

· 论 著 ·

维生素 D 受体基因多态性与藏族儿童结核病易感性研究*

张 弢¹, 张艳虹¹, 朱国龙¹, 李天如¹, 王森舟^{2△}

(1. 青海省妇女儿童医院感染消化科, 西宁 810001; 2. 青海大学附属医院肿瘤科, 西宁 810001)

摘要:目的 探讨维生素 D 受体基因 Fok I、Bsm I 多态性与青藏高原藏族儿童结核病易感性的相关性。方法 选取青海省妇女儿童医院 2013—2015 年的 162 例藏族儿童活动性肺结核患者作为病例组, 167 例有分枝杆菌接触史的同民族健康者作为对照组。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析方法对两组研究对象进行维生素 D 受体基因 Fok I、Bsm I 多态性的检测, 根据不同标本中分布结果进行统计学分析以研究两种多态性与青藏高原藏族儿童肺结核易感性的关系。结果 病例组的 FF、Ff 与 ff 3 种基因型频率高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $OR = 2.692$, $95\%CI: 1.349 \sim 5.373$)。病例组的 BB、Bb、bb 3 种基因型与对照组的相应基因型频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $OR = 1.009$, $95\%CI: 0.560 \sim 1.816$)。结论 维生素 D 受体的 Fok I 多态性与高原藏族儿童肺结核易感性相关, 其 ff 基因型可能是发病的风险因素, 而与 Bsm I 多态性则无关。

关键词: 维生素 D 受体; 青藏高原; 藏族儿童; 结核

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.19.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)19-2853-03

Study on vitamin D receptor gene polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility among Tibetan children in Qinghai-Tibetan plateau*

ZHANG Tao¹, ZHANG Yanhong¹, ZHU Guolong¹, LI Tianru¹, WANG Miaozhou^{2△}

(1. Department of Infectious Gastroenterology, Qinghai Provincial Women and Children's Hospital, Xining, Qinghai 810001, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China)

Abstract: Objective To study the correlation between vitamin D receptor (VDR) gene Fok I and Bsm I polymorphisms with pulmonary tuberculosis (PTB) susceptibility among Tibetan children in Qinghai-Tibetan plateau. Methods One hundred and sixty-two Tibetan children cases of PTB in the Qinghai Provincial Women and Children's Hospital during 2013 to 2015 were selected as the cases group and 167 healthy Tibetan children with mycobacterial contact history as the healthy control group. The VDR gene Fok I and Bsm I in the two groups were detected by PCR-RFLP. The association between two kinds of polymorphisms with PTB susceptibility were analyzed by adopting PCR-RFLP. Then the distribution results of different samples were performed the statistical analysis for conducting the relationship between the two kinds of polymorphisms and PTB susceptibility of Tibetan children.

Results The genotype frequencies of FF, Ff and ff in the cases group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$, $OR: 2.692$, $95\%CI: 1.349 - 5.373$). The genotype BB, Bb and bb had no statistically significant difference between the cases group and control group ($P > 0.05$, $OR: 1.009$, $95\%CI: 0.560 - 1.816$). **Conclusion** The VDR Fok I gene polymorphism is correlated with the PTB susceptibility among Tibetan children in Qinghai-Tibetan plateau, its genotype ff might be an onset risk factor. But the Bsm I polymorphism has no relationship with PTB onset.

Key words: vitamin D receptor; Qinghai-Tibetan plateau; Tibetan children; tuberculosis

结核病 (TB) 是由结核分枝杆菌感染引起的疾病, 是仅次于艾滋病的导致人类死亡的感染性疾病^[1]。TB 在发达国家以中老年人人居多, 而在发展中国家则以青少年居多。由于儿童生理特点, 使儿童 TB 在很多方面与成人 TB 不同。藏族人群由于长期居住于高原特殊环境, 在进化中可能形成某些结核易感基因。维生素 D 受体基因 (VDR) 最初被发现与骨质疏松密切相关, 并逐渐发现该基因与肿瘤、代谢性疾病、感染性疾病等存在关联^[2-4]。因此, 本研究靶向青藏高原藏族儿童 TB 患者, 对 VDR 的 Fok I、Bsm I 多态性与 TB 的相关性进行研究, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取青海省妇女儿童医院 2013—2015 年收

治的 162 例青藏高原藏族儿童活动性肺结核患者作为病例组, 其中男 72 例, 女 90 例, 年龄 0~16 岁。根据病史、临床表现、细菌学及影像学检查确诊为肺结核, 且排除患有自身免疫性疾病、内分泌系统疾病、人类免疫缺陷病毒感染及长期使用肾上腺皮质激素或其他免疫抑制剂的患者。把有结核分枝杆菌接触史的藏族健康儿童 167 例作为对照组, 其中男 76 例, 女 91 例, 年龄 0~16 岁。结核菌素试验 (PPD) 硬结反应平均直径 < 5 mm, 均经胸透检测无异常发现, 随访 1 年, 未发现罹患结核者。

1.2 仪器与试剂 K960 聚合酶链反应 (PCR) 仪 (杭州晶格科学仪器有限公司); MA-1000 分光光度计 (美林恒通); Champ-Gel 5000 凝胶成像仪 (北京赛智创业科技有限公司); D3024R

* 基金项目: 青海省科技计划资助项目 (2013-Z-740)。

作者简介: 张弢, 男, 副主任医师, 主要从事小儿感染方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 18609780037@163.com。

离心机高速冷冻离心 (SCIOLOGEX)。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), HsTaq 酶 (TaKaRa), Fok I, Bsm I 限制性内切酶 (Thermo), DNA LADDER (Thermo)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 抽取受试者外周静脉血 200 μL, 以 DNeasy Blood & Tissue Kit 按试剂盒说明书从血中分离白细胞, 并分离获得 DNA。

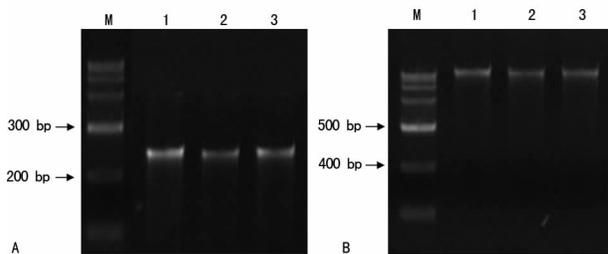
1.3.2 PCR 引物序列 Fok I 多态性: 上游 AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT, 下游 ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC。Bsm I 多态性: 上游 CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA, 下游 AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG。PCR 反应体系: DNA 模板 100 ng, primers (10 μmol/L) 0.3 μL, 10×PCR Buffer 1.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.2 μL, Taq 酶 0.1 μL, 总反应体系 15 μL。以 PCR 仪进行目的基因扩增, 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。2.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

1.3.3 限制性片段多态性分析 分别以 Fok I 限制性内切酶及 Bsm I 限制性内切酶对 VDR 基因的 Fok I、Bsm I 多态性进行分型。VDR Fok I 分为 FF、Ff、ff 3 种基因型, Bsm I 分为 BB、Bb、bb 3 种基因型。酶切反应体系: PCR 产物 5 μL, Fok I 内切酶或 Bsm I 内切酶 0.5 μL, 10×buffer 0.75 μL, 反应体系 10 μL。37 °C 酶切 1.5 h。2.5% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V 电压) 对 4S Green Plus 无毒核酸染料染色的酶切产物进行检测, 凝胶成像系统观察。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行分析处理, 组间比较采用 χ² 检验, 检验水准 α=0.05, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物 Fok I 多态性 PCR 产物为 267 bp, 见图 1A。Bsm I 多态性 PCR 产物为 822 bp, 见图 1B。



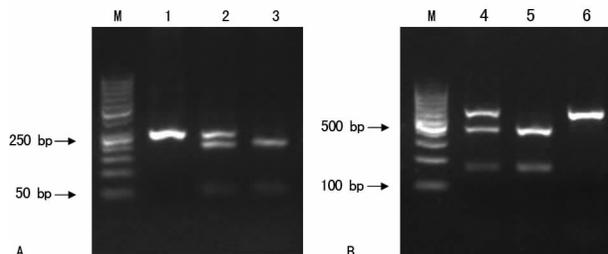
注: M 表示 Marker; 1~3 表示 PCR 电泳产物

图 1 VDR 基因 Fok I、Bsm I 多态性 PCR 产物电泳结果

2.2 酶切产物 VDR 受体基因 Fok I 多态性 F 基因型不具有 Fok I 酶切位点, 因此, FF 纯合子酶切显示 1 条 267 bp 的片段, f 基因型具有 Fok I 酶切位点, ff 纯合子酶切显示 2 条大小分别为 207、60 bp 的片段, Ff 为杂合子, 酶切显示大小为 267、207、60 bp 的 3 个片段, 见图 2A。VDR 受体基因 Bsm I 多态性 B 基因型不具有 Bsm I 酶切位点, 因此, BB 纯合子酶切显示 1 条 822 bp 的片段, b 基因型具有 Bsm I 酶切位点, bb 纯合子酶切显示 2 条大小分别为 646、176 bp 的片段, Bb 为杂合子, 酶切显示大小为 822、646、176 bp 3 个片段, 见图 2B。

2.3 基因型及等位基因分布频率的分析 病例组 VDR 基因

Fok I 多态性的 FF、Ff 与 ff 3 种基因型与对照组的相应基因型比较, 差异有统计学意义 (χ²=8.85, P=0.013)。等位基因分析显示, 病例组的 F、f 2 个等位基因的频率与对照组的相应基因频率比较, 差异有统计学意义 (χ²=6.25, P=0.01)。Bsm I 多态性在病例组中 BB、Bb、bb 3 种基因型分别与对照组的相应基因型进行比较, 差异无统计学意义 (χ²=0.976 P=0.614)。等位基因分析显示, 病例组的 B、b 2 个等位基因频率与对照组的相应基因频率比较, 差异无统计学意义 (χ²=0.989, P=0.32)。见表 1、2。



注: M 表示 Marker; 1 表示 FF; 2 表示 Ff; 3 表示 ff; 4 表示 Bb; 5 表示 bb; 6 表示 BB

图 2 VDR 基因 Fok I、Bsm I 多态性 PCR-RFLP 琼脂糖电泳

表 1 维生素 D 受体 Fok I、Bsm I 基因多态性与青藏高原藏族儿童肺结核易感性分析 [n(%)]

基因型	病例组 (n=162)	对照组 (n=167)	OR(95%CI)
Fok I			
FF	55(33.9)	70(41.9)	0.712(0.455~1.114)
Ff	77(47.6)	84(50.3)	0.895(0.581~1.380)
ff	30(18.5)	13(7.8)	2.692(1.349~5.373)
Bsm I			
BB	2(1.3)	1(0.6)	2.075(0.186~23.109)
Bb	24(14.8)	20(11.9)	1.278(0.676~2.418)
bb	136(83.9)	146(87.5)	1.009(0.560~1.816)

表 2 青藏高原藏族结核儿童维生素 D 受体 Fok I、Bsm I 等位基因分布频率 [n(%)]

基因型	病例组 (n=162)	对照组 (n=167)
Fok I		
F	187(57.7)	224(67.1)
f	137(42.3)	110(32.9)
Bsm I		
B	28(8.6)	22(6.6)
b	296(91.4)	312(93.4)

3 讨论

虽然结核杆菌是 TB 的病原菌, 但 TB 的发病依然受除致病菌之外的诸如环境因素及宿主易感基因多态性等的影响。儿童在机体免疫方面与成人有着一定的差异, 而且由于藏族儿童定居高原, 环境具有低压、低氧、寒冷的特点, 可能表现出一定的易感基因多态性特点。因此, 在分子水平上对藏族儿童结

核易感基因多态性与结核发生、发展关系进行研究,将有利于进一步了解藏族儿童 TB 的发病机制,制订更加有效的防治方法,以改善 TB 的预后。

维生素 D 受体是一种亲核蛋白,介导 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 发挥相应生物学效应,属超家族成员^[5]。根据特定限制性内切酶识别位点,VDR 具有 Fok I、Bsm I、Taq I、Apa I 等酶切位点。有研究显示 VDR 多态性与 TB 发生、发展相关^[6-7]。本研究检测了 VDR 基因的 Fok I、Bsm I 多态性在青藏高原藏族儿童结核病患者及同民族健康儿童中的表达情况,结果发现 VDR 基因 Fok I 多态性的各基因型频率在两组之间的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。VDR 基因 Fok I 的 ff 基因型者罹患结核的风险是 FF 基因型者的 3.781 倍(95% CI: 1.349~5.373)。Wu 等^[8]在藏族、汉族人群中的研究及 Lee 等^[9]的研究均发现 Fok I 的 ff 基因型为结核易感基因型。Gao 等^[10]通过 Meta 分析发现在亚洲人群中 Fok I ff 基因携带者结核发病风险约增加 1 倍($OR = 2.0, 95\% CI: 1.300 \sim 3.200$);Cao 等^[11]及 Huang 等^[12]等通过 Meta 分析也得出了同样的结果。因此可推测 VDR 基因 Fok I 多态性的 ff 基因型引起维生素 D 受体的结构和功能发生改变并进而导致宿主的免疫功能发生相应变化。其机制可能是该位点在 VDR 基因的第 2 外显子的起始密码子 ATG 发生 T→G 转换,而 f 基因的这种转换造成了该起始位点与转录因子 II B 不能有效地相互作用,从而降低了转录效率,并使翻译出来的蛋白质减少了 3 个氨基酸,进而造成 VDR 不能有效地结合 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$,导致其难以协同单核巨噬细胞系统发挥抑制结核分枝杆菌生长的作用。

VDR 基因的 Bsm I 多态性位点位于 VDR 基因 3' 的第 8 内含子处,可以影响 mRNA 并进而影响氨基酸序列,产生相应生物学效应。本研究在高原藏族儿童结核病患者中 VDR b 基因型未显示出明显的结核易感相关性($OR = 1.009, 95\% CI: 0.560 \sim 1.816$)。Rathored 等^[13]对印度北部人群研究显示,该地区居民 VDR b 基因型与结核易感性无关。Sinaga 等^[14]对印度尼西亚巴塔克族人群的结核易感基因研究中发现,Bsm I 的 bb 基因型与结核易感性具有相关性,可以降低结核的发病风险。而 Cao 等^[11]通过 Meta 分析发现,Bsm I bb 基因型的亚洲人群中,结核病的发病风险明显降低。以上研究提示 VDR 的 Bsm I 基因多态性对 TB 的影响可能具有民族差异性。因此,在青藏高原藏族儿童中,VDR 的 Fok I 多态性的 ff 基因型具有结核易感性,而 Bsm I 基因多态性的基因型与结核易感性无明显相关性。

参考文献

[1] Jeyaseelan L, Williams D, Tibrewal S, et al. Tuberculosis of the cuboid; a case report and review of the literature [J]. J Foot Ankle Surg, 2015, 54(4): 713-716.
 [2] Abd-El salam EA, Ismaeil NA, Abd-El salam HS. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk among postmenopausal Egyptian women[J]. Tumour Biol, 2015, 36(8): 6425-6431.

[3] Abd-Allah SH, Pasha HF, Hagrass HA, et al. Vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children[J]. Gene, 2014, 536(2): 430-434.
 [4] Abdollahzadeh R, Fard MS, Rahmani F, et al. Predisposing role of vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in the development of multiple sclerosis; A case-control study [J]. J Neurol Sci, 2016, 367: 148-151.
 [5] Takada I, Makishima M. Therapeutic application of vitamin D receptor ligands; an updated patent review[J]. Expert Opin Ther Pat, 2015, 25(12): 1373-1383.
 [6] Fol M, Druszczynska M, Wlodarczyk M, et al. Immune response gene polymorphisms in tuberculosis[J]. Acta Biochim Pol, 2015, 62(4): 633-640.
 [7] Hu Q, Chen Z, Liang G, et al. Vitamin D receptor gene associations with pulmonary tuberculosis in a Tibetan Chinese population[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 469.
 [8] Wu L, Deng H, Zheng Y, et al. An association study of NRAMP1, VDR, MBL and their interaction with the susceptibility to tuberculosis in a Chinese population[J]. Int J Infect Dis, 2015, 38: 129-135.
 [9] Lee YH, Song GG. Vitamin D receptor gene Fok I, Taq I, Bsm I, and Apa I polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis; a meta-analysis[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3): 9118-9129.
 [10] Gao L, Tao Y, Zhang L, et al. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis[J]. Int J Tuberc Dis, 2010, 14(1): 15-23.
 [11] Cao Y, Wang X, Cao Z, et al. Vitamin D receptor gene Fok I polymorphisms and tuberculosis susceptibility; a meta-analysis[J]. Arch Med Sci, 2016, 12(5): 1118-1134.
 [12] Huang L, Liu CX, Liao GF, et al. Vitamin D receptor gene Fok I polymorphism contributes to increasing the risk of tuberculosis an update Meta-Analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(51): e2256.
 [13] Rathored J, Sharma SK, Singh B, et al. Risk and outcome of multidrug-resistant tuberculosis; vitamin D receptor polymorphisms and serum 25(OH)D[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2012, 16(11): 1522-1528.
 [14] Sinaga BY, Amin M, Siregar Y, et al. Correlation between Vitamin D receptor gene Fok I and BSM I polymorphisms and the susceptibility to pulmonary tuberculosis in an Indonesian Batak-ethnic population[J]. Acta Med Indones, 2014, 46(4): 275-282.

(收稿日期:2017-03-07 修回日期:2017-05-16)