

• 论 著 •

乙型肝炎感染者血清标志物与 ApoAI-75MspI 基因多态性的相关性研究

尹志农¹, 刘 薇², 王俊文¹

(1. 北京市垂杨柳医院暨北京微创医院实验中心 100022; 2. 河北医科大学, 石家庄 050017)

摘 要:目的 探讨 ApoAI-75MspI 基因多态性与乙型肝炎标志物之间的内在相关性。方法 留取本院 720 例被检者静脉血标本。为叙述方便, 把 HbsAg、抗-HBs、HbeAg、抗-HBe、抗-HBc 分别作为 1、2、3、4、5 项。分为 9 组, 1、2、3、4、5 全阴组, 2、5 阳性组, 1、3、5 阳性组, 1、4、5 阳性组, 4、5 阳性组, 1、5 阳性组, 5 阳性组, 2 阳性组, 2、4、5 阳性组。每组 80 例。采用 SnaPshot 法检测 ApoAI-75MspI 基因的多态性, 最后用测序法验证检测结果。结果 1、2、3、4、5 项全阴组与其他组相比, ApoAI-75MspI 等位基因和基因型分布差异有统计学意义($P<0.05$)。1、2、3、4、5 项全阴组 G/G 基因型高于其他组别, G/A 基因型低于其他组别($P<0.05$)。5 项全阴组 G 等位基因频率高于其他组别($P<0.05$), A 等位基因频率则低于其他组别($P<0.05$)。结论 ApoAI-75MspI 基因多态与乙型肝炎血清标志物不同组别有相关。

关键词:载脂蛋白 A-I; 基因多态性; 乙型肝炎
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.010 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)03-0276-02

Correlation between serum markers and polymorphism of ApoAI-75MspI gene in patients with type B hepatitis

Yin Zhinong¹, Liu Wei², Wang Junwen¹

(1. Laboratory Center, Beijing Cuiyangliu Hospital, Beijing 100022, China;
2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between gene polymorphisms of ApoAI-75 MspI genotypes and models of HBV serum markers in patients with type B hepatitis. **Methods** Blood samples of 720 cases of subjects were collected randomly. For convenience, HbsAg, anti-HBs, HbeAg, anti-HBe, and anti-HBc were named as 1, 2, 3, 4 and 5 respectively. All patients were divided into 9 groups, including 1, 2, 3, 4 and 5 negative group, 2 and 5 positive group, 1, 3 and 5 positive group, 1, 4, and 5 positive group, 4 and 5 positive group, 1 and 5 positive group, 5 positive group, 2 positive group, and 2, 4 and 5 positive group. There were a total of 720 cases, including 80 patients for each group. Detection for gene polymorphisms of ApoAI-75MspI was carried out by single-base multilocus micro-sequencing (Snapshot method), and different genotypes of each locus were conducted by the method of sequencing in order to support the final evidence of the accuracy of test results. **Results** There were significant differences not only in allele frequency but also in genotype distribution between 1, 2, 3, 4 and 5 negative group and the rest groups. And significantly higher frequencies of G allele gene and G/G genotype were observed between 1, 2, 3, 4 and 5 negative group and the rest groups. **Conclusion** The different models of HBV markers was associated with the gene polymorphism of ApoAI-75 MspI.

Key words: apolipoprotein A-I; gene polymorphisms; hepatitis B

乙型肝炎是世界范围内最常见的传染病之一, 有很高的发病率, 中国是乙型肝炎高发区。HBV 感染以后出现不同的临床转归与病原体因素、宿主免疫因素及宿主遗传因素有关。

基因多态性是指在一个生物群体中, 同时和经常存在两种或多种不连续的变异型或基因型或等位基因, 亦称遗传多态性^[1]。对遗传标志与疾病关联程度的分析, 在阐明人体对疾病的易感性、耐受性、临床表现的多样性以及对药物的反应性中都起到重要作用, 有助于了解疾病的发病机制和评估病情预后等。载脂蛋白 A-I (apolipoprotein A-I, ApoAI) 基因启动子-75 位点存在 G/A 突变, 与 ApoAI 的表达有关^[2]。笔者对 HBV 感染者进行研究, 以探讨 ApoAI-75MspI 基因多态性与乙型肝炎的内在关联性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按照《病毒性肝炎防治方案》^[3]所规定的标准随机选取本院感染科 HBV 感染患者 720 例, 其中男 342 例, 女 378 例, 平均年龄(42±5)岁。为叙述方便, 将 HBV 抗原抗体标志物的 HBsAg、抗-HBs、HbeAg、抗-HBe、抗-HBc 分别作为 1、2、3、4、5 项。按 HBV 血清标志物的不同模式将全部病例分

为 9 组, 每组 80 例, 年龄和性别构成尽可能一致。对照组(1、2、3、4、5 全阴): 男 41 例, 女 39 例, 平均年龄(35±3)岁; 2、5 阳性组: 男 40 例, 女 40 例, 平均年龄(39±4)岁; 1、3、5 阳性组: 男 39 例, 女 41 例, 平均年龄(36±2)岁; 1、4、5 阳性组: 男 41 例, 女 39 例, 平均年龄(36±6)岁; 4、5 阳性组: 男 41 例, 女 39 例, 平均年龄(44±2)岁; 1、5 阳性组: 男 39 例, 女 41 例, 平均年龄(40±2)岁; 5 阳性组: 男 40, 女 40, 平均年龄(41±4)岁; 2 阳性组: 男 40 例, 女 40 例, 平均年龄(37±1)岁; 2、4、5 阳性组: 男 38 例, 女 42 例, 平均年龄(44±1)岁。

1.2 仪器与试剂 Perkin Elmer GeneAmp 9600 PCR 仪(购自 ABI 公司); ABI 3730 核酸分析仪(购自 ABI 公司); 雅培 I2000 全自动免疫分析仪及相应配套试剂; ABI PRISM™ SNaPshot Multiplex Kit; 北京三博远志血液基因组小量提取试剂盒。

1.3 方法 (1)基因组 DNA 提取: 抽取肘静脉非抗凝血 5 mL, 采用血液基因组小量提取试剂盒, 严格按说明操作, 所提取 DNA 在-86℃保存。(2)基因多态性检测: ①引物设计: ApoAI-75MspI 引物参照文献设计, 由三博远志公司合成。上

游引物:5'-TAA GTG AGC ATT GCC AGG AC-3',下游引物:5'-CAC ACG GGA GAA GAC CTC CA-3'。② PCR 扩增:反应体系总体积为 20 μ L,其中 DNA 模板 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 2 U,10 $\times$ plus PCR Buffer 2 μ L,dNTP(10 mM)0.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 循环条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。③ PCR 产物电泳鉴定:PCR 产物通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,电泳 Buffer 为 TBE,电压 150 v,电泳 15 min。目的条带经 EB 染色后在紫外灯下观察。④ SNaPshot 反应:在紧邻待检测位点设计引物,位点的基因型由 SNaPshot 反应后引物标记上的不同荧光代表。荧光标记:A 绿色,G 蓝色。在相应位点出现单色峰即纯合子,双色峰为杂合子。反应原理如图 1 所示。⑤ DNA 测序:资料采用 NTI9.0 软件包分析。⑥ 统计学处理:全部数据使用 SPSS17.0 统计软件分析处理。计算各组间不

同基因型基因频率,确认其符合 Hardy-Winberg 平衡定律。多组间统计分析采用 *F* 分析,两两比较采用 *q* 检验;计数资料采用卡方检验。⑦ SNaPshot 法所判定基因型结果最终由测序进行验证。

2 结 果

2.1 不同组别不同基因型基因频率比较 在 720 例被检标本中,ApoAI-75MspI 共检出 3 种基因型,即 GG 型、GA 型、AA 型。统计分析后,5 项全阴组 GG 基因型频率高于其他组别($P<0.05$),GA 基因型则基因型频率低于其他组别($P<0.05$)。详见表 1。

2.2 不同组别不同等位基因频率比较 ApoAI-75MspI 共有 G、A 2 种等位基因。5 项全阴组 G 等位基因频率高于其他 7 组($P<0.05$),A 等位基因频率则低于其他组 7 组($P<0.05$),详见表 2。

表 1 不同组别 ApoAI-75 MspI 不同基因型频率比较

基因型	5 项全阴性	2,5 阳性	2,4,5 阳性	4,5 阳性	1,3,5 阳性	1,5 阳性	5 阳性	1,4,5 阳性	2 阳性
GG	72(0.90)	55(0.69) *	58(0.73) *	42(0.52) *	46(0.58) *	51(0.64) *	46(0.57) *	58(0.73) *	42(0.53) *
GA	8(0.10)	25(0.31) *	22(0.27) *	38(0.47) *	34(0.41) *	29(0.36) *	34(0.42) *	20(0.25) *	38(0.47) *
AA	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(0.02)	0(0.00)

* :与 5 项阴性组比较, $P<0.05$ 。

表 2 不同组别 G、A 等位基因频率比较

等位基因	全阴性	2,5 阳性	2,4,5 阳性	4,5 阳性	1,3,5 阳性	1,5 阳性	5 阳性	1,4,5 阳性	2 阳性
G	152(0.95)	135(0.84) *	136(0.85) *	122(0.80) *	126(0.79) *	131(0.82) *	126(0.79) *	136(0.85) *	122(0.76) *
A	8(0.05)	25(0.16) *	24(0.15) *	38(0.2) *	34(0.21) *	29(0.18) *	34(0.21) *	24(0.15) *	38(0.24) *

* :与全阴性组比较, $P<0.05$ 。

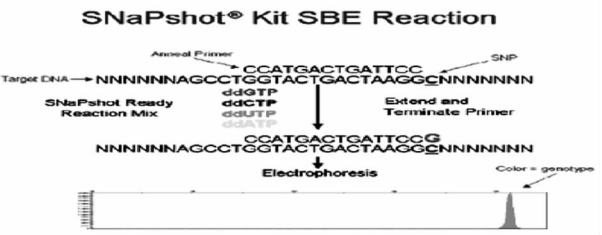


图 1 SNaPshot 反应原理图

3 讨 论

肝脏是脂类代谢的重要场所,与脂类的消化、吸收、分解、合成、运输等过程密切相关,参与脂肪酸分解、合成与改造。由于肝脏在脂类代谢中起到重要作用,肝脏受损会影响脂类代谢的正常运行。有研究表明,血脂和载脂蛋白可间接反映肝细胞的功能状态,可作为诊断、鉴别诊断、判断预后的参考依据^[4]。

ApoAI 主要在肝细胞中合成并通过细胞分泌到细胞膜表面和血浆^[5],血浆中的 ApoAI 在结合其他载脂蛋白、游离胆固醇等后以脂蛋白的形式进入血液循环。ApoAI 是血浆高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)主要载脂蛋白^[6],维持 HDL 结构,作为 HDL 受体的配体,被 HDL 受体识别与结合,可激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT),参与胆固醇酯化,在胆固醇的逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)过程中起重要作用。

近来研究表明,ApoAI 与病毒感染密切相关,其主要机制

有:(1)ApoAI 可抑制促炎性反应的氧化磷脂的产生和释放,从而启动急性时相反应抑制感染^[7];(2)ApoAI 可能通过干扰脂质双分子层而发挥抗病毒和免疫抑制活性^[8-9]。同时,一些学者发现,ApoAI 的下降水平和 HBV 复制或基因表达呈相关性^[10-11]。本研究对 ApoAI-75MspI 基因在乙型肝炎血清标志物不同模式中的基因多态性进行了探索,结果显示,ApoAI-75MspI 基因在乙型肝炎血清标志物不同组别之间表达有一定的差异,5 项全阴组 GG 基因型频率高于其他组别($P<0.05$),GA 基因型则低于其他组别($P<0.05$),5 项全阴组 G 等位基因频率高于其他组别($P<0.05$),A 等位基因则相反($P<0.05$)。由于 ApoAI-75MspI 位于 GC 富集区,G/A 的不同可能会影响 ApoAI 的转录和表达。已有研究显示,ApoAI 的生成率在 G/A 杂合子显著低于 G/G 纯合子,A 等位基因伴有启动子活性的降低,并且表达水平减少。同时有报道称,肝硬化患者血清中 ApoAI 水平低于健康人^[12]。再又因 ApoAI 是 HDL 的主要组成成分,HDL 有抗炎和抗病毒的活性,同时 ApoAI 与病毒感染密切相关,由此推之,ApoAI-75MspI 不同基因型频率以及等位基因频率在乙型肝炎血清标志物不同模式中会有差异^[13]。

乙型肝炎在世界范围内流行,严重威胁人们的健康。本研究表明 ApoAI 基因多态性与乙肝病毒感染存在相关性,其具体机制仍需进一步探索,以便为临床提供新的、灵敏、特异的诊断方法和有价值的生物标志物,为乙型病毒性肝炎的早期诊断、治疗以及改善预后提供新的思路。(下转第 280 页)

3 讨 论

目前,临床检验中绝大部分项目采用自动化分析仪器及配套试剂盒进行测定,尽管检测效率和精密度大大提高,但结果的准确性和可比性有待提高,建立有效、准确,同时便于操作运行的参考方法是进行常规检测结果量值溯源和评估的重要前提,相对于同位素稀释液相色谱/质谱法,本研究以期建立血清尿酸测定的紫外分光光度参考方法。

精密度是方法可靠的前提之一,本研究对不同性状及基质成分的血清基质冻干校准品、参考方法能力评估(RELA)样本和新鲜患者血清样本进行方法的精密度评估,以期获得方法的精密度进行了研究,结果表明方法精密度良好,批内精密度小于 1%,批间精密度小于 2%,对不同样本类型表现一致。

参考方法的建立需要对各种主要影响量进行评估确认,标准物质浓度及定标重现性是关键要素。本研究使用尿酸国家标准物质作为量值传递标准,为确定配制标准溶液和多点稀释校准液浓度的准确和标准化,对各浓度标准液吸光度进行测定,确认吸光度测定结果与文献结果一致^[6]。在手工参考方法测定过程中,天间差异是结果最大变异来源,这种变异包括定标差异、试剂配制、人工操作以及仪器工作状态的变动,其中定标过程是主要因素,本研究对定标曲线的变异进行了分析,在人员操作熟练和仪器状态良好的情况下,3 d 内标准曲线回归斜率变异在 0.5% 以内,表明方法良好的稳定性和重现性,但前提是做好仪器性能确认和人员操作培训。

准确度是方法可靠性的关键,通过分析有证参考物质或直接与已有的高级溯源方法进行比较,或通过正确性室间质评活动以确认方法的准确性。本研究首先分析测试有证参考物质 SRM909b,以及 IFCC 参考实验室质量评价(RELA)样本,对方法的准确度进行了初步验证,再通过测试真实临床新鲜血清与尿酸 ID-LC/MS/MS 决定性方法进行比较,确认结果的可

比性。

综上所述,血清尿酸紫外分光光度法已基本建立,具有优于常规方法的精密度和准确度,测量结果和同位素稀释液相色谱/质谱法可比,可为尿酸检测溯源体系的建立和常规系统性能评估提供便捷有效的方法。

(相关实验得到了杨振华老师,卫生部临检中心张传宝老师的大力支持,在此深表感谢!)

参考文献

[1] 李加平,喻巧云. 高尿酸血症与代谢综合征的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(12): 1322-1325.

[2] 李红静. 临床上血清尿酸与冠心病的关联[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 428.

[3] 张纯. 2160 例社区居民高尿酸血症与相关疾病的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 126-128.

[4] Arno H, Dietmar F, Klaus K, et al. Quantitation of urinary uric acid by reversed phase liquid chromatography[J]. Clin Chem, 1981, 27(8): 1445-1456.

[5] James JC, Holly C, Roberta D, et al. A simplified alkaline phosphotungstate assay for uric acid in serum[J]. Clin Chem, 1971, 17(3): 158-160.

[6] Patricia HD, Nathan G, Teresa C, et al. A candidate reference method for uric acid in serum[J]. Clin Chem, 1982, 28(2): 284-290.

[7] Patricia D, Nathan G, David B, et al. A candidate reference method for uric acid in serum[J]. II. Interlaboratory Testing[J]. Clin Chem, 1982, 28(2): 291-293.

(收稿日期: 2011-10-09)

(上接第 277 页)

参考文献

[1] Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 641-644.

[2] Bai H, Saku K, Liu R, et al. Analysis of a new polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene: association with serum lipoprotein levels and coronary heart disease [J] Cardiol, 1996, 28(4): 207-212.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.

[4] Wu XN, Zhou YH. The diagnose and treatment experience of inflammatory bowel disease[J]. Chin J Dig, 2003, 23(9): 562.

[5] Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, et al. Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I milano[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(5): 992-997.

[6] Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, et al. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein[J]. Curr Opin Lipidol, 2000, 11(1): 105-115.

[7] Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, et al. D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic peptide, inhibits the inflammatory response induced by influenza A infection of human type II pneumocytes[J].

Circulation, 2004, 10(20): 3252-3258.

[8] Shi ST, Polyak SJ, Tu H, et al. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins[J]. Virology, 2002, 292(2): 198-210.

[9] Jan CF, Chen CJ, Chiu YH, et al. A population-based study investigating the association between metabolic syndrome and hepatitis B/C infection (Keelung Community-based Integrated Screening study No. 10)[J]. Int J Obes (Lond), 2006, 30(5): 794-799.

[10] Norton PA, Gong Q, Mrhta AS, et al. Hepatitis B virus-mediated changes of apolipoprotein mrna abundance in cultured hepatoma cell[J]. J Virol, 2003, 77(9): 5503-5506.

[11] Smith JD, Brington EA, Breslow JL. Polymorphism in the human apolipoprotein A- I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro[J]. J Clin Invest, 1992, 89(6): 1796-1800.

[12] 叶倩, 陈燕, 李筱莉, 等. 原发性肝癌患者乙型肝炎病毒标志物模式与病毒 DNA 载量分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 185-186.

[13] 孟令国, 李和楼, 赵建香, 等. HBV-DNA 与 PreSI 以及 ALT 联合检测乙型肝炎的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1052-1054.

(收稿日期: 2011-10-09)