汉族人群中白介素 23 受体基因多态性与肺结核易感性的关联性研究

金鏊 张治国 曹树辉 王伟 王旭 程建 苏虹 李传友

【摘要】 目的 探索白细胞介素 23 受体(IL-23R)基因多态性在汉族人群中的分布,以及与肺结核患病的相关性。方法 选取 2014 年 3 月至 2015 年 12 月在首都医科大学附属北京胸科医院所收治的肺结核住院患者作为病例组,共 243 例;选取北京市昌平区结核病防治所于 2014 年 5—10 月进行结核病体检的健康者作为对照组,共 226 名。利用 NCBI 数据库筛选出 9 个 IL-23R 基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点(rs3762318、rs11209026、rs10889657、rs10889677、rs6682925、rs1004819、rs11465804、rs2201841、rs7514847)作为待测位点,利用高温连接酶检测技术对待测位点进行检测并做基因分型,比较病例组和对照组等位基因及基因型频率,分析找出连锁不平衡和易感单倍型,从而发现该基因多态性与肺结核易感性之间的关系。结果 经过比较分析,IL-23R 多态性位点 rs6682925 最小等位基因 C 在病例组中频率为 44.0%(213/484),高于对照组中的 37.4%(169/452),差异有统计学意义[$\chi^2=4.24, P=0.040$;OR(95%CI)值:1.32(1.01~1.71)];基因型 TT 在病例组频率为 30.1%(73/242),低于对照组的 38.9%(88/226),差异有统计学意义[$\chi^2=3.99, P=0.040$;OR(95%CI)值:0.68(0.46~0.99)]。rs3762318 等位基因 C 频率在病例组中为 16.0%(78/486),高于对照组的 10.2%(46/450),差异有统计学意义[$\chi^2=7.04, P<0.01$;OR(95%CI)值:1.69(1.14~2.49)];基因型 CC 在病例组中频率为 3.3%(8/243),高于对照组的 0.4%(1/225),差异有统计学意义[$\chi^2=5.02, P=0.040$;OR(95%CI)值:7.63(0.95~61.46)];基因型 TT 频率在病例组中为 71.5%(173/243),低于对照组的 80.0%(180/225),差异有统计学意义[$\chi^2=4.89, P=0.030$;OR(95%CI)值:0.62(0.40~0.95)]。连锁分析和单倍型分析中发现由 9 个目标 SNP 位点构建的单倍型 CTCACTCTG 在病例组中期望频率为 5.1%,在对照组中为 2.2%,差异有统计学意义[$\chi^2=5.65, P=0.017$;OR(95%CI)值:2.44(1.14~5.19)]。结论 IL-23R 的 rs6682925 和 rs3762318 多态性位点突变在汉族人群中有较高的频率,且和肺结核患病相关;携带由 9 个目标 SNP 点位构建的单倍型 CTCACTCTG 是肺结核的危险因素。

【关键词】 结核,肺; 白细胞介素 23; 受体,白细胞介素; 多态性,单核苷酸; 疾病易感性; 病例对照研究

Relationship between interleukin-23 receptor gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis in Chinese Han population JIN Liu*, ZHANG Zhi-guo, CAO Shu-hui, WANG Wei, WANG Xu, CHENG Jian, SU Hong, LI Chuan-you. * Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230031, China

Corresponding authors: SU Hong, Email: suhong5151@sina.com; LI Chuan-you, Email: bjyysxjmyslcy@126.com

【Abstract】 Objective To investigate distribution of interleukin-23 receptor (IL-23R) polymorphisms in Chinese Han and the relationship between the distribution and pulmonary tuberculosis (PTB). **Methods** A case-control study was performed, 243 PTB cases were selected as case group hospitalized Beijing Chest Hospital, Capital Medical University during March 2014 to December 2015 and 226 healthy controls were recruited by the tuberculosis physical examination in Beijing Changping Center for tuberculosis control and prevention during May 2014 to October 2014. Nine polymorphic sites (rs3762318, rs11209026, rs10889657, rs10889677, rs6682925, rs1004819, rs11465804, rs2201841, rs7514847) were screened out using NCBI database, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected by ligase detection reaction (LDR) for genotyping and frequency comparison,

linkage analysis and haplotype analysis were performed to find out linkage disequilibrium and haplotype. Through above-mentioned methods, the association between IL-23R SNPs and PTB were estimated. **Results** There was a significant difference in the distribution of IL-23R gene polymorphism at polymorphic site *rs6682925* between PTB cases and healthy controls, allele C frequency in cases (44.0% (213/484)) was significantly higher than in controls (37.4% (169/452)) ($\chi^2=4.24$, $P=0.040$; $OR=1.32$, 95% CI : 1.01–1.71); genotype TT frequency in cases (30.1% (73/242)) was also significantly higher than in controls (38.9% (88/226)) ($\chi^2=3.99$, $P=0.040$; $OR=0.68$, 95% CI : 0.46–0.99). As to polymorphic site *rs3762318*, allele T frequency in cases (16.0% (78/486)) was significantly higher than in controls (10.2% (46/450)) ($\chi^2=7.04$, $P<0.01$; $OR=1.69$, 95% CI : 1.14–2.49); genotype CC frequency in cases (3.3% (8/243)) was significantly higher than in controls (0.4% (1/225)) ($\chi^2=5.02$, $P=0.040$; $OR=7.63$, 95% CI : 0.95–61.46); genotype TT frequency in cases (71.5% (173/243)) was significantly higher than in controls (80.0% (180/225)) ($\chi^2=4.89$, $P=0.030$; $OR=0.62$, 95% CI : 0.40–0.95). Haplotype CTCACTCTG built by nine target SNPs sites in cases was found significantly different from controls by haplotype analysis (5.1% vs. 2.2%, $\chi^2=5.65$, $P=0.017$; $OR=2.44$, 95% CI : 1.14–5.19). **Conclusion** Polymorphic sites *rs6682925* and *rs3762318* are widely existed among Chinese Han population and these two SNPs are susceptible to PTB. Haplotype CTCACTCTG built by the nine SNPs sites is a risk factor for susceptibility to PTB in Chinese Han population.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary; Interleukin-23; Receptors, interleukin; Polymorphism, single nucleotide; Disease susceptibility; Case-control studies

尽管感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是导致结核病的必要条件, 但大多数感染者却并未发病, 研究表明, 仅有 10% 的感染者会进一步发展为活动性结核病^[1]。这就提示我们结核病的发病与个体的免疫状态相关, 而个体免疫状态的差异与遗传因素密不可分。机体有效地抵抗 MTB 感染需要天然免疫和适应性免疫协同完成, 白细胞介素-23 (interleukin-23, IL-23) 在两者中起到重要的连接作用。IL-23 复合物为 IL-23 P19 和 IL-12 P40 两个亚单位组成, 分别对应受体 IL-23R 和 IL-12R β ^[2-3]。目前研究表明, IL-23 为 CD4⁺T 细胞的活化、增殖、分化的关键细胞因子, IL-23 可以诱导 CD4⁺T 细胞的增殖, 并可以增强树突状细胞 (dendritic cell, DC) 等抗原提呈细胞的活动, 直接诱导 DC 分泌 γ 干扰素 (IFN- γ) 和 IL-12, 从而活化抗原提呈细胞, 增强辅助 T 细胞 1 (Th1) 的活动, 进而增强巨噬细胞的吞噬、自然杀伤细胞的杀伤能力, 以及组织的炎性反应等作用^[4]。近年来, Th17 在结核病感染的机制中被关注。有研究表明, Th17 通过趋化因子募集中性粒细胞在病灶的聚集并调节由病原体感染而引起的炎性反应, 从而促进肉芽肿的形成和维持其完整性^[5-7]。如果 IL-23 及其受体缺失, 可导致肺部感染组织严重的炎性反应和纤维蛋白的沉积, 这可能会导致 MTB 扩散进而发展为活动性肺结核^[8-9]。IL-23R 存在于 Th17 表面, 为 Th17 分化和存活的重要细胞因子; 若 IL-23 缺失, 则 Th17 不能增殖和存活^[10-11]。IL-23R 基因多态性与结核病发病之间的关联研究在汉族人群中尚无报道, 而我国是结核病高负担国, 结核病疫情严

峻^[12]。本研究对我国汉族人群 IL-23R 基因 9 个多态性位点进行分析, 以探索 IL-23R 基因多态性与肺结核易感性之间的关联。

对象和方法

1. 研究对象: 选取 2014 年 3 月至 2015 年 12 月在首都医科大学附属北京胸科医院所收治的肺结核住院患者作为病例组, 共 243 例; 选取北京市昌平区结核病防治所于 2014 年 5—10 月进行结核病体检的健康者作为对照组, 共 226 名。两组研究对象均为汉族且无亲属关系。研究对象的纳入通过了首都医科大学附属北京胸科医院及北京市昌平区结核病防治所伦理委员会的审核, 并经研究对象知情同意。

样本量的确定使用 NCSS-PASS 11 软件, 根据非配对病例-对照研究样本量计算方法, 通过 NCBI 数据库给出的人群中标签单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的频率, SNP 的频率取值 $P_0=20\%$, 根据实验预测结果, 在 $OR=2$, $\alpha=0.05$ (双侧), $\beta=0.1$ 的水平上, 通过软件计算得出病例组和对照组各需样本数量为 230, 考虑到实验成功率并非 100%, 因此, 确定两组样本数量均为 245。由于实验过程中造成样本损失, 最终具有有效数据的研究对象为病例组 243 例, 对照组 226 名。

2. 纳入标准: (1) 病例组: ①痰培养检测呈阳性, 同时胸部 X 线摄片显示有结核样病灶; ②痰培养阴性, 但影像学检测显示活动性肺结核征象, 且通过抗结核药物治疗好转, 临床证实为肺结核; ③结核菌素试验 (PPD 试验) 强阳性, 结核感染 T 细胞斑点试验 (T-SPOT. TB) 检测阳性, 并伴有明显肺结核临床

症状者;④无糖尿病、恶性肿瘤、HIV 感染等免疫功能低下者,无肺炎、尘肺等相似呼吸系统疾病者。(2)对照组:①无结核病史,无糖尿病、恶性肿瘤、HIV 感染者;②经 PPD 检测、T-SPOT. TB 检测、影像学诊断无 MTB 感染及活动性结核病患者;③无肺结核临床症状,且无肺炎、尘肺等相似病患。

3. 实验器材和试剂:(1)实验器材:基因组提取采用天根 DP318-02 血液基因组 DNA 提取试剂盒(北京诺博莱德科技有限公司);PCR 试验采用北京东胜创新生物科技有限公司的东胜龙黑金刚 EDC-810 PCR 仪;用 3730XL 基因测序仪(美国 ABI 公司)对 PCR 产物进行测序;离心机:Allegra 25R 台式高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)、Micro 17R 微量台式离心机(美国 Thermo 公司);微量可调移液器(德国 Eppendorf 公司)。(2)主要试剂:Taq 酶(加拿大 Fermentas 公司)、dNTP(加拿大 Fermentas 公司)、Taq DNA ligase(美国 NEB 公司)。

4. 标本收集:采集研究对象肘部静脉血 5 ml,常温下保存不超过 24 h, -80 °C 低温长期保存。采集的血标本提取完血清后,对剩余血块进行 DNA 提取,即将血块用垫有 2 层无菌纱布的注射器进行挤压过滤,再用垫有 4 层无菌纱布的注射器进一步挤压过滤^[13]。通过该方法处理,可有效过滤掉血块中的纤维状成分,血块充分被打散,血细胞处于游离状态,并利用全血 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。

5. SNP 的选择和分型:IL-23R 基因位于染色体 1p31 区域,全长 298 660 bp。通过 NCBI 数据库获取 IL-23R 基因的全场序列,并对 IL-23R 基因的标签 SNP 进行检索。根据对现有 SNP 的报道为依

据,SNP 与结核病发病有类似免疫机制的疾病相关,且在人群中分布频率 >5%,进行 SNP 筛选。最终从基因上游 2 kb 区域、外显子、内含子中筛选出 SNP: rs3762318、rs11209026、rs10889657、rs10889677、rs6682925、rs1004819、rs11465804、rs2201841、rs7514847,作为待检测多态性位点(表 1)。基因分型采用高温连接酶检测反应(ligase detection reaction, LDR),通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)对目标基因片段进行扩增,利用高温连接酶实现对基因多态性位点的识别(高温连接酶一旦检测到 DNA 与互补的 2 条寡聚核苷酸接头对应处存在着基因点突变类型的碱基错配,则连接反应就不能进行),再将所得 PCR 产物进行测序,判断目标点位的基因型。

6. 统计学分析:数据录入使用 EpiData 3.0 软件,使用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。计数资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用两独立样本 *t* 检验;计量资料采用百分率与构成比表示,组间差异的比较采用 χ^2 检验。SNP 与肺结核发病之间的关联通过单因素 logistic 回归分析,并计算 OR(95%CI)值;Hardy-Weinberg 平衡检测、连锁不平衡分析,以及单倍型分析运用 SHEsis 软件(<http://analysis.bio-x.cn>);使用 NCSS_PASS_11 软件对样本量进行估计。以上统计分析均以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况:研究对象中,病例组有 243 例,对照组有 226 名;两组研究对象年龄、性别、婚姻状况、文化程度比较差异均无统计学意义,均衡可比(表 2)。

表 1 所选标签 SNP 的信息

SPN 编号	染色体位置	转录改变	功能区域	参考频率
rs3762318	Chr1:67,131,422	C→T	基因上游 2 kb	G=0.1504
rs10889657	Chr1:67,149,801	T→C	内含子	C=0.2853
rs6682925	Chr1:67,165,579	C→T	基因上游 2 kb	T=0.4742
rs10889677	Chr1:67,189,524	A→C	内含子	A=0.1881
rs1004819	Chr1:67,204,530	G→A	内含子	A=0.3980
rs7514847	Chr1:67,215,986	T→G	内含子	G=0.3560
rs2201841	Chr1:67,228,519	A→G	内含子	G=0.3954
rs11465804	Chr1:67,236,843	T→G	内含子	G=0.0341
rs11209026	Chr1:67,240,275	G→A	外显子(Arg381Gln)	A=0.0469

注 Chr1:一号染色体;Arg:精氨酸;Gln:谷氨酰胺

表 2 不同人口特征在病例组和对照组分布情况的比较

人口特征	病例组	对照组	统计检验值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	52.40 ± 14.52	49.56 ± 17.13	$t=1.94$	0.053
性别[例或名, 构成比(%)]			$\chi^2=0.46$	0.562
男	161(66.26)	143(63.27)		
女	82(33.74)	83(36.73)		
婚姻状况[例或名, 构成比(%)]			$\chi^2=1.27$	0.292
未婚	95(39.09)	77(34.07)		
已婚	148(60.91)	149(65.93)		
文化程度[例或名, 构成比(%)]			$\chi^2=7.27$	0.064
小学	29(11.93)	20(8.85)		
初中	104(42.80)	111(49.12)		
高中或中专	88(36.22)	63(27.88)		
大专及以上	22(9.05)	32(14.15)		

表 3 等位基因和基因型在病例组和对照组中分布情况

SNP 位点	病例组				对照组			
	MAF	基因型			MAF	基因型		
<i>rs1004819</i> ^a	C	CC	CT	TT	C	CC	CT	TT
	215(44.2)	50(20.6)	115(47.3)	78(32.1)	183(40.5)	35(15.5)	112(49.8)	78(34.7)
<i>rs11209026</i> ^a	A	GG	GA	AA	A	GG	GA	AA
	2(0.4)	241(99.2)	2(0.8)	0(0.0)	0(0.0)	225(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
<i>rs3762318</i> ^a	C	TT	CT	CC	C	TT	CT	CC
	78(16.0)	173(71.5)	62(25.2)	8(3.3)	46(10.2)	180(80.0)	44(19.6)	1(0.4)
<i>rs10889657</i> ^a	C	TT	TC	CC	C	TT	TC	CC
	148(30.5)	121(49.8)	96(39.5)	26(10.7)	122(27.1)	120(53.3)	88(39.1)	17(7.6)
<i>rs10889677</i>	C	AA	CA	CC	C	AA	CA	CC
	135(27.8)	127(52.3)	97(39.9)	19(7.8)	115(25.4)	120(53.1)	97(42.9)	9(4.0)
<i>rs6682925</i> ^b	C	TT	CT	CC	C	TT	CT	CC
	213(44.0)	73(30.1)	125(51.7)	44(18.2)	169(37.4)	88(38.9)	107(47.4)	31(13.7)
<i>rs11465804</i> ^b	G	AA	AG	GG	G	AA	AG	GG
	1(0.2)	241(99.6)	1(0.4)	0(0.0)	0(0.0)	226(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
<i>rs2201841</i> ^b	T	CC	CT	TT	T	CC	CT	TT
	127(26.2)	132(54.5)	93(38.5)	17(7.0)	111(31.1)	126(55.7)	89(39.4)	11(4.9)
<i>rs7514847</i> ^b	T	CC	CT	TT	T	CC	CT	TT
	195(40.3)	84(34.7)	121(50.0)	37(15.3)	205(44.4)	72(31.9)	108(47.8)	46(20.3)

注 SNP: 单核苷酸多态性; MAF: 最小等位基因频率; ^a: 该位点对照组缺失 1 名研究对象信息; ^b: 该位点病例组缺失 1 例研究对象信息; 表中括号外数值为等位基因或基因型频次, 括号内数值为等位基因或基因型频率(%)

2. 基因多态性与疾病关联分析: 对 9 个 SNP 位点的基因型分布分别在病例组和对照组中进行 Hardy-Weinberg 平衡检测, 发现各基因型均满足 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)。对 9 个 SNP 位点进行分型, 并计算最小等位基因和基因型频率(表 3), 分别在病例组和对照组之间比较最小等位基因和各基因型分布的差异。通过单因素 logistic

回归分析可以看出, *rs6682925* 和 *rs3762318* 在病例组和对照组间的分布差异有统计学意义(表 4)。

利用 SHEsis 软件对该样本进行了连锁不平衡分析和单倍型分析, 从而确定各位点之间的关联以及发现是否存在具有疾病风险的单倍型^[14]。其中, 通过连锁不平衡分析评估该 9 个 SNP 位点是否存在非随机相关, 并给出各点位关联度 D' 值和 r^2 值。

表 4 rs6682925 和 rs3762318 位点等位基因和基因型在病例组和对照组间分布的比较

SNP 位点	病例组	对照组	χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI 值
<i>rs6682925</i> ^a						
等位基因			4.24	0.040	1.32	1.01~1.71
C	213(44.0)	169(37.4)				
T	271(56.0)	283(62.6)				
基因型						
CC	44(18.2)	31(13.7)	1.73	0.190	1.40	0.85~2.31
CT	125(51.7)	107(47.4)	0.87	0.350	1.19	0.83~1.71
TT	73(30.1)	88(38.9)	3.99	0.040	0.68	0.46~0.99
<i>rs3762318</i> ^b						
等位基因			7.04	<0.01	1.69	1.14~2.49
C	78(16.0)	46(10.2)				
T	407(84.0)	405(89.8)				
基因型						
CC	8(3.3)	1(0.4)	5.02	0.040	7.63	0.95~61.46
CT	62(25.2)	44(19.6)	2.37	0.120	1.41	0.91~2.19
TT	173(71.5)	180(80.0)	4.89	0.030	0.62	0.40~0.95

注 SNP:单核苷酸多态性;^a:该点位病例组缺失 1 例研究对象信息;^b:该点位对照组缺失 1 名研究对象信息;表中括号外数值为等位基因或基因型频次,括号内数值为等位基因或基因型频率(%)

表 5 IL-23R 多态位点单倍型期望频率在病例组和对照组间的比较

单倍型 ^a	病例组期望频率 (%)	对照组期望频率 (%)	χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI 值
CTCACACTG	2.3	3.4	1.18	0.277	0.65	0.29~1.42
CTCACTCTG	5.1	2.2	5.65	0.017	2.44	1.14~5.19
TCCACACTG	3.7	3.9	0.07	0.796	0.92	0.47~1.80
TCCACTCTG	4.6	2.6	2.66	0.103	1.80	0.88~3.74
TCCATTCTG	4.6	5.1	0.16	0.692	0.89	0.49~1.61
TCCCCATTG	6.8	4.8	1.68	0.195	1.45	0.83~2.54
TCCCCTTG	7.2	7.2	0.07	0.932	0.98	0.59~1.62
TTTATACTG	18.6	21.8	1.96	0.162	0.79	0.57~1.10
TTTATTCTG	26.2	26.8	0.17	0.684	0.94	0.69~1.27
TTTCCTTG	4.8	4.7	0.00	0.994	1.00	0.55~1.84

注 各点位从染色体上游至下游顺序依次为 rs3762318、rs10889657、rs6682925、rs10889667、rs1004819、rs7517847、rs2201841、rs11465804、rs11209026;^a:单倍型频率分布在病例组或对照组中大于 3%

D' 值结果显示各多态性位点普遍存在非随机相关,以 $D' \geq 0.8$ 作为连锁不平衡强关联标准,则有 13 组位点两两组合存在强关联;以 $r^2 \geq 0.8$ 作为连锁不平衡强关联标准, r^2 值显示 rs10889677 和 rs2201841 存在强关联, $r^2 = 0.88$ 。由于各位点间普遍存在连锁不平衡,因而全部 9 个 SNP 位点被纳入到单倍型分析中。经分析存在 51 种单倍型组合,其中,对 10 种单倍型在组间的分布进行了比较,而其余单倍型

频率由于均小于 3%,因而予以排除。经分析,IL-23 R 单倍型 CTCACTCTG 在病例组中的期望频率为 5.1%,明显高于对照组中的 2.2%,差异有统计学意义,携带 CTCACTCTG 单倍型者肺结核患病风险是未携带者的 2.44 倍(表 5)。

讨 论

IL-23 及其受体在机体免疫应答中起到重要的

作用。近年来,大量关于 IL-23R 基因多态性与免疫相关疾病的关联已被报道。Dong 等^[15]在中国汉族人群中发现 IL-23R 多态性位点 *rs7517847* 中等位基因 G 和基因型 GG, *rs11209032* 中基因型 AA, *rs17375018* 中等位基因 T 与强直性脊柱炎密切相关; Szabo 等^[16]在欧洲白人人群中发现 IL-23 多态性位点 *rs1343151* 最小等位基因 A, *rs10889677* 中基因型 AA 是克罗恩病的风险因素; Lee 和 Song^[17] 在一项关于 IL-23R 与牛皮癣的荟萃分析中发现多态性点 *rs6687695* 和 *rs11209026* 中的最小等位基因 T 和 A 与牛皮癣发病相关。这不仅揭示了 IL-23R 多态性在各人群中广泛分布,而且在免疫相关疾病中起到重要的影响。除了自身免疫性疾病, Zhang 等^[18]在汉族人群中发现由分枝杆菌感染的麻风病与多态性位点 *rs3762318* 存在关联,其中最小等位基因 A 是麻风病的保护因素。然而, IL-23R 基因多态性与结核病之间的关联研究却很少。2013 年, Ben-Selma 和 Boukadida^[19]在突尼斯人群中进行了研究,结果表明 IL-23R 多态性位点 *rs11209026* 在该人群中突变频率很高,最小等位基因 A 和基因型 AA 是肺结核的危险因素;而在维吾尔族人群中发现, IL-23R 多态性位点 *rs7518660* 基因型 AA, *rs10889677* 基因型 CC 在肺结核患者与健康对照者中分布存在明显差异,并影响 IL-23R 基因拷贝数^[20-22]。而 SNP 在不同人群中的分布常会出现较大差异, IL-23R 多态性与结核病的关联研究在汉族人群中尚无报道。

本次研究发现, *rs6682925* 和 *rs3762318* 的最小等位基因和最小等位基因纯合子在肺结核患者和健康对照者中存在分布差异,其中 *rs6682925* 中最小等位基因 C 为肺结核的风险基因,其在健康人中的基因频率达 37.4%,与先前报道的汉族人群该基因分布基本吻合^[23],印证了该基因在汉族人群中有较高的突变频率。同时,该突变位点曾被广泛验证在恶性肿瘤和冠心病患者中具有较高突变频率^[23-25],在结核病患者中尚未见报道。在多态性位点 *rs3762318* 中,本研究发现携带最小等位基因 C, 突变基因型 CC 者均有肺结核患病风险,其中最小等位基因 C 频率在健康人群中达 10.2%,与 Zhang 等^[18]在 2011 年做的一项关于麻风病的全基因组关联分析的最小等位基因频率基本一致。有趣的是,携带最小等位基因 C 是麻风病患病的保护因素,而在本次研究中确定其为肺结核患病的危险因素。该结果不能简单解释为由于抽样造成,虽然结核病与

麻风病均由分枝杆菌引起,而发病机制不尽相同,因而该差异需要持续关注。同时,本次研究验证了多态性位点 *rs1004819* 等位基因 T 虽然在汉族人群中存在较高的突变率,但无论是等位基因还是基因型,均与肺结核患病没有关联。该结果与突尼斯进行的肺结核相关性研究的结论存在明显差异^[19],从而验证了该位点多态性不是汉族人的肺结核患病的风险基因。江道斌等^[22]在中国维吾尔族人群中发现 *rs10889677* 位点基因型 CC 与肺结核的易感性相关($OR=1.53, 95\%CI:1.01\sim2.31$);在本次研究中未发现该位点基因型 CC 与肺结核患病存在相关性,究其原因,可能为抽样误差所致,尚待进一步探究。而 *rs10889677* 位点 T→C 突变在汉族人群中普遍存在,最小等位基因频率为 25.4%,应持续关注。

多位点之间的单倍型分析较单个点位的分析具有明显优势,以往进行的 SNP 研究往往忽略了各位点之间的关联,而当同一基因上多个突变等位基因相互作用,则可构建出一个对疾病表型有更强作用的“超级等位基因”。Epstein 和 Satten^[26]指出,当疾病是由于同一染色体上多个易感变量的相互作用引发时,单倍型分析能更为有效地找出发病关联。本次研究通过连锁不平衡分析确定了各检测位点之间的关联度,而单倍型分析发现在 IL-23R 基因中单倍型 CTCACTCTG 与肺结核患病相关。

由于我国人群广泛接种卡介苗,传统的结核菌素试验在区分结核分枝杆菌感染者和由于接种卡介苗的健康者存在困难,因而难以将隐性感染者从健康对照中筛出,从而影响研究结果。本研究在健康对照者的选择上,从 1263 名体检人员中选取了 PPD 阴性,且 T-SPOT.TB 阴性的 226 名作为对照组,有效地筛选出无结核隐性感染的健康对照者,从而提高了研究效率。

本研究尚存在一些不足:(1)仅对 IL-23R 基因内的 9 个多态性位点进行了检测。由于 IL-23R 基因多态性位点众多,笔者仅通过数据库筛选了部分标签位点进行验证分析。虽然进行了连锁不平衡和单倍型分析,但与其他未检测位点是否具有关联性不得而知。而影响到基因表达往往是多个位点共同参与的结果。(2)本次研究未纳入潜伏感染者作为研究对象。IL-23R 基因多态性对于健康者感染 MTB 到潜伏感染者发病的影响则需进一步验证。(3)未进行基因表达水平的验证。由于受体存在于细胞膜表面,通过一般的血清学方法无法检测到

IL-23R 受体的表达水平,而受制于标本状态也很难进行细胞流式实验。因而突变位点的对象中,IL-23R 的表达水平无法得知。(4)在进行统计分析时,考虑到多重校正相对严格保守,可能会筛掉一些有意义的位点,由于本次研究位点较少,且各 SNP 位点均位于同一染色体上,因而本研究统计分析结果未进行多重比较校正。

综上所述,本次研究发现 IL-23R 基因 *rs6682925* 和 *rs3762318* 多态性位点的变异在汉族人群中具有较高的频率,且和肺结核患病相关;单倍型 CTCACTCTG 是肺结核患病的危险因素。*rs10889677* 在汉族人群中具有较高的突变率,可能与肺结核患病相关,应持续关注。基因与基因间相互关联则需要进一步探究,而多态性位点 *rs6682925* 和 *rs3762318* 是否影响到机体 IL-23R 表达水平也需要进行进一步验证。

参 考 文 献

[1] Möller M, de Wit E, Hoal EG. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010, 58(1): 3-26.

[2] Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2006, 54(1): 15-24.

[3] Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 2000, 13(5): 715-725.

[4] Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, et al. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2004, 202: 96-105.

[5] Khader S, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*, 2007, 8(4): 369-377.

[6] Miyamoto M, Prause O, Sjöstrand M, et al. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol*, 2003, 170(9): 4665-4672.

[7] Stark M, Huo Y, Burcin T, et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 2005, 22(3): 285-294.

[8] Dragon S, Saffar AS, Shan L, et al. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol*, 2008, 45(1): 160-168.

[9] Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, et al. IL-23 and the IL-17 pathway promotes inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*, 2007, 37(10): 2695-2706.

[10] Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T

cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*, 2006, 116(5): 1310-1316.

[11] Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, 2008, 41(2): 79-83.

[12] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health Organization, 2016.

[13] Che N, Li S, Zhang Z, et al. Identification of a novel IRGM promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(21/22): 1645-1649.

[14] Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*, 2005, 15(2): 97-98.

[15] Dong H, Li Q, Zhang Y, et al. IL23R gene confers susceptibility to ankylosing spondylitis concomitant with uveitis in a Han Chinese population. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67505.

[16] Szabo M, Safrany E, Pazar B. Marked diversity of IL23R gene haplotype variants in rheumatoid arthritis comparing with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 359-363.

[17] Lee YH, Song GG. Associations between interleukin-23R and interleukin-12B polymorphisms and psoriasis susceptibility: a meta-analysis. *Immunol Invest*, 2013, 42(8): 726-736.

[18] Zhang F, Liu H, Chen S, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet*, 2011, 43(12): 1247-1251.

[19] Ben-Selma W, Boukadida J. IL23R (Arg381Gln) functional polymorphism is associated with active pulmonary tuberculosis severity. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(8): 1188-1192.

[20] Jiang D, Wubuli A, Hu X, et al. The variations of IL-23R are associated with susceptibility and severe clinical forms of pulmonary tuberculosis in Chinese Uygurs. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 550.

[21] 江道斌, 胡昕, 李双, 等. 白细胞介素 23 受体基因单核苷酸多态性与肺结核和耐药肺结核易感性的相关性. *中华医学杂志*, 2015, 95(20): 1576-1580.

[22] 江道斌, 胡昕, 李双, 等. 新疆维吾尔族人群白介素-23 受体基因拷贝数变异与结核病易感性的相关性. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(1): 97-100.

[23] Zhang M, Cai ZR, Zhang B, et al. Functional polymorphisms in interleukin-23 receptor susceptibility to coronary artery disease. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(12): 891-897.

[24] Chu H, Cao W, Chen W, et al. Potentially functional polymorphisms in IL-23 receptor and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, 2012, 130(5): 1093-1097.

[25] Liu Y, Pan S, Liu L, et al. A genetic variant in long non-coding RNA HULC contributes to risk of HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35145.

[26] Epstein MP, Satten GA. Inference on haplotype effects in case-control studies using unphased genotype data. *Am J Hum Genet*, 2003, 73(6): 1316-1329.

(收稿日期:2016-12-26)

(本文编辑:李敬文)