

CCR2 和 CCR5 基因多态性与结核性脓胸的相关性研究

王保群¹ 方秀梅²

1. 河北师范大学附属医院, 河北石家庄 050091; 2. 河北省张家口市地方病防治所 河北张家口 075000

通讯作者: 王保群, Email:262188639@qq.com

[摘要] **目的** 探讨CCR2基因-190G/A 和 CCR5 基因-59029 G/A 单核苷酸多态性 (SNP) 与结核性脓胸的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法对 200 例结核性脓胸患者和 200 例健康人进行-190G/A 和-59029 G/A SNPs 检测, 采用逐步 Logistic 回归分析其与结核性脓胸的相关性。**结果** 与 CCR2 基因-190G/G 基因型相比, 携带 A/G 和 A/A 基因型均可增加结核性脓胸发病风险 ($OR=2.250$, $95\% CI=1.046\sim4.842$ 和 $OR=8.706$, $95\% CI=4.232\sim17.909$)。无卡介苗接种史亦增加结核性脓胸发病风险 ($OR=3.031$, $95\% CI=2.109\sim4.356$)。CCR5 基因-59029 G/A 位点各基因型未进入回归方程, 与结核性脓胸的发病风险无明显相关性。**结论** CCR2 基因-190G/A SNP 与结核性脓胸有相关性, CCR5 基因-59029 G/A SNP 可能与结核性脓胸无关。

[关键词]: 结核性脓胸; CCR2 基因; CCR5 基因; 单核苷酸多态性 (SNP)

Correlation of Gene Polymorphisms of CCR2 and CCR5 with Tuberculous Empyema

WANG Bao-qun¹, FANG Xiu-mei²

1. The Affiliated Hospital of Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050091, 2. The institute of endemic diseases of zhangjiakou city, Hebei Zhangjiakou 075000

[Abstract] **Objective:** To discuss the correlation of single nucleotide polymorphism (SNP) of CCR2 gene-190G/A and CCR5 gene-59029 G/A with tuberculous empyema. **Methods:** Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was selected to check -190G/A and -59029 G/A SNPs of 200 tuberculous empyema patients and 200 healthy people, the correlation of SNPs with tuberculous empyema was analyzed by stepwise Logistic regression. **Results:** Compared with the CCR2 gene -190G/G genotype, A/G and A/A genotype may increase the risk of tuberculous empyema ($OR = 2.250$, $95\% CI = 1.046 \sim 4.842$ and $OR = 8.706$, $95\% CI = 4.232 \sim 17.909$). No history of BCG vaccination could also increase the risk of tuberculous empyema ($OR = 3.031$, $95\% CI = 2.109 \sim 4.356$). CCR5 gene -59029 G/A locus genotypes did not enter the regression equation, and the risk of tuberculous empyema has no significant correlation with it. **Conclusion:** CCR2 gene -190G/A SNP has correlation with tuberculous empyema, CCR5 gene -59029 G/A SNP may be unrelated to tuberculous empyema.

[Keywords]: Tuberculous empyema; CCR2 gene; CCR5 gene; single nucleotide polymorphism (SNP)

结核性脓胸为胸膜腔结核杆菌严重感染, 并产生脓性渗出液积聚所致, 发病率近年来呈明显上升趋势。结核杆菌侵犯胸膜组织的过程, 是由多种细胞因子参与的细胞免疫过程。CCR2和CCR5作为重要的CC趋化因子受体, 具有调控T细胞和单核细胞/巨噬细胞系迁移、增殖与免疫的功能, 在炎症部位募集和活化免疫细胞上扮演了重要角色。我们采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 的方法对结核性脓胸与CCR2基因-190G/A和CCR5基因-59029 G/A单核苷酸多态性 (SNP) 的相关性进行了研究, 研究结果如下:

1. 对象和方法

1.1 对象 采用病例对照研究的方法, 病例组与对照组按 1:1 安排病例, 每选择一个结核性脓胸患者

就选择一个性别相同、年龄相差 5 岁以内的健康人为对照组。选择 2010 年 6 月~2014 年 6 月行手术治疗的结核性脓胸患者 200 例，术后标本均经病理学证实，同时排除 HIV 感染等免疫缺陷患者，其中男性 168 例，女性 132 例，平均年龄 40.2 ± 8.6 岁。对照组 200 例，其中男性 168 例，女性 132 例，平均年龄 40.9 ± 8.8 岁。两组年龄比较差异无统计学意义。所有研究对象的性别、年龄、身高、体重、卡介苗（BCG）接种史在经当事人知情同意前提下由专门的调查员询问调查。

1.2 研究方法 取研究对象静脉血 5ml, 经枸酸钠抗凝, 以蛋白酶消化-饱和氯化钠盐析法提取外周血白细胞 DNA。CCR2 基因-190G/A 和 CCR5 基因-59029G/A 引物均参考文献^[1,2]设计, 由上海伯昊生化科技有限公司合成。-190G/A 上游引物序列: 5'-CATTGCAATCCCAAAGACCCACTC-3', 下游引物序列: 5'-TTGGTTTTGTGGCAACATGATGG-3'。-59029 G/A 上游引物序列: 5'-CCCGTGAGCCCATAGTTAAACTC-3', 下游引物序列: 5'-TCACAGGGCTTTTCAACAGTAAGG -3'。扩增条件: 预变性 94℃ 5min、94℃变性 30s、退火温度 (-190G/A 为 56℃、-59029 G/A 为 62℃) 30s、72℃延伸 30s 35 个循环后, 最后 72℃延伸 5min。分别应用 BsaBI 酶和 BspI2861 酶对-190G/A 和-59029G/A 扩增产物进行酶切, 分别取酶切产物在 3% (-190G/A) 和 2% (-59029G/A) 琼脂糖凝胶上进行电泳, 以 100bp Marker 为参照, 紫外灯下观察、拍照并分析其结果。

1.3 统计学处理 数据统计分析采用 SPSS19.0 版软件处理, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。以 Logistic 回归法计算表示相对风险度的优势比 (OR) 及其 95% 可信区间 (95%CI)。

2. 结果

2.1 基因型分析: CCR2 基因-190G/A 位点的 PCR 扩增片段长度为 173bp, 酶切产物进行电泳, AA 基因型仅见一条 173 bp 电泳带, AG 基因型显示为 173bp、149bp 和 24bp 三条带, GG 基因型表现为 149bp 和 24bp 两条带。CCR5 基因-59029 G/A 位点的 PCR 扩增片段长度为 268bp, 酶切产物进行电泳, AA 基因型仅见一条 268 bp 电泳带, AG 基因型可见三条带分别为 268bp、137bp 和 131bp, GG 基因型表现为 137 bp 和 131bp 两条带。对照组的-190G/A 和-59029 G/A 位点的基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.2 相关性分析: 以卡介苗接种史、CCR2 基因-190G/A 各基因型和 CCR5 基因-59029 G/A 各基因型为自变量, 以是否结核性脓胸为因变量, 进行逐步 Logistic 回归分析。分析发现, 对于 CCR2 基因-190G/A 位点, 与 G/G 基因型相比, 携带 A/G 和 A/A 基因型均可明显增加结核性脓胸发病风险 ($OR=2.250$, $95\% CI=1.046 \sim 4.842$, $P < 0.05$ 和 $OR=8.706$, $95\% CI=4.232 \sim 17.909$, $P < 0.001$)。无卡介苗接种史也增加结核性脓胸发病风险 ($OR=3.031$, $95\% CI=2.109 \sim 4.356$, $P < 0.001$)。CCR5 基因-59029 G/A 位点各基因型未进入回归方程, 表明其与结核性脓胸的发病风险无明显相关性。见表 1。

表 1 CCR2 和 CCR5 基因多态性与结核性脓胸的逐步 Logistic 回归分析

指标	β	SE	Wald值	P值	OR	OR 的 95% CI
卡介苗接种史	1.109	0.185	35.935	0.000	3.031	2.109~4.356
-190G/G			62.407	0.000		
-190A/G	0.811	0.391	4.302	0.037	2.250	1.046~4.842
-190A/A	2.164	0.368	34.580	0.000	8.706	4.232~17.909

3 讨论

趋化因子单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 是具有重要生理作用的化学趋化因子, 结核患者 MCP-1 的表达水平较正常人升高^[11]。CCR2 是 MCP-1 的特异受体, 属 G 蛋白耦联的受体家族, 为含有 7 个富含疏水氨基酸的 α 螺旋穿膜区结构, 编码 355 个氨基酸残基蛋白, 表达于多种细胞类型如单核细胞、THP-1 细胞、记忆 T 细胞、嗜碱性粒细胞等。趋化因子对免疫细胞的趋化作用是通过免疫细胞表面的趋化因子受体实现的。

MCP-1与其受体CCR2可发生特异性结合,通过细胞膜上的G-蛋白耦联的磷脂酰肌醇途径,将信号传入细胞内,趋化单核/巨噬细胞,促进炎症的发生。CCR2基因存在多个研究SNP位点,其中位于启动子区的-190G/A SNP可引起不同程度的转录活性改变,从而影响其蛋白的表达水平和功能,进一步影响个体间对疾病遗传易感性的差异。Ilhan Sezgin等^[1]发现-190G/A位点各基因型在慢性肾衰患者和正常人群中分布有显著性差异,增加慢性肾功能衰竭发病风险。Miyagishi R等^[3]发现在日本人群中-190位点G→A突变与多发性硬化的发生负相关。关于此位点与结核病关系的研究,国内外已有报道,结论不尽一致,韩锐等^[4]采用病例对照研究,应用MassARRAY技术对-190G/A位点进行基因研究,发现CCR2基因-190G/A SNP与中国汉族儿童结核病易感不存在相关性。而在对印度中北部Sahariya部落人群的研究中显示^[5],对照组的A/A基因型和A等位基因的频率明显高于结核组。不同人群、种族分布的多样性,可能是导致不同族群对结核病的易感性不同的原因之一。目前国内外尚未见此位点多态性与结核性脓胸的关系的报道,本研究结果显示,CCR2基因-190G/A SNP与结核性脓胸有显著相关性,可增加结核性脓胸的发病风险。

CCR5是G蛋白偶联的趋化因子受体,主要在粒细胞、巨噬细胞、幼稚树突状细胞、CD8⁺T淋巴细胞和Th1淋巴细胞上表达,而且影响它们的迁移和活性。CCR5基因位于人染色体3q21.3,由1个启动子、2个外显子和1个中间分隔的内含子组成。其启动子区域检测到多种突变,研究较多的是-59029 G/A。有研究显示-59029 G/A位点多态性(g或a)影响CCR5基因的转录及其表达水平,并进一步影响个体对疾病的易感性^[6]。已有的研究发现CCR5 -59029 G/A基因多态性与糖尿病肾病、艾滋病及肉瘤病的发展密切相关^[2,7,8,9]。关于此位点与结核病关系的研究国内外已有报道,Manju Mamtani等^[10]在哥伦比亚成年人群中发现CCR5基因的HHD单倍体型与结核易感相关。而在中国汉族儿童中和印度Sahariya部落人群中却发现CCR5基因多态性与结核病易感不存在相关性^[4,5]。结果不一致的原因考虑与地域、种族有关。目前尚未发现关于CCR5基因-59029 G/ASNP与结核性脓胸关系的报道,本研究结果显示,CCR5基因 -59029 G/A SNP可能与结核性脓胸发病风险无关。

结核性脓胸的发病是一个多因素参与的错综复杂的过程,其中易感基因多态性影响人类对结核性脓胸易感性。限于样本量、遗传背景、种族差异等因素,报道结果存在差异。因此,大样本量和不同种族人群的进一步研究对阐明SNP在结核性脓胸发生机制中的作用具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Ilhan Sezgin,Binnur Koksai,Gokhan Bagci,et al.CCR2 Polymorphism in Chronic Renal Failure Patients Requiring Long-Term Hemodialysis[J].Internal medicine,2011,50(12):2457-2461.
- [2] 王睿,张松,时立新.CCR5基因启动子多态性与2型糖尿病肾病相关性研究[J].贵州医药,2007,31(6): 500-503.
- [3] Miyagishi R,Niino M,Fukazawa T,et al.C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis[J].J Neuroimmunol,2003,145(2):135-138.
- [4] 韩锐,綦辉,孙琳,等.CCR2、CCL5、CCR5和CCL1基因多态性与中国汉族儿童结核病易感性的关联研究[J].标记免疫分析与临床,2014,21(2):171-175.
- [5] Mishra G,Poojary SS,Raj P,et al.Genetic polymorphisms of CCL2 CCL5 CCR2 and CCR5 genes in Sahariya tribe of North Central India: an association study with pulmonary tuberculosis[J]. Infect Genet Evol,2012,12(5):1120-1127.
- [6] 盛磊,常生军,程江.CCR5基因多态性的研究进展[J].实用医技杂志,2007,14(4):429-430.
- [7] 程洁.MCP-1、RANTES及CCR5基因多态性与2型糖尿病肾病[J].中南大学博士论文,2006.
- [8] Nakajima K,Tanaka Y,Nomiyama T,et al.Chemokine receptor genotype is associated with diabetic nephropathy in Japanese with type 2 diabetes[J].Diabetes,2002,51(1):238-242.
- [9] Smith MW,Dean M,Carting Tonm,et al.Comtrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variant son HIV-1 infection and disease progression[J].Science,1997,277(5328):959-965.

- [10] Mamtani M,Mummididi S,Ramsuran V,et al.Influence of variations in CCL3 L1 and CCR5 on tuberculosis in a northwestern Colombian population[J].J Infect Dis,2011,203(11):1590-1594.
- [11] 王威,周末花,叶军辉,等.肺癌和结核性胸腔积液/血清MCP-1及其受体CCR2的测定及临床意义[J].中国高等医学教育,2012,2(2):142-143.