的情况不同,即 t(gt)_n ac(gt)_n ggcag(g)_n 重复数目不同,现已发现有六种等位基因^[15]。1 个微卫星分布在 3'UTR。采用微卫星多态标记技术可检测。Buu 等^[16]的研究显示有 11 个多态位点,其中 9 个位点与 Liu 等^[14]的研究相同,但发现在第 2 外显子有一变异位点(136 del 9)。在克隆了 NRAMP1 的 3'UTR 中约 700 bp 的片段后,证实该片段内含有 Alu 成分。在 3'UTR 的 Alu 后,有一个微卫星,即(CAAA)_n。位于 NRAMP1 附近的 TNP1 基因,有一酶切位点。另 3 个具有高度多态性的 D-segment 标记物,即 D2S104, D2S173, D2S1471, Able 等在进行多态性位点分析中,将这四个标记物命名为 NRAMP1 基因外单倍型^[17]。而将 6 个等位基因(allelic),即 274C/G, 469+14G/C, 823C/T, 1465-85G/A, D543N, 以及 199(CAAA)_n 组成的多态性位点,命名为基因内单倍体^[5]。有学者发现 NRAMP1 5'端启动子有与 IFN- γ 的可诱导的启动子相关区域^[16]。因发现 UTRs 内的多态性与疾病相关有意义,认为分析该基因这些位点,对分析巨噬细胞介导对分支菌疾病的易感性有用处。

(2) 麻风病高发家系 NRAMP1 基因检测:Able 等^[5]对居住在越南 20 户麻风病高发家系(16 户当地越南人和 4 户中

作者单位:100050 北京热带医学研究所(翁小满);解放军第三〇二医院传染病研究所(王福生)

国人)中的 168 人,进行了 NRAMP1 多态位点检测。由于麻风病为非单基因、即受多基因控制,他们采用受累同胞配对分析和 LOD 连锁分析技术分析了 NRAMP1 与麻风病易感性的关系,显示 NRAMP1 单倍体分离型符合孟德尔遗传方式。该研究将 NRAMP1 基因的单倍体定义为 2 种。仅分析基因内单倍体,父母的杂合度为 38%。然而,父母的基因外单倍体却获得 100% 杂合度。分析患病子代 NRAMP1 单倍体分离。在 20 户高发家系中,观察到 NRAMP1 基因多态性位点显著地、非随机分离到患病的子代中。并提出 NRAMP1 是控制麻风病易感性基因中的一个基因^[5]。

Roger^[9]等对法国 7 个玻立利西亚人的麻风病高发家系、84 人进行研究。除选择对 NRAMP1 基因的 9 个多态位点的分析(SSCP-PCR 法)外,还对其他 3 个多态微卫星标记物(D2S104, D2S173, D2S1471)进行了分型。该研究发现,与白人、亚洲人相比,玻立利西亚人 NRAMP1 基因变异位点杂合度很低。对三种不同 penetrate 的遗传模式,也采用 LOD 连锁分析和受累同胞配对分析,并没有发现 NRAMP1 与麻风病易感的证据。

(3) NRAMP1 与麻风菌素皮肤试验:麻风菌素皮肤试验是机体对皮内注射加热灭活麻风菌所致的迟发性超敏反应,其病理表现为结核样肉芽肿。它可测定机体对麻风菌的细胞免疫反应能力,并对判断机体对麻风菌是易感还是抵抗有较高的预测值。早在 20 世纪 60 年代,在麻风病和非麻风病家系中,根据麻风菌素反应,即注射部位出现的红斑、结节、溃疡的直径大小定量分析,发现父母与子女的麻风菌素反应显著相关^[17]。提示常染色体基因对参与的、麻风菌素阴性为隐性表现型的这一推测。为此,有学者研究麻风菌素与 NRAMP1 多态性连锁的关系。Alcaiss 等^[10]采用(2 sib-pair) ASP 等方法,并对健康和受累同胞分别分析。在麻风菌素反应 >10 mm 和 <3 mm(直径)组中,等位基因共享比例高,提示麻风菌素反应与 NRAMP1 相关。并认为两者的连锁与麻风病病型是独立的^[16]。然而, Natagima 等^[11]对 NRAMP1 基因三个位点(D543N, 1729+55 del 4, 274C/T)进行检测,采用 ASP 法分析,却得出了与 Alcaiss 完全不同的结果,即 NRAMP1 基因与麻风菌素晚期反应无关联。有学者认为, NRAMP1 基因在获得性抗分支菌感染的免疫反应中起调节作用,但对其调节机理并不完全清楚。因为 NRAMP1 等位基因与结核菌素阳性反应相关,提示 NRAMP1 基因影响 Th1/Th2 细胞的分化^[10]。

2. 免疫应答相关基因:

(1) HLA: HLA 系统的主要作用是控制细胞介导的免疫反应。有人认为 HLA-DR, 即 HLA-II 类抗原, 介入麻风菌再次免疫反应的发展。80 年代后, HLA 与麻风病相关的研究很多。虽结果不完全一致, 但多数发现, 麻风病与 HLA-DR2 相关。一般认为, HLA-DR 同种异型(isotype), 如 HLA-DR3 与保护性免疫的结核样型麻风病相关, 而 HLA-DQ1 与 LL 麻风相关^[5, 18]。为此认为 HLA 等位基因调节免疫反应, 可能

决定患者的发展型别。但是, 父母的 HLA 单倍性随机分离到患病和非患病子代中, 又提示麻风病的易感性可能受非 HLA 基因控制。

(2) TNF: 对免疫反应基因的研究, 加深了对 NRAMP1 基因功能的了解。TNF 基因位于 6 号染色体的 HLA-III 区内, 该基因启动子内, 转录起始部位上游-308 发生单个碱基置换(G/A), 被命名为 TNF2。现已发现肿瘤坏死因子(TNF)基因调控区的单核苷酸多态性(SNP)与许多疾病的易感性相关, 如重型的疟疾、利司曼及麻风病。TNF2 可导致 TNF- α 水平增高。在免疫调控中, TNF- α 对促进炎症反应起重要作用。在抗分支菌的免疫反应中, 虽 TNF- α 除具有保护作用, 但它参与分支杆菌介入的肉芽肿形成和组织损伤。Sarno 等^[19]研究显示, 尽管发生麻风反应的患者, 其 TNF2 和 TNF1 的频率无差异, 但 TNF2 的患者中, 其杂合子发生麻风反应的频率比纯合子高。Roy 等^[6]已发现瘤型麻风 TNF2 基因频率增高, 而结核样型麻风却不增高, 认为该基因多态性决定患麻风病的型别。作者分析了 TNF2 和 HLA II 抗原的等位基因, 发现 HLA-DR2 与 TNF2 连锁不平衡。也就是说, TNF2, HLA-II 与麻风病相关似乎是独立的。Moreas 等^[20]发现, 具有 TNF2 等位基因的人中, 82.2% 麻风菌素反应 >6 mm, 而无 TNF2 者, 麻风菌素反应 >6 mm, 仅为 54.3%。而且, 在具有抵抗力 TT/BT 患者中, 具有 TNF2 等位基因的频率增高^[20]。有研究证实小鼠 NRAMP1 抵抗性基因型与高水平的 TNF- α 产生相关, 提示 TNF- α 在抗分支菌的免疫反应中具有关键的作用^[19]。

(3) 干扰素- γ (IFN- γ): IFN- γ 在分支菌感染的免疫反应起关键作用。Newport 等^[21]在马尔他的一个多种分支菌感染的家系中发现白细胞缺乏 IFN- γ 受体。这是因为 IFN- γ 受体 1 基因的 395 核苷酸位置上发生了点突变, 从而产生截短型的无功能的蛋白。此后, 在播散性 BCG 感染的儿童中也发现了 IFN- γ 受体的不同突变。因而 IFN- γ 产生缺陷可导致分支菌及非典型性分支菌感染的扩散。位于干扰素- γ 受体(IFNGR)基因 395 核苷酸位置处的一个点突变引入一个终止子而突变, 导致细胞膜表面受体缺失, 以及巨噬细胞在与 IFN- γ 反应时, 对 TNF- γ 的正向调节功能性缺失^[7]。有学者认为干扰素- γ 受体(IFNGR)基因可限制细菌生长, 胞内致病菌, 如结核、麻风、利司曼在巨噬细胞内的生长。有学者对 TNF- α , IFN- γ 与麻风病进行了连锁研究。如前所述, 因发现 NRAMP1 5' 端启动子有与 IFN- γ 的可诱导的启动子相关区域^[12]。通过 NRAMP1 5' 端启动子区域的研究, 可探讨该基因与控制 IFN- γ 产生的关系。

(4) VDR 活化的维生素 D 基因: 活化的维生素 D 不仅调节钙和骨的代谢, 而且通过维生素 D 受体(VDR)与单个核细胞、巨噬细胞和活化的淋巴细胞结合, 产生免疫调节作用。因而认为 VDR 是调节免疫反应的基因。VDR 3' 端 352 处有一个 Tag I 的酶切位点, 可致 C \rightarrow T 的单个碱基变化。这个位点与其附近的 BsmI 位点多态性具有很强的连锁不平

衡。Roy 等对麻风患者和正常人 VDR 基因与 NRAMP1 基因的变异位点同时检测,分析 VDR3' Tag I 的酶切位点多态性各基因型在 TT、LL 型麻风患者与正常人的频率。与正常人相比,TT 患者的 tt 型频率低,LL 患者 TT 型频率高;杂合性 Tt 在两型中的频率均低于正常人,显示 VDR 与麻风病相关,但发现 NRAMP1 与麻风病不相关,并认为 VDR 多态性可能通过对宿主免疫反应的类型和强度来影响对疾病的易感性^[22]。

3. 多态性检测及易感性分析:识别和鉴定易感基因,以及认识基因多态性是如何影响传染病的易感性差异等问题,尤为重要。一般可根据基因的功能和作用机理,基因编码蛋白质的类型、功能是否影响疾病发病和病理机理。在已知鼠与人类相关的保守基因,利用在先天/获得性保护性免疫反应中具有重要作用的免疫学知识,分析与疾病易感有关的区域,采用高发家系验证疾病易感与基因组内分布不均的约 300~400 小卫星基因,进行总基因组扫描^[4]。

研究与遗传表型相关的 DNA 序列变异是遗传学研究的主题之一。单核苷酸多态性(SNP)即属基因多态性表现,其中最少数等位基因在群体中的频率不少于 1%。人类基因序列的变异大多数是单核苷酸的突变。SNP 的检测技术主要包括 PCR、PCR-RFLP、PCR-SSP(PCR specific primers)、PCR-SSC(sequence-specific oligonucleotide),以及等位基因特异性 PCR(allele specific PCR、AS-PCR)、等位基因特异性寡核苷酸探针杂交、直接测序等。

4. 问题与展望:麻风病易感性或免疫遗传学的研究,即使对同一基因的分析得出不一致的结果。随着人类基因组学的发展,该领域将吸引更多的实验科学家和临床医生共同开展深入的研究,特别是实验设计将更为合理、将克服以往有关数据的相互矛盾可能与不精确的和/或分辨率低的 HLA 分型方法、基因之间的连锁不平衡、人群研究中种族的差异、样本量小和人群分组设计等多因素。下一步工作不仅要证实麻风病的发病率和严重性与某种蛋白和 DNA 多态性之间单一的关系,更要揭示人体基因巨大的多样性、复杂性,从而科学地、有效地指导麻风病的防治。特别是麻风病由环境和遗传因素共同作用,可能受多种基因控制。通过发现新的易感和抗性基因,希望从分子遗传学研究揭示麻风病发生、发展、预后的相关机制;并从免疫调控或药理学方面,对靶分子或靶途径进行干预。以便进行有效的治疗和预防,以彻底地控制麻风病。

参 考 文 献

- 1 Ali PM, Ramanujam K. Leprosy in Twins. *Int J Lepr*, 1966, 34: 404-407.
- 2 Blackwell JM. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multigase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Int J Parasit*, 1998, 28: 21-28.

- 3 Hill AVS. The Immunogenetics of Human Infection Diseases. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 593-617.
- 4 Lagrange PH, Abel L. The genetic susceptibility to leprosy in human. *Acta Leprol*, 1996, 10: 11-27.
- 5 Able L, Sanchez FO, Oberti J, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis*, 1998, 177: 133-145.
- 6 Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor, CGN et al. Tumor Necrosis Factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Intern Dermat*, 1997, 176: 530-532.
- 7 Doffinger R, Altare F, Casanova JL. Genetic heterogeneity of Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. *Microbes and infection* 2000, 2: 1553-1557.
- 8 Siddiqui MR, meisner S, Tosh K, et al. A major susceptibility locus for leprosy in india maps to chromosome 10p13. *Nature Genetics*, 2001, 27: 439-441.
- 9 Roger M, Levee G, Chanteau S, et al. No evidence for linkage between leprosy susceptibility and the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene in French Polynesia. *Int J Lepr*, 1997, 65: 197-202.
- 10 Alcaiss A, Sanchez FO, Thuc NV, et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Misuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *J Infect Dis*, 2000, 181: 302-308.
- 11 Natagima A, Opromolla DVA, Ura S, et al. No evidence of Linkage between Misuda Reaction and the NRAMP1 locus. *Int J Lepr*, 2001, 69: 99-103.
- 12 Skamene E, Schurr ES, Gros P. INFECTION GENOMICS: Nrampl as a major Determinant of Natural Resistance to Intracellular Infections. *Annu Rev Med*, 1998, 49: 275-287.
- 13 Cellier BM, Govoni G, Vidal S, et al. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, Chromosomal Mapping, Genomic Organization, and Tissue-specific Expression. *J Exp Med*, 1994, 180: 1741-1752.
- 14 Liu J, Fujiwara TM, Buu NT, et al. Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance associated macrophage protein gene. *Am J Hum Genet*, 1995, 56: 845-853.
- 15 Graham AM, Dollinger MM, Howie SEM, et al. Identification of novel alleles at a polymorphic microsatellite repeat region in the human NRAMP1 gene promoter: analysis of allele frequencies in primary biliary cirrhosis. *J Med Genet*, 2000, 37: 150-152.
- 16 Buu N, Sanchez F, Schurr E, et al. The Bcg Host-Resistance gene. *Clin Infect Dis*, 2000, 31 (suppl 3): s81-s85.
- 17 Feitosa M, Krieger H, Borecki L, et al. Genetic Epidemiology of the Mitsuda Reaction in leprosy. *Hum Hered*, 1996, 46: 32-35.
- 18 Rani R, Fernandez Vina MA, Zaheer SA, et al. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from North Indian. *Tissue Antigens*, 1993, 42: 133-137.
- 19 Sarno, EN, Santos AR, Jardim MR, et al. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF α . *Lepr Rev*, 2000, 71 (suppl): s154-s160.
- 20 Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, et al. Tumor Necrosis Factor promoter polymorphism TNF2 is associated with a strong delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy reaction. *Immunogenetics* 2001, 53: 45-47.
- 21 Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. Mutation in the interferon-gamma-receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*, 1996, 335: 1941-1949.
- 22 Roy S, Frodsham A, Saha B, et al. Association of Vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Inter Dermatol*, 1999, 179: 187-190.

(收稿日期 2002-09-27)

(本文编辑:尹廉)