

• 论 著 •

慢性 HBV 感染者甘露糖结合蛋白基因多态性与 HBV 基因型的关系

高建平¹, 郑瑞丹², 朱青川¹, 林震群¹, 洪伍华¹, 李庆端¹, 陈哲¹, 蔡秀珍¹

(1. 福建省漳州市中医院 363000; 2. 中国人民解放军第一七五医院, 漳州 363000)

摘要:目的 探讨甘露糖结合蛋白(MBP)基因多态性及 HBV 基因型与慢性乙型肝炎(HBV)进展的关系。方法 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法和实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术对 360 例慢性 HBV 感染者[其中 66 例无症状 HBV 携带者组(ASC 组)、182 例慢性乙型肝炎患者组(CH 组)、112 例肝硬化患者组(LC 组)和 65 例对照组]的 MBP 基因第 54 号密码子多态性和 HBV 基因分型进行检测。结果 ASC 组和轻、中型 CH 组均以 B 基因型占优势, MBP 基因 GGC/GAC 基因型频率和 GAC 等位基因频率与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 重型 CH 组、代偿期 LC 组、失代偿期 LC 组均以 C 基因型占优势, MBP 基因 GGC/GAC 基因型频率和 GAC 等位基因频率显著高于对照组($P < 0.05$), 其中失代偿期 LC 组突变率最高(37.7%)。结论 该地区乙型肝炎人群以 B 和 C 基因型为主; MBP 基因第 54 号密码子突变与 HBV 感染的慢性化无明显关系, 而与 HBV C 基因型及慢性 HBV 感染者的肝病进展有关。

关键词:基因; 突变; 肝炎病毒, 乙型; 甘露糖结合蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)07-0755-02

The relationship of mannose binding protein(MBP)genetic polymorphisms and HBV genotype on patients with chronic HBV infection

Gao Jianping¹, Zheng Ruidan², Zhu Qingchuan¹, Lin Zhenqun¹, Hong Wuhua¹, Li Qingduan¹, Chen Zhe¹, Cai Xiuzhen¹

(1. Department of Gastroenterology, Chinese Traditional Medicine Hospital in Zhangzhou, Fujian Province, Zhangzhou 363000, China; 2. 175 Hospital in Zhangzhou, Fujian Province, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Objective To determine the influences of Mannose binding protein(MBP)genetic polymorphisms and HBV genotype on the progression of liver disease. **Methods** The codon 54 polymorphisms of MBP gene in a cohort of 360 patients with chronic HBV infection, including 66 with asymptomatic HBV carriers(ASC), the remaining 182 with chronic hepatitis B(CH), 112 with liver cirrhosis(LC) and 65 with controls were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) and fluorescent quantitative PCR(FQ-PCR). **Results** ASC group, CH group(mild), CH group(moderate) all demonstrated the advantage with B Genotype, the genotype frequencies of GGC/GAC and alleles genetic frequencies of GAC no significant differences comparing to the control group ($P > 0.05$); CH group(severe), compensation phase of LC, decompensation of LC all demonstrated the advantages with C Genotype, higher than those in the control group ($P < 0.05$), the decompensation of LC was 37.7%, highest of all. **Conclusion** The genotype B and genotype C are the major genotype in patients with hepatitis B infection in the area analyzed. Codon 54 mutation of MBP gene is not related to the persistence of hepatitis B, but Codon 54 mutation of MBP gene and genotype C are associated with the progression of hepatitis B infection.

Key words: genes mutation; hepatitis B virus; mannose-binding protein

机体感染乙型肝炎病毒(HBV)后可形成不同的疾病谱,其原因非常复杂,除与 HBV 的变异、宿主的年龄、性别和免疫状态有密切关系外,遗传基因的多态性和 HBV 基因型可能也是导致 HBV 感染慢性化的重要原因。本研究采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)和实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术分析不同临床类型的 HBV 感染者甘露糖结合蛋白(MBP)基因多态性与 HBV 基因型之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择漳州市中国人民解放军一七五医院传染科门诊、住院和漳州市中医院消化内科门诊、住院的不同临床类型慢性乙型肝炎感染者 360 例。其中男 256 例,女 104 例,年龄 17~68 岁,并进行了肝穿刺病理学检查。无症状携带者 66 例(ASC);慢性乙型肝炎患者 182 例(CH),其中轻度 61 例、中度 67 例、重度 54 例;肝硬化代偿期患者 55 例;肝硬化失代偿期患者 57 例。对照组为 65 例乙型肝炎感染恢复者,HBsAg 阴性,HBsAb/HBcAb 阳性,肝功能检查正常,HBV DNA 阴性。排除既往有乙型肝炎疫苗接种史者,排除甲、丙、戊型肝炎病毒和 HIV 合并感染。诊断标准为 2000 年(西安)中华医学

会传染病与寄生虫分会、肝病学会联合修订的病毒性肝炎防治方案,并排除合并其他病毒性肝炎。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取静脉抗凝血 2 mL,按梯度密度离心法分离单个核细胞后,加入蛋白酶 K 和裂解液消化,按苯酚-氯仿-异丙醇方法提取,纯化 DNA,最后加水 30 μ L 溶解。

1.2.2 MBP 基因多态性分析 应用 PCR-RFLP 方法检测 MBP 基因第 54 号密码子的多态性。PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,正引物序列:5'-GTA GGA CAG AGG GCA TGC TC-3';负引物序列:5'-CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGC-3'。Taq DNA 聚合酶和三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)为 TakaRa 公司产品。PCR 反应条件:初始变性 95 $^{\circ}$ C 3 min,35 个循环,每个循环中变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,退火 64 $^{\circ}$ C 1 min,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,终末延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。取 PCR 扩增产物 6 μ L,加入 Ban I (Gene 公司)5 单位,10 \times 缓冲液 2 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 孵育酶切 4 h。Ban I 能够识别 5'-GGY RCC-3'序列,当 GGC 变异为 GAC 时,该酶切位点消失。

1.2.3 结果判断 酶切产物经 2.5% 琼脂糖溴化乙锭电泳分

离,紫外灯下判断结果。PCR 扩增产物 329 bp,经 Ban I 酶切后,GGC/GGC 型表现为 245 bp 和 84 bp 两个片段,而 GAC/GAC 型表现为 329 bp 单一片段,杂合型 GGC/GAC 则表现为 329、245、84 bp 3 个片段。

1.2.4 HBV 基因型检测 采用实时荧光定量 PCR 技术,试剂由上海克隆高技术有限公司提供,操作按说明书,仪器采用罗氏公司 LightCycler 荧光定量 PCR 仪。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验,然后经 Hardy-Weinburg 遗传平衡定律检验,表明各基因型频率已达遗传平衡,具有群体代表性。

2 结 果

2.1 MBP 基因多态性在对照组中的分布 分布频率分别为 GGC/GGC(70.8%)、GGC/GAC(29.2%)、GAC/GAC(0.0%);等位基因频率为 GGC(85.4%)、GAC(14.6%)。结果见表 1。

表 1 MBP 基因多态性及 HBV 基因型在慢性 HBV 感染者中的分布情况

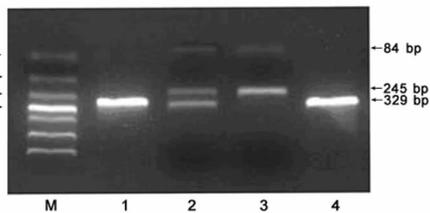
组别	例数 (n)	基因型频率(%)			等位基因型频率(%)		HBV 基因型(%)	
		GGC/GGC	GGC/GAC	GAC/GAC	GGC	GAC	B	C
对照组	65	46(70.8)	19(29.2)	0(0.0)	85.4	14.6	—	—
ASC 组	66	44(66.7)	22(33.3)	0(0.0)	83.3	16.7 Δ	64.4	35.6
轻度 CH 组	61	37(60.7)	24(39.3)	0(0.0)	80.3	19.7 Δ	60.7	39.3
中度 CH 组	67	37(55.2)	30(44.8)	0(0.0)	77.6	22.4	55.2	44.8
重度 CH 组	54	21(33.3)	32(64.8)	1(1.9)	68.5	31.5 \blacktriangle	47.6	52.4
代偿期 LC 组	55	24(43.6)	31(56.4)	0(0.0)	71.8	28.2 \blacktriangle	41.8	58.2
失代偿期 LC 组	57	15(19.3)	41(78.9)	1(1.8)	62.3	37.7 \blacktriangle	39.5	60.5

Δ : $P > 0.05$, \blacktriangle : $P < 0.05$, 与对照组比较; —: 表示无数据。

2.2 MBP 基因多态性及 HBV 基因型在慢性 HBV 感染者中的分布 ASC 组和轻、中型 CH 组均以 B 基因型占优势,MBP 基因 GGC/GAC 基因型频率和 GAC 等位基因频率与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);重型 CH 组、代偿期 LC 组、失代偿期 LC 组均以 C 基因型占优势,MBP 基因 GGC/GAC 基因型频率和 GAC 等位基因频率显著高于对照组($P < 0.05$),其中失代偿期 LC 组突变率最高,为 37.7%。见表 1。

2.3 MBP 基因第 54 号密码子多态性 见图 1。

以通过识别糖基与乙型肝炎表面抗原结合,并激活补体系统。机体可通过补体受体或细胞表面的 MBP 受体清除 MBP-HBV 复合物,从而增强从外周血中清除 HBV 的能力。有报道道含有可产生大量功能性 MBP 基因的纯合子个体易于从乙型肝炎感染中康复,而那些携带只能产生少量功能性 MBP 基因型的个体更易演变为慢性肝炎,表明 MBP 在急性乙型肝炎感染过程中起重要作用^[2]。Chloe 等^[3]也证实乙型肝炎患者能否康复与 MBP 水平及基因有很大程度的相关性。童福易等^[4]研究认为 MBP 基因突变与乙型肝炎慢性化无明显关系,而与重型肝炎的发生有显著相关性。因此,推测 MBP 基因变异所造成的补体系统调理功能障碍可能参与乙型肝炎发病的病理生理过程,可能是对 HBV 感染具有宿主遗传易感性的基因之一。



M 为 DNA 标准相对分子质量;1 为未经酶切的 PCR 产物;2 为 GGC/GAC 基因型;3 为 GGC/GGC 基因型;4 为 GAC/GAC 基因型。

图 1 MBP 基因第 54 号密码子多态性电泳结果

3 讨 论

甘露糖结合蛋白(MBP)由肝细胞合成,是一个钙依赖性的 C 型凝集素,结构与补体成分 Clq 相似,在免疫防御中起重要作用。HBV 外壳表面蛋白含有较多的甘露糖寡糖,可以结合 MBP,因而 MBP 对 HBV 颗粒具有调理作用。编码 MBP 的基因位于 10q11.2~10q21,含 4 个外显子。迄今发现的 MBP 基因编码区突变均为第 1 个外显子的点突变,分别是密码子 52(CGT→TGT)、密码子 54(GGC→GAC)及密码子 57(GGA→GAA),其中第 54 号密码子变异在高加索人和东方人中相当常见,故本组选择 MBP 基因第 54 号密码子的多态性进行检测。MBP 变异型可导致氨基酸改变,影响亚单位空间结构形成,导致调理功能缺陷,不能形成完整性、功能性的 MBP 蛋白,而直接影响到 MBP 的最终生理效应,进而对多种疾病的发生、发展和预后产生影响。Chong 等^[1]研究发现,MBP 可

目前根据 HBV 基因型的差异,将其分为 A~H 8 种基因型,中国人群以 B 型和 C 型为主,北方 C 型占优势,南方 B 型占优势,新疆、西藏有 D 型分布,A 型和 F 型仅有少数报道,未检测到 E、G、H 型。许多资料显示,HBV 基因型与临床表现、预后、治疗应答等均有一定关系,C 型与更严重的肝脏疾病以及更差的预后有关^[5]。本研究检测到的 HBV 以 B 型和 C 型为主,符合其地理分布特点,同时也发现在 ASC 组和轻、中型 CH 组中 B 型占优势,在重型 CH 组和 LC 组中 C 型占优势,这进一步证实了 C 型与肝脏疾病的严重程度密切相关。为进一步探讨机体遗传易感性和 HBV 基因型对肝脏疾病进展的影响,本组对不同基因型 HBV 感染者 MBP 基因第 54 号密码子多态性进行检测发现,在慢性 HBV 感染者不同类型肝病中,密码子 54 突变和 B、C 基因型所占比例有差异,慢性乙型肝炎携带者和轻、中型慢性乙型肝炎患者密码子 54 突变率与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),均以 B 基因型占优势。在重型乙型肝炎患者、代偿期和失代偿期肝硬化患者中密码子 54 突变率明显增加,其中失代偿期肝硬化患者密码子 54 突变率最高,为 37.7%,均以 C 基因型占优势。本研究结果显示,MBP 密码子 54 突变率与 C 基因型感染率及(下转第 759 页)

同时也成功表达了 CYP11D6^[6]。

质粒载体 PQE30 的应用,其优势:能将目的基因定向克隆导入大肠杆菌表达,产生 SLA 与 6 个组氨酸的融合蛋白,不仅能高效表达,且分离纯化方便。6 个组氨酸短肽抗原性极弱,可直接用亲和纯化的融合蛋白制备 SLA 和 CYP11D6 的抗体。经 SDS-PAGE 和蛋白印迹技术验证,大肠杆菌 M15 表达的 SLA、CYP11D6 产量高,具有抗原活性^[7-9]。

经 NI-NTA 金属层析一步法分离提纯的蛋白,测定其含量约为 0.7 mg/200 mL LB,这样高的提纯量与其载体质粒 PQE30 的高效表达有着密不可分的关系。本组在用 NI-NTA 亲和层析时采用的是在变性条件下蛋白的提纯,这样选择是因为:其一,变性条件下对细菌的裂解更彻底,可以提取更多的目的蛋白;其二,所要提取的目的蛋白是一种线形抗原。只要其蛋白的一级结构不被破坏,那么它依旧具有抗原性,但如果提取的目的蛋白是抗体,则不能用变性的条件,蛋白在变性时会破坏抗体的结构而使其不再有抗原性,此时应选用非变性条件提纯^[10-12]。本组所选用的亲和层析法中有一个重要的成份,即融合蛋白上的 6 个组氨酸的尾巴,它是由 PQE30 载体上的特定序列编码的,它能与 NI-NTA 的带有金属离子的 agarose 在碱性条件下相结合,而在酸性条件下重新游离分开,由于它的特性使得一部分游离蛋白有了前提条件。而由于这个组氨酸尾巴的抗原性极弱,这使本组分离出的抗原可以直接用于临床患者血清的检测^[13]。

目前 AIH 的发病机制尚未阐明,因此克隆、表达出 SLA、CYP11D6 的意义不仅在于临床诊断,而且为研究这两种抗原诱导的自身免疫紊乱在 AIH 中的作用提供了极其重要物质基础。

参考文献

[1] Czaja AJ, Dickson ER. Chronic active hepatitis; the mayo clinic ex-

perience(gastroenterology series)[M]. New York, USA; Marcel Dekker, 1986:105-126.

[2] Johnson PJ, Mcfarlane IG. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group[J]. Hepatology, 1993, 18(9):998-1005.
 [3] 仲人前,孔宪涛.肝病免疫学[M].上海:上海科学技术文献出版社,1997:84-89.
 [4] Stephan K, Carolyn W, Guido G, et al. Lohse Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis[J]. Journal of Hepatology, 1999, 31(21):635-640.
 [5] 范列英,仲人前,屠小卿,等.自身免疫性肝炎特异性靶抗原的制备及临床应用[J].中国免疫学杂志,2002,18(2):67.
 [6] 张利方,付丽萍,徐娟,等.自身抗体在肝病患者诊断中的意义[J].现代检验医学杂志,2006,21(2):70-72.
 [7] 李白顺,纪官治.抗核抗体谱在 96 例自身免疫疾病中的应用探讨[J].福建医学杂志,2006,2(2):134-135.
 [8] 张铁汉,赵永新.免疫印迹法与间接免疫荧光法检测抗核抗体对照分析[J].中国热带医学,2008,8(4):568-570.
 [9] 闻亚峰.抗核抗体在内身免疫性肝病诊断中的应用[J].检验医学与临床,2008,12(5):949-950.
 [10] 李朴,孔飞飞,余雪梅,等.人 YB21 蛋白的高效原核表达、纯化及其多抗的制备[J].第三军医大学学报,2010,32(14):1579-1581.
 [11] 李海,贾继东.自身免疫性肝病的发病机制[J].临床消化病杂志,2008,20(6):327-329.
 [12] 马作新,廉娜,郑立.3 种检测方法在诊断自身免疫性肝病中的价值[J].国际检验医学杂志,2010,31(6):540-543.
 [13] 高玉洁,郭鹤,赵高阳,等.免疫印迹法检测 ENA 及其在自身免疫性肝病中的诊断价值分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(5):427-429.

(收稿日期:2010-07-08)

(上接第 756 页)

肝脏疾病的严重程度呈正相关,既往感染 C 基因型的患者发生 MBP 突变较高,而且发展至重症肝病者也显著多于 B 基因型感染者,提示 HBV 感染者尤其是 C 基因型的 MBP 突变者应积极采取抗病毒治疗。同时也表明 MBP 密码子 54 突变与 HBV 感染的慢性化无相关性,但与慢性 HBV 感染者的疾病进展相关。其原因可能为中国人群 HBV 感染慢性化的最重要因素在于胎儿期或儿童早期的病毒感染,在获得母体经胎盘分泌 HBeAg 后,诱导了 T 细胞耐受,且感染的概率较大,在此机制下,婴幼儿的感染就成为了持续性感染;而 MBP 密码子 54 突变,使其氨基酸残基发生改变,破坏了 MBP 胶原样区结构,基因结构单位不能寡聚化,从而不能形成完整性、功能性的蛋白质,使血清 MBP 水平低下和调理缺陷,不能有效地清除 HBV 及循环免疫复合物,较高的病毒负荷加重肝脏的免疫损害且大量的免疫复合物沉积在肝脏,引起更严重的肝细胞炎症,造成肝细胞大量水肿坏死,最终导致更严重的后果。研究也表明,HBV 感染者中,低水平 MBP 与肝硬化的发生有关。

综上所述,MBP 密码子 54 突变和 HBV 基因型是决定 HBV 感染者临床预后的一个重要因素。与 C 基因型及 MBP 突变者相比,B 基因型及未发生 MBP 突变的 HBV 感染者肝脏病变进展较慢且严重程度较低。由于研究的标本和方法不

尽相同,不同地域、环境及不同种族的 MBP 突变和 HBV 基因型的关系结论可能不同。因此,建立本民族和同地域相同遗传背景的、与 HBV 感染者有关的基因数据对探讨乙型肝炎的发病机制具有十分重要的临床意义。

参考文献

[1] Chong WP, To YF, Ip WK, et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2005, 42(5):1037-1045.
 [2] Thio CL, Mosbrugger T, Astembomki J, et al. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virusinfection[J]. J Virol, 2005, 79(14):8846-8847.
 [3] Chloe L, Timothy M, J acquie A, et al. Mannose binding lecting genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection[J]. J Virol, 2005, 79(14):9192-9196.
 [4] 童福易,甘建,陆芹,等.甘露糖结合蛋白基因突变与乙型肝炎的相关性研究[J].中华医学遗传学杂志,2008,25(3):331-333.
 [5] 周彬,黄月华,单光华,等.乙型肝炎病毒基因型及病毒变异对慢性肝病进展的影响[J].热带医学杂志,2008,8(4):302-305.

(收稿日期:2011-01-03)