

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000614

ATG4A 及 ATG16L1 基因多态性与肺结核易感性的关系

黄 秦¹, 赵凤容², 李 霞³, 胡少婷¹, 贺 巧³, 周向东¹, 李升锦¹, 陈维贤³

(1. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科, 重庆 400010; 2. 重庆市酉阳县人民医院妇产科, 重庆 409800;

3. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨自噬相关基因 4A (autophagy related 4A, ATG4A) 及自噬相关基因 16L1 (autophagy related 16 like 1, ATG16L1) 的多态性位点与中国西南地区人群肺结核易感性的关系。**方法:**采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术检测 218 例肺结核患者及 248 例健康对照者 ATG4A 基因 rs807185 位点及 ATG16L1 基因 rs2241880 位点的基因型, 用 logistic 回归分析上述 2 个位点与肺结核易感的相关性。**结果:**2 组人群中 rs807185 位点的 A 等位基因、AT 基因型及显性模型 AA+AT vs. TT 的频率分布存在统计学差异 ($P<0.05$), 且在女性中差异更突出。而 rs2241880 位点的各指标频率分布差异均不明显 ($P>0.05$)。**结论:** ATG4A 基因 rs807185 位点多态性与中国西南地区人群肺结核易感性呈负相关, 而 ATG16L1 基因 rs2241880 位点多态性则与该地区人群肺结核易感性无明显相关。

【关键词】肺结核; ATG4A; ATG16L1; 单核苷酸多态性; 遗传学**【中图分类号】**R521**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-12-30

Association between ATG4A, ATG16L1 gene polymorphism and the susceptibility to pulmonary tuberculosis

Huang Qin¹, Zhao Fengrong², Li Xia³, Hu Shaoting¹, He Qiao³, Zhou Xiangdong¹, Li Shengjin¹, Chen Weixian³

(1. Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. The Department of Gynecology and Obstetrics, Youyang People's Hospital;

3. Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship between ATG4A gene rs807185 (T/A), ATG16L1 gene rs2241880 (A/G) polymorphism and the susceptibility to pulmonary tuberculosis (PTB) in the Southwestern Chinese population. **Methods:** The single nucleotide polymorphism (SNP) of the ATG4A gene rs807185 and ATG16L1 gene rs2241880 were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 218 cases versus 248 controls. Logistic regression was used to analyze the correlation between the site and the susceptibility to PTB. **Results:** Frequencies of A allele ($OR=0.69$, 95% $CI=0.51$ to 0.92 , $P=0.012$), AT genotype ($OR=0.53$, 95% $CI=0.30$ to 0.92 , $P=0.025$), and AA+AT vs. TT ($OR=0.62$, 95% $CI=0.42$ to 0.92 , $P=0.017$) were reduced significantly in cases than in controls. In female respondents, aforementioned indices did the same. The frequencies distribution of genotype, allele and dominant/recessive model in rs2241880 site had no significant difference ($P>0.05$) in cases and controls. **Conclusion:** Genetic variant in ATG4A gene (rs807185) are associated with pulmonary tuberculosis susceptibility in a Southwestern Chinese population. However, the SNP of ATG16L1 rs2241880 might not be associated with the susceptibility to PTB.

【Key words】pulmonary tuberculosis; autophagy related 4A; autophagy related 16-like 1; single nucleotide polymorphism; genetics

全世界近三分之一的人口具有结核杆菌感染史, 而仅 5%~10% 发展为结核病。越来越多的研究

表明, 个体遗传因素与结核病的发生与进展密切相关^[1]。自噬是真核细胞中普遍存在的一种防御和应激调控机制, 其被报道在多种病毒及细菌感染 (尤其是胞内菌感染) 中发挥着重要作用^[2]。近来研究表明, ATG4A 及 ATG16L1 基因是参与细胞自噬信号转导的重要组成部分, 且 ATG4A 基因 rs807185 位点及 ATG16L1 基因 rs2241880 位点与众多慢性感染性疾病存在明显的相关性, 然而, 目前其与肺结核

作者介绍: 黄 秦, Email: huangqin@126.com,

研究方向: 呼吸系统免疫防御机制。

通信作者: 陈维贤, Email: ache11@163.com。

基金项目: 重庆市卫计委课题 (编号: 2012-2-370); 重庆市酉阳县科委课题 (编号: 201406)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150405.2101.013.html>
(2015-04-05)

易感性的关联研究尚未见相关报道。因此,本文拟通过行病例对照研究检测 rs807185 位点及 rs2241880 位点 SNP,以探讨该位点的多态性与中国西南地区人群肺结核病的相关关系。

1 对象及方法

1.1 实验对象

本研究得到作者所在单位人体试验伦理委员会的审查批准,并取得病人的知情同意。受检对象无亲缘关系,为西南地区人群,血液标本均由重庆医科大学附属第二医院检验科提供。病例组为 218 例肺结核病患者,来源于重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,包含男性 127 例和女性 91 例,平均年龄(48 ± 17)岁。所有病例均经过影像学检查、痰结核菌涂片及培养检查并结合临床症状确诊为肺结核病。对照组为 251 例健康体检者,由 133 名男性和 115 名女性组成,平均年龄(48 ± 16)岁,年龄分布与病例组相仿。所有研究对象均除外 HIV 感染、糖尿病、肿瘤以及肝功能异常等情况。

1.2 实验方法

1.2.1 提取基因组 DNA 每位受检者抽取 2 ml 静脉血,采用 EDTA-K2 抗凝。用血液基因组提取试剂盒(北京天根公司)提取外周血基因组 DNA,置于 -80°C 保存。

1.2.2 PCR-RFLP 使用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,ATG4A 引物序列为 F:GAGCAGTGCTGTCCAGTA-GAA,R:GGGGGAAATGATCTCTCTCTG;ATG16L1 的引物序列为 F:CTCTGTCACCATATCAAGCGTGG,R:TCTAGAAGG-ACAGG-CTATCAACAGATG。PCR 反应体系:上下游引物各 1 μl (10 mmol/L),10 μl PCR MIX(大连宝生物公司)及基因组 DNA 1 μl (100 ng/ μl),余下用无酶水补足至 20 μl 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,重复 40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 后冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。取 1 μl 扩增产物加入含 Gold View 染色剂的 2% 琼脂糖凝胶中电泳,选用 100 bp DNA Marker(大连宝生物公司)。ATG4A 及 ATG16L1 基因 PCR 扩增产物分别采用限制性内切酶 *Alu* I (酶切序列为 5'-AGCT-3',大连宝生物公司)、*Bfu* I (酶切序列为 5'-GTATCC-3',美国赛默飞公司)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱内温育 1 h 后,全部加入 3% 琼脂糖凝胶(含 Gold View 染色剂)中,分别选用 100 bp、50 bp DNA Marker(大连宝生物公司),80 V 恒压电泳 1 h,用凝胶成像仪查看结果并存档。

1.2.3 DNA 测序 每个基因在病例组及对照组每种基因型中分别随机挑选 10 份 PCR 扩增产物送至上海生工公司测序,测序结果用 DNAMAN 5.0 及 Chromas 软件进行分析,并与酶切分型结果进行比对,以确认酶切分型准确无误。

1.3 统计学分析

本文所有数据均采用 SPSS 19.0 及 EmpowerStats 2.13.9 软件进行分析。人口统计学中的年龄差异采用独立样本 *t* 检验进行分析,性别差异则采用卡方检验。ATG4A 基因

rs807185(NM_052936.3;c.10+5652A>T)位点及 ATG16L1 基因 rs2241880(NG_023038.1:g.28152A>G)位点的多态性与肺结核病相关性则采用 logistic 回归进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 产物扩增结果

病例组及对照组样本 ATG4A 及 ATG16L1 基因 PCR 扩增均成功,目的片段长度分别为 222 bp 和 282 bp,见图 1A、B。

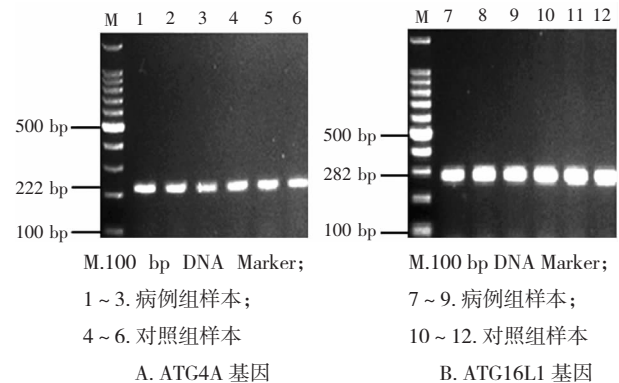


图 1 ATG4A 及 ATG16L1 基因 PCR 电泳图

Fig.1 Electrophores pattern of PCR in ATG4A and ATG16L1 gene

2.2 基因型判定

ATG4A 基因 rs807185 位点的 TT 基因型为野生型,不能被切开,仍在 222 bp 处可见条带,AT 基因型则在 222 bp、134 bp 及 88 bp 处均可见条带,其为杂合突变型;AA 基因型为纯合突变型,将被切分成 2 条片段:134 bp 和 88 bp(详见图 2A)。而 ATG16L1 基因 rs2241880 位点的 AA 基因型为野生型,将被切分成 2 条片段:166 bp 和 116 bp;GG 基因型为纯合突变型,不能被切开,仍在 282 bp 处可见条带,AG 基因型则在 282 bp、166 bp 及 116 bp 处均可见条带,其为杂合突变型(详见图 2B)。

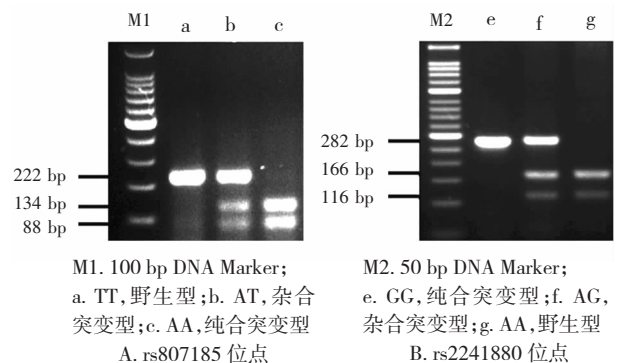


图 2 rs807185 位点及 rs2241880 位点多态性酶切电泳图

Fig.2 The electrophoresis results of restriction analysis in the rs807185 and rs2241880 locus

2.3 PCR 产物 DNA 测序结果

送检标本测序结果与酶切分型完全匹配,证实酶切结果正确。ATG4A 基因测序分型结果见图 3A,野生型 TT,为红色 T 峰;杂合突变型 AT,为重叠的红色 T 峰和绿色 A 峰;纯合突变型 AA,则为绿色 A 峰。图 3B 为 ATG16L1 测序分型结果,野生型 AA,为绿色 A 峰;杂合突变型 AG,为重叠的绿色 A 峰和黑色 G 峰;纯合突变型 GG,则为黑色 G 峰。

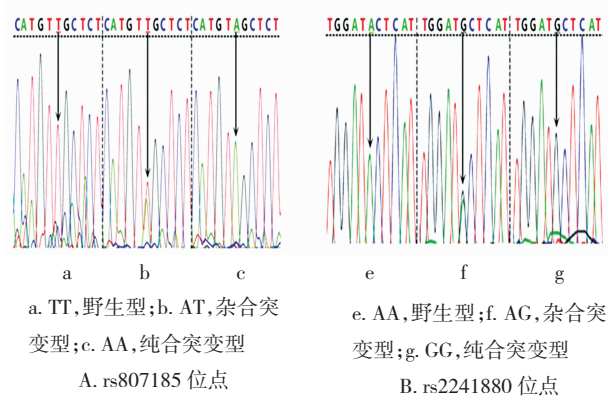


图 3 rs807185 位点及 rs2241880 位点 DNA 测序图
Fig.3 DNA sequencing analysis for detection of rs807185 and rs2241880

2.4 人口统计学分析

2 组人群的年龄经独立样本 t 检验分析后不存在统计学差异($t=-0.352, P=0.725$),经卡方检验分析性别后也无统计学差异($\chi^2=1.007, P=0.316$)。

2.5 ATG4A 及 ATG16L1 基因多态性分析

2 组人群中 ATG4A 的 rs807185 位点(T/A)及 ATG16L1 的 rs2241880 基因型频率的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。在病例组中,rs807185 位点的 TT 基因型、AT 基因型及 AA 基因型频率分别为:71.1%、10.6%和 18.3%,对照组中上述指标频率为:60.5%、16.9%及 22.6%,经统计分析后得到 $P=0.025$,比值比(95%可信区间)[$OR(95\%CI)$]为 0.53(0.30, 0.92)和 0.119,0.69(0.44, 1.10);2 组人群 T、A 等位基因分析得到 $P=0.012$, $OR(95\%CI)$ 为 0.69(0.51, 0.92),显性模型分析得到 $P=0.017$, $OR(95\%CI)$ 为 0.62(0.42, 0.92);而 ATG16L1 的 rs2241880 位点(A/G)的各指标经分析均无统计学意义,详见表 1。按性别分析后,rs807185 位点的前述指标在女性中得到相同的趋势,而在男性中均无统计学意义;rs2241880 位点的各指标在男女中仍无统计学意义(见表 2)。

表 1 病例组及对照组 ATG4A 及 ATG16L1 基因多态性的基因型和等位基因频率分布

Tab.1 The allele and genotype frequencies of ATG4A and ATG16L1 in pulmonary tuberculosis cases and controls

基因		病例组(n, %)	对照组(n, %)	$OR(95\%CI)$	P 值
ATG4A	等位基因 T	333(76.4)	342(69.0)	0.69(0.51, 0.92)	0.012
	A	103(23.6)	154(31.0)		
	基因型 TT	155(71.1)	150(60.5)	0.53(0.30, 0.92)	0.025
	AT	23(10.6)	42(16.9)	0.69(0.44, 1.10)	0.119
	AA	40(18.3)	56(22.6)		
	隐性模型 TT+AT	178(81.7)	192(77.4)	0.77(0.49, 1.21)	0.260
	AA	40(18.3)	56(22.6)		
显性模型	TT	155(71.1)	150(60.5)	0.62(0.42, 0.92)	0.017
	AA+AT	63(28.9)	98(39.5)		
ATG16L1	等位基因 A	276(63.3)	310(62.5)	0.97(0.74, 1.26)	0.800
	G	160(36.7)	186(37.5)		
	基因型 AA	78(35.8)	93(37.5)	1.15(0.78, 1.71)	0.474
	AG	120(55.0)	124(50.0)	0.77(0.41, 1.46)	0.420
	GG	20(9.2)	31(12.5)		
	隐性模型 AA+AG	198(90.8)	217(87.5)	0.71(0.39, 1.28)	0.253
	GG	20(9.2)	31(12.5)		
	显性模型 AA	78(35.8)	93(37.5)	1.08(0.74, 1.57)	0.701
	GG+AG	140(64.2)	155(62.5)		

注:n:例数; $OR(95\%CI)$:比值比(95%可信区间); $P<0.05$ 差异具有统计学意义

表 2 病例组及对照组 ATG4A 与 ATG16L1 基因多态性的基因型和等位基因频率在男女中的分布

Tab.2 The allele and genotype frequencies of ATG4A and ATG16L1 between pulmonary tuberculosis cases and controls in gender

			病例组		对照组		OR值(95%CI)		P 值	
			男 n(%)	女 n(%)	男 n(%)	女 n(%)	男	女	男	女
ATG4A	等位基因	T	192(75.6)	141(77.5)	190(71.4)	152(66.1)	0.81(0.55, 1.19)	0.57(0.36, 0.88)	0.283	0.012
		A	62(24.4)	41(22.5)	76(28.6)	78(33.9)				
	基因型	TT	92(72.4)	63(69.2)	94(70.7)	56(48.7)	4.09(0.85, 19.8)	0.33(0.17, 0.67)	0.080	0.002
		AT	8(6.3)	15(16.5)	2(1.5)	40(34.8)	0.75(0.42, 1.32)	0.61(0.28, 1.34)	0.316	0.218
		AA	27(12.4)	13(14.3)	37(27.8)	19(16.5)				
	隐性模型	TT+AT	100(78.7)	78(85.7)	96(72.2)	96(83.5)	0.70(0.40, 1.24)	0.84(0.39, 1.81)	0.221	0.660
		AA	27(21.3)	13(14.3)	37(27.8)	19(16.5)				
	显性模型	TT	92(72.4)	63(69.2)	94(70.7)	56(48.7)	0.92(0.54, 1.57)	0.42(0.24, 0.75)	0.753	0.003
		AA+AT	35(27.6)	28(30.8)	39(29.3)	59(51.3)				
ATG16L1	等位基因	A	166(65.4)	110(60.4)	160(60.2)	150(65.2)	0.80(0.56, 1.14)	1.23(0.82, 1.84)	0.220	0.318
		G	88(34.6)	72(39.6)	106(39.8)	80(34.8)				
	基因型	AA	51(40.2)	27(29.7)	48(36.1)	45(39.1)	0.94(0.56, 1.59)	1.56(0.85, 2.84)	0.821	0.149
		AG	64(50.4)	56(61.5)	64(48.1)	60(52.2)	0.54(0.24, 1.21)	1.33(0.47, 3.79)	0.134	0.589
		GG	12(9.4)	8(8.8)	21(15.8)	10(8.7)				
	隐性模型	AA+AG	115(90.6)	83(91.2)	112(84.2)	105(91.3)	0.56(0.26, 1.19)	1.01(0.38, 2.68)	0.128	0.981
		GG	12(9.4)	8(8.8)	21(15.8)	10(8.7)				
	显性模型	AA	51(40.2)	27(29.7)	48(36.1)	45(39.1)	0.84(0.51, 1.39)	1.52(0.85, 2.74)	0.500	0.158
		GG+AG	76(59.8)	64(70.3)	85(63.9)	70(60.9)				

注: n: 例数; OR (95%CI): 比值比(95%可信区间); $P < 0.05$ 差异具有统计学意义

3 讨 论

自噬是以胞质空泡化为特征的细胞天然免疫方式, 主要辅助机体清除病原物质并维持机体免疫平衡。当病原体逃脱吞噬溶酶体的作用并对宿主细胞产生危害时, 自噬系统可帮助清除病原体。细胞自噬清除病原体主要通过如下步骤来完成: 内质网来源的双层膜结构吞噬感染病原体并分隔胞浆成分, 形成自噬体, 随后自噬体与溶酶体融合而形成自噬溶酶体, 其所吞噬的成分最终将被送至溶酶体系统内降解。由于形成自噬体是细胞自噬发生过程中最核心的环节, 因此, 几乎所有调节自噬过程的相关基因均参与或影响自噬体的形成。多项研究表明, 真核生物中 ATG12-ATG5 和 ATG8-phosphatidylethanolamine (ATG8-PE, 微管相关蛋白 1 轻链-磷脂酰乙醇胺) 泛素样结合系统与自噬体的形成密切相关^[3]。其中作为机体参与自噬过程的必需基因^[4], ATG5 及 ATG8 在机体通过自噬清除胞内结核杆菌的过程中发挥着不可替代的作用。

ATG4A 基因, 位于染色体 Xq22.1-q22.3 上, 是 C-54 家族中的一种半胱氨酸蛋白酶, 其可通过控制 ATG8 的裂解以调节 ATG8 与微管相关蛋白轻链-磷脂酰乙醇胺的共价结合与解离而影响自噬体的形成^[5]; ATG16L1 基因位于染色体 2q37.1 上, 主要在肠上皮细胞、CD4+ 和 CD8+ 淋巴细胞以及巨噬细胞内表达, 其所编码的蛋白质在细胞自噬过程中将与 ATG5 和 ATG12 形成复合物, 可有效地控制胞内细菌感染^[6]; 利用 SiRNA 沉默 ATG16L1 基因通过阻断 ATG12-ATG5 与细胞膜相结合, 引起细胞自噬受阻及清除病原体的能力下降, 从而阻碍自噬体的形成, 如 ATG16L1 基因缺陷可减少 HeLa 细胞对沙门氏杆菌的吞噬作用^[7]; 并且 ATG4A 基因及 ATG16L1 基因通过介导细胞自噬体的形成, 从而参与机体通过自噬清除病原体。

rs807185 是位于 ATG4A 基因的内含子区上 SNP 位点, 该位点的等位基因由 T 突变为 A。而 rs2241880, 是 ATG16L1 基因上一个编码非同义氨基酸变化的 SNP 位点, 其第九外显子区第 47 等位基

因上的 A 突变为 G,以致编码的苏氨酸突变为丙氨酸。此两个基因的 SNP 位点多次被证实与欧美多国人群的多种慢性感染性疾病存在易感性相关^[8-9]。然而在中国和日本的多项研究报道中均未发现其与疾病的易感相关性^[10-11]。以上结果提示基因位点的多态性在人种及地域等方面可能存在一定的差异。最近的研究发现,该位点的多态性也与许多呼吸系统疾病相关。Liao 等^[13]指出 ATG16L1 基因 rs2241880 位点多态性与台湾地区男性吸烟人群慢性阻塞性肺疾病存在相关性。ATG4A 基因 rs807185 位点及 ATG16L1 基因 rs2241880 位点的 SNP 与结核病的相关关系尚未见报道,故对此进行了相关研究。

本研究结果显示,ATG4A 基因 rs807185 位点的多态性与西南地区人群肺结核病呈现负相关,且在女性群体中该趋势更加明显。考虑可能与该 SNP 位点位于性染色体上或与女性性激素有一定关系,有报道指出该基因与许多女性肿瘤性疾病存在密切关系^[13-14]。而 ATG16L1 基因 rs2241880 位点多态性与西南地区人群肺结核病则无明显相关。考虑与该位点在其他疾病中一样,可能存在种族地域差异问题,或因检测样本量偏少,存在检验效能偏倚,还有可能是 rs2241880 位点多态性对疾病的影响不起独立作用。本课题组将在后续研究中继续扩大样本量,尝试各种先进的实验方法,并检测更多自噬相关基因的多态性位点与肺结核的易感性,并设计相关的功能试验,为将来发展肺结核基因诊断及治疗提供依据。

参 考 文 献

- [1] Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics[J]. *Genes Immun*, 2003, 4(1): 4-11.
- [2] Lam KK, Zheng X, Forestieri R, et al. Nitazoxanide stimulates autophagy and inhibits mTORC1 signaling and intracellular proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(5): e1002691. doi: 10.1371/journal.ppat.1002691
- [3] Ohsumi Y, Mizushima N. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15(2): 231-236.
- [4] Zhao Z, Fux B, Goodwin M, et al. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens[J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(5): 458-469.
- [5] Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, et al. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis[J]. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1792-1802.
- [6] Cummings JR, Cooney R, Pathan S, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13(8): 941-946.
- [7] Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 596-604.
- [8] Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, et al. Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(29): 4643-4651.
- [9] Newman WG, Zhang Q, Liu X, et al. Genetic variants in IL-23R and ATG16L1 independently predispose to increased susceptibility to Crohn's disease in a Canadian population[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2009, 43(5): 444-447.
- [10] Zhang J, Chen J, Gu J, et al. Association of IL23R and ATG16L1 with susceptibility of Crohn's disease in Chinese population[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(10): 1201-1206.
- [11] Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, et al. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients[J]. *J Hum Genet*, 2007, 52(7): 575-583.
- [12] Chen CZ, Ou CY, Wang RH, et al. Association of Egr-1 and autophagy-related gene polymorphism in men with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Formos Med Assoc*, 2013 Sep 4; pii: S0929-6646(13)00262-3. doi: 10.1016/j.jfma.2013.07.015.
- [13] Liao YP, Chen LY, Huang RL, et al. Hypomethylation signature of tumor-initiating cells predicts poor prognosis of ovarian cancer patients[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(7): 1894-1906.
- [14] Wolf J, Dewi DL, Fredebohm J, et al. A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype[J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(6): R109.

(责任编辑:冉明会)