

## · 实验研究 ·

## NRAMP1 基因 INT4 和 3'UTR 位点多态性与肺结核易感性的研究

安雅臣 冯福民 袁聚祥 纪春梅 王育华 郭梅 邓小娟 高宝霞 王东 刘茜

**【摘要】** 目的 探讨人类自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 1(NRAMP1)基因 INT4 和 3'UTR 位点多态性与中国北方汉族成人肺结核发病的关系。方法 采用 1:1 配对的病例对照研究设计,用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析方法检测 NRAMP1 基因中 INT4 和 3'UTR 两个多态性位点,对与肺结核相关的危险因素进行问卷调查,进行单因素和多因素条件 logistic 回归分析,同时对基因型与肺结核病变的性质和程度进行研究。结果 对 124 对研究对象进行了 INT4 和 3'UTR 两个多态性位点的基因分型,3'UTR TGTG +/del 基因型病例组频率显著高于对照组,粗 OR 值(95% CI)为 2.923(1.557~5.487)。病例组和对照组 INT4 各基因型频率比较差异均无统计学意义。对 17 个环境危险因素进行了单因素分析,在多因素分析中调整卡痕、体重指数、人均居住面积、家族史 4 个因素后,3'UTR TGTG +/del 基因型仍与肺结核显著相关,调整 OR 值(95% CI)为 2.955(1.369~6.381)。在 INT4 不同基因型中,病例组和对照组肺结核病变性质差异具有统计学意义( $\chi^2 = 9.634, P < 0.05$ )。结论 NRAMP1 基因 3'UTR 位点多态性可能是中国北方汉族成人肺结核的易感因素,而 INT4 多态性可能与肺结核的病变性质有关系。

**【关键词】** 肺结核;自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 1 基因;基因多态性;病例对照研究

**Study on the association of INT4 and 3'UTR polymorphism of natural-resistance-associated macrophage protein 1 gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis** AN Ya-chen\*, FENG Fu-min, YUAN Ju-xiang, JI Chun-mei, WANG Yu-hua, GUO Mei, DENG Xiao-juan, GAO Bao-xia, WANG Dong, LIU Qian. \*Epidemiological Department of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China  
Corresponding author: FENG Fu-min

**【Abstract】 Objective** To investigate the association between natural-resistance-associated macrophage protein 1(NRAMP1) gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis(TB) in Han nationality from Northern part of China. **Methods** A 1:1 matched case-control study was adopted. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique were used to type the two NRAMP1 polymorphisms: INT4 and 3'UTR. Information on environmental-related risk factors and pathological changes of tuberculosis was collected using a pre-tested standard questionnaire. Univariate and multivariate conditional logistic analyses were conducted using SPSS for window software. **Results** A sample consisting 124 pairs of cases and controls was studied. Univariate analysis demonstrated that the 3'UTR TGTG +/del genotype occurred more frequently in the cases than in the controls, with crude OR (95% CI) being 2.923(1.557-5.487). No significant association was observed between TB and INT4 polymorphism. In multivariate analysis, associations of TB and 3'UTR TGTG +/del genotype remained, after adjusting for scar of bacillus Calmette-Guérin vaccine, marriage status, body mass index and exposure history. Adjusted OR (95% CI) was 2.955(1.369-6.381). Again, no significant association between INT4 polymorphism and TB was found. Among different INT4 genotypes, the pathological characters of pulmonary tuberculosis were also found different( $\chi^2 = 9.634, P < 0.05$ ). **Conclusion** Polymorphism of 3'UTR locus in NRAMP1 gene might affect their susceptibility to TB in Han nationality living in the northern part of China, and polymorphism of INT4 might affect the pathological characters of tuberculosis.

**【Key words】** Pulmonary tuberculosis; Natural-resistance-associated macrophage protein 1 gene; Polymorphism; Case-control study

作者单位:063000 唐山,华北煤炭医学院流行病学教研室(安雅臣、冯福民、袁聚祥、郭梅、邓小娟、高宝霞、王东、刘茜);唐山市协和医院呼吸内科(纪春梅);唐山市第四医院一病区(王育华)

通讯作者:冯福民, Email:fm\_feng@sina.com.cn

人类自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 1 (natural-resistance-associated macrophage protein 1, NRAMP1) 基因是主要的易感基因之一, 其多态现象可能影响对肺结核的易感性<sup>[1]</sup>。本文采用配对病例对照研究和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法研究中国北方汉族成年一般人群 NRAMP1 基因 INT4 和 3' UTR 两个位点的多态现象同肺结核的关系, 以进一步了解遗传因素和环境因素影响肺结核发病的作用机制, 为中国结核病防治提供新的思路。

### 对象与方法

1. 研究对象: 病例组为 2004 年 3-6 月上旬唐山市结核病医院收治的汉族成人 (年龄 ≥ 18 岁) 肺结核患者, 按照 1998 年修订的《中国结核病分类法》诊断。排除肺炎、肺癌、尘肺、糖尿病、艾滋病病毒感染、长期使用肾上腺皮质激素及其他免疫抑制剂的患者。通过健康查体的方式选择与病例同民族、同性别、年龄相差不超过 3 岁、相同居住地 (城市或农村)、且经统一结核菌素试验 (PPD) 确认为有结核分支杆菌感染的健康者为对照组, 排除与研究对象有血缘关系及现在或既往有结核病史者。采用 1:1 匹配的方法, 与每名病例匹配的对照至少有 2 名, 在其中随机选取一名与病例结为对子。

#### 2. 方法:

(1) 环境相关危险因素调查: 设计统一的专用调查表, 内容包括研究对象出生年月、职业、文化程度、民族、婚姻状况、呼吸系统疾病史及其他重大疾病史、烟酒嗜好、卫生习惯、饮食生活习惯、家庭经济状况、住房状况、家族患结核情况、结核病接触史、卡介苗接种史及其他系统疾病史和服药史。

(2) 基因组 DNA 的获取: 每个研究对象晨起空腹抽取静脉血 5 ml, 2% EDTA 抗凝。采用低渗溶血法分离白细胞, 常规酚抽提法提取基因组 DNA。

(3) PCR 扩增: INT4 位点引物: 5'-CCTGCC TCCTCACAGCTTCT-3' 和 5'- TGTGCTATCAGT TGAGCCTC-3'; 3' UTR 位点引物设计参考文献 [1]: 5'-GACTCTCCCAATTCATGGT-3' 和 5'-AACTGTCCACTCTATCCTG-3', 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。PCR 反应体系: 反应的总体积为 25 μl, Taq DNA 聚合酶 1 U, 10× PCR buffer 2.5 μl, 上下游引物各 0.4 μmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, DNA 模板 1.0 μl, 无菌双蒸水 14.5 μl。

PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环。扩增产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

(4) 限制性内切核酸酶酶切分析: INT4 酶切体系为 PCR 产物 8 μl, Apa I 限制性内切核酸酶 5 U, 10× buffer 2 μl, 无菌双蒸水 9 μl; 3' UTR 酶切体系为 PCR 产物 6 μl, Fok I 限制性内切核酸酶 5 U, 10× buffer 2 μl, 0.1% BSA 2 μl, 无菌双蒸水 9 μl; 酶切体积为 20 μl, 37℃ 水浴 4 h。分别取 INT4 和 3' UTR 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

(5) 统计学分析: 采用 Excel 2003 建立数据库, SPSS 12.0 进行统计分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用条件 logistic 回归模型进行单因素分析和多因素逐步回归分析。计算各因素 OR 值及其 95% CI, 来估计相对危险度 (RR)。显著性检验采用最大似然比检验方法。

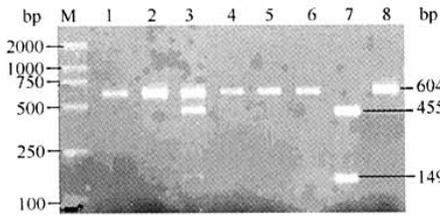
### 结 果

1. 病例组和对照组一般情况比较: 在收治的 124 例汉族成人肺结核住院患者中, 男性 83 例 (66.9%), 女性 41 例 (33.1%); 农村患者 75 例 (60.5%), 城市患者 49 例 (39.5%)。男性患者平均年龄 (47.0 ± 15.8) 岁, 女性平均年龄 (37.4 ± 14.7) 岁。健康体检现场共采集血样 518 份, 其中 PPD 试验确认有结核分支杆菌感染的健康者 361 人。随机抽出 124 人作为对照, 其中男性平均年龄 (44.9 ± 15.2) 岁, 女性平均年龄 (42.3 ± 12.1) 岁, 经配对  $t$  检验 ( $t = 0.843$  和  $1.671$ ,  $P > 0.05$ ) 与病例组年龄差异均无统计学意义。

2. PCR-RFLP 结果: INT4 扩增产物经酶切后产生三种基因型: INT4G/G (604 bp), INT4G/C (604 bp、455 bp 与 149 bp), INT4C/C (455 bp 与 149 bp); 3' UTR 扩增产物经酶切后也产生三种基因型: 3' UTR +/+ (240 bp), 3' UTR +/del (240 bp、211 bp 与 33 bp), 3' UTR del/del (211 bp 与 33 bp) (图 1、2)。

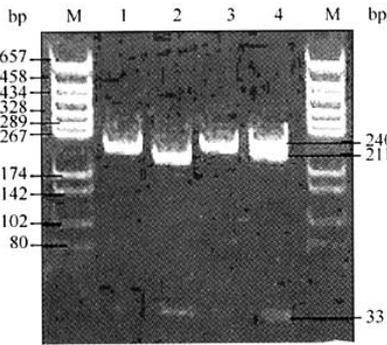
3. 条件 logistic 回归分析: 研究因素的赋值方式见表 1。

(1) 单因素分析: 单因素分析结果见表 2, 环境危险因素中卡痕、体重指数 (BMI)、卡介苗接种史、人均居住面积、接触史和家族史等因素有统计学意义。有卡痕、卡介苗接种史、BMI 大、人均居住面积



1,8:NRAMP1 基因 INT4 位点 PCR 扩增产物; 2~7: Apa I 限制性内切核酸酶切产物(3 为 INT4 G/C 基因型, 7 为 INT4 C/C 基因型, 2,4~6 为 INT4 G/G 基因型)

图1 NRAMP1 基因 INT4 位点 PCR-RFLP 产物琼脂糖凝胶电泳结果



1:NRAMP1 基因 3'UTR 位点 PCR 扩增产物; 2~4:Fok I 限制性内切核酸酶切产物(2 为 3'UTR TGTG del/del 基因型, 3 为 3'UTR +/+ 基因型, 4 为 3'UTR del +/- 基因型)

图2 NRAMP1 基因 3'UTR 位点 PCR-RFLP 产物 12% PAGE 电泳结果

表1 logistic 回归模型中各因素的赋值方式

| 研究变量名称          | 等级  | 赋值                               | 方法   |
|-----------------|-----|----------------------------------|------|
| 卡痕              | 0~1 | 0=有, 1=无                         |      |
| 家族史             | 0~1 | 0=无, 1=有                         |      |
| 婚姻状况            | 0~1 | 0=已婚, 1=未婚                       |      |
| 文化程度            | 0~3 | 0=文盲, 1=小学, 2=中学, 3=大专及以上        |      |
| 劳动强度            | 0~2 | 0=极轻和轻体力劳动, 1=中体力劳动, 2=重体力劳动     |      |
| 吸烟状况            | 0~1 | 0=不吸, 1=吸                        |      |
| 吸烟指数            |     |                                  | 连续变量 |
| 饮酒状况            | 0~1 | 0=不饮, 1=饮                        |      |
| 健身活动            | 0~2 | 0=每周≤1次, 1=每周2~3次, 2=每周>3次       |      |
| 卡介苗接种史          | 0~1 | 0=有, 1=无                         |      |
| 既往病史及服药史        | 0~1 | 0=无, 1=有                         |      |
| 接触史             | 0~1 | 0=无, 1=有                         |      |
| BMI             |     |                                  | 连续变量 |
| 蔬菜摄入情况          | 0~2 | 0=每周≤1次, 1=每周2~3次, 2=每周>3次       |      |
| 肉类摄入情况          | 0~2 | 0=每周≤1次, 1=每周2~3次, 2=每周>3次       |      |
| 人均居住面积          |     |                                  | 连续变量 |
| 人均家庭月收入         |     |                                  | 连续变量 |
| INT4 G/C 基因型    | 0~1 | 赋值(G/G=0, 0; G/C=0, 1; C/C=1, 0) |      |
| 3'UTR +/del 基因型 | 0~1 | 赋值(C/C=0, 0; C/T=0, 1; T/T=1, 0) |      |

大为肺结核发病的保护因素;有接触史和家族史为肺结核发病的危险因素。病例组 INT4G/C 基因型频率为 30.645% (38/124), 对照组为 23.387% (29/124), 差异无统计学意义。病例组 3'UTR +/del 基因型频率为 41.129% (51/124), 对照组为 20.161% (25/124), 差异有统计学意义。

表2 单因素条件 logistic 回归分析

| 因素        | OR 值(95% CI)        | P 值   |
|-----------|---------------------|-------|
| 无卡痕       | 2.343(1.408~3.899)  | 0.001 |
| 有接触史      | 1.831(1.062~3.158)  | 0.030 |
| 有家族史      | 3.096(1.539~6.230)  | 0.002 |
| 无卡介苗接种史   | 2.055(1.222~3.454)  | 0.007 |
| 人均居住面积    | 0.972(0.954~0.990)  | 0.003 |
| BMI       | 0.829(0.765~0.898)  | 0.003 |
| INT4 G/G  | 1.000               |       |
| G/C       | 1.600(0.915~2.797)  | 0.099 |
| C/C       | 2.000(0.181~22.056) | 0.571 |
| 3'UTR +/+ | 1.000               |       |
| +/del     | 2.923(1.557~5.487)  | 0.001 |
| del/del   | 1.500(0.251~8.977)  | 0.657 |

(2)多因素逐步回归分析:多因素逐步条件 logistic 回归分析结果见表 3。结果表明无卡痕、有家族史、3'UTR +/del 基因型为肺结核发病的危险因素;BMI 大、人均居住面积大为肺结核发病的保护性因素。

(3)基因型与肺结核病变的性质和程度的关系:结果见表 4、5。研究发现,在 INT4 不同基因型中,代表疾病进展表现的渗出性病灶和干酪性病灶同代表机体免疫力占优势的增殖性病灶差异有统计学意义( $\chi^2 = 9.634, P < 0.05$ )。但同病变的轻重程度没有相关性。3'UTR 位点多态性同肺结核患者病变特点之间未发现有明显的相关性。

表3 多因素条件 logistic 回归分析

| 模型    | 变量                 | 调整 OR 值(95% CI)     | P 值   |
|-------|--------------------|---------------------|-------|
| INT4  | INT4 G/G           | 1.000               |       |
|       | INT4 G/C           | 1.507(0.720~3.154)  | 0.276 |
|       | INT4 C/C           | 2.228(0.152~32.749) | 0.559 |
| 3'UTR | 无卡痕                | 3.293(1.393~7.785)  | 0.007 |
|       | BMI                | 0.854(0.780~0.934)  | 0.001 |
|       | 人均居住面积             | 0.967(0.943~0.991)  | 0.008 |
|       | 家族史                | 2.917(1.308~6.504)  | 0.009 |
|       | 3'UTR +/+          | 1.000               |       |
|       | 3'UTR +/del        | 2.955(1.369~6.381)  | 0.006 |
|       | 3'UTR del/del      | 1.447(0.154~13.630) | 0.747 |
|       | 无卡痕                | 3.776(1.532~9.307)  | 0.004 |
|       | BMI                | 0.845(0.768~0.931)  | 0.001 |
|       | 人均居住面积             | 0.968(0.944~0.994)  | 0.014 |
| 家族史   | 2.640(1.169~5.962) | 0.020               |       |

表4 基因型与肺结核病变性质的单因素分析

| 多态性位点 | 渗出性干酪性病灶为主 | 增殖性病灶为主  | $\chi^2$ 值 | P 值   |
|-------|------------|----------|------------|-------|
| INT4  |            |          |            |       |
| 野生型   | 24(28.6)   | 60(71.4) | 9.634      | 0.002 |
| 突变型   | 23(57.5)   | 17(42.5) |            |       |
| 3'UTR |            |          |            |       |
| 野生型   | 31(42.5)   | 42(57.5) | 1.570      | 0.143 |
| 突变型   | 16(31.4)   | 35(68.6) |            |       |

注:括号内数字为构成比(%);括号外数据为例数

表5 基因型与肺结核病变程度的关系

| 多态性位点     | 肺结核病变程度* |    |    | $\chi^2$ 值 | P 值   |
|-----------|----------|----|----|------------|-------|
|           | 轻度       | 中度 | 重度 |            |       |
| INT4 野生型  | 52       | 13 | 19 | 0.086      | 0.958 |
| INT4 突变型  | 24       | 6  | 10 |            |       |
| 3'UTR 野生型 | 48       | 9  | 16 | 1.779      | 0.411 |
| 3'UTR 突变型 | 28       | 10 | 13 |            |       |

\* NTA 分类法:轻度为无空洞,病变范围相加不超过两个肺野;中度为有空洞,病变范围相加不超过两个肺野;重度为有空洞,病变范围相加超过两个肺野

### 讨 论

全球约有 1/3 的人感染结核杆菌,但其中不到 1/10 发展为结核病,这些患者中除少部分有明显的危险因素如艾滋病病毒感染、糖尿病和激素治疗等外,其余大部分是基因与环境因素共同作用的结果。大量遗传学证据表明,肺结核的发生是环境因素(除遗传因素以外的所有后天因素,包括个体生活方式)与机体遗传因素共同作用的结果。以前对肺结核与环境因素和易感基因关系的流行病学研究通常都是分别进行的,因此无法考虑两者在肺结核发病中的独立作用,也无法研究两者间的交互作用。本研究将环境因素与易感基因共同纳入病例对照研究,克服了以上缺点。国内刘玮等<sup>[2]</sup>也进行了类似的研究,但其研究对象为单纯部队人员、男性、年龄段为(28±13)岁、对照组为部队一般健康人群,而我们此次研究的研究对象为唐山市结核病院连续收治的所有成人肺结核患者,对照组选择肺结核的抵抗人群(虽然感染但未发病者),因此具有更好的人群代表性,能够很好地解释绝大多数受感染成人个体不发病现象,有利于分析宿主基因与肺结核病易感性的关系。我们的研究中,病例组 INT4G/C 基因型频率为 30.645% (38/124),对照组为 23.387% (29/124);病例组 3'UTR +/del 基因型频率为 41.129% (51/124),对照组为 20.161% (25/124)。与其他研究结

果不同<sup>[2]</sup>,其原因可能是病例对照研究设计造成的,如不同的病例对照来源、纳入标准、两组的可比性以及不同的基因-环境间的交互作用等。

在影响宿主防御机制的遗传学因素中,作为一种自然抵抗因素的 NRAMP1 占有重要的地位。NRAMP1 位于静息巨噬细胞晚期胞内腔内,在巨噬细胞吞噬病原体后,转移到吞噬体膜<sup>[3]</sup>。进一步的研究表明 NRAMP1 可能通过改变吞噬溶酶体内环境限制胞内病原体的繁殖<sup>[4]</sup>。本研究发现调整了卡痕、体重指数、家族史、人均居住面积四个环境因素后,多态性位点 3'UTR TGTG+/del 基因型在病例中的分布频率显著高于对照,可能是肺结核的易感基因型,尽管这种相关不排除来源于 3'UTR 与临近的另一易感基因的连锁不平衡,但 Bellamy 等<sup>[1]</sup>认为由于 NRAMP1 基因是建立在以鼠的 NRAMP1 基因基础上筛选的候选基因,所以这种可能性不大。本次研究中还发现,在 INT4 不同基因型中,代表疾病进展表现的渗出性病灶和干酪性病灶同代表机体免疫力占优势的增殖性病灶差异有统计学意义,这表明 INT4 位点的不同基因型可能与疾病的进展有关系。

随着人类基因组计划的完成和后基因组时代的到来,越来越多的肺结核易感基因被发现,而在不同人群中开展的基因组流行病学研究,将使这些易感基因对疾病发生所起的作用及基因与基因间、基因与环境间的交互作用逐步阐明,有助于肺结核高危人群的预测,为优选干预措施(医学干预、行为干预或环境干预)提供科学依据,为制定适宜的预防策略打下基础。

### 参 考 文 献

- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al. Variation in the human NRAMP1 gene and human tuberculosis in an African population. *N Engl J Med*, 1998, 338:640-644.
- 刘玮, 张翠英, 田磊, 等. 自然抗性相关巨噬细胞蛋白 1 基因多态性与肺结核易感性的研究. *中华预防医学杂志*, 2003, 37: 408-411.
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, et al. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp 1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med*, 1997, 185: 717-730.
- Supek F, Supekova L, Nelson H, et al. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:5105-5110.

(收稿日期:2005-02-05)

(本文编辑:孙强正)