

东亚人群 *NRAMP1* 基因多态性与结核易感性的 Meta 分析

李洪涛 张天托 黄勤欢 吕波 黄瑾

【摘要】 目的 应用 Meta 分析探讨东亚人群 *NRAMP1* 基因 3 个多态性位点与结核易感性的关系。方法 应用主题词和关键词“*NRAMP1*”、“*SLC11A1*”、“tuberculosis”和“结核”,检索 1995 年 1 月至 2005 年 5 月 Medline、Ovid 及 CBM disc 数据库发表的有关文献,并辅以文献追溯的方法。结果 结核病例组和对照组 3' UTR、D543N 和 INT4 位点的多态现象同最常见纯合子基因型频率比值比 (OR) 的合并 OR 值分别为 1.68 (95% CI: 1.31~2.16, $P < 0.001$); 1.78 (95% CI: 1.38~2.30, $P < 0.001$); 1.56 (95% CI: 0.72~3.35, $P = 0.26$)。Egger 线性回归分析提示 3' UTR 和 D543N 基因型相关文献没有发表偏倚, INT4 基因型相关文献有一定的发表偏倚。结论 东亚人群 *NRAMP1* 基因 3' UTR 和 D543N 多态性位点与结核易感性相关; INT4 多态性位点与结核易感性无统计学意义。

【关键词】 结核; 多态现象(遗传学); 基因, *NRAMP1*; Meta 分析; 人种群

Meta-analysis on *NRAMP1* gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility in East-Asia population

LI Hong-tao*, ZHANG Tian-tuo, HUANG Qin-huan, LV Bo, HUANG Jin. *Department of Respiratory Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Zhuhai 519000, China

Corresponding author: HUANG Jin, Email: huangjin1960@163.com

【Abstract】 Objective To provide a quantitative summary in estimating the association between polymorphisms of 3 loci in *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in East-Asia population by means of meta-analysis. **Methods** We searched databases (MEDLINE, OVID and CBM disc) from January 1995 to May 2005 using “*NRAMP1*” or “*SLC11A1*”, in combination with “tuberculosis”, also performed a manual search of citations from relevant original studies and literature. For each study involved, information was collected concerning the characteristics of the subjects, such as mean age of cases and the size of study. These characteristics were used to evaluate the sources of variation. Summary ORs and corresponding 95% CI were estimated by fixed effects (Mantel-Haenszel) or random effects (DerSimonian and Laird) model. To check for publication bias, a funnel plot, using Egger's linear regression method, was constructed. Cumulative meta-analysis was performed to evaluate whether the summary OR for studies with the polymorphisms of the 3 loci in the *NRAMP1* gene was changing along with the accumulation of more data. Chi-square goodness of fit was used to test deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. **Results** Eight publications, with the number of cases and controls of 1067 and 1084 respectively, were identified and all genotype frequencies were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. The summary ORs for studies with polymorphisms of 3' UTR, D543N and INT4 loci of the *NRAMP1* gene among the East-Asia population were 1.68 (95% CI: 1.31-2.16, $P < 0.001$), 1.78 (95% CI: 1.38-2.30, $P < 0.001$), 1.56 (95% CI: 0.72-3.35, $P = 0.26$), respectively when compared with their corresponding common homozygotes. Publication bias was not found in the studies with the three loci, except for INT4 locus, by Egger linear regression method. The cumulative summary effects ORs were 1.85 ($P = 0.02$) in 2000, 1.35 ($P = 0.12$) in 2002, 1.64 ($P = 0.001$) in 2003, and 1.68 ($P < 0.001$) in 2004 for 3' UTR locus, 1.88 ($P = 0.001$) in 2000, 1.65 ($P = 0.001$) in 2002, 1.70 ($P < 0.001$) in 2003, 1.76 ($P < 0.001$) in 2004, and 1.78 ($P < 0.001$) in 2005 for D543N locus, and 0.88 ($P = 0.70$) in 2002, 2.50 ($P = 0.41$) in 2003, 1.52 ($P = 0.42$) in 2004 and 1.56 ($P = 0.26$) in 2005 for INT4 loci. **Conclusion** Polymorphisms at 3' UTR and D543N loci had statistically significant association between the *NRAMP1* variants and susceptibility to tuberculosis in the East-Asia descendants, and variant in the INT4 locus failed to show statistically significant association in the East-Asia population.

【Key words】 Tuberculosis; Polymorphism (Genetics); *NRAMP1* gene; Meta-analysis; Ethnic Groups

NRAMP1 基因 (natural-resistance-associated macrophage protein1, NRAMP1), 又称 SLC11A1 基因, 是基于鼠同类基因上筛选的在结核病发生、发展中发挥一定作用的候选基因。NRAMP1 蛋白重要功能之一是通过吞噬体膜泵出二价阳离子 NRAMP1 Fe^{+2} , 而 Fe^{+2} 含量影响结核分枝杆菌在吞噬体内生长^[1]。NRAMP1 基因变异可能影响该蛋白功能。NRAMP1 基因存在多态性位点, 不同基因型可能影响宿主对结核病的易感性。现已有该基因多态性与结核易感性的多篇报道, 但结论迥异。可能与样本量小、选择偏倚或种族差异有关。Meta 分析可以克服上述部分缺点。笔者晚近一篇荟萃分析表明 NRAMP1 基因部分位点多态性与结核易感性相关^[2]。但该研究主要针对整个人群, 有关东亚人群的荟萃分析尚未见报道, 且此后又检索到该人群的研究文献^[3]。本文应用 Meta 分析方法分析东亚人群的有关研究, 以探讨本地区 NRAMP1 基因多态性与结核易感性的关系。

资料与方法

1. 研究基因位点: 选取 NRAMP1 基因 3 个常被研究的基因位点, 即 3'UTR (位于 NRAMP1 基因第 15 外显子最后一个密码子下游第 55 个核苷酸处 TGTG 缺失)、D543N (15 外显子第 543 位密码子的天冬氨酸变为天冬酰胺的非保守碱基替换)、INT4 (第 4 内含子单个核苷酸改变)。

2. 检索方法: 应用主题词和关键词“NRAMP1”、“SLC11A1”、“tuberculosis”和“结核”, 检索 1995 年 1 月至 2005 年 5 月 Medline、Ovid 及 CBM disc 数据库有关文献, 并辅以文献追溯方法。

3. 数据分析及文献纳入和排除条件: 纳入标准: ①以论文形式发表的病例对照研究; ②研究对象为东亚人群; ③原始资料完整; ④对照组基因分布符合 Hardy-Weinberg (H-W) 遗传平衡定律。排除以家族为基础的研究。对原始数据有重复的论文, 仅纳入最近文献。整理每篇纳入文献的研究特点: 出版年限、受试人群、研究对象平均年龄、结核类型、研究对象人数、结核病诊断方法以及对照人群来源等。部分研究特点用于分析考查不同研究间的异质性及其来源。

4. 统计学分析: 假定显性遗传方式, 将少见纯合子基因型频率与杂合子基因型频率相联合, 与常见基因型频率比值比 (OR) 作为效应合并指标。

STATA 统计软件 (StataCorp LP, USA) 计算合并 OR 值及 95% 可信区间 (CI)。累积 Meta 分析 (cumulative meta-analysis) 考查合并 OR 值随研究文献增多而变化的情况。应用 Egger 线性回归方法, 将标准效应量与效应量方差的倒数进行线性回归分析, 检测截距与零有无显著性差异决定漏斗图是否对称。以截距及其 95% CI 衡量出版偏倚。通过分析研究特点来探讨异质性来源。应用 χ^2 拟合优度检验进行对照组 H-W 遗传平衡检验。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

结 果

共检出 18 篇有关文献, 其中 9 篇因研究对象不属于东亚人群^[1,4-11], 或者对照组基因型分布不符合 H-W 遗传平衡定律而排除^[6]。同一作者有两篇有关中国人群的病例对照研究^[12,13], 仅纳入其最近一篇文献^[12]。另一篇文献分别包括 HIV 阳性及 HIV 阴性两组人群的病例对照研究^[14], 将其作为两篇单独研究纳入。入选文献对照组基因型分布经假设检验均符合 H-W 遗传平衡定律。最终共有 8 篇文献纳入, 结核病例组和对照组分别为 1067 例和 1084 例。结核病例数 > 100 例者 5 篇^[3,12,15-17], < 100 例 3 篇^[14,18,19]。入选文献一般资料及基因型频率见表 1 和表 2。入选患者多为活动性肺结核。肺外结核 (结核性胸膜炎、骨结核、结核性脑膜炎) 约占 7.3%。结核病诊断标准: 5 篇以痰涂片和/或培养阳性作为诊断标准^[3,14,16,17,19]。若上述标准阴性时, 2 篇依据临床表现^[15,16], X 线及 PPD 阳性者也纳入。1 篇胸膜活检阳性确诊结核性胸膜炎^[19]。

1. 3'UTR 多态性与结核易感性: 纳入 6 篇文献^[12,14-16,18,19], 结核病例组和对照组研究例数分别为 660 和 791 例。经异质性检验 ($\chi^2 = 9.07, P = 0.17$), 选用固定效应模型, 合并 OR 值为 1.68 (95% CI: 1.31~2.16, $P < 0.001$) (图 1)。应用随机效应模型或去掉权重最大的研究进行敏感性分析^[12], 合并 OR 值结论类似。Egger 方法线性回归分析没有提示出版偏倚 ($Y = -0.40, 95\% CI: -4.00, 3.21$)。异质性检验提示有异质性趋势 ($P = 0.17$), 结核病患者平均年龄与异质性相关 ($P = 0.02$), 而结核病患者病例数与异质性未达到统计学意义 ($P = 0.21$)。3'UTR 累积合并 OR 值为: 2000 年 1.85 ($P = 0.02$), 2002 年 1.35 ($P = 0.12$), 2003 年 1.64 ($P = 0.001$), 2004 年为 1.68 ($P < 0.001$) (图 2)。

表1 有关 NRAMP1 基因多态性纳入研究的一般特点

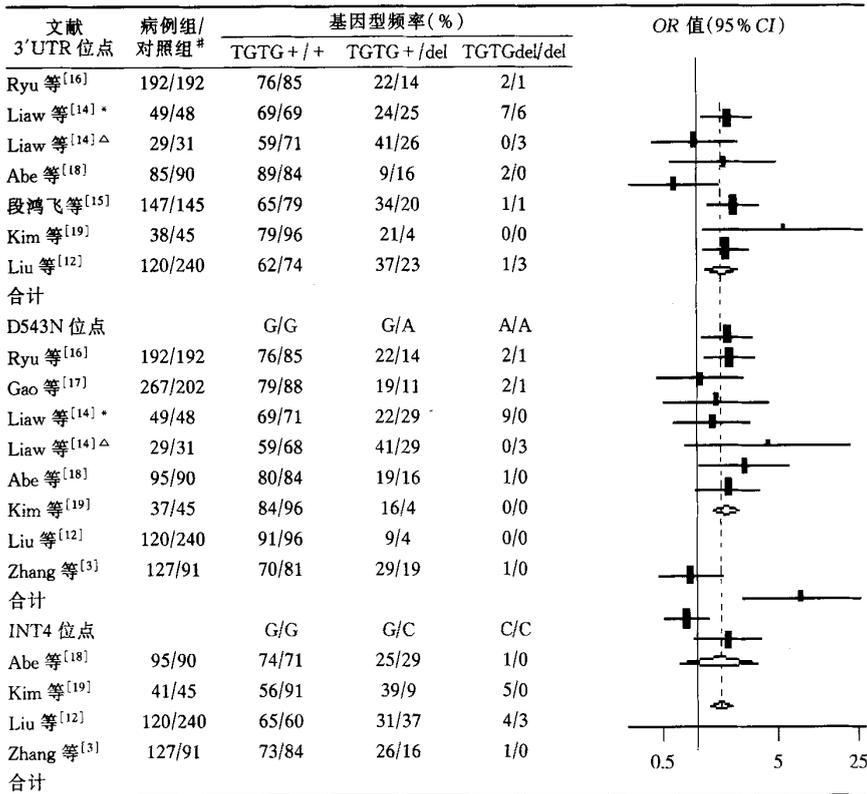
文献	出版时间(岁)	研究人群	男性患者百分比(%)	平均年龄(岁)		对照人群来源
				结核病患者	对照组	
Gao 等 ^[17]	2000	日本	86.1	57.8 ± 15.8	45.4 ± 16.8	某医药公司职员
Ryu 等 ^[16]	2000	韩国	NA	NA	NA	无结核史的健康成人
Abe 等 ^[18]	2002	日本	73.7	58.0	61.4	未患结核的患者
Liaw 等 ^[14]	2002	中国台湾	75.1	56.0	49.0	常规体检者
段鸿飞等 ^[15]	2003	中国大陆	52.4	44.0	48.0	有结核分枝杆菌接触史的汉族正常人
Kim 等 ^[19]	2003	韩国	67.9	39.0 ± 2.73	30.4 ± 1.45	健康成人
Liu 等 ^[12]	2004	中国大陆	100.0	27.3 ± 9.2	27.7 ± 12.7	男性军人
Zhang 等 ^[3]	2005	中国大陆	70.9	52.3 ± 13.1	NA	献血者

注: NA = 未提及

表2 纳入研究的基因型频率(结核组/对照组)

文献	3'UTR			D543N			INT4		
	TGTG+/+	TGTG+/-	TGTG-/-	G/G	G/A	A/A	G/G	G/C	C/C
Ryu 等 ^[16]	146/164	43/27	3/1	146/164	43/27	3/1	NA	NA	NA
Liaw 等 ^{[14]*}	34/33	12/12	3/3	34/34	11/14	4/0	NA	NA	NA
Liaw 等 ^{[14]#}	17/22	12/8	0/1	17/21	12/9	0/1	NA	NA	NA
Abe 等 ^[18]	76/76	8/14	1/0	76/76	18/14	1/0	70/64	24/26	1/0
段鸿飞等 ^[15]	95/115	50/29	2/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kim 等 ^[19]	30/43	8/2	0/0	31/43	6/2	0/0	23/41	16/4	2/0
Liu 等 ^[12]	74/178	44/56	2/6	109/231	11/9	0/0	78/144	37/89	5/7
Gao 等 ^[17]	NA	NA	NA	210/177	51/23	6/2	NA	NA	NA
Zhang 等 ^[3]	NA	NA	NA	89/74	37/17	1/0	93/76	33/15	1/0

注: NA = 未提及; * 排除 HIV 阳性患者; # 为 HIV 阳性患者

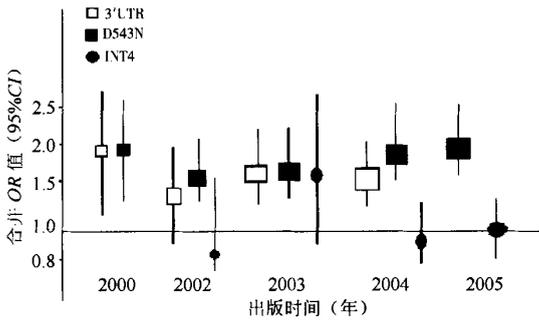


2. D543N 基因多态性与结核易感性: 入选 7 篇文献^[3,12,14,16-19]。结核病患者及对照组例数分别为 916 和 939 例。固定效应模型(异质性检验 $\chi^2 = 3.69, P = 0.82$) 计算合并 OR 值为 1.78 (95% CI: 1.38~2.30, $P < 0.001$) (图 1)。应用随机效应模型或去掉权重最大的研究进行敏感性分析^[17], 合并 OR 值结论类似。Egger 线性回归分析方法没有提示出版偏倚 ($Y = 0.26, 95\% CI: -1.87 \sim 2.38$)。结核病患者病例数 ($P = 0.11$) 和结核病患者平均年龄 ($P = 0.07$) 与异质性无统计学意义。D543N 累积合并 OR 值为:

OR 值为上述各位点少见纯合子基因型频率与杂合子基因型频率相联合, 与常见基因型频率的比值比;

* 排除 HIV 阳性患者; △ 为 HIV 阳性患者; # 为正常人

图1 NRAMP1 基因多态性位点(3'UTR、D543N 和 INT4)与结核易感性



病例组/对照组累积人数

3'UTR	192/192	355/361	540/551	660/791	
D543N	459/394	632/563	669/608	789/848	916/939
INT4		95/90	136/135	256/375	383/466

图2 NRAMP1 基因多态性位点累积 Meta 分析

2000 年 1.88 ($P = 0.001$), 2002 年 1.65 ($P = 0.001$), 2003 年 1.70 ($P < 0.001$), 2004 年为 1.76 ($P < 0.001$), 2005 年为 1.78 ($P < 0.001$) (图 2)。

3. INT4 基因多态性与结核易感性: 4 篇文章入选^[3,12,18,19]。结核病例组及对照组例数分别为 383 和 466 例。随机性效应模型 (异质性检验 $\chi^2 = 15.04$, $P = 0.002$) 计算合并 OR 值为 1.56 (95% CI: 0.72~3.35, $P = 0.26$) (图 1), 差异无统计学意义。应用固定效应模型或去掉权重最大的研究进行敏感性分析^[12], 合并 OR 值结论类似。结核病患者平均年龄与异质性相关 ($P = 0.002$), 结核病患者病例数与异质性差异无统计学意义 ($P = 0.42$)。Egger 线性回归分析提示有一定出版偏倚 ($Y = 5.90$, 95% CI: -1.48~13.28)。INT4 累积合并 OR 值为: 2002 年 0.88 ($P = 0.70$), 2003 年 2.50 ($P = 0.41$), 2004 年为 1.52 ($P = 0.42$), 2005 年为 1.56 ($P = 0.26$) (图 2)。

讨 论

自 Bellamy 等^[1] 1998 年首次在西非人群报道 NRAMP1 基因多态性与结核易感性相关以来, 已有多篇结论迥异的研究。冈比亚^[1]、日本^[17]、中国大陆^[12,15] 及韩国^[16,19] 人群研究发现 3'UTR、D543N 位点基因变异与结核易感性相关, 而中国台湾^[14]、印度^[11]、马拉维^[8]、柬埔寨^[6] 却没能发现上述联系。此种差异可能与不同人群基因差异所致。笔者的一篇文章亚组分析亚非欧人群, 发现不同人群间 NRAMP1 基因多态性与结核的关系存在差异^[2], 也提示这种差异与不同人群基因背景有关。本文将以

东亚人群作为受试对象的研究进行荟萃分析, 均为黄种人, 可部分排除人种差异的混杂因素。Meta 分析提示东亚人群 NRAMP1 基因 3'UTR 和 D543N 位点多态性与结核易感性有统计学意义。合并 OR 值分别为 1.68、1.78, 相当于相对危险度 (RR) 分别为 1.48、1.62^[20], 即具有 3'UTR 和 D543N 位点基因多态性的人群比具有上述位点常见纯合子人群患结核病的风险分别上升 48%、62%。选用不同效应模型或去除权重最大的文献进行敏感性分析, 合并 OR 值结论类似, 说明本研究合并结果稳定性好, 基本可靠。累积 Meta 分析也提示随着研究数据增加, 合并 OR 值仍有统计学意义。Egger 线性回归方法没有提示两位点相关文献存在出版偏倚。然而, 易感基因多态性与疾病易感性有统计学意义时注意分析三种可能: ①等位基因通过改变氨基酸序列或 mRNA 稳定性等影响基因功能, 进而影响发病的危险性; ②等位基因与实际引起疾病的基因位点连锁不平衡; ③假阳性 (I 型错误)^[21]。本文 Meta 分析显示对照组人群 3'UTR 和 D543N 位点均符合 H-W 遗传平衡定律, 可减少 I 型错误, 因而不可能是假阳性结果。但多项研究发现 3'UTR 和 D543N 连锁不平衡。有研究发现亚洲^[6,11,16-18]、非洲^[1,10] 及欧洲人群^[4,9] 3'UTR del 等位基因和 D543N A 等位基因, 或者 5'(CA)_n non-Allele3 等位基因和 INT4 C 等位基因存在连锁不平衡。因此, 分析 NRAMP1 基因多态性与结核易感性的关系时需考虑多方面因素。INT4 位点在东亚人群异质性差异有统计学意义, 随机性效应模型分析发现与结核易感性无统计学意义。

我们探讨了上述位点相关文献异质性来源。D543N 和 3'UTR 相关文章异质性检验差异无统计学意义, 没有发现结核病患者平均年龄和研究病例数与两位点相关文章异质性相关 (除结核病患者平均年龄在 3'UTR 相关文章与异质性有统计学意义)。INT4 相关文章存在异质性, 结核病患者平均年龄与其异质性有关。需要指出, 由于 Meta 分析不能获得纳入文献每个患者的数据, 我们仅应用结核病患者平均年龄作为评估异质性的指标之一。另外, 虽然同为东亚人群, 但不同文献间等位基因频率存在差异。3'UTR del 等位基因在中国对照组人群等位基因频率为 14.2%^[12], 而在韩国对照组人群等位基因频率为 2.2%^[19]。其他存在异质性的因素尚有基因-环境相互作用, 以及病例组、对照组性别并

非完全相匹配等。

本文 Meta 分析不足之处在于纳入文献的病例组与对照人群标准有所不同:多数研究为肺结核,尚有些研究包括肺外结核^[15,19]及 HIV 阳性患者^[14];有些研究以健康人或献血者作为对照组^[3,12,15-17,19],也有研究以患结核病以外的其他病患者为对照人群^[18],而且样本量偏少。由于仅纳入发表的文献,可能会遗漏未发表的“散在文献”,如学位论文等。既然多种因素影响候选基因的病例对照研究,故重复验证十分重要。有必要进行该地区的大样本病例对照研究及家庭为基础的研究,以进一步证实 *NRAMP1* 基因多态性与结核易感性的关系。为阐明易感基因在结核发病中的作用,优选干预措施,制定预防策略提供科学依据。

(感谢胡晓萍对本文部分图表制作的帮助)

参 考 文 献

- 1 Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med*, 1998, 338: 640-644.
- 2 Li HT, Zhang TT, Zhou YQ, et al. *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006, 10: 3-12.
- 3 Zhang W, Shao L, Weng X, et al. Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (*NRAMP1*) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 2005, 40: 1232-1236.
- 4 Soborg C, Andersen AB, Madsen HO, et al. Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *J Infect Dis*, 2002, 186: 517-521.
- 5 Puzyrev VP, Freidin MB, Rudko AA, et al. Polymorphisms of tuberculosis susceptibility candidate genes in the Slavonic population of Siberia: a pilot study. *Mol Biol*, 2002, 36: 634-636.
- 6 Delgado JC, Baena A, Thim S, et al. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, 2002, 186: 1463-1468.
- 7 Awomoyi AA, Marchant A, Howson JM, et al. Interleukin-10, polymorphism in *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*, 2002, 186: 1808-1814.
- 8 Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, et al. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the karonga district of northern

- Malawi. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 71: 341-349.
- 9 Ma X, Dou S, Wright JA, et al. 5' dinucleotide repeat polymorphism of *NRAMP1* and susceptibility to tuberculosis among Caucasian patients in Houston, Texas. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2002, 6: 818-823.
- 10 Hoal EG, Lewis LA, Jamieson S, et al. *SLC11A1* (*NRAMP1*) but not *SLC11A2* (*NRAMP2*) polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis in a high incidence community in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8: 1464-1471.
- 11 Selvaraj P, Chandra G, Kurian SM, et al. *NRAMP1* gene polymorphism in pulmonary and spinal tuberculosis. *Curr Sci*, 2002, 82: 451-454.
- 12 Liu W, Cao WC, Zhang CY, et al. *VDR* and *NRAMP1* gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8: 428-434.
- 13 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.
- 14 Liaw YS, Tsai-Wu JJ, Wu CH, et al. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility of tuberculosis in Taiwanese. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2002, 6: 454-460.
- 15 段鸿飞, 周新华, 马珂, 等. *NRAMP1* 基因 3' UTR 多态现象与汉族结核病易感性研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26: 286-289.
- 16 Ryu S, Park YK, Bai GH, et al. 3' UTR polymorphisms in the *NRAMP1* gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000, 4: 577-580.
- 17 Gao PS, Fujishima S, Mao XQ, et al. Genetic variants of *NRAMP1* and active tuberculosis in Japanese populations. *Clin Genet*, 2000, 58: 74-76.
- 18 Abe T, Iinuma Y, Ando M, et al. *NRAMP1* polymorphisms, susceptibility and clinical features of tuberculosis. *J Infect*, 2003, 46: 215-220.
- 19 Kim JH, Lee SY, Lee SH, et al. *NRAMP1* genetic polymorphisms as a risk factor of tuberculous pleurisy. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7: 370-375.
- 20 Zhang J, Yu KF. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. *JAMA*, 1998, 280: 1690-1691.
- 21 Silverman EK, Palmer LJ. Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22: 645-648.

(收稿日期: 2005-10-13)

(本文编辑: 张林东)