SP110 和 VDR 基因多态性与结核病的关联及其与环境因素的交互作用

向 颖[1],林 辉[1],胡代玉[2],刘 洁[2],沈 静[2],吴 龙[1],李至伟[3],熊鸿燕[1] (1. 第三军医大学军队流行病学教研室,重庆 400038;2. 重庆市结核病防治所,重庆 400050;3. 解放军 78511 部队门诊部,四川 雅安 625000)

[摘 要] **目的** 探讨 SP110 和维生素 D 受体(VDR)基因多态性、环境因素与结核病的联系及交互作用。**方法** 采用病例对照研究方法,以 198 例确诊肺结核病例为病例组,与病例组年龄、性别成组匹配的 195 例健康人作为对照组,用高分辨率溶解曲线技术(HRM)检测 VDR 基因(TaqI、FokI)、SP110 基因(rs1135791、rs722555)多态性,并收集传统环境因素暴露情况。采用 SPSS 18.0 软件包进行数据管理和分析。**结果** 病例组中 VDR 基因 FokI-ff、SP110 基因 rs722555 G/G 和 rs1135791 C/T 的分布频率显著高于对照组($P<0.05$),且以野生型为参照,*OR* 值及 *OR*95% *CI* 值下限均大于 1。吸烟、结核病患者接触史、FokI-ff 和 rs722555 基因型 G/G 进入多因素 logistic 回归模型,其中同时具备 FokI-ff 与吸烟、结核病患者接触史的人群以及同时具备吸烟、FokI-ff 与 rs722555-G/G 人群发生结核病的危险性明显高于各个因素独立时的危险性。**结论** FokI-ff、rs722555-G/G 与结核病发生相关,且与环境间存在一定正交互作用。

[关键词] 结核病;VDR;SP110;环境因素;交互作用

[中图分类号] R183;R52 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)04-0377-03

Interaction of SP110 and VDR gene polymorphisms with environmental factors in tuberculosis

XIANG Ying, LIN Hui, HU Dai-yu, LIU Jie, SHEN Jing, WU Long, LI Zhi-wei, XIONG Hong-yan (Department of Epidemiology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the interaction of SP110 and VDR gene polymorphisms with environmental factors in pulmonary tuberculosis. **Methods** A case-control study was conducted based on 198 patients with pulmonary tuberculosis and 195 healthy people. Single nucleotide polymorphism of SP110 and VDR gene were analyzed by high resolution melting curve technique (HRM). Environmental exposure were collected by using a questionnaire. Univariate and multivariate conditional logistic regression analysis was done using SPSS 18.0 software package. **Results** The frequency distribution of FokI-ff, rs722555 G/G and rs1135791 C/T in cases were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). History of exposure to tuberculosis patients, smoking, FokI-ff and rs722555 G/G were in the multivariate conditional logistic regression model. **Conclusion** FokI-ff, rs722555 G/G and rs1135791 C/T would be potential risk factors for tuberculosis. There are certain interaction among FokI-ff, rs722555 G/G, smoking and history of exposure in tuberculosis.

Keywords: tuberculosis; VDR; SP110; environmental factors; interaction

结核病的发生和转归与传统环境因素及宿主遗传因素密切相关,且这些因素之间存在复杂的交互作用,但关于两者在结核病发生中的交互作用研究报道极少。维生素 D 受体(VDR)基因和 SP110 基因均可影响结核杆菌感染免疫及产生组织学应答最主要的效应细胞巨噬细胞的功能和活性,从而影响结核分支杆菌在巨噬细胞中的存活、生长及感染后的转归等。大量流行病学研究证实 VDR 基因(TaqI、FokI)[1-3]、SP110 基因(rs1135791、rs722555)SNPs 多态性与结核病易感性相关[4-6]。本研究以重庆地区人群为研究对象,采用病例对照研究方法探讨 SP110、VDR 基因的多态性与肺结核易感性的关系及基因间、基因与传统环境间的交互作用,为进一步理解结核病病因等提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例组:2010 年 4 月至 2011 年 4 月,按照《中国结核病分类法》诊断标准,从重庆市结核病防治所和沙坪坝区结核病防治中心连续收集新确诊的汉族肺结核病患者 198 例组成病例组,排除伴有 HIV 感染、糖尿病、肿瘤、慢性肺炎等其他疾病的患者。对照组:要求与病例组的年龄和性别成组匹配,从某三甲医院献血中心和体检中心同期体检的人群中选择健康的人群(胸透正常,PPD 试验阴性)共 195 人作为对照组。

1.2 调查主要方法

1.2.1 流行病学调查 根据文献报道,选择与结核病主要相关因素进行调查,如年龄、性别、家庭收入、烟草暴露、卡介苗接种史等。采用面对面询问的方式填写调查表。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201304013

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30700685);重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2009-1-06)。

[通讯作者] 熊鸿燕,教授,博士,主要从事分子流行病学研究,E-mail: hongyanxiong@sohu.com

[收稿日期] 2013-04-15 [修回日期] 2013-04-28

1.2.2 DNA 提取 利用全血基因组提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司)提取柠檬酸钠抗凝静脉血 5 基因组 DNA,-30°保存备检。

1.2.3 基因多态性检测 选择与结核病联系相对稳定的 VDR 基因(TaqI、FokI)和 SP110 基因(rs1135791、rs722555)作为交互作用分析位点。依据 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html)信息,设计并合成 PCR 扩增引物(由上海生工生物工程有限公司合成),见表 1。由江苏为真生物医药科技有限公司采用高分辨率溶解曲线技术(high resolution melt, HRM)进行多态性检测,并采用 DNA 测序进行分型确认。结合基因型分型图和 DNA 测序结果判断基因型。

1.2.4 统计分析方法 采用 SPSS 18.0 软件包进行数据管理和统计分析。分别采用单因素分析和多因素非条件 logistic 回归分析进行相关性和交互作用分析,以 $P<0.05$ 具有统计学显著性差异。

表 1 VDR 和 SP110 基因多态性 PCR 扩增引物

基因	位点	引物	PCR 产物(bp)
VDR	TaqI	F: TGCAGGACGCCGCGCT	54
		R: GCACTGTGTTGGACAGGCGG	
	FokI	F: GCCCTGGCACTGACTCTGG	93
		R: CAGGGTCAGGCAGGGAAGT	
SP110	rs1135791	F:GAACGCAAAGAACTGGAAAC	147
		R:GCTCTTCACATTTCTGCTCTTA	
	rs722555	F:ATACCCCATCATAGTTCACATT	126
		R:TAAAAGAGACATAGGGACAGGA	

2 结果

2.1 研究对象及一般情况

分别收集 215 名肺结核病病例和对照,其中病例组 198 名和对照组 195 名完成 HRM 检测纳入分析,据样本含量公式估算,达到统计学最低样本量要求(180 例)。2 组的年龄和性别构成无统计学显著性差异($P>0.05$)。

2.2 主要环境因素与结核病相关性分析

传统环境因素与结核病相关性的单因素分析结果证实结核病患者接触史、吸烟、人居平均面积、人均年收入、居室通风、工作强度等与结核病发生有关[7]。

2.3 VDR 和 SP110 基因多态性与结核病相关性分析

2.3.1 Hardy-Weinberg 平衡分析 对照组中 VDR 基因(FokI、TaqI)和 SP110 基因(rs1135791、rs722555)多态性位点的基因型分布频率与 Hardey-Weinberg 平衡的理论频数之间没有显著性差异($P>0.05$),见表 2,表明所选择的对照人群符合遗传平衡状态,基因型分布均匀,可以进行下一步分析。

2.3.2 基因多态性与结核病的相关性 由表 3 可见,病例组与对照相比,病例组中 VDR 基因 FokI-ff 基因型的分布频率(22.2%)显著高于对照组的该基因型分布(13.3%),$P<0.05$;以 FokI-FF 为参照计算 *OR* 及 95% *CI* 值均大于 1。未发现 TaqI 基因多态性与结核病明显的相关性。

病例组与对照相比,rs722555 基因型 G/G、rs1135791 基因型 C/T 的分布频率存在统计学显著性差异($P<0.05$),且以对应的野生型为参照的 *OR* 值及 *OR*95% *CI* 值下限均大于 1。

2.3.3 传统因素与基因的交互作用分析 选择单因素分析中与结核病相关的传统因素和基因位点进行多因素非条件 logistic 回归分析,以了解它们在结核病发生中的作用。由表 4 可见,结核病患者接触史、吸烟、FokI-ff 和 rs722555 基因型 G/G 进入回归模型,*OR* 及 *OR*95% *CI* 与因素单独存在时有明显差异。再将这些因素分别组合为一独立因素,再次进行多因素 logistic 回归分析,以判断它们间交互作用。其中同时具备 FokI-ff 与吸烟、结核病患者接触史的人群发生结核病的危险性明显高于这 3 个因素单独时的危险性。

3 讨论

研究证实结核病的发生、转归与传统环境因素(如吸烟、居住环境、接触史等)和宿主遗传易感基因(如 VDR[1-3]、HLA[8]、NRAMP1[3]、SP110[4-6]等)等因素共

表 2 VDR、SP110 基因型分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验

基因位点	基因型	检测值	理论值	χ^2	P
VDR 基因 FokI	FF	90	86.0	1.650	0.199
	Ff	79	87.0		
	ff	26	22.0		
VDR 基因 TaqI	TT	140	138.8	0.445	0.505
	Tt	49	51.5		
	tt	6	4.8		
SP110 基因 rs72255	A/A	48	52.8	1.922	0.165
	A/G	107	97.3		
	G/G	40	44.8		
SP110 基因 rs1135791	T/T	165	166.2	1.354	0.244
	C/T	30	27.7		

表 3 VDR 基因 FokI、TaqI 位点基因型的组间分布及关联分析

基因型	VDR 基因 FokI			VDR 基因 TaqI			SP110 基因 rs722555			SP110 基因 rs1135791	
	FF	Ff	ff	TT	Tt	tt	A/A	A/G	G/G	T/T	C/T
病例组	69(34.8)	85(42.9)	44(22.2)	157(79.3)	37(18.7)	4(2.0)	35	94	69	152	46
对照组	90(46.2)	79(40.5)	26(13.3)	140(71.8)	49(25.1)	6(3.1)	48	107	40	165	30
χ^2	5.21	0.24	5.30	2.992	5.140	0.442	2.925	2.151	10.074		3.879
P	0.022	0.627	0.021	0.084	0.023	0.506	0.087	0.142	0.002		0.049
OR(95% *CI*)	1	1.40(0.91~2.18)	2.21(1.24~3.93)	1	0.67(0.42~1.09)	0.59(0.16~2.15)	1	1.21(0.72~2.02)	2.37(1.32~4.24)	1	1.66(1.00~2.77)

表 4 环境因素和基因多态性在结核病发生中的多因素非条件 logistic 回归分析

因素	*B*	*P*	*OR*	*OR*95% *CI*
①结核病患者接触史	1.252	0.031	2.29	2.01 ~ 5.28
②吸烟	0.564	0.026	2.51	1.63 ~ 4.23
③FokI-ff	0.725	0.033	3.25	1.82 ~ 5.27
④ rs722555-G/G	0.746	0.015	1.98	1.22 ~ 5.24
① + ③	1.162	0.013	3.27	2.27 ~ 4.26
② + ③	1.274	0.006	4.16	2.75 ~ 5.69
① + ② + ③	0.923	0.017	5.32	2.17 ~ 8.31
② + ③ + ④	1.341	0.007	6.14	3.37 ~ 15.13

同作用密切相关,但关于传统环境因素与易感基因在结核病发生中的交互作用研究报道较少。其中 SP110 基因和 VDR 基因分别位于 2q37.1,12q13-q14,其编码产物均可调节巨噬细胞生物活性,影响结核分枝杆菌在其内的生长繁殖,而与结核病易感性相关[9-10],这已被国内外大量流行病学研究分别证实。本研究选择文献报道与结核病联系相对稳定的 VDR 基因(TaqI、FokI)和 SP110 基因(rs1135791、rs722555)作为验证和后续交互作用分析位点,以进一步探讨基因与基因、基因与传统环境因素的交互作用。本研究的样本量符合统计学要求,同时对照组基因多态性分布符合遗传平衡状态,其结果可为进一步认识本研究地区结核病的发病机制提供科学依据。

VDR 基因 FokI-ff 基因型导致 VDR 基因功能第 1 个起始密码子 ATG 突变为 ACT,导致其结构和其翻译氨基酸增加,从而影响 VDR 受体活性,而与结核病易感性相关。本研究(表 3)与 Singh[3] 和 Merza[11] 等均发现 VDR FokI-ff 与肺结核易感性相关。但与 Sharma 等[2] 报道结果相左。本研究及周丹等[4] 均发现重庆地区 SP110 rs722555 和 rs1135791 单核苷酸多态性和肺结核易感性存在相关,且与 JeVrey 等[12] 分别以南非、俄罗斯、西非为研究对象的 *OR*95% *CI* 接近。但 Xun 等[13] 纳入共 6 篇关于 SP110 基因多态性与结核病易感性的病例对照研究进行系统评价,结果提示 SP110 基因多态性与结核病易感性相关性不强。这些研究进一步提示基因多态性与结核病的相关性存在明显地区和人群差异。因此,以不同人群为研究对象开展相关研究对于阐明结核病遗传相关性有重要意义。

多因素 logistic 回归分析结果(表 4)显示,结核病患者接触史、吸烟、FokI-ff 和 rs722555 基因型 G/G 进入回归模型,其中同时具备 FokI-ff 与吸烟、结核病患者接触史的人群以及同时具备吸烟、FokI-ff 与 rs722555-G/G 人群发生结核病的危险性明显高于各个因素独立时的危险性,提示基因与环境、基因间存在一定正交互作用。

由于本研究纳入研究的样本量相对较小,难以进行分层分析,在一定程度上限制了传统因素与基因、基因与基因间的交互作用判断,同时与结核病发生相关传统环境因素、易感基因众多,有待扩大样本量和选择更多易感基因、环境因素进行深入系统地研究,为阐明结核病发生、发展机制提供科学依据。

[参考文献]

[1] Su Qian, Ma Xiangyu, Lin Hui, et al. Association between gene polymorphisms of vitamin D receptor and pulmonary tuberculosis susceptibility: a meta-analysis[J]. Journal of Medical Colleges of PLA, 2011, 26(2): 63 - 75.

[2] Sharma PR, Singh S, Jena M, et al. Coding and non-coding polymorphisms in VDR gene and susceptibility to pulmonary tuberculosis in tribes, castes and Muslims of Central India[J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(6): 1456 - 1461.

[3] Singh A, Gaughan JP, Kashyap VK, et al. SLC11A1 and VDR gene variants and susceptibility to tuberculosis and disease progression in East India[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(11): 1468 - 1474.

[4] 周 丹,陶 杨,蔡家春,等. Sp110 基因 rs1135791、rs722555 多态性与结核病的相关性研究[J]. 现代预防医学,2008,35(3):416 - 419.

[5] Liang L, Zhao YL, Yue J, et al. Association of SP110 gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis in a Chinese population[J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(5): 934 - 939.

[6] Tosh K, Campbell SJ, Fielding K, et al. Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(27): 10364 - 10368.

[7] 苏 倩,向 颖,胡代玉,等. VDR 基因多态性、环境因素与重庆肺结核病的联系及交互作用研究[J]. 局解手术学杂志,2012,21(4):361 - 364.

[8] Duarte R, Carvalho C, Pereira C, et al. HLA class II alleles as markers of tuberculosis susceptibility and resistance[J]. Rev Port Pneumol, 2011, 17(1): 15 - 19.

[9] Lewis SJ, Baker I, Davey Smith G. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2005, 9(10): 1174 - 1177.

[10] 周 丹. 核体蛋白 Sp110 及其生物学功能[J]. 医学分子生物学杂志,2006,3(4):271 - 274.

[11] Merza M, Farnia P, Anoosheh S, et al. The NRAMPI, VDR and TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility[J]. Braz J Infect Dis, 2009, 13(4): 252 - 256.

[12] JeVrey S, Szeszko. Barry Healy, Helen Stevens, et al. Resequencing and association analysis of the SP110 gene in adult pulmonary tuberculosis[J]. Hum Genet, 2007, 21(2): 155 - 160.

[13] Xun Lei, Hang Zhu, Lang Zha, et al. SP110 gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: A systematic reviewand meta-analysis based on 10 624 subjects[J]. Infect Genet Evol, 2012, 2(7): 1473 - 1480.

(编辑:魏 源)