论著

文章编号:1000-5404(2010)24-2616-03

MIF水平及MIF-173 G/C多态性与结核病关系研究

邓少丽[1],李艳林[2],陈 鸣[1],陈 伟[1],黄恒柳[1],夏 季[1],张海峰[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科[1];400016 重庆,重庆医科大学检验系[2])

【摘要】 **目的** 研究结核病患者巨噬细胞移动抑制因子(migration inhibitory factor,MIF)表达水平,分析MIF-173G/C多态性与结核杆菌易感性关系。**方法** 选取第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸科2009年9月至2010年9月结核病患者68例及70例健康体检者,采用RFLP-PCR的方法分析2组MIF-173基因型,ELISA法检测血清中MIF水平。**结果** 结核病组中MIF-173 CC纯合基因型及MIF-173 * C等位基因频率较正常对照组明显升高(*OR*值分别为3.99和1.58,*P*=0.003和0.02),结核组MIF水平明显高于对照组[(705.21±67.98)pg/ml *vs* (355.31±57.29) pg/ml,*P*<0.01],表达水平平均升高1倍左右。**结论** MIF-173 * C基因型与结核杆菌易感有关,在结核病发病中可能发挥重要作用。

【关键词】 巨噬细胞移动抑制因子;单核苷酸;结核;多态性

【中图法分类号】 R394.3;R446.139;R520.2 【文献标志码】 A

Relationship of serum MIF level and -173G/C polymorphism with tuberculosis: a retrospective study on 68 cases

Deng Shaoli[1], Li Yanlin[2], Chen Ming[1], Chen Wei[1], Huang Hengliu[1], Xia Ji[1], Zhang Haifeng[1] ([1]Department of Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2] Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To analyze the serum level of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in tuberculosis patients and evaluate the potential relationship of its level and-173G/C polymorphism with tuberculosis. **Methods** A total of 68 tuberculosis patients who admitted in our hospital from September 2009 to September 2010 and a matched control group of 70 healthy volunteers in the same period were included in this study. Their blood samples were collected. MIF-173 G/C was genotyped by using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Serum MIF level was detected by ELISA. **Results** The numbers of patients who carrying with MIF-173 C/C and MIF-173 * C were much larger than those of healthy control (*OR* = 3.99, 1.58). The serum MIF level in tuberculosis patients was also higher than control (705.21±67.98 *vs* 355.31±57.29 pg/ml, *P*<0.01). **Conclusion** The C genotype of MIF-173 locus may be associated with the risk of tuberculosis and play a certain role in the incidence.

【**Key words**】 macrophage migration inhibitory factors; single nucleotide; tuberculosis; polymorphism

Supported by the Key Project of National Infectious Disease Prevention and Treatment (2008ZX10003-012). Corresponding author: Deng Shaoli, Tel: 86-23-68757602, E-mail: dengsl072@yahoo.com.cn

我国是世界上22个结核病高负担国家之一,我国1/3左右的人口感染过结核杆菌,受感染人数超过4亿。结核病的预防与治疗已成为我国急需解决的问题。研究[1]同时发现,只有5%~10%感染结核的人群会发展为活动性结核,除了人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染、酗酒、营养不良等因素影响结核病进展,宿主遗传因素也起着重要作用[2]。机体抗结核的保护性免疫反应依赖T细胞和NK细胞产生的γ干扰素,另外,与机体固有免疫相关的巨噬细胞、树突状细胞在抗结核免疫反应中发

【基金项目】 国家传染病防治科技重大专项课题(2008ZX10003-012)

【通信作者】 邓少丽,电话:(023)68757602, E-mail:dengsl072@yahoo.com.cn

挥了重要作用[3]。激活的巨噬细胞和树突状细胞产生的细胞因子是激活 T 淋巴细胞所必需。其中,巨噬细胞移动抑制因子(migration inhibitory factor,MIF)与宿主抵抗病原菌有关。人 MIF 基因位于染色体 22q11.2,MIF 启动子区域 -173 位点 G/C 多态性影响启动子活性[4]。多项研究证实此种遗传变异与自身免疫性疾病易感相关[5],国内外也有少量研究[6]报道 MIF 多态性与结核病易感性的关系。本研究通过分析结核病患者巨噬细胞移动抑制因子(migration inhibitory factor,MIF)表达水平,以探讨中国人结核病患者 MIF 水平及 MIF 多态性的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

结核病组 68 例,病例均为我院 2009 年 9 月至 2010 年 9 月的住院患者,根据临床症状、体征、X 线胸片、痰菌检查确诊,其中男性 48 例,女性 20 例,年龄 23 ~ 79 岁。对照组为我院的健康体检者,共 70 例,其中男性 50 例,女性 20 例,年龄 22 ~ 70 岁。纳入标准:无高血压、糖尿病、甲状腺疾病、肝肾疾病、恶性肿瘤、慢性消耗性疾病,排除心、脑、肾、肺部感染。

1.2 主要试剂与仪器

全血基因组 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),GoTaq Green master PCR 试剂盒(美国 Promega 公司),MIF ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),胶回收试剂盒(美国 Promega 公司),*Alu* Ⅰ限制性内切酶(美国 Promega 公司),DNA 标准分子(美国 promega 公司),iCycler PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),美国 NANODROP-1000 DNA 浓度测试仪等。

1.3 MIF-173 位点单核苷酸多态性的检测

采用 Qiagen 公司全血基因组试剂盒提取外周血 DNA,分离出来的 DNA 加入 70% 乙醇洗涤 2 ~ 3 次并加入 40 μl TE 缓冲液(pH = 8.0)保存。MIF-173 基因型分析按文献[7]进行,PCR 上游引物:5′-ACTAAGAAAGACCCGAGG-3′,PCR 下游引物:5′-TGGCAGAAGGACCAGGAGAC-3′,产物为 330 bp。产物行 PCR 扩增反应,反应条件为:95°C 10 min;95°C 45 s,60°C 45 s,72°C 45 s,34 次循环;72°C 7 min. PCR 产物经电泳、胶回收后,用 *Alu* Ⅰ限制性内切酶 37°C 过夜酶切,3% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 血清 MIF 水平分析

抽取结核患者及正常对照组人群静脉血 3 ml 分离血清,血清贮藏于 -20 ℃ 冰箱以备统一检测,采用美国 R&D 公司 ELISA 试剂盒检测血清 MIF 水平,严格按照说明书操作。

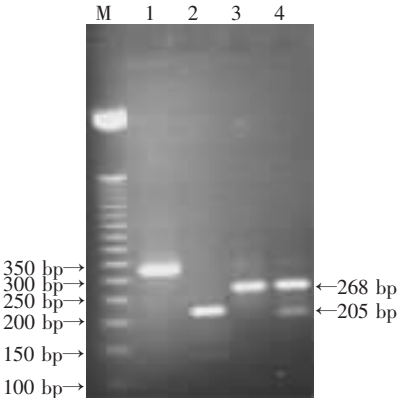
1.5 统计学分析

用基因计数法计算 MIF 各位点基因频率和基因型频率,采用 χ^2 检验进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检测,组间等位基因和基因型分布比较采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,MIF 水平比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 MIF 基因多态性分析

提取结核病组和对照组 DNA 进行 MIF 基因多态性分析,MIF-173G/G 型酶切为 268 bp 及 62 bp 片段;MIF-173C/C 型酶切为 205、62、63 bp;而 MIF-173G/C 基因型酶切为 268、205、62、63 bp 4 个片段(图 1)。



M:DNA 标准;1:PCR 产物;2:CC 基因型;3:GG 基因型;4:GC 基因型

图 1 MIF-173 位点 RFLP-PCR 电泳结果

MIF 启动子-173G/C 等位基因频率分布见表 1,结果显示结核组中 MIF-173CC 纯合基因型及 MIF-173 * C 等位基因频率明显高于对照组(*OR* 值分别为 3.99 和 1.58)。

表 1 结核病组及正常人群中 MIF-173G/C 基因型及等位基因分布

基因型/等位基因	结核病组[例(%)]	正常对照组[例(%)]	*P* 值	*OR*(95% *CI*)
MIF-173				
G/G	32(47.50)	38(54.21)	0.240	1.00
G/C	25(36.14)	29(41.12)	0.430	1.03(0.25 ~ 2.35)
C/C	11(16.34)	3(4.67)	0.003	3.99(1.02 ~ 8.41)
G 等位基因频率	65.40%	75.00%	0.030	1.00
C 等位基因频率	34.60%	25.00%	0.020	1.58(1.02 ~ 2.56)

2.2 结核病患者血清 MIF 表达水平分析

结核病组与对照组人群血清中 MIF 水平检测结果见表 2。结核病组患者 MIF 水平较对照组明显升高($P < 0.01$),表达水平平均升高 1 倍左右。结核病组 MIF-173 C/C 基因型患者 MIF 浓度高于 MIF-173 G/G 基因型患者,但无统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 结核病患者和对照组人群血清中 MIF 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MIF 浓度(pg/ml)
结核病组		705.21 ± 67.98[a]
MIF-173 G/G	32	687.62 ± 65.69
MIF-173 G/C	25	696.54 ± 68.87
MIF-173 C/C	11	711.73 ± 70.20
对照组		355.31 ± 57.29
MIF-173 G/G	38	356.28 ± 59.24
MIF-173 G/C	29	355.47 ± 60.29
MIF-173 C/C	3	354.26 ± 61.19

a:$P < 0.01$,与对照组比较

3 讨论

全球约有1/3的人感染过结核杆菌,但其中只有5%～10%发展为结核病。究其原因,这些患者中除少部分有明显的危险因素如HIV感染、应用激素治疗外,其余大部分是由遗传因素(如基因多态性)与环境因素共同作用的结果[8-9]。目前研究与结核杆菌易感相关的基因多态性包括人类自然抵抗相关巨噬细胞蛋白1(NRAMP1)、人类白细胞抗原(HLA)、维生素D受体(VDR)及甘露糖结合蛋白(MBP)的基因多态性[10-11]。到目前为止,MIF基因启动子多态性与结核易感性关系尚不清楚,研究我国人群基因多态性同结核易感性的关系有重要的意义。

MIF是一种含有115个氨基酸的蛋白质,脑垂体前页和单核巨噬细胞是血MIF的主要来源。MIF能够抑制巨噬细胞的游走,促进巨噬细胞在炎症或感染局部的聚集[12]。本研究显示,MIF-173 * C基因型与结核病密切相关,*OR*值1.58,提示此基因型的人群结核易感。Donn等[13]研究小组使用MatInspector软件分析,MIF-173位点(G > C)产生了转录因子AP-4潜在的结合位点,因此对MIF启动子活性产生重要作用,从而影响MIF水平,因此本研究也证实MIF-173 * C基因型分布频率高的结核病组MIF水平明显高于健康对照组,研究结果还提示,结核病组MIF-173 C/C基因型患者MIF浓度高于MIF-173 G/G基因型患者,但无统计学差异,可能与标本数量偏少有关。MIF水平升高机制还不明确,可能与调节细胞溶质磷脂酶2的炎症反应相关,与抑制p53依赖的凋亡相关。体外实验已证明人MIF可以抑制致病性结核分枝杆菌在巨噬细胞内的繁殖[14]。这些结果提示MIF在抗结核免疫中起了重要的作用。我们推测MIF启动区的基因变异可能改变了炎性途径功能,继而增加了发展为结核的风险。

MIF作为机体的一种多功能细胞因子,在机体中分布广泛,并参与了多种疾病的发生和发展过程。近年来其在炎症及病原体感染的作用备受人们关注[15-16],尽管目前对其致病机制还不完全清楚,但研究提示其与结核病易感性、发生进展相关,因而有望成为诊断、治疗结核病的一个新的靶点。

参考文献:

[1] Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics[J]. Genes Immun, 2003, 4(1): 4-11.

[2] Casanova J L, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(1): 55-66.

[3] Dorman S E, Hatem C L, Tyagi S, *et al*. Susceptibility to tuberculosis: clues from studies with inbred and outbred New Zealand White rabbits[J]. Infect Immun, 2004, 72(3): 1700-1705.

[4] Barton A, Lamb R, Symmons D, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphism is associated with susceptibility to but not severity of inflammatory polyarthritis[J]. Genes Immun, 2003, 4(7): 487-491.

[5] de-la-Fontaine L, Schwarz M J, Riedel M, *et al*. Investigating disease susceptibility and the negative correlation of schizophrenia and rheumatoid arthritis focusing on MIF and CD14 gene polymorphisms[J]. Psychiatry Res, 2006, 144(1): 39-47.

[6] 蹇锐,程小星,钟敏,等. 人MIF基因启动子多态性与结核病易感性的关系[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(5): 1-3.

[7] Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2007, 13(1): 71-82.

[8] Jepson A, Fowler A, Banya W, *et al*. Genetic regulation of acquired immune responses to antigens of Mycobacterium tuberculosis: a study of twins in West Africa[J]. Infect Immun, 2001, 69(6): 3989-3994.

[9] Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics[J]. Genes Immun, 2003, 4(1): 4-11.

[10] Kaufmann S H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?[J]. Nat Rev Immunol, 2001, 1(1): 20-30.

[11] Maglione P J, Xu J, Casadevall A, *et al*. Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during Mycobacterium tuberculosis infection[J]. J Immunol, 2008, 180(5): 3329-3338.

[12] Martinez A, Orozco G, Varade J, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor gene: influence on rheumatoid arthritis susceptibility[J]. Hum Immunol, 2007, 68(9): 744-747.

[13] Donn R, Alourfi Z, De-Benedetti F, *et al*. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(9): 2402-2409.

[14] Gomez L M, Sanchez E, Ruiz-Narvaez E A, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor gene influences the risk of developing tuberculosis in northwestern Colombian population[J]. Tissue Antigens, 2007, 70(1): 28-33.

[15] Temple S E, Cheong K Y, Price P, *et al*. The microsatellite, macrophage migration inhibitory factor -794, may influence gene expression in human mononuclear cells stimulated with E. coli or S. pneumoniae[J]. Int J Immunogenet, 2008, 35(4/5): 309-316.

[16] Oddo M, Calandra T, Bucala R, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor reduces the growth of virulent Mycobacterium tuberculosis in human macrophages[J]. Infect Immun, 2005, 73(6): 3783-3786.

(收稿:2010-07-20 修回:2010-09-15)

(编辑 吴培红)