

• 论 著 •

甘露糖结合凝集素水平的调节与肺结核易感性关系的研究*

刘 洋¹, 郭艳玲^{2#}, 姜广路³, 孙 琦⁴, 郑素华¹, 张宗德^{4△}(北京市结核病胸部肿瘤研究所/首都医科大学附属北京胸科医院: 1. 流行病学研究室;
2. 检验科; 3. 参比室; 4. 分子生物学实验室 101149)

摘要:目的 研究甘露糖结合凝集素(MBL)水平的调节与肺结核易感性的关系。方法 对 142 例肺结核患者和 120 例健康对照者血清中 MBL 水平进行测定。同时采用限制性片段长度多态性分析方法对 MBL2 基因多态性进行测定。结果 采用单因素方差分析不同基因型组的 MBL 水平, YA/YA 组, XA/YA 组和 XA/XA、YA/YB、XA/YB、YB/YB 组, 发现 3 组之间和任何两组之间的 MBL 水平差异均有统计学意义($P < 0.01$)。肺结核患者 MBL 水平显著高于健康对照($P < 0.01$)。健康对照者中携带 YA/YA 基因的个体中有 93.2%(55/59)的 MBL 水平大于 1 000 ng/mL。而携带 XA/XA 或 B 等位基因的个体 100%(26/26)的 MBL 水平小于或等于 1 000 ng/mL。结论 MBL 水平可能与肺结核易感性有关, 而决定高水平 MBL 的 YA/YA 基因可能是一种保护性基因。

关键词:甘露糖结合凝集素; 多态性; 结核; 易感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)13-1767-03

Study on relation between regulation of MBL level and pulmonary tuberculosis susceptibility*

LIU Yang¹, GUO Yanling², JIANG Guanglu³, SUN Qi⁴, ZHENG Suhua¹, ZHANG Zongde^{4△}(1. Beijing Municipal Institute of Tuberculosis and Chest Tumor/Research Room of Epidemiology;
2. Department of Clinical Laboratory; 3. Reference Room; 4. Experiment Room of Molecular Biology,
Affiliated Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China)

Abstract: Objective To study the relation between the regulation of mannose-binding lectin (MBL) level and pulmonary tuberculosis (TB) susceptibility. **Methods** A total of 142 inpatients with pulmonary TB and 120 healthy controls were recruited to participate in this case-control study. Serum MBL level was detected, meanwhile the restriction fragment length polymorphism (RFLP) was adopted to detect MBL2 gene polymorphism. **Results** The one-way analysis of variance was adopted to analyze the MBL level in different genotype groups, including the group YA/YA, XA/YA, XA/XA, YA/YB, XA/YB and YB/YB, it was found that the MBL level had statistical differences among 3 groups and between any two groups ($P < 0.01$). The MBL level in the pulmonary TB group was significantly higher than that in the healthy control group ($P < 0.01$). Among the healthy controls, the MBL level in 93.2% individuals (55/59) carrying YA/YA genotype was $> 1\ 000$ ng/mL, while which in 100% individuals (26/26) carrying genotype XA/XA or allele B was $\leq 1\ 000$ ng/mL. **Conclusion** The MBL level may be associated with the susceptibility to pulmonary TB. The YA/YA gene for determining high MBL level may be a protected gene.

Key words: mannose binding lectin; polymorphism; tuberculosis; susceptibility

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种感染性疾病, 每年大约有二百万人因感染结核而死亡。由于多耐药及超级耐药菌的出现导致结核病疫情不断加剧^[1]。在结核病发生过程中, 结核分枝杆菌与环境、宿主间复杂的相互作用可能起到关键的影响。而某种程度上宿主因素可能决定结核易感性^[2]。甘露糖结合凝集素(MBL)是一种 Ca^{2+} 依赖型凝集素家族中的急性期蛋白, 为天然免疫系统中一个关键因子。它可通过碳水化合物识别区识别病原微生物^[3-4]。MBL 由 MBL2 编码, 后者位于第 10 号染色体上, 有 7 个 MBL2 单核苷酸多态性 (SNPs) 可能与 MBL 水平或功能相关。在外显子 1 区有 3 个单核苷酸改变将野生型变为突变型 (A/B, A/C 和 A/D), 这些改变打破胶原结构从而形成功能性寡聚物。此外位于启动子和 5'-非翻译区的其他等位基因如 H/L、X/Y、P/Q, 也可被 SNPs 鉴定, 其中等位基因 X 表现出更低的转录活性^[5]。

MBL 基因多态性与结核易感性的关系有过相关报道, 但 MBL 基因多态性与 MBL 水平关系以及 MBL 水平与结核关系报道较少。一些研究者发现低水平的血清 MBL 能抑制结核菌感染^[6-7], 而另一些研究则有相反的观点^[8-9]。本文通过 MBL2 基因多态性与 MBL 水平关系及肺结核患者与健康对照者 MBL 水平比较, 探讨 MBL 水平与肺结核易感性关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 1 月至 2012 年 6 月首都医科大学附属北京胸科医院收治入院的肺结核患者 142 例, 患者诊断标准参照中华医学会结核病临床诊疗指南, 除肿瘤、肺炎、糖尿病等疾病。另选取本院同期健康体检者 120 例作为健康对照, 排除既往有肺结核病史者。本研究经北京市胸科医院伦理委员会批准, 所有纳入研究者均签署知情同意书。

1.2 标本收集与 DNA 提取 抽取患者和健康对照者静脉血

* 基金项目:北京市科技新星基金项目(2008A040);北京市优秀人才培养项目(2012D00303400006)。

作者简介:刘洋,男,副研究员,主要从事结核分子生物学和流行病学研究。 # 共同第一作者:郭艳玲,女,副研究员,主要从事临床微生物鉴定和分子生物学研究。 △ 通讯作者, E-mail: zzd417@163.com。

4 mL, 3 000×g 离心分离血清。同时抽取患者和健康对照者静脉血 2 mL 经乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。采用血液 DNA 抽提试剂盒(MBI 公司, 美国)进行 DNA 提取。具体操作按照说明书进行。将提取的 DNA 储存在 -20 °C 冻存。

1.3 MBL2-221X/Y 和外显子 154A/B 基因分型 对 -221 位点和外显子区 54 号位点限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)进行基因分型。引物序列为(1)5'-ACC TGG GTT TCC ACT CAT TCT CAT-3', (2)5'-CCC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG-3', 扩增产物为 623 bp。反应体系为 50 μL, PCR 反应条件为: 95 °C 4 min; 之后 95 °C 30 s, 63 °C 1 min, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物经柱式纯化试剂盒(MBI 公司, 美国)纯化后分别采用 Btg I (NEB 公司, 美国)和 BshN I (MBI 公司, 美国)进行酶切消化, 酶切体系为 20 μL, 37 °C 过夜消化。Btg I 针对 X/Y 基因型(Y 等位基因为 540 bp), BshN I (A 等位基因为 536 bp)。扩增产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。根据 PCR 产物条带数及位置确定基因型。

1.4 血清 MBL 水平测定 采用人 MBL ELISA Kit (R&D, 美国)对 142 例肺结核患者和 120 例健康对照者的血清 MBL 水平进行测定。具体操作按照说明书进行。同时对 MBL2 基因多态性与 MBL 水平关系及肺结核患者和健康对照者之间血清 MBL 水平进行分析比较。

1.5 验证 MBL2 基因多态性和 MBL 水平的关系 将 MBL2 二倍体型分为 3 组, 分别为 YA/YA 组, XA/YA 组和 XA/XA、YA/YB、XA/YB、YB/YB 组, 比较组间 MBL 水平差异。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计分析。采用单因素方差分析, 对不同 MBL2 基因型与 MBL 水平之间差异进行比较。采用 t 检验对肺结核患者与健康对照者的 MBL 水平进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺结核患者和健康对照者的 MBL 水平比较 肺结核患者 MBL 水平为 $(2\ 291.6 \pm 1\ 575.9)$ ng/mL, 健康对照者为 $(1\ 721.1 \pm 1\ 423.3)$ ng/mL, 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 肺结核患者血清中 MBL 水平更高。肺结核患者 MBL 基因 YA/YA 二倍体型有 49 例, 频率为 34.5%, 健康对照者 YA/YA 二倍体型为 59 例, 频率为 49.2%, 二者差异有统计学意义 ($P = 0.016$), 而 MBL2 基因 XA/XA 二倍体型则在肺结核患者中相对更多有 15 例 (10.6%), 健康对照者为 2 例 (1.7%), 二者差异有统计学意义 ($P = 0.004$)。见表 1。

表 1 不同二倍体型在肺结核患者与健康对照者之间的比较[n(%)]

基因型	患者	健康对照者	P	OR 值(95%CI)
YA/YA	49(34.5)	59(49.2)	0.016	0.54(0.33~0.89)
YA/XA	36(25.4)	35(29.1)	0.489	0.82(0.48~1.42)
YB/YB	6(4.2)	2(1.7)	0.296	2.60(0.52~13.14)
YA/YB	27(19.0)	17(14.1)	0.296	1.42(0.73~2.76)
XA/XA	15(10.6)	2(1.7)	0.004	6.97(1.56~31.12)
XA/YB	9(6.3)	5(4.2)	0.436	1.56(0.51~4.78)

2.2 MBL2 基因多态性和 MBL 水平的关系 YA/YA 组, XA/YA 组和 XA/XA、YA/YB、XA/YB、YB/YB 组之间 MBL 水平差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 此外任何两组之间也差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。在健康对照者中携带 YA/YA 基因的个体中有 93.2% (55/59) 的 MBL 水平大于 1 000

ng/mL。而携带 XA/XA 或 B 等位基因的个体 100% (26/26) 的 MBL 水平小于或等于 1 000 ng/mL。

表 2 不同二倍体型在肺结核患者和健康对照者中的 MBL 水平($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

二倍体型	患者		健康对照者	
	n	MBL	n	MBL
YA/YA	49	3 675.6 ± 1 224.4	59	2 882.3 ± 1 151.1
YA/XA	36	2 642.3 ± 1 048.1	35	754.7 ± 385.7
其他	57	767.7 ± 390.7	26	387.1 ± 162.2

3 讨 论

由于 MBL 基因启动子区与外显子各位点存在连锁不平衡。到目前为止, 仅证实了 LYPA、LYPB、HYPA、HYPD、LX-PA、LYQA、LYQC 共 7 种单体型^[10]。本研究中, 针对 MBL2 基因-221Y/X 和外显子 1 密码子 54 A/B 进行分析发现, 研究人群中仅有 YA、XA、YB 3 种单倍体型。基因型 YA/YA 在健康对照者中频率更高。说明 YA/YA 或许是一种保护性基因型而 XA/XA 则有可能是一种结核病易感基因型。这一结果与文献[10-11]研究结果一致。但有研究认为 X、Y 等位基因与肺结核发生无关^[12]。考虑到结核分枝杆菌与人类相互作用的进化史, 许多基因突变发生频率较高, 有研究者指出不同生活环境选择压力可能使 MBL 基因型发生突变并对结核感染产生强烈的表型影响^[12]。所有这些研究表明结核感染的发生是一个复杂的过程。

MBL 由肝脏分泌, 是一种钙依赖因子, 同时具有胶原区及凝集素域为特征的胶凝素家族的成员, 可与广泛表达于病原菌的糖类结合 (特别是甘露糖和 N-乙酰葡萄糖残基)。MBL 在宿主防御病原微生物中起到重要作用。这些病原微生物包括细菌、真菌、寄生虫和病毒^[13-16]。通过与结核分枝杆菌结合, MBL 起到调理素作用, 增强吞噬作用, 并促进炎症反应以释放细胞因子。因此, 有研究者认为高水平血清 MBL 可能通过促进对结核分枝杆菌调理作用导致结核感染概率增加。此外, MBL 可能增强对其他分枝杆菌吞噬活性, 并引起 MBL 缺乏从而对诸如麻风分枝杆菌感染起到保护性防御作用^[17]。这与本研究结果一致。同时为证实 MBL 基因与与血清 MBL 水平关系, 本研究对肺结核患者和健康对照者中不同基因型的 MBL 水平进行比较, 发现 MBL 在不同二倍体型之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 不同组中两两比较仍有显著性差异。虽然还不能定义 MBL 缺乏的标准, 但有研究通过对大样本 ($n = 1\ 037$) 进行分析后将 MBL 水平 $\leq 1\ 000$ ng/mL 作为部分和严重的 MBL 缺乏^[18]。本研究结果几乎与这一研究一致。在健康人群中携带 YA/YA 基因的个体中有 55/59 (93.2%) 的 MBL 水平大于 1 000 ng/mL, 在 XA/XA 或 B-携带个体中达到 100% (26/26)。

有研究者对涉及 MBL2 基因型和/或 MBL 水平与结核病关系的 17 个实验进行 meta 分析后发现, 血清 MBL 水平在结核感染时均升高。这或许表明高水平 MBL 与结核易感性显著相关。本研究结果与这些研究一致。近年来, 有研究对结核病患者中非吸烟人群进行研究, 被动吸烟, 烹调采用固体燃料, 以及 MBL 基因多态性均与结核易感性有关。说明结核病发生涉及环境、遗传、宿主内环境等多因素, 还需要对相关机制进行进一步的探讨。

总之, 本研究表明高水平 MBL 或许与结核易感性显著

相关。启动子-221 (Y/X) 和外显子 1 密码子 54 (A/B) MBL 基因突变与肺结核易感性有关。而 YA/YA 可能对肺结核病发生起到保护作用。尽管环境、遗传、宿主内环境等多种因素涉及结核病产生,通过结核病 MBL 水平测定以及 MBL 基因多态性与 MBL 水平相互关系与结核易感性的研究,将有助于了解结核病的发生机制,为结核病的控制提供思路。

参考文献

[1] Denholm JT, McBryde ES, Eisen DP. Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis [J]. Clin Exp Immunol, 2010, 162(1): 84-90.

[2] Moller M, Hoal EG. Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2010, 90(12): 71-83.

[3] Orsatti CL, Nahás EA, Nahas-Neto J, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism and risk factors for cardiovascular disease in postmenopausal women[J]. Mol Immunol, 2014, 61(1): 23-27.

[4] Heitzeneder S, Seidel M, Förster-Waldl E, et al. Mannan-binding lectin deficiency-good news, bad news, doesn't matter[J]. Clin Immunol, 2012, 143(13): 22-38.

[5] Zhang DF, Huang XQ, Wang D, et al. Genetic variants of complement genes ficolin-2, mannose-binding lectin and complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China[J]. Hum Genet, 2013, 132(6): 629-640.

[6] Selvaraj P, Jawahar MS, Rajeswari DN, et al. Role of mannose binding lectin gene variants on its protein levels and macrophage phagocytosis with live Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 46(3): 433-437.

[7] Søborg C, Madsen HO, Andersen AB, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2003, 188(5): 777-782.

[8] Da Cruz HL, Da Silva RC, Segat L, et al. MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a north-eastern Brazilian population[J]. Infect Genet Evol, 2013, 19(19): 323-329.

[9] Liu W, Zhang F, Xin ZT, et al. Sequence variations in the

MBL gene and their relationship to pulmonary tuberculosis in the Chinese Han population[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(10): 1098-1103.

[10] Hijikata M, Matsushita I, Hang NT, et al. Age-dependent association of mannose-binding lectin polymorphisms with the development of pulmonary tuberculosis in Viet Nam[J]. Hum Immunol, 2014, 75(8): 840-846.

[11] Capparelli R, Iannaccone M, Palumbo D, et al. Role played by human mannose-binding lectin polymorphisms in pulmonary tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2009, 199(5): 666-672.

[12] Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis[J]. Infect Immun, 2012, 80(10): 3343-3359.

[13] Van Emmerik LC, Kuijper EJ, Fijen CA, et al. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis[J]. Clin Exp Immunol, 1994, 97(3): 411-416.

[14] Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults[J]. Lancet, 1995, 345(8954): 886-889.

[15] Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases[J]. Clin Infect Dis, 2003, 37(11): 1496-1505.

[16] Eisen DP, Dean MM, Boermeester MA, et al. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection[J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(4): 510-516.

[17] Dornelles LN, Pereira-Ferrari L, Messias-Reason I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 145(3): 463-468.

[18] Albert RK, Connett J, Curtis JL, et al. Mannose-binding lectin deficiency and acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2012, 7(7): 767-777.

(收稿日期:2016-02-12 修回日期:2016-04-24)

(上接第 1766 页)

体在小细胞肺癌诊断及预后的临床价值[J]. 国际肿瘤学杂志, 2007, 34(3): 216-218.

[4] 赵肖, 王孟昭. 肺癌血清肿瘤标志物的临床意义[J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(3): 286-291.

[5] 陈梅, 周静, 陈绪元. 肿瘤标志物检测在非小细胞肺癌化疗中的临床意义[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(16): 1512-1514.

[6] Yamaguchi K, Katagiri H, Takahashi M, et al. ProGRP is a possible tumor marker for patients with Ewing sarcoma [J]. Biomed Res, 2015, 36(4): 273-277.

[7] 赵先文, 荆洁线, 韩存芝, 等. 小细胞肺癌血清 ProGRP (31-98)与神经元性烯醇化酶同步检测的临床价值及其相关性[J]. 肿瘤研究与临床, 2011, 23(8): 518-521.

[8] 杨焕莲, 宋丽华. 肿瘤标志物对肺癌疗效判断的临床价值 [J]. 山东医药, 2009, 49(52): 110-111.

[9] 张晓丰, 陆友金. 肺癌标志物临床研究评点[J]. 临床肺科杂志, 2010, 7(7): 997-999.

[10] Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, et al. American society of clinical oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003 [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(2): 330-353.

[11] 王莉, 贾志凌, 于忠和, 等. 血清 Pro-GRP 和 NSE 检测在小细胞肺癌中的意义[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(9): 1235-1236.

(收稿日期:2016-01-25 修回日期:2016-04-06)