

甘露糖结合蛋白基因多态性与肺结核发病关系的研究

冯福民 郭梅 刘茜 王东 高宝霞 孙永红 安雅臣 纪春梅

【摘要】 目的 探讨甘露糖结合蛋白(MBP)基因多态性与中国人肺结核发病的关系。方法 采用病例对照研究,收集肺结核病例 125 例和健康对照 198 名的环境因素暴露情况及静脉血,MBP 基因多态性分析采用特异引物 PCR 方法,用 SPSS 11.5 软件进行危险因素的单因素分析和多因素非条件 logistic 回归分析。结果 病例组和对照组 MBP-52、54、57 位点的等位基因突变频率分别为 8.0%、7.2%、0.4% 和 5.3%、4.3%、0.5%,按性别分层的 Mantel-Haenszel χ^2 分析两组间差异无统计学意义。单因素分析表明体重指数、婚姻状况、卡介苗接种史、卡痕、结核病接触史及家族史、体力劳动、文化程度与肺结核的发生有关。在多因素分析中调整上述危险因素后,总 MBP($OR = 2.182, 95\% CI: 1.058 \sim 4.499$)和 MBP-52 突变型等位基因型($OR = 2.574, 95\% CI: 1.028 \sim 6.446$)与肺结核发病有统计学意义。结论 总 MBP 和 MBP-52 突变型等位基因可能与肺结核发病有关。

【关键词】 结核,肺;甘露糖结合蛋白基因;病例对照研究;基因多态性

Study on mannose-binding protein gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis
FENG Fu-min, GUO Mei, LIU Qian, WANG Dong, GAO Bao-xia, SUN Yong-hong, AN Ya-chen, JI Chun-mei. North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

【Abstract】 Objective To explore the association between the genetic polymorphisms of mannose-binding protein (MBP) alleles and susceptibility to pulmonary tuberculosis. **Methods** 125 pulmonary tuberculosis cases and 198 healthy controls were collected. A case-control study was conducted. Three structural gene mutations in exon 1 of MBP gene (codon 52, codon 54 and codon 57) were studied. Polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) was carried out in the polymorphism in MBP alleles. Information on related risk factors of tuberculosis was collected, using a pre-tested questionnaire. Univariate and multivariate logistic analyses were conducted with SPSS software package.

Results The frequencies of mutant heterozygote or homozygote of MBP-52, 54, 57 were 8.0%, 7.2% and 0.4% for cases and 5.3%, 4.3%, 0.5% for controls, respectively. The distribution of mutant genotypes of MBP did not show significant difference between tuberculosis patients and control by Mantel-Haenszel χ^2 on sex. The univariate analysis demonstrated that body mass index, marital status, vaccinal vestige, bacillus of Calmette-Guerin vaccine immunization, contacted with pulmonary tuberculosis patients, familial traits were the risk factors of pulmonary tuberculosis. After adjusting those related environmental factors in the multivariate logistic analyses, the total MBP (MBP-52, MBP-54 and MBP-57) and MBP-52 heterozygote genotypes were significantly overrepresented in cases, with adjusted OR (95% CI) being 2.182 (1.058-4.499) and 2.574 (1.028-6.446). **Conclusion** Total MBP and MBP-52 mutant genotypes might be associated with the susceptibility to pulmonary tuberculosis.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary; Mannose-binding protein; Case-control study; Genetic polymorphism

甘露糖结合蛋白(mannose-binding protein, MBP)是由肝脏分泌的钙离子依赖性凝集素,具有与甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺末端结合的功能,在宿主的抗感染免疫中发挥重要的作用^[1,2]。MBP 基因第

一外显子的 52(CGT→TGT)、54(GGC→GAC)和 57(GGA→GAA)位点突变破坏其蛋白的螺旋结构,使得血浆中 MBP 浓度下降^[3]。在印度的研究发现 MBP 基因突变与肺结核的发生有关^[4],但在土耳其的一项研究却没有证实这种联系^[5],甚至有研究认为 MBP 基因突变是肺结核的保护因素^[6]。表明不同地区、不同种族的研究结论不同,国内尚未见相关

基金项目:河北省卫生厅基金资助项目(04256);河北省教育厅博士基金资助项目(B2004127)

作者单位:063000 唐山,华北煤炭医学院流行病与卫生统计学科

报道。本文旨在探讨 MBP 基因多态性是否与汉族人群肺结核的发生有关。

对象与方法

1. 研究对象:收集 2004 年 4 月至 2005 年 6 月唐山市结核病院确诊的肺结核患者 125 例为病例组,同期健康体检者 198 名为对照组。病例的纳入与排除标准:①所有病例均为新发确诊住院病例,且痰涂片阳性;②汉族,年龄 ≥ 18 岁;③肺结核诊断按 GB 15987-1995 标准,PPD 试验强阳性并具有明显结核病的临床特征;④按 WHO 推荐程序进行规范的抗结核化疗;⑤无慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺癌、糖尿病、高血压等合并症。对照的纳入和排除标准:①无结核病史;②PPD 确认为有结核分枝杆菌感染(有卡痕者 PPD 硬结反应平均直径 ≥ 10 mm,无卡痕、无卡介苗接种史者 PPD 硬结反应平均直径 5~10 mm);③汉族,年龄 ≥ 18 岁;④与纳入的病例和对照均无血缘关系;⑤无慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺癌、糖尿病、高血压等合并症。对全部研究对象进行问卷调查:包括一般情况(年龄、性别、身高、体重、婚姻状况)、经济收入、劳动强度居住环境、吸烟饮酒状况、肺结核患者接触史、卡介苗接种史、结核病患者族史、卡痕等。同时抽取 EDTA 抗凝静脉血 5 ml, 4℃ 保存备用。

2. 基因组 DNA 提取:低渗溶血法提取白细胞,以 SDS 裂解白细胞,蛋白酶 K 消化蛋白,经酚-氯仿抽提和乙醇沉淀获得基因组 DNA。

3. 聚合酶链反应(PCR):采用特异引物 PCR 方法。Taq DNA 聚合酶由大连 TaKaRa 公司提供,引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。针对每个突变位点将样品分 2 管扩增,每管 PCR 反应体系:100 ng DNA 模板,1 U Taq DNA 聚合酶,分别加入阳性质控上下游引物和一条特异引物终浓度为 5 μ mol/L, dNTP 为 200 μ mol/L, 10 \times buffer 2 μ l, 加超纯水至 20 μ l。在 Biometra PCR 仪上扩增,采用双

温循环设计,选择 2 个样品的相应 PCR 扩增片段送上海生物工程公司测序,确定目的基因位点的序列,作为优化 PCR 反应条件的基础。优化后的扩增条件为:94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 64℃ 退火和延伸 50 s, 共计 35 个循环。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,鉴定 PCR 扩增产物。其引物序列和对应的扩增片段大小见表 1。同时出现阳性质控片段和特异片段提示特异引物扩增阳性,野生型和突变型特异引物扩增均为阳性者判为杂合子,否则即为野生型或突变型纯合子。每一个突变位点抽取一份样品进行测序,以证实 PCR 反应的特异性。MBP-52 和 MBP-54 位点电泳见图 1。

4. 统计学分析:将资料整理后用 EXCEL 录入数据,统计分析软件为 SPSS 11.5。基因型分布的 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析采用拟合优度 χ^2 检验。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。将是否发病作因变量,基因型别为自变量,单因素分析中有显著意义的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。

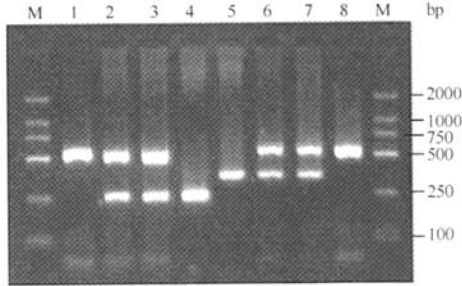
结 果

1. 年龄和性别的均衡性检验及 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验:由于随着年龄的增加,结核病的发生率呈上升趋势,而且男性和女性发生肺结核的概率不同,因此需对两组研究对象的年龄和性别进行均衡性检验。结果显示病例组和对照组的年龄和性别具有可比性。病例组年龄(43.60岁 \pm 16.61岁)和对照组(44.66岁 \pm 14.62岁)差异无统计学意义($t=0.603, P=0.547$)。病例组(男性 82 例,女性 43 例)和对照组(男性 116 人,女性 82 人)性别差异无统计学意义($\chi^2=0.207, P=0.126$)。

对病例组和对照组基因型别进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,各观察值与期望值近似, χ^2 值均 < 3.84 ,显示 Hardy-Weinberg 平衡定律

表1 PCR 扩增的引物及扩增片段大小

引物名称	5'~3'序列	片段大小(bp)	备注
上游引物 MBP5	CAGATTGTAGGACAGAGGGCATGCTC	574	阳性质控片段
下游引物 MBP3	TCTTGAACCTGGTGCCATCCCTACTG		MBP5 + MBP3
野生型特异引物 P52-5C	GGCTTCCCAGGCAAAGATGGC	351	P52-5C + MBP3
突变型特异引物 P52-5T	GGCTTCCCAGGCAAAGATGGT	351	P52-5T + MBP3
野生型特异引物 P54-3G	TCCCCCTTTTCTC(T)CCTTGGTGC	273	MBP5 + P54-3G
突变型特异引物 P54-3A	TCCCCCTTTTCTC(T)CCTTGGTGT	273	MBP5 + P54-3A
野生型特异引物 P57-3G	CACGTACCTGGTTCCCCCTTTTCTC	285	MBP5 + P57-3G
突变型特异引物 P57-3A	CACGTACCTGGTTCCCCCTTTTCTT	285	MBP5 + P57-3A



M: DL-2000 Marker; 1, 8: 阳性内参; 2: MBP-5 野生型; 3: MBP-54 突变型; 4: 指示片段 273 bp; 5: 指示片段 351 bp; 6: MBP-52 野生型; 7: MBP-52 突变型

图1 MBP-52 和 MBP-54 位点 PCR-SSP 琼脂糖凝胶(1.5%)电泳

的拟合优度均优良,说明两组人群均处于平衡状态,样本人群均具有良好的代表性,可以从基因频率来估计基因型频率。

2. 环境因素与肺结核发病的单因素分析:以体重指数[BMI = 体重(kg)/身高(m)²]分析肥胖程度与肺结核发病的关系,病例组 BMI(21.76 ± 3.50)明显低于对照组(24.08 ± 3.52),统计学检验, $t = 5.771, P = 0.0001$ 。分类资料经 χ^2 检验,吸烟、饮酒情况和城乡居住地在两组中的分布无统计学意义。婚姻、结核患者接触史、卡介苗接种史、卡痕、家族史、文化程度、职业和劳动强度在病例组和对照组的分布不同(表 2)。结核接触史和家族史是肺结核发生的危险因素;初中以上文化程度、从事重体力劳动的农民易发生肺结核;已婚、卡介苗接种史和卡痕是保护性因素。

3. MBP 等位基因突变频率比较:病例组和对照组 MBP-52、54、57 位点的突变型等位基因频率分别为 8.0% (20/250)、7.2% (18/250)、0.4% (1/250) 和 5.3% (21/396)、4.3% (17/396)、0.5% (2/396)。按性别分层后,男性病例的 MBP-52、MBP-54 和总的 MBP 突变型等位基因频率高于对照组,而女性未见差异,但是按性别分层的 Mantel-Haensez χ^2 分析差异无统计学意义。MBP-57 位点突变频率太低,未进行统计分析(表 3)。

4. MBP 等位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,MBP-52 和 MBP-54 等位基因为自变量,BMI(超重和不超重分成两组)、婚姻状况、结核病患者接触史、卡介苗接种史、卡痕、家族史、文化程度、劳动强度和职业为协变量,进行多因素 logistic 回归分析,结果显示调整了上述因素

后,除文化程度外,各环境因素仍然与肺结核发病有关,而总 MBP 和 MBP-52 突变型等位基因也与肺结核发病有关(表 4),提示各因素间存在混杂作用。

表2 肺结核发病的单因素分析

因素	病例组	对照组	χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
婚姻					
已	102	181	6.748	0.009	0.410(0.206~0.816)
未	22	16			
接触史					
有	43	42	24.527	0.0004	2.949(1.721~5.056)
无	60	143			
卡介苗接种史					
是	47	109	7.612	0.006	0.500(0.305~0.821)
否	56	65			
卡痕					
无	32	98	5.566	0.046	1.988(1.119~3.523)
有	37	57			
家族史					
有	35	14	25.825	0.0003	5.084(2.602~9.933)
无	89	181			
文化程度					
文盲	5	21	3.951	0.047	1.632(1.005~2.649)
小学	30	55			
初中	48	52			
高中	26	31			
大专及以上	15	38			
职业					
工人	35	101	21.387	0.002	0.639(0.448~0.912)
干部	36	45			
农民	54	34			
劳动强度					
轻	23	75	15.587	0.004	0.573(0.355~0.923)
中	36	52			
重	65	71			

讨 论

人 MBP 基因突变影响了肺结核患者的细胞免疫反应,与杂合子及野生型个体相比,纯合子个体的淋巴细胞对结核菌素的反应性下降^[7],血清 MBP 水平浓度很低甚至检测不到^[2],体外研究证实 MBP 可以增强巨噬细胞对结核杆菌的吞噬活性^[8]。本文在单因素分析中未发现突变型等位基因携带者发生肺结核的危险性高于野生型等位基因携带者,但在多因素分析中控制了其他因素的混杂作用后却发现总的 MBP 和 MBP-52 突变型等位基因在病例组的分布高于对照组,与多数研究报道结论一致。MBP 基因突变是人类适应环境的进化行为,属人体正常的抗感染免疫反应,因此不同地区和种族的 MBP 突变频率差异较大。例如 5 万年前从非洲撒哈拉地区迁徙到澳大利亚的土著人 MBP 基因突变频率只有 1.3%^[9],土耳其人 MBP-54 和 MBP-57 的突变频率也只有 1% 左右^[10];但南美洲和非洲的冈比亚人 MBP 基因突变频率均较高^[10,11],后者的杂合子频

表3 病例组和对照组 MBP 等位基因构成

基因位点	等位基因	男		女		χ^2 值*	P 值
		病例组	对照组	病例组	对照组		
MBP(52, 54, 57)	野生型	136	217	76	139	3.121	0.077
	突变型	28	15	10	25		
MBP-52	野生型	150	225	80	150	1.709	0.191
	突变型	14	7	6	14		
MBP-54	野生型	150	226	82	151	1.383	0.240
	突变型	14	6	4	13		
MBP-57	野生型	164	230	85	164	-	-
	突变型	0	2	1	0		

* Mantel-Haenszel χ^2 分析

表4 肺结核发病的多因素非条件 logistic 回归分析结果

因素	β	s_x	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
MBP(52, 54, 57)	0.780	0.369	4.467	0.035	2.182(1.058~4.499)
MBP-52	0.945	0.468	4.075	0.044	2.574(1.028~6.446)
MBP-54	0.693	0.442	2.458	0.117	2.001(0.841~4.761)
卡痕	0.686	0.273	6.301	0.012	1.986(1.162~3.393)
婚姻	-0.730	0.370	3.895	0.048	0.482(0.233~0.995)
文化程度	0.007	0.115	0.004	0.948	1.008(0.805~1.262)
职业	-0.375	0.127	8.783	0.003	0.687(0.536~0.881)
劳动强度	-0.410	0.166	6.075	0.014	0.664(0.479~0.920)
接种史	0.170	0.226	0.567	0.451	1.185(0.762~1.844)
接触史	0.960	0.190	25.524	0.000	2.611(1.799~3.788)
家族史	0.969	0.335	8.346	0.004	2.634(1.365~5.081)
BMI	-0.103	0.034	9.027	0.003	0.902(0.843~0.965)

率达到 31%，纯合子频率为 10%。MBP 基因突变在健康英国人中也非常多见，其杂合子和纯合子突变频率达到 22.5% 和 4.6%^[12]。本文研究结果表明，汉族人 MBP-52 和 54 位点的突变频率达到 6% 以上且明显高于 57 位点，而施虹等^[13]只发现了汉族人中存在 MBP-54 基因位点的突变，但因不属于随机抽样研究，这两个结论均不能代表汉族人的基因特征，只能反映一个侧面而已。

在 MBP 基因突变与肺结核发病的关系研究中，世界各国的结论也不尽相同，印度人和非洲裔美国人肺结核病例 MBP-54 等位基因突变频率高于对照组^[4,14]，在美国白人和西班牙裔人及土耳其人中未发现 MBP 基因突变与肺结核的相关性^[5,14]，甚至发现 MBP-57 位点突变型是肺结核的保护基因型 ($r=0.565, P=0.037$)^[10]，均与本文的研究结论不同。反映不同种族的基因型特征存在明显的差异。单因素分析中发现男性的 MBP 基因突变是肺结核的危险因素，但是按性别分层的 Mantel-Haenszel χ^2 分析却不支持这一结论。既往研究表明 X 染色体上存在着与肺结核发病相关的等位基因，但本文由于样本例数偏少，难于进行不同性别的分析，需增大样本量的后续研究证实。总之，本文首次揭示了汉

族人肺结核的发生与 MBP 基因多态性之间的关系，深化了对基因易感性在肺结核发病中作用的认识。

参 考 文 献

- 1 Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. J Biochem (Tokyo), 1983, 94: 937-947.
- 2 Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. Immunol Today, 1996, 17: 532-540.
- 3 Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, et al. Mutations in the human mannan-binding protein gene: frequencies in several population groups. Eur J Hum Genet, 1996, 4: 13-19.
- 4 Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of functional mutant homozygotes of the mannan-binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indian. Tuber Lung Dis, 1999, 74: 221-227.
- 5 Ozbaz-Gerceker F, Tezcan I, Berkel AI, et al. The effect of mannan-binding protein gene polymorphisms in recurrent respiratory system infections in children and lung tuberculosis. Turk J Pediatr, 2003, 45: 95-98.
- 6 Soborg C, Madsen HO, Andersen AB, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. J Infect Dis, 2003, 188: 777-782.
- 7 Selvaraj P, Kurian SM, Uma H, et al. Influence of non-MHC genes on lymphocyte response to Mycobacterium tuberculosis antigens & tuberculin reactive status in pulmonary tuberculosis. Indian J Med Res, 2000, 112: 86-92.
- 8 Bonar A, Chmiela M, Rudnicka W, et al. Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria in vitro. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005, 53: 437-441.
- 9 Mombo LE, Lu CY, Ossari S, et al. Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections. Genes Immun, 2003, 4: 362-367.
- 10 Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, et al. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. QJM, 1998, 91: 13-18.
- 11 Turner MW, Dinan L, Heatley S, et al. Restricted polymorphism of the mannan-binding lectin gene of indigenous Australians. Hum Mol Genet, 2000, 9: 1481-1486.
- 12 Mead R, Jack D, Pembrey M, et al. Mannose-binding lectin alleles in a prospectively recruited UK population. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. Lancet, 1997, 349: 1669-1670.
- 13 施虹, 王福生, 金磊, 等. 中国五个民族的甘露糖结合蛋白基因多态性特点及意义. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18: 202-205.
- 14 El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, et al. The effect of mannan-binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups. Scand J Infect Dis, 2004, 36: 106-108.

(收稿日期: 2006-03-20)

(本文编辑: 张林东)