维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0423-05

Sp110 基因与肺结核易感相关性研究

熊 宇,周 丹,陶 杨,李 革

(重庆医科大学公共卫生学院流行病学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 Sp110 基因 rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 位点基因多态性与重庆市汉族人群肺结核发病的关系。方法:采用病例对照研究设计,检测 rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 位点 SNP 多态性,用 SAS 软件进行显著性检验。结果:(1)Sp110 基因 rs1135791 CT 基因型、rs722555 GG 基因型、rs116799831 GG 基因型、rs3948464 CC 基因型在病例组的频率明显高于对照组;(2)病例组 rs1135791 C 等位基因、rs722555 G 等位基因、rs116799831 G 等位基因、rs3948464 C 等位基因频率都高于对照组,差异有统计学意义。结论:rs1135791 C/T、rs722555 A/G、rs116799831 A/G、rs3948464 C/T 可能是重庆市汉族人群肺结核易患的危险因素。

【关键词】Sp110 基因;肺结核

【中国图书分类法分类号】R181.3+3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-24

Association between Sp110 gene and susceptibility to tuberculosis

XIONG Yu, et al

(*Department of Epidemiology, College of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the association between rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 polymorphisms of Sp110 gene and susceptibility to tuberculosis of Han people in Chongqing. *Methods*: Using case-control study, rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 polymorphisms of Sp110 gene were detected. The test of significance was performed with the computer program, SAS Version 8.2. *Results*: (1)The frequencies of rs1135791 CT、rs722555 GG、rs116799831 GG、rs3948464 CC had statistically significant difference between the case and the control group. (2)The frequencies of rs1135791 C allele、rs722555 G allele、rs116799831 G allele、rs3948464 C allele had statistically significant difference between the case and the control group. *Conclusion*: The rs1135791 C/T、rs722555 A/G、rs116799831 A/G、rs3948464 C/T polymorphisms of Sp110 gene were possibly susceptible to the tuberculosis of the Han people in Chongqing.

【Key words】 Sp110 gene; Tuberculosis

经过大范围流行病学调查显示,结核杆菌感染后是否发病表现出明显的个体差异,可见遗传因素在决定宿主个体对结核杆菌的易感性上起着重要作用。研究发现,肺结核的遗传易患性是由多基因所决定的,研究者已经发现多种与肺结核易患性相关的基因,如 NRAMP1 基因[1]、VDR 基因[2]等。

2005 年 Kramnik 等人通过小鼠动物实验发现一种能调节小鼠对结核病的先天免疫力的 Ipr1 基因,其表达可有效抑制结核杆菌在细胞内和细胞外的繁殖。人体中与 Ipr1 蛋白最接近的同源蛋白是核体蛋白 Sp110b,两者有 41%的同源性[3],因此研究者认为 Sp110 基因多态性可能和人体肺结核的易感性相关。

本研究的主要探讨 Sp110 基因 rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 位点 SNP 与重庆汉族人群肺结核易感性关系及各位点在肺结核发病中的交互作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

病例组人群为 2005 年 12 月~2006 年 2 月间在重庆市结核病防治所和重庆市沙坪坝区结核病防治所就诊者,根据临床表现、细菌学检查及胸部 X 线确诊的初治痰涂片阳性的结核病患者;排除伴 HIV、EBV、肝炎病毒等感染及恶性肿瘤、糖尿病、严重心、肝、肾器质性病变者,共 100 例,其中男

作者介绍:熊 宇(1981-),女,硕士,研究方向:流行病学。

通讯作者:李 革,女,副教授,E-mail:Lige1209@vip.sina.com。

基金项目:重庆市教委科技项目(编号:KJ 060310)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

63例,女 37 例,平均年龄 39 岁。

对照组人群为同期在重庆市九龙坡区疾病预防控制中心、重庆市博爱医院以同样的纳入排除标准收集的正常人及非结核病患者 106 例,其中男 64 例,女 42 例,平均年龄 37.4 岁。

经 χ^2 检验,2 组的年龄、性别均无统计学差异,说明 2 组人群具有较好的可比性。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取 每个研究对象抽取 5ml 静脉血,枸橼酸钠抗凝,以酚/氯仿抽提法提取 DNA。

1.2.2 SNP 位点选择 按照下列条件选出 rs1135791、rs722555、rs116799831 3 个 SNP 位点:(1)杂合度 >45%;(2)弱势基因频率 >10%;(3)范围从 5'端启动区到 3'端调控区,以外显子中的错义突变为主。

2006 年,Kerrie Tosh 等人研究发现 Sp110 基因外显子区的 r3948464 位点 SNP 与非洲西部人群肺结核的发病相关[4],将该位点纳入本次研究中,观察验证其在重庆市汉族人群中是否与肺结核相关。

1.2.3 基因多态性分析 rs1135791 采用嵌套式等位基因特异性引物 PCR 技术(NASP-PCR)[5],在 1 个 PCR 反应体系内有 1 对内引物(等位基因特异性上游引物 A:5'-GGAATATACGTTGTGAAGGAAT-3'、等位基因特异性下游引物 B:5'-AGCAGCTCTCCTAGGGTCG-3')和 1 对外引物(嵌套式上游引物 P:5'-CACCACTCAGTCAGGCTTTAG-3'、嵌套式下游引物 Q:5'-CCACCATCAGGAACAATATG-3')(图 1)。这样经 PCR 扩增后,若为 TT 纯合子则产生 228bp、520bp 2 个片段;若为 CC 纯合子则产生 332bp、520bp 2 个片段;若为 CT 杂合子则产生 228bp、332bp、520bp 3 个片段。

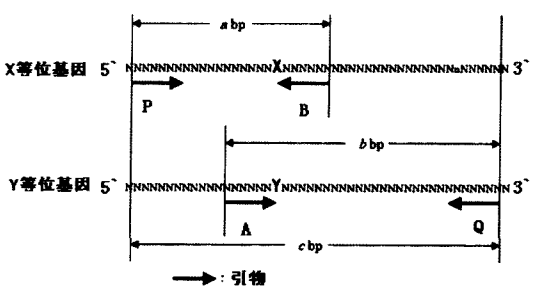


图 1 NASP-PCR 引物设计原理模式图

rs722555 同样采用 NASP-PCR 方法[5],设计等位基因特异性上游引物 A:5'-ATCTAAACAAGTTCCACACACTG-3';等位基因特异性下游引物 B:5'-GGACAGGAGAGCCAAATGT-3';嵌套式上游引物 P:5'-ACACTTCATAGGATTATCACACC-3';嵌套式下游引物 Q:5'-TATCACGGATTTAGGTATTGC-3'。PCR 扩增后,若是 AA 纯合子则产生 221bp、558bp 2 个片段;若是 GG 纯合子则产生 221bp、378bp、558bp 3 个片段;若是 AG 杂合子则产生 378bp、558bp2 个片段。

rs116799831 采用等位基因特异性扩增法(ASA-PCR)(图 2),按等位基因的多态性位点设计 2 条上游引物:A 5'-AGTGCCCGCAATAGGCGGATT-3'、A' 5'-AGTGCCCGCAATAGGCGGCTC-3',以及 1 条下游引物 B 5'AGGTCCAAATGTTCTGAAGGCTGA-3'。以引物 A 与引物 B,引物 A'与引物 B 为一组分别加于 2 支 PCR 管中,若引物 A 与引物 B 扩增有目的产物,说明该位点为 AA 型基因;若引物 A'与引物 B 扩增有目的产物,说明该位点为 GG 基因型;若 2 管里均有目的产物,则该位点是 AG 型杂合子。

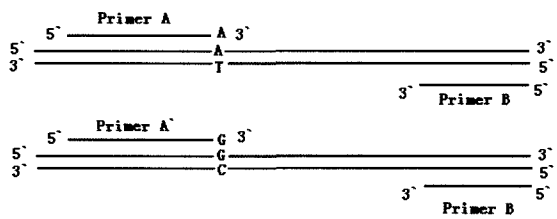


图 2 ASA 方法的原理

rs3948464 采用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性分析方法(PCR-SSCP),设计上游引物 5'-GGCAAGATAACTCCTGAAAG-3'和下游引物:5'-CAAAGCCAAGGTGAACTG-3',PCR 产物长度 439bp。用限制性内切酶 Taq Ⅰ进行酶切,酶切体系:10U Taq Ⅰ酶,2μl 10×Taq Ⅰ Buffer,6μl PCR 产物,双蒸水补足 20μl;酶切条件:65℃水浴锅中水浴酶切 2h。完毕后,取 4μl 酶切产物与 2μl 6×Loading Buffer 混合均匀,2%的琼脂糖凝胶(EB 工作浓度 0.5μg/ml)在 120V 恒压下电泳 30min,参照 DL-2000 为标准相对分子质量,紫外分

表 1 PCR 反应体系

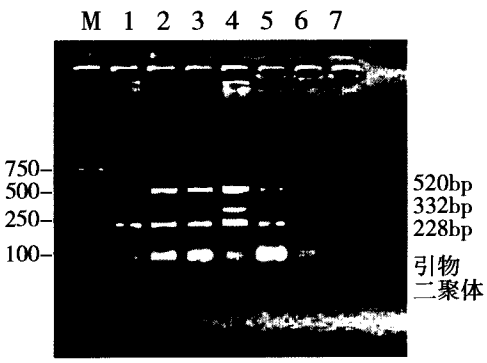
SNP 位点		Buffer (μl)	$MgCl_2$ (mmol/L)	dNTPs (μmol/L)	外或上游引物 (μmol/L)	内或下游引物 (μmol/L)	Taq 酶 (U)	模板 (ng)	ddH_2O
rs1135791		2	2.5	250	0.5	0.5	1	100~150	补足 20μl
rs722555		2	2.5	250	0.5	0.5	1		
rs116799831	G	5	1.5	200	4	4	2.5		补足 50μl
	A	5	1.5	200	4	4	2.5		
rs3948464		2	2.5	250	4	4	1.5		补足 20μl

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 PCR 反应条件

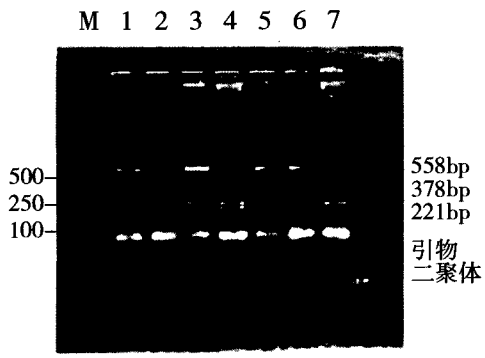
SNP 位点	预变性	变性	退火	延伸	循环次数	终末延伸
rs1135791	95℃ 5min	94℃ 30s	54℃ 30s	72℃ 30s	40	72℃ 10min
rs722555			52℃ 30s			
rs116799831			60℃ 30s	72℃ 1min	35	72℃ 7min
rs3948464		95℃ 30s	50℃ 45s		30	

注:反应完成后将反应产物保存在 4℃环境中



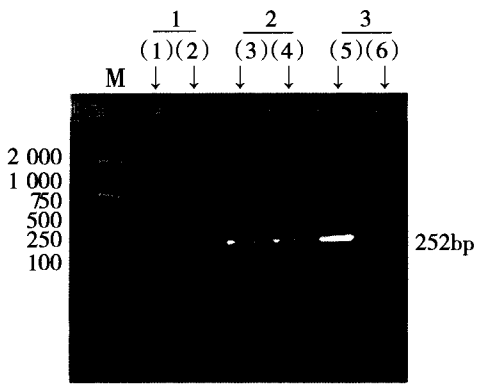
(M. marker;用 NASP-PCR 技术,TT 纯合子产生 228bp、520bp 2 个片段,如 2、3、7 泳道所示;CC纯合子产生 332bp、520bp 2 个片段,本次研究未见;CT 杂合子产生 228bp、332bp、520bp 3 个片段,如 1、4、5、6 泳道所示)

图 3 rs1135791 C/T 位点 PCR 产物电泳图



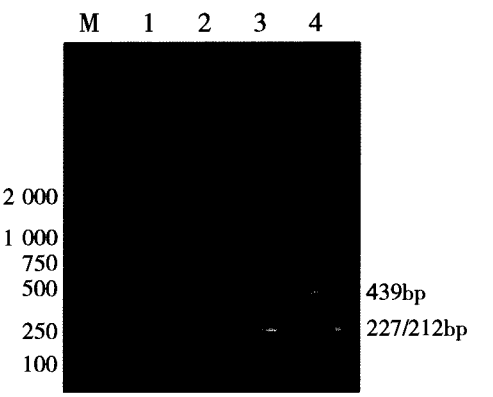
M. marker; 用 NASP-PCR 技术扩增后:6 泳道为 AA 纯合子,产生 221bp、558bp 2 个片段;1、5为 GG 纯合子,产生 221bp、378bp、558bp 3 个片段;2、3、4、7 泳道是 AG 杂合子,产生 378bp、558bp 2 个片段。

图 4 rs722555 A/G 位点 PCR 产物电泳图



M. marker;(1)、(2)泳道对应第 1 受试者;(3)、(4)泳道对应第 2 受试者;(5)、(6)泳道对应第3 受试者;(1)、(3)、(5)加入针对 A 变异的特异性引物;(2)、(4)、(6) 加入的为针对 G 变异的特异性引物。受试者 1 只在(2)泳道有条带,为 GG 纯合子;受试者 3 只有(5)泳道有结果,为 AA 纯合子;受试者 2 在 2 个泳道均出现目标条带,为 AG 杂合子。

图 5 rs11679983 A/G 位点 PCR 产物电泳图



M. marker; 第一泳道为 PCR 产物电泳图,产物长度 439bp;第二泳道未加样。4 为 CC 纯合子,能被 Taq Ⅰ 酶酶切,产生 227bp、212bp2 个片段;3 为 CT 杂合子,酶切可产生 227bp、212bp、439bp3 个片段。若为 TT 纯合子,不能被酶切,最终片段长度为 439bp,本次研究未见此型别

图 6 rs3948464 C/T 位点 PCR 与酶切产物电泳图

析仪及凝胶成像系统观察结果。若为 CC 纯合子时,构成 Taq Ⅰ 酶的酶切位点,产生 227bp、212bp2 个片段;若为 TT 纯合子,不能被酶切,最终片段长度为 439bp;CT 杂合子则有 227bp、212bp、439bp 3 个片段。

1.3 统计学分析

全部资料输入 Excel 表格,应用 SAS8.2 进行统计分析。比较病例对照一般情况均衡性之后,对各基因型频率、等位基因频率与肺结核发病的关系分别进行单因素分析。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 4 位点 SNP 基因型与肺结核相关性分析

本次研究中:未检检出 rs1135791 CC 基因型和 rs3948464TT 基因型。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡性分析,rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 4 位点 SNP 各基因型符合遗传平衡规律。4 位点 SNP 不同基因型在病例组和对照组分布频率如表 3 所示。

病例组 rs1135791 CT 基因型、rs722555 GG 基因型、rs116799831 GG 基因型、rs3948464 CC 基因型高于对照组,差异有统计学意义(rs1135791:P=0.019 2、rs722555:P=0.039 4、rs116799831:P<0.01、rs3948464:P<0.01),提示 rs1135791 CT 基因型、rs722555 GG 基因型、rs116799831 GG 基因型、rs3948464 CC 基因型可能是重庆市汉族人群肺结核发生的易患基因型。

2.2 4 位点 SNP 等位基因频率与肺结核发病相关性分析

如表 4 所示,病例组 rs1135791 C 等位基因、rs722555 G等位基因、rs116799831 G 等位基因及 rs3948464 C 等位基因,高于对照组,经检验差异有统计学意义(P 均 <0.01)。提示 rs1135791 C 等位基因、rs722555 G等位基因、rs116799831 G 等位基因及 rs3948464 C 等位基因可能与重庆市汉族人群肺结核易患性相关。

3 讨 论

随着分子生物学时代的来临,遗传因素在结核病发病中的作用越来越受到人们的重视,对肺结核易患基因的研究一直没有停止。2005 年 4 月,研究者通过动物实验发现了一种位于鼠类肺结核超易感 1(Super-susceptibility to tuberculosis 1,sst1)基因座上,能调节结核病先天免疫力的新基因 -Ipr1(细胞内病原体抗体 -1)基因。实验显示 Ipr1 基因在抗

表 3 4 位点各基因型与肺结核易患性关系

基因位点	基因型	病例组(%)	对照组(%)	χ^2	P 值
rs1135791	TT	55(55.00)	75(70.75)	5.49	0.019 2
	CT	45(45.00)	31(29.25)		
rs722555	AA	12(12.00)	23(21.70)		
	AG	56(56.00)	63(59.43)	6.468 9	0.039 4
	AG	32(32.00)	20(18.87)		
rs116799831	AA	21(21.00)	44(41.51)		
	AG	56(56.00)	58(54.72)	18.11	<0.01
	GG	23(23.00)	4(3.77)		
rs3948464	CC	91(91.00)	66(62.26)	23.44	<0.01
	CT	9(9.00)	40(37.74)		

表 4 4 位点等位基因频率分布

基因位点	等位基因	病例组(%)	对照组(%)	χ^2 值	P 值
rs1135791	T	155(77.50)	181(85.38)	4.244 9	0.039 4
	C	45(22.50)	31(14.62)		
rs722555	A	80(40.00)	109(51.42)	5.400 8	0.020 1
	G	120(60.00)	103(48.58)		
rs116799831	A	98(49.00)	146(68.87)	17.36	<0.001
	G	102(51.00)	66(31.13)		
rs3948464	C	191(95.5)	172(81.13)	20.27	<0.01
	T	9(4.5)	40(18.87)		

维普资讯 http://www.cqvip.com

性鼠巨噬细胞中表达并在结核杆菌感染、活化巨噬细胞后表达上调，而在易感鼠巨噬细胞中不表达，这说明，Ipr1 基因的表达可有效抑制结核杆菌在细胞内和细胞外的繁殖，其很可能是一种能调节结核病先天免疫力的新基因[3]。人体中 Sp110b 与 Ipr1 蛋白有 41%的同源性；目前对 Sp110b 功能学研究后人们推测，Sp110 可能在细胞核激素受体，干扰素信号传输和病原体之间介导了一种相互交叉作用，从而影响机体感染结核杆菌后的发生、发展过程。

Sp110 基因作为可能与人类肺结核易患性相关的一个新候选基因而被纳入研究范围中：T Thye 等在非洲西部人群中进行了研究，对 24 个研究对象进行基因分型，结果没有发现 Sp110 基因多态性与肺结核之间的联系[6]；Kerrie Tosh 等人在非洲西部（冈比亚、几内亚、几内亚 Bissau 共和国）的研究发现 Sp110 基因 rs2114592、r3948464、Sp110int10 多态性与结核易患性相关；在冈比亚、几内亚人群中，r3948464 的 C 等位基因与肺结核易患性相关[7]。现阶段的研究还很少，而且主要集中在非洲西部人群中，本研究针对重庆市汉族人群的研究在国内乃至世界尚属首例。

本次研究结果显示：重庆市汉族人群 Sp110 基因 rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 4 个位点 SNP 可能与群肺结核易感性相关，Sp110 基因 rs1135791 CT 基因型、rs722555 GG 基因型、rs116799831 GG 基因型、rs3948464 CC 基因型还可能是重庆市汉族人群肺结核的易感基因型；rs1135791 C 等位基因、rs722555 G 等位基因、rs116799831 G 等位基因及 rs3948464 C 等位基因可能是使重庆市汉族人群肺结核易患性增加的危险等位基因。

由于时间限度和实际情况，本次研究还存在许多不足。接下来的工作中，我们还应扩大样本量、选取更广泛地区更大范围的人群进行基因分型研究，以获得比较完整的基因频率数据。研究筛选出的 4 个位点 rs1135791、rs722555、rs116799831、rs3948464 均位于外显子区，但是由于位点基因型的改变直接影响 Sp110 基因的功能，还是由于同另一尚未发现的功能性多态现象存在连锁不平衡造成本次研究得出的相关性结果，目前尚不清楚。解决这个问题有待于我们对不同基因型功能学的进一步研究。

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[J]. N Engl J Med,1998;338(1):640-644.

[2] 刘 玮，张翠英，吴晓明，等.维生素 D 受体多态性与肺结核易患性的病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志，2003；24(5)：389-392.

[3] Hui P,Bo-Shiun Y.Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis[J]. Nature,2005;434(2):767-772.

[4] Kerrie T,Sarah J. Variants in the Sp110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in west Afirca[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006;103(27):10364-10368.

[5] Fukuda K,Tsuchihara K,Hijikata M,et al. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1,in response to mitogenic stimuli[J]. Hepatology,2001;33(3):159-165.

[6] Thye T,Browne EN. No associations of human pulmonary tuberculosis with Sp110 variants[J]. J. Med. Genet,2006;43(4):e32.

[7] Kerrie T,Sarah J. Variants in the Sp110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in west Afirca[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006;103(27):10364-10368.

（责任编辑：谭乐勤）

（上接第 422 页）

al BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone[J]. Reproduction,2006;131(3):591-602.

[9] 杨正望，尤昭玲，冯光荣，等. 多囊卵巢综合征动物模型的构建及中药干预机制述评[J]. 湖南中医学院学报，2006；26(2)：56-58.

[10] Honnma H,Endo T,Henmi H,et al. Altered expression of Fas/Fas Ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats[J]. Apoptosis,2006;11(9):1525-1533.

[11] Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease:an update[J]. Fertility and sterility,2005;84(2):1228-1234.

[12] Manni L,Lundeberq T,Aloe L, et al. Ovarian expression of alpha(1)- and beta(2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries[J]. Auton Neurosci,2005;118(1-2):79-87.

[13] Poretsky L,Clemons J,Bogovich K. Hyperinsulinenia and human chorionie gonadotropin synergistically promote the growth of ovarian follicular cysts in rats[J]. Metabolism,1992;41(8):903-910.

[14] 冯光荣，尤昭玲，贺 冰，等. 多囊卵巢综合征动物模型建立的研究现状与展望[J]. 湖南中医药导报，2004；10(1)：45-46.

[15] 丰有吉，冯 铿，主编. 妇产科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2005.254.

（责任编辑：关蕴良）