

• 基础实验研究论著 •

慢性丙型肝炎病毒感染者甘露糖结合凝集素基因多态性研究

何莉莉¹, 张兴旺², 居 军²

(1. 甘肃省卫生学校, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院检验中心, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 研究丙型肝炎病毒(HCV)感染者甘露糖结合凝集素(MBL)基因多态性。方法 应用序列特异性引物 PCR 法(PCR-SSP)方法检测甘肃地区汉族 150 例慢性丙型肝炎及 75 例健康对照者 MBL 第一外显子(EXON I)52、54、57 位基因型。结果 甘肃地区汉族人群 MBL 基因 EXON I 的 52、57 位没有检测出突变体,而 54 位基因在 HCV 感染者和在正常对照者中的基因型频率和基因频率比较差异均无统计学意义($P>0.05$);丙氨酸转氨酶(ALT) >80 U/L、ALT <40 U/L 两组基因型频率和等位基因频率比较差异均有统计学意义($P<0.05$);HCV-RNA 定量中、高载量组与低载量组 MBL-54 位基因型频率和基因频率比较差异也均有统计学意义($P<0.05$)。结论 HCV 感染者 MBL 的 EXON I 54 位基因多态性与慢性 HCV 感染无显著相关性,而 54 位等位基因与 ALT 的升高和 HCV-RNA 载量有一定的相关性。

关键词:甘露糖结合凝集素; 丙型肝炎; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)19-2505-02

Genetic association of mannan-binding lectin polymorphisms with hepatitis C virus infection

He Lili¹, Zhang Xingwang², Ju Jun²

(1. Gansu Province Health School, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. Clinical laboratory Centre, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the association between gene polymorphisms in mannan-binding lectin(MBL) and HCV infection. **Methods** 150 Han ethnic patients with chronic hepatitis C disease and 75 healthy controls were studied. The polymorphisms were performed by PCR-SSP. **Results** The difference in MBL gene genotype and allele distributions between patients with chronic HCV infection and controls was not significant. MBL gene was significantly different at position 54 genotypes and allele distributions between ALT >80 U/L than in those with ALT <80 U/L groups($P<0.05$). MBL gene was significantly different at position 54 genotypes and allele distributions between medium high and low HCV RNA loading groups. **Conclusion** The polymorphisms in MBL gene at position 54 was not associated with HCV infection. The genetic polymorphisms of MBL may be related to inflammatory reaction in the liver of the patients with chronic HCV infection.

Key words: mannan-binding lectin; hepatitis C; gene polymorphisms

丙型肝炎(hepatitis C, HC)是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染而导致的一种复杂的病理过程^[1]。甘露糖结合凝集素(mannan-binding lectin, MBL)是一种肝源性糖蛋白,属 Ca²⁺ 依赖型凝集素,能选择性地与多种细菌、病毒、真菌以及某些肿瘤细胞表面的糖结构结合,进而启动机体的天然免疫机制,在免疫功能发挥和稳定中起重要作用^[2]。研究发现,MBL 结构基因第一外显子分别在第 52、54、57 位存在 3 个密码子点突变。可以导致 MBL 蛋白血清含量降低,引起调理作用、吞噬作用的缺失^[3]。

有关 MBL 基因多态性与 HCV 感染相关性报道国外有些研究^[4-10],而我国汉族人群 MBL 基因多态性与 HCV 感染的关系报道较少。本研究中采用序列特异性引物 PCR 法(PCR-SSP)方法,用病例对照研究,分析甘肃地区汉族人群 MBL 基因多态性与 HCV 感染的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HCV 感染组为 2009 年 1 月至 2012 年 1 月甘肃省人民医院门诊和住院慢性丙型肝炎 150 例,男性 110 例,女性 40 例;年龄 16~82 岁,平均(38±10)岁。所有病例均符合 2000 年制订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准^[11],并排除合并感染其他病毒性肝炎。健康对照组为 75 名体检健康者,各型肝炎病毒血清标志均阴性者。根据 HCV 感染组血清

丙氨酸转氨酶(ALT)水平分为 ALT >80 U/L 组和 ALT <40 U/L 组;根据 HCV 感染组 HCV-RNA 水平分为中、高载量组(HCV-RNA $\geq 10^5$ copies/mL)和低载量组(HCV-RNA $<10^5$ copies/mL)。以上所有研究对象均来自中国甘肃地区汉族,无血缘关系。排除标准制定如下:(1)患有恶性肿瘤、自身免疫性疾病者;(2)正在使用免疫抑制剂者。

1.2 试剂与仪器 全血基因组 DNA 提取试剂盒、Taq DNA 预混酶、DNA-Marker、Agarose Gel、DNA Purification Kit 等购自大连宝生物公司。

1.4 检测方法 抽取 3 mL 静脉血/份,置于加有 EDTA 抗凝剂的抗凝采血管中,一 70 ℃ 冰箱保存,用于提取纯化基因组 DNA。抽取 5 mL 静脉血/份,置于加有促凝剂的促凝管中静置 10 min,3 000 r/min 离心 10 min 取上清液,一 70 ℃ 冰箱保存。ELISA 法检测抗-HCV 抗体,检测血清谷丙转氨酶活性。

1.5 PCR-SSR 法检测 (1)基因组 DNA(gDNA)提取纯化:用全血基因组 DNA 提取试剂盒,严格按说明书操作实验。(2)引物设计与合成:引物设计序列见表 1,由上海生工生物工程有限公司合成。(3)MBL 基因 EXON I 52、54、57 位 PCR 扩增,PCR 反应体系(50 μ L)如下:Taq 预混酶 25 μ L,上下游引物各 50 pmol/ μ L 各 1 μ L,模板 DNA 5 μ L,双蒸水 18 μ L。PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 35 s,58 ℃ 退

火 25 s,72 ℃ 延伸 35 s,重复 30 次,72 ℃ 延伸 7 min,结束 PCR 反应。以 HGH 引物为内参,同时以蒸馏水为模板扩增为阴性对照。(4)电泳鉴定 PCR 产物:PCR 扩增结束后,进行凝胶电泳,与标准的 DNA Maker 比较分析。结果判读:外显子 B、C 和 D 扩增均阴性而非 B(ACD)、非 C(ABD)和非 D(ABC)均阳性者为野生型 A 型;若 ACD,ABD 和 ABC 均阳性而 B、C 和 D 产物中有一种阳性者为该位点变异的杂合子。

表 1 引物序列		
引物名称	序列	产物大小
Exon1	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3'	—
52(+223)D	5'-TCTCCCTfGGTGCCATCACA-3'	268
52(+223)nonD	5'-TCTCCC'ITGGTGCCATCACG-3'	268
54(+230) B	5'-CCCCCTTTTCTCCCTTGGTGT-3'	278
54(+230) nonB	5'-CCCCCTTTTCTCCGTTGGTGT-3'	278
57(+239)C	5'-ACGTACGTGGTTCCCCCTTTTCTt-3'	290
57(+239)nonC	5'-ACGTACCTGGTTCCCCCTTTTGTGTC-3'	290
HGHI	5'-TGCCTTCCCAACCAATTCCTTA-3'	—
HGH2	5'-CCACTCACGGAATTCTGTGTGTTC-3'	—

—:此项无数据。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件分析处理。计算不同组基因型频率和等位基因频率,HCV 感染组和健康对照组进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数先经方差齐性检验后采用 *t* 检验分析。计数资料用 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCV 感染组与健康对照组两组基因型和等位基因比较 两组均未检测出 52、57 位密码子存在基因多态性。MBL 54 位密码子基因型构成和等位基因频率见表 1。HCV 感染组与健康对照组两组间 MBL 54 位密码子基因型构成和等位基因频率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 HCV 感染者不同 ALT 水平组间基因型和等位基因比较 ALT>80 U/L 组及 ALT<40 U/L 组 MBL 54 位密码子基因型和等位基因见表 2。两组间基因型频率相比差异有统计学意义($P<0.05$),等位基因频率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 HCV 感染者病毒载量组间基因型和等位基因比较 HCV 感染者低载量及中、高载量两组间 MBL 54 位基因型频率比较差异有统计学意义($P<0.05$),两组间等位基因频率相比差异也有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 1 HCV 感染组与正常对照组基因型及等位基因频率比较[n(%)]

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		GGC/GGC	GAC/GAC	GGC/GAC	GGC	GAC
HCV 感染组	150	106(70.7)	8(5.3)	36(24.0)	248/300(82.7)	52/300(17.3)
正常对照组	75	54(72)	3(4)	18(24)	126/150(84)	24/150(16.0)

表 2 HCV 感染者不同 ALT 水平 MBL 基因型及等位基因频率比较[n(%)]

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		GGC/GGC	GAC/GAC	GGC/GAC	GGC	GAC
ALT>80 U/L 组	65	50(76.9)	3(4.6)	12(18.5)	112/130(86.2)	18/130(13.8)
ALT<40 U/L 组	62	38(61.3)	4(6.5)	20(32.2)	96/124(77.4)	28/124(22.6)

表 3 HCV 感染者不同病毒载量组间基因型及等位基因频率比较[n(%)]

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		GGC/GGC	GAC/GAC	GGC/GAC	GGC	GAC
低载量组	60	49(81.7)	3(5.0)	8(13.3)	106/120(88.3)	14/120(11.7)
中、高载量组	90	57(63.3)	5(5.6)	28(31.1)	142/180(78.9)	38/180(21.1)

3 讨 论

影响 MBL 功能的突变大都位于第一外显子,例如第 54 位密码子的突变。MBL 基因突变可干扰形成稳定性和功能性的蛋白多聚体,导致体内 MBL 血清水平大幅度降低,削弱机体的免疫防御和免疫监视能力,使人体对多种细菌及病毒感染的易感性增加。本研究采用的 SSP-PCR 方法精确检测 MBL 基因外显子 SNP,从而确定个体基因的单倍型及基因型。

在不同的研究中,MBL 基因 SNP 和单体基因型频率主要因人种不同而不同,研究方法的差异也会对实验结果有一定的影响。甘肃地区汉族健康人群 MBL 基因第 54 位多态性与其

他人群比较本研究结果显示;甘肃地区汉族正常健康对照组与文献报道的丹麦高加索正常人群和香港华人中的 MBL 基因第 54 位密码子各基因型频率及等位基因频率相互接近^[12]。

国外不同研究者对 MBL 基因与 HCV 感染相关性结论不一致^[4-10]。本研究结果显示;MBL 54 位各基因型频率在 HCV 感染者中和在健康对照者中的基因型频率差异无统计学意义($P>0.05$);MBL 54 位等位基因与 ALT 的升高有一定的相关性;MBL 54 位等位基因与 HCV 复制水平也有一定的相关性。这可能是由于 MBL 第 54 位密码子 GGC/GAC 的突变使得 MBL 肽链胶原样结构域 Gly-X-Y 重复序列(下转第 2509 页)

3 讨 论

与不禁食组比较,禁食组大鼠雌性血清 TG 降低,雄性 CHO 降低,可能是由于食物缺乏,能量供应不足,机体为维持基本生命活动,引起脂肪动员来满足机体的需要,这与文献报道一致^[1-6]。禁食组雌性 TBIL 升高,临床上除了溶血、肝胆疾患可影响血清胆红素浓度外,某些肝外因素也可影响血清胆红素的测定结果如:绝食、剧烈运动,乙醇、雌激素、妊娠、月经等。因此,作者认为,禁食可能引起了 TBIL 的升高^[2,5]。

禁食组雌性大鼠 ALB 升高、雄性 TP 升高;不禁食组雌性大鼠 ALB 升高、雄性 TP 降低,有临床意义^[5-6]。分析 ALB 临床意义时,需注意的是低 ALB 血症对肝病不具特异性,因为其水平降低除由于合成障碍外,这可能因为:(1)进入血管外池,体内的 40%ALB 分布于血管内,60%分布于各器官组织和组织液中(血管外池),如果各种病因使血管内 ALB 进入血管外池,可致血清内水平降低;(2)氨基酸(尤其是色氨酸)是合成蛋白质的原料,如供应不足,如摄入减少或吸收障碍,清蛋白合成减少 40%~50%;(3)感染、发热、肿瘤等时,清蛋白分解加速;(4)异常途径丢失。经过结合血液数据和大鼠解剖肉眼观察情况,作者认为,不禁食组大鼠血清 ALB 降低,可能是大鼠某些脏器(子宫、睾丸等)出现水肿有关。

禁食组雌性 BUN 升高、雄性 AST 升高,雄性 ALP 降低、雌性 Cre 降低,可能是两组动物血液指标测试前质控值存在系统误差,导致血液指标的差异,因此没有病理意义,但这方面需要深入地探讨。禁食组雌性 Na⁺ 均升高,雌性 MCHC 降低,但仍在正常范围内。禁食组雄性 WBC 升高,通过经验认为,可能是大鼠某些脏器炎症感染有关。

禁食与否对 SPF 级 SD 大鼠部分血液生化、血象、电解质指标有不同程度的影响;同时,样品测试前的质控值的差异也对部分血液指标有影响。因此,无论在药效学或毒理学研究

中^[7-12],对采血前实验动物的禁食、禁食时间,质控值波动范围应进行统一规范。

参考文献

- [1] 柯斌,秦鉴,张俊杰. 短期禁食对大鼠生理生化指标的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):2778-2780.
- [2] 胡建廷,王韶艳,屈卉锦,等. 禁食对 SD 大鼠血清生化指标的影响[J]. 实验动物与比较医学,2011,31(2):126-127.
- [3] 崔学升,周朝伟,李志琼. 禁食和热应激对齐口裂腹鱼生化指标的试验[J]. 饲料研究,2010,2:63-65.
- [4] 孙劲,徐元宏. SD 大鼠常见血液学检测指标参考范围的建立[J]. 临床输血与检验,2008,10(3):253-255.
- [5] 韩英海,李树桐. 临床肝脏病学[M]. 济南市:山东科学出版社,2005,4:51-76.
- [6] 周新,涂植光. 临床生物化学和生物化学化检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2003,2:48-58.
- [7] 林炜炜,于嘉屏. 患者状态对临床检验结果的影响[J]. 中国实验诊断学,2010,14(12):2060-2062.
- [8] 英永,胡建廷,李莉,等. 禁食时间对 Beagle 犬血液学指标的影响[J]. 上海畜牧兽医通讯,2012,3(1):12-13.
- [9] 张俭,刘杰,伍贤进. KM 小鼠糖尿病动物模型的建立[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):174-175.
- [10] 许良银,程宜福. 不同剂量四氧嘧啶与禁食对制作小鼠糖尿病模型的影响[J]. 皖南医学院学报,2004,23(4):251-252.
- [11] 牛屹东,梁蜀龙,张孟蕾. 禁食与非禁食处理对构建 2 型糖尿病小鼠模型血糖的影响[J]. 四川动物,2009,28(2):218-220.
- [12] 王澍,田晓峰,梁锐. 长期禁食对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J]. 大连医科大学学报,2008,30(3):201-204.

(收稿日期:2013-04-29)

(上接第 2506 页)

中羧基端第 6 个序列的 Gly 为 Asp 所替代,胶原样结构被中断,从而不能形成具有完整功能的 MBL 蛋白,使得 MBL 不能有效地抵抗各种细菌及病毒的感染和侵蚀。本研究尚未发现甘肃地区汉族 MBL 基因第 52、57 位密码子存在基因多态性。

参考文献

- [1] 全俊,胡国龄,范学工,等. 丙型肝炎病毒核心区蛋白在 HepG2 细胞中的表达[J]. 中国现代医学杂志,2002,12(20):34-35.
- [2] Gabius HJ, Andre S, Kaltncr H, et al. The sugar code:fnctional lectinomics[J]. Biochim Biophys Acta,2002,1572(2):165-177.
- [3] Peterson SV, Thiel S, Jonsenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation;biology and disease association [J]. Mol Immnol,2001,38(1):133-149.
- [4] Vallinoto AC, da Silva RF, Hermes RB, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are not associated with susceptibility to hepatitis C virus infection in the Brazilian Amazon region[J]. Hum Immunol,2009,70(9):754-761.
- [5] Endo M, Ohsawa I, Ohi H, et al. Mannose-binding lectin contributes to glomerulonephritis induced by hepatitis C virus infection [J]. Nephron,2001,87(4):374-379.
- [6] Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection[J].

Scand J Gastroenterol,2000,35(9):960-965.

- [7] Tulio S.Faucz FR, Werneck RI, et al. MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection[J]. Hum Immunol,2011,72(10):912-917.
- [8] Halla MC, do Carmo RF, Silva Vasconcelos LR, et al. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population[J]. Hum Immunol,2010,71(9):883-890.
- [9] Melo FM, Vasconcelos LR, Silva BS, et al. Structural polymorphism of the mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene in HCV-infected patients with a serological marker for thyroid autoimmunity [J]. Int J Immunogenet,2009,36(6):377-381.
- [10] Koutsounaki E, Goulielmos GN, Koulentaki M, et al. Mannose-binding lectin MBL2 gene polymorphisms and outcome of hepatitis C virus-infected patients[J]. J Clin Immunol,2008,28(5):495-500.
- [11] 中华医学会传染病与寄生虫病学会、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.
- [12] 徐向红,居军,罗伟立,等. 中国裕固族及汉族人 MBL 基因 ExonI 54 位密码子点突变频率研究[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(12):1378-1380.

(收稿日期:2013-04-25)