

· 论 著 ·

MxA 启动子和 eIF-2a 调节区 2 基因多态性对 HBV 感染自然转归的影响*

魏新素¹, 张平安^{1△}, 李 艳¹, 邓 碩²

(武汉大学人民医院:1. 检验科; 2. 感染科, 武汉 430060)

摘要:目的 探讨干扰素诱导的黏病毒抗性蛋白 A(MxA)和真核细胞起始因子 2a 调节区 2(eIF-2a-reg2)基因的单核苷酸多态性(SNP)对乙型肝炎病毒(HBV)感染自然转归的影响。方法 收集湖北地区 160 例 HBV 自限感染者和 243 例慢性 HBV 感染者的外周血标本,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析方法,检测 MxA 启动子 -88、-123 位点及 eIF-2a-reg2 基因型。结果 MxA 启动子 -88G/T 位点基因型和等位基因在慢性 HBV 感染者和自限性感染者中的分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。HBV 自限性感染者 MxA 启动子 -88 位点 GG 基因型和 G 等位基因频率分别为 41.3%、62.8%, 均较慢性感染者频率 52.7%、74.9% 低($P = 0.025$ 和 $P = 0.001$), 而 TT 基因型和 T 等位基因频率分别为 15.6%、37.2%, 均较慢性感染者频率 2.9%、25.1% 高($P = 0.000$ 和 $P = 0.001$), 比值比为 6.24, 95% 可信限 2.63~14.81。然而, MxA 启动子 -123 位点、eIF-2a-reg2 基因的不同基因型和等位基因在 HBV 自限性感染组和慢性感染组间的分布频率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 MxA 启动子 -88G/T 位点多态性与 HBV 感染后的结局有关, 其中 TT 基因型或 T 等位基因的存在可能有利于 HBV 感染后的清除。

关键词:乙型肝炎病毒; 黏病毒抗性蛋白 A; 真核细胞起始因子 2a 调节区 2; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)05-0536-02

Influences of the gene polymorphisms of MxA promoter and eIF-2a-reg2 on the clinical outcome of hepatitis B virus infection*

Wei Xinsu, Zhang Pingan, Li Yan, et al.

(1. Department of Laboratory Science, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Department of Infection Disease, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Objective To explore the influences of the gene polymorphisms of myxovirus resistance A(MxA) promoter and eukaryocyte initiation factor 2 alpha regulatory region 2(eIF-2a-reg2) on the outcome of hepatitis B virus(HBV)infection. **Methods** After the process of extracting genomic DNA from blood of 160 subjects who spontaneously recovered and 243 patients with chronic HBV infection, three single nucleotide polymorphism(SNP)sites in MxA promoter marked as -88G/T, -123C/A and eIF-2a-reg2 were determined by polymerase chain reaction(PCR)-restriction fragment length polymorphism(RFLP)analysis. **Results** Subjects with self-limiting infection had a lower frequency of MxA - 88 GG genotype(41.3% vs 52.7%, $P = 0.025$) or G allele(62.8% vs 74.9%, $P = 0.001$), and a higher frequency of TT genotype(15.6% vs 2.9%, $P = 0.000$) or T allele(37.2% vs 25.1%, $P = 0.001$) than patients with persistent HBV infection(OR:6.24, 95% CI:2.63~14.81). However, no significant differences in the distribution of MxA - 123C/A and eIF-2a-reg2 gene SNP between patients with persistent HBV infection and subjects with self-limiting HBV infection were observed($P > 0.05$). **Conclusion** There is an association between polymorphisms of the promoter region -88G/T of MxA and the resolution of HBV infection. The presence of the TT genotype or T allele in MxA promoter -88 sites may be resistant to HBV infection, which gives some new clues to the study of pathogenesis of persistent HBV infection.

Key words: Hepatitis B virus; Myxovirus resistance A; Eukaryocyte initiation factor 2 alpha regulatory region 2; Single nucleotide polymorphism

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的转归非常复杂^[1-2], 这种巨大差异的机制尚未完全阐明, 基因多态性决定的个体遗传因素可能为其主要原因。干扰素(interferon, IFN)是机体抗 HBV 感染和临床治疗乙型肝炎的重要细胞因子, 然而 IFN 的抗病毒机制主要通过其诱导抗病毒蛋白来完成^[3-4]。因此, 本研究选择 IFN 诱导的抗病毒蛋白: 黏病毒抗性蛋白 A (myxovirus resistance A, MxA) 和真核细胞起始因子 2a 调节区 2 (eukaryocyte initiation factor 2 alpha regulatory region 2, eIF-2a-reg2) 作为研究切入点, 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分析方法, 检测湖北地区 HBV 自限性感染者和慢性感染者 MxA 启动子 -88、-123 位点及 eIF-2a-reg2 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymor-

phisms, SNP), 探讨其基因型与 HBV 自然感染转归的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 慢性 HBV 感染者(简称慢性感染组)243 例, 男 178 例, 女 65 例, 年龄(54.7 ± 14.8)岁, 所有病例的诊断均符合 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎诊断标准, 并排除合并感染其他肝炎病毒。HBV 自限性感染者 160 例(简称自限性感染组), 男 106 例, 女 54 例, 年龄(56.4 ± 14.0)岁, 未接种过 HBV 疫苗, 且 HBsAg(-), HBsAb(+), 血常规、生化指标均在参考范围内, 排除肝脏、肾脏、内分泌和心血管疾病。两组间性别构成和年龄分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 基因组 DNA 提取 采集 2 组对象清晨空腹静脉血样本。采用上海赛百盛基因技术有限公司基因组 DNA 提取试

* 基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(2008CDB164)。 △ 通讯作者, E-mail: zhangpingan@yahoo.com.cn。

剂盒,抽提全血中的基因组 DNA,并保存于-20℃备用。

1.3 引物设计及主要试剂 通过美国国家生物信息中心的基因库(GenBank)获得 MxA 启动子和 elF-2a-reg2 基因序列及相应位点的单核苷酸信息,应用 Primer5.0 并参考文献^[5-6]设计符合要求的引物序列,引物由上海赛百盛生物工程有限公司合成。MxA 启动子-88 和 -123 引物序列相同(方向 5'→3'),F: TGA AGA CCC CCA ATT ACC AA, R: CTC TCG TTC GCC TCT TTC AC, 扩增片段长度为 350 bp。elF-2a-reg2 引物序列为(方向 5'→3'),F: TGC TTG CTA GTT TGT TTC CCA C, R: GCC ATG TAC ATC ACA GGT TTA CTG, 扩增片段长度为 563 bp。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量标记购自大连宝生物工程有限公司。限制性内切酶 Hha I、Pst I 和 Ssp I 均为上海生工生物工程技术服务有限公司代理的美国 BBI 公司产品。

1.4 PCR 扩增目的基因 PCR 扩增体系为:10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, dNTPs 各 200 μmol/L, MgCl₂ 2.0 μmol/L, 引物各 0.4 μmol/L, 模板 50~100 ng, 总体积 25 μL。MxA 启动子-88、-123 位点扩增条件为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 45 s; 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。elF-2a-reg2 位点扩增条件为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增后取产物 8 μL, 加 2 μL 载样缓冲液混匀, 经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察, 结合 DNA 分子量标准判断扩增是否成功。

1.5 RFLP 方法检测 SNP PCR 产物 10 μL, 10×缓冲液 2 μL, 限制性内切酶 1 μL(2 U/μL), 10×BSA 2 μL, 补去离子水至总体积 20 μL 反应体系。该反应体系在 37℃ 酶切 4 h。取酶切产物 12 μL 用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下参照 DNA 分子量标准鉴定酶切片段。

1.6 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MxA 启动子基因多态性分析 MxA 启动子 PCR 产物经鉴定为 350 bp 片段,结果与预期相符。分别用 Hha I(酶切 MxA 启动子-88 G/T 位点)和 Pst I(酶切 MxA 启动子-123 C/A 位点)消化 PCR 产物,电泳后判断结果。MxA 启动子-88 G/T 位点存在 TT(310 bp)、GT(310 bp、259 bp) 和 GG(259 bp)3 种基因型,-123 C/A 位点则存在 AA(350 bp)、CC(225 bp、125 bp) 和 CA(350 bp、225 bp 和 125 bp)3 种基因型。HBV 自限性感染者 MxA 启动子-88 位点 GG、GT 和 TT 基因型频率分别为 41.3%、43.1% 和 15.6%,慢性感染者频率为 52.7%、44.4% 和 2.9%。与慢性感染者相比,HBV 自限性感染者 MxA 启动子-88 位点携带的 GG 基因型($P=0.025$)或 G 等位基因($P=0.001$)频率较低,但携带的 TT 基因型($P=0.000$)或 T 等位基因($P=0.001$)频率较高,比值比为 6.24, 95% 可信限 2.63~14.81。MxA 启动子-123 位点 CC、CA 和 AA 基因型在 HBV 自限性感染组频率分别为 68.7%、26.3% 和 5.0%,而在慢性感染组频率为 64.2%、30.9% 和 4.9%,不同基因型和等位基因在 HBV 自限性感染组和慢性感染组间的分布频率差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 elF-2a-reg2 基因多态性分析 elF-2a-reg2 基因 PCR 产物经鉴定为 563 bp 片段,与本研究引物设计预期的 DNA 扩增片段大小一致。用 Ssp I 消化 PCR 产物,电泳后判断结果。elF-2a-reg2 A/G 位点存在 AA(476 bp)、GG(563 bp) 和 AG

(476 bp、563 bp)3 种基因型。elF-2a-reg2 A/G 位点 AA、AG 和 GG 基因型在 HBV 自限性感染组频率分别为 81.3%、16.2% 和 2.5%,而在慢性感染组频率为 76.5%、18.5% 和 5.0%,两组间基因型和等位基因分布频率差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

病毒感染机体后,早期的抗病毒反应中,最重要的是诱导 IFN 产生。IFN 是诱生蛋白,正常细胞一般不自发产生 IFN,只具有合成 IFN 的潜能,IFN 基因处于被抑制的静止状态,病毒感染机体后可解除抑制,使 IFN 获得表达。IFN 与受体结合,激活下游的 JAK-STAT 信号通路形成 2 个转录因子,IFN 活化因子(IFN-alpha-activated factor,AAF)和 IFN 刺激基因因子 3(IFN-stimulated gene factor 3,ISGF3)。AAF 和 ISGF3 转位入核,结合到含有 IFN 激活反应元件(interferon-stimulated response element,ISRE)的抗病毒蛋白基因启动子上,导致一系列 IFN 诱导的抗病毒蛋白基因的表达,生成多种抗病毒蛋白,例如:蛋白激酶、2',5'-寡腺苷酸合成酶和 MxA 蛋白等^[7-8]。

MxA 蛋白被认为是特异性最强的 IFN 作用指标,它可直接抑制 HBV 复制。据 GenBank 显示 MxA 启动子有 3 处类似 ISRE 的序列,其中 MxA 启动子-88 位点所在区域与第 2 个 ISRE 序列相近,特别是发生 G→T 突变后,更类似 ISRE 序列,可促进 MxA 基因 mRNA 的表达,生成 MxA 蛋白,起到抗病毒作用,所以推测 MxA 启动子-88、-123 位点的 SNP 可能影响 MxA 基因的 mRNA 表达^[9]。本研究发现,HBV 自限性感染者 MxA 启动子-88 位点携带的 TT 基因型或 T 等位基因频率较慢性感染者高,比值比为 6.24,95% 可信限 2.63~14.81。可能含 T 基因型(GT、TT)个体要比不含 T 基因型(GG)个体表达更多的 MxA 蛋白产物,从而有利于 HBV 感染的自然恢复,因此,MxA 启动子-88 位点 GT、TT 型者抗 HBV 效果优于 GG 型者。对于 MxA 启动子-123 位点基因多态性与病毒感染关系的研究报道较少,Hijikata 等^[10]在研究慢性丙型肝炎时提示 MxA 启动子-123C/A 位点 SNP 与 IFN 疗效有关,且该位点 SNP 与 -88G/T 高度连锁,但本研究发现 MxA 启动子-123 位点不同基因型和等位基因在 HBV 自限性感染组和慢性感染组间的分布频率差异均无统计学意义,这一结果可能与标本量或病毒基因型有关。

蛋白激酶活化的 elF-2a-reg2 也是宿主 IFN 信号转导通道上的重要因子,King 等^[5]研究 82 例中国台湾慢性乙型肝炎患者 elF-2a-reg2 基因 SNP 与 IFN 疗效的关系,结果提示 elF-2a-reg2 基因 SNP 与 IFN 治疗效果有相关关系,AG 基因型慢性乙型肝炎患者 IFN 疗效差。本研究则从另外的角度,探讨 elF-2a-reg2 基因 SNP 与 HBV 感染后自然转归的关系,结果发现 elF-2a-reg2 不同基因型和等位基因在 HBV 自限性感染组和慢性感染组间的分布频率差异均无统计学意义,提示 elF-2a-reg2 基因可能在 HBV 感染后病毒清除上不起主要作用。

影响 HBV 感染结局的因素有很多,除病毒生物学特征及宿主对 HBV 的免疫状态等因素外^[11-12],IFN 的抗病毒作用还存在其信号通路上众多基因及其诱导产生的各种抗病毒蛋白。因此,MxA 启动子和 elF-2a-reg2 基因 SNP 与 HBV 感染自然转归的关系仅显示宿主遗传背景多样性和复杂性的一个方面,所以评价 IFN 信号通路基因 SNP 与 HBV 感染关系有待今后大规模检测 SNP,积累更多资料综合各方面因素再来定论。总之,宿主遗传因素对 HBV 感染自然转归的影响发生了改变,值得同类研究高度注意。与 elF-2a-reg2(下转第 540 页)

统在 BNP 浓度为 44.5、430.6、1 571.8 pg/mL 处的批内 CV 分别为 2.3%、2.2%、1.8%，总 CV 分别为 4.4%、2.6%、2.5%，Modular E170 系统在 NT-proBNP 为 259.6、6 039.2 pg/mL 处的批内 CV 分别为 0.7%、0.4%，总 CV 分别为 0.8% 和 0.8%。本文结果显示，BNP 浓度在 30.6~1 736.8 pg/mL 范围内，批内 CV 为 1.1%~2.3%，总 CV 为 2.3%~3.5%，与国外报道相一致，各浓度点的 CV 值均小于厂商声明的不精密度，其分析性能得到验证确认。NT-proBNP 浓度在 72.9~4 322.0 pg/mL 范围内，批内 CV 为 1.1%~2.2%，总 CV 为 1.5%~2.9%，与国外报道一致，与厂商声明值比较，除 72.9 pg/mL 浓度水平外，各浓度点的不精密度均小于厂商声明的不精密度，经计算验证值，72.9 pg/mL 浓度水平外实验测得的批内标准差和总标准差均小于验证值，说明实验得到的不精密度与厂商声明值没有差异，厂商声明的不精密度仍得到验证确认。

Gorissen 等^[9] 报道，使用西门子 ADVIA Centaur 化学发光免疫系统测定 BNP 的批内 CV 平均为 3.66%，批间 CV 平均为 6.05%，而用罗氏 Cobas E170 电化学发光免疫分析系统测定 NT-proBNP 的批内 CV 平均为 1.39%，批间 CV 平均为 2.96%。Prontera 等^[10] 对 2005~2008 年意大利参加能力验证试验的 90 至 112 家实验室共 28 个能力验证样本结果的研究表明，BNP 测定方法内 CV 为 20.2%，方法间 CV 为 46.4%，而 NT-proBNP 方法内 CV 为 4.1%，方法间 CV 为 7.3%，BNP 测定平均总的 CV 是 50.6%，明显高于 NT-proBNP 的 8.4%。Wu 等^[7] 的一项研究显示，西门子 ADVIA Centaur 化学发光免疫分析系统测定 BNP 个体内生物学变异为 50%，个体间的生物学变异为 28%；依此导出 BNP 精密度质量指标小于 12.5% 较为理想。本研究结果显示，BNP 和 NT-proBNP 测定的不精密度 CV 均小于 10%，表明 2 个检测系统的精密度性能临床均可接受，但 NT-proBNP 测定的批内 CV 和总 CV 均低于 BNP，表明 NT-proBNP 测定具有更好的精密度，提示 NT-proBNP 测定对心力衰竭的诊治在一定程度上要优于 BNP。

参考文献

[1] 张秀明, 郑松柏, 庄俊华, 等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分

(上接第 537 页)

基因 SNP 相比，MxA -88G/T 多态性有望成为 HBV 感染预防和药物治疗应答的预测指标。

参考文献

- [1] Mahboobi N, Agha-Hosseini F, Mahboobi N, et al. Hepatitis B virus infection in dentistry: a forgotten topic [J]. J Viral Hepat, 2010, 17(5): 307-316.
- [2] 黄建宏, 邹全明. 乙型肝炎病毒基因型临床研究近况 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 743-745.
- [3] Cao B, Liu X, Hou F, et al. The haplotype of the MxA gene promoter is associated with hepatitis B virus infection in a Chinese population [J]. Liver Int, 2009, 29(9): 1383-1388.
- [4] Book H, Yang SJ. Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon [J]. Yonsei Med J, 2010, 51 (1): 9-17.
- [5] King JK, Yeh SH, Lin MW, et al. Genetic polymorphisms in interferon pathway and response to interferon treatment in hepatitis B patients: A pilot study [J]. Hepatology, 2002, 36(6): 1416-1424.
- [6] Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, et al. Polymorphisms in interfer-

析性能验证方案与实验方法 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30 (11): 1293-1297.

- [2] NT-proBNP 共识专家组. NT-proBNP 国际专家共识 [EB/OL]. <http://wenku.baidu.com/view/46969181e53a580216fcfe89.html>.
- [3] 中华医学会检验分会. 冠状动脉疾病和心力衰竭时心脏标志物临床检测应用建议 [J]. 中华医学检验杂志, 2006, 29(9): 774-778.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. User demonstration of performance for precision and accuracy EP15-A2 [S]. Wayne, USA: CLSI, 2004.
- [5] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 126.
- [6] Yeo KT, Wu AH, Apple FS, et al. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage BNP assay [J]. Clin Chim Acta, 2003, 338(8): 107-115.
- [7] Wu AH, Packer M, Smith A, et al. Analytical and Clinical Evaluation of the Bayer ADVIA Centaur Automated B-Type Natriuretic Peptide Assay in Patients with Heart Failure: A Multisite Study [J]. Clin Chem, 2004, 50(5): 867-873.
- [8] Rawlins ML, Owen WE, Roberts WL. Performance Characteristics of Four Automated Natriuretic Peptide Assays [J]. Am J Clin Pathol, 2005, 123(4): 439-445.
- [9] Gorissen C, Baumgarten R, de Groot M, et al. Analytical and clinical performance of three natriuretic peptide tests in the emergency room [J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(5): 678-684.
- [10] Prontera C, Zaninotto M, Giovannini S, et al. Proficiency testing project for brain natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal part of the propeptide of BNP (NT-proBNP) immunoassays: the CardioOrmocheck study [J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47 (6): 762-768.

(收稿日期: 2010-08-10)

on-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS 1 and PKR [J]. Genes Immun, 2003, 4(6): 411-419.

- [7] 张克菊, 魏茂提, 何丽, 等. MxA 基因多态性与病毒性疾病研究进展 [J]. 武警医学院学报, 2007, 14(6): 476-478.
- [8] Pandey M, Rath PC. Organization of the interferon-inducible 2', 5'-oligoadenylate-dependent ribonuclease L (RNase L) gene of mouse [J]. Mol Biol Rep, 2007, 34(2): 97-104.
- [9] 尹彦涛, 夏平安, 崔保安, 等. MxA 抗病毒蛋白的研究概况 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(1): 87-89.
- [10] Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, et al. Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patient: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro [J]. Intervirology, 2001, 44(6): 379-382.
- [11] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection [J]. N Engl J Med, 2008, 359(14): 1486-1500.
- [12] 张平安, 吴健民, 李艳. 几种细胞因子基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关系 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(2): 173-175.

(收稿日期: 2010-08-03)