论著

文章编号:1000-5404(2006)22-2276-04

CⅡTA基因启动子Ⅳ区G-944C多态性与慢性HBV感染发病易感性的关系研究

洪晓俊,张绪清,邓国宏 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨MHC Ⅱ类反式激活因子(CⅡTA)启动子Ⅳ区G-944C基因多态性与慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染发病易感性的关系。**方法** 在1 203例慢性HBV感染无症携带与慢性肝患者中,应用序列特异性引物PCR技术(PCR-SSP)对CⅡTA基因启动子Ⅳ区G-944C位点进行基因分型研究。**结果** CC基因型频率在2组人群中分别为25.7%和19.7%,彼此间相差显著($\chi^2=5.560$,$P=0.018$),而GC基因型频率分别为43.6%和49.9%,彼此间相差显著($\chi^2=4.774$,$P=0.029$);在G基因显性模式下(C基因隐性模式),即GG+GC基因型频率在无症状携带和发病组人群中分别为74.3%和80.3%,两者间相差显著($\chi^2=5.560$,$P=0.018$);在慢性肝炎、慢性重型肝炎和肝炎肝硬变3组人群中,C等位基因频率分别为44.1%、45.8%和45.0%,彼此间相差不显著($P>0.05$)。**结论** CⅡTA基因启动子Ⅳ中的G-944C位点多态性与慢性HBV感染者发病易感性存在一定的关系,而与疾病的严重程度无明显关系;基因型为CC纯合子的慢性HBV感染者不容易发展成慢性肝病。

关键词: MHC Ⅱ类反式激活因子;乙型肝炎病毒;序列特异性引物-多聚酶链式反应;单个核苷酸多态性

中图法分类号: R195.4;R394.3;R512.62 **文献标识码:** A

Association between disease susceptivity of chronic HBV infection and SNP G-944C in CⅡTA gene promoter Ⅳ

HONG Xiao-jun, ZHANG Xu-qing, DENG Guo-hong (Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the SNP G-944C in class Ⅱ transactivator (CⅡTA) gene promoter Ⅳ and disease susceptivity of chronic HBV infection. **Methods** G-944C locus of CⅡTA gene promoter Ⅳ was analyzed by sequence-specific primer PCR (PCR-SSP) in 1 203 patients with chronic HBV infection including 670 asymptomatic carriers (AsCs) and 533 cases of HBV related chronic liver diseases (119 chronic hepatitis B, 156 chronic severe hepatitis B, 239 liver cirrhosis and 19 liver cancer). **Results** CC genotype frequency in AsCs was 25.7%, higher than 19.7% in patients with HBV related chronic liver diseases ($\chi^2=5.560$, $P=0.018$). GC genotype frequency in AsCs was 43.6%, lower than 49.9% in patients with HBV related chronic liver diseases ($\chi^2=4.774$, $P=0.029$). In the dominant pattern of G allele, the total frequency of GG and GC genotype in AsCs was 74.3%, lower than 80.3% in patients with HBV related chronic liver diseases ($\chi^2=5.560$, $P=0.018$). No significant difference of C allele frequency was found in chronic hepatitis B (44.1%), chronic severe hepatitis B (45.8%), and liver cirrhosis (45.0%) ($P>0.05$). **Conclusion** The polymorphism of G-944C in CⅡTA gene promoter Ⅳ was associated with the susceptivity of chronic HBV infection, but was not associated with severity of diseases. The individuals with chronic HBV infection of CC genotype are of less possibility to develop chronic liver disease than those of other genotypes.

Key words: class Ⅱ transactivator; HBV; sequence-specific primer PCR; single nucleotide polymorphism

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371283)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371283)

作者简介: 洪晓俊(1978-),男,广东省普宁市人,硕士研究生,医师,从要从事乙肝发病机制方面的研究。电话:13228686211

通讯作者: 张绪清,E-mail:xuqing651005@tom.com

收稿日期: 2006-04-11;**修回日期:** 2006-10-12

慢性 HBV 感染的临床表型复杂多样，其形成机制尚未阐明。除了病毒因素外，宿主遗传易感性是一个重要的方面，双生子的研究证明，宿主遗传因素对 HBV 感染的临床表型有着极为重要的影响[1]。MHC Ⅱ类分子在宿主清除 HBV 和导致肝组织免疫炎症损伤等过程中起关键作用。Ⅱ类反式激活因子（Class Ⅱ transactivator，CⅡTA）是调控细胞是否表达 MHC Ⅱ类分子及其水平的“限速因子”[2]。CⅡTA 有 4 个启动子[3]，具不同组织特异性，其中启动子Ⅳ只有在 γ 干扰素等细胞因子诱导下被利用，参与调控无基础性 MHC Ⅱ类分子表达细胞（如肝细胞）的诱导性 MHC Ⅱ类分子的表达。我们前期的研究显示中国人 CⅡTA 基因启动子Ⅳ区存在 4 个 SNP 位点，其中 G-944C 和 T-538C 2 个 SNP 位点频率较高（未发表）。为了探讨 CⅡTA 启动子Ⅳ基因多态性是否与慢性 HBV 感染发病易感性有关，我们在大样本人群中分析了 CⅡTA 基因启动子Ⅳ区的 1 个常见 SNP 位点 G-944C 基因型和等位基因频率在慢性 HBV 感染无症状携带者与 HBV 感染相关的慢性肝病患者中的分布。

1　材料与方法

1.1　研究对象

1 203 例慢性 HBV 感染者均为我院门诊与住院患者，男性 927 例，女性 276 例，年龄 5～69 岁，平均（36±10）岁。其中慢性无症状 HBV 携带者 670 例，慢性 HBV 感染相关性肝病患者 533 例（慢性重型肝炎 156 例，慢性乙型肝炎 119 例，肝炎后肝硬变 239 例，肝癌 19 例），临床诊断均符合 2000 年第 10 次全国病毒性肝炎学术会议修订的诊断标准。所有患者为无亲缘关系的汉族人群。所有病例经检查均除外合并 HAV、HCV、HDV、HEV 感染。

1.2　实验仪器和试剂

1.2.1　主要仪器　　PCR 自动扩增仪（MJ PTC-250，USA）；DYY-6C 型水平电泳仪（北京六一仪器厂）；GEL DOC2000 凝胶成像仪（Bio-Rad，USA）。

1.2.2　主要试剂　　HotStar 热启动 *Taq* 酶（Qiagen，德国），2.5 μmol/L dNTPs（TaKaRa，日本），DL2000 DNA 标准（TaKaRa，日本），琼脂糖（Gibcol）。

1.2.3　特异性引物　　根据 CⅡTA 基因启动子Ⅳ区 G-944C 位点两侧序列设计 2 对特异性引物内引物 1（针对 C 等位基因）、内引物 2（针对 G 等位基因）、外引物 1、外引物 2（表 1），由北京奥科生物技术公司合成。

1.3　实验方法

1.3.1　血样和资料采集　　抽取研究对象 10 ml 全血，5 ml EDTA K_2 抗凝血用于基因组 DNA 提取，5 ml 不抗凝血用于病毒标志和生化检测。同时收集研究对象的流行病学和临床资料并录入电脑。

表 1　PCR-SSP 引物序列及位置

引物	引物序列	引物所在位置（nt）	Tm 值
内引物 1（针对 C 等位基因）	5′-CACTCCAGGAAAATTGACACC-3′	−924～−944	59 ℃
内引物 2（针对 G 等位基因）	5′-CCTGAAGAAGTCGTTTACATTGTC-3′	−967～−944	59 ℃
外引物 1	5′-CTCTGGGTTCAAAGCAAACC-3′	−728～−747	59 ℃
外引物 2	5′-TCCCCCCAGTTTCCTAATG-3′	−1 107～−1 087	59 ℃

1.3.2　肝炎病毒标志小肝功能　　血清抗 HAV-IgM、HBV 感染血清学标志、抗-HCV、抗-HDV、抗 HEV-IgM 均用 ELISA 法检测，HBV-DNA 用定量 PCR 检测，肝功能和凝血酶原时间分别用自动生化分析仪和血凝分析仪检测。

1.3.3　人白细胞基因组 DNA 提取　　采用盐析法提取基因组 DNA，将提取的 DNA 经 $D(260)/D(280)$ 紫外定量，保存于 TE 中 −20 ℃冻存。

1.3.4　样本 DNA 模板制备　　将样本 DNA 稀释至 5～10 ng/μl，排列成 96 孔 DNA panel，−20 ℃冻存。

1.3.5　PCR-SSP 法分型　　取患者基因组 DNA 模板（5 ng/μl）1.5 μl、2 μmol/L 的引物混合物 1 μl、$MgCl_2$ 3 mmol/L，dNTP 0.3 mmol/L，Hotstar DNA 聚合酶 0.05 U。PCR 反应体系为 10 μl，反应条件为：95 ℃ 预变性 15 min，94 ℃ 30 s，56 ℃ 1 min，72 ℃ 45 s，35 循环，最后 72 ℃ 继续延伸 5 min。反应完毕取5 μl产物与 5 μl 上样缓冲液（95% 甲酰胺，0.03% 二甲苯青，0.05% 溴酚蓝和 20 mmol/L EDTA）混匀，用 2% 的琼脂糖凝胶电泳，电压 220～250 V，电流 90～120 mA，电泳后显像仪成像。

1.3.6　测序验证　　选择经 PCR-SSP 分型的 CC 纯合子、GG 纯合子和 GC 杂合子各 2 个，分别用外引物 1 和外引物 2 作引物进行 PCR 扩增获得 380 bp 的 DNA 片段，然后送北京鼎国生物公司进行双向测序验证。

1.4　统计学分析

采用直接计算法计算基因型和等位基因频率；χ^2 检验判断多态性位点的基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡；用 Logistic 回归分析所有数据、直接计算 P 值。使用 SPSS 10.0 统计软件。

2　结果

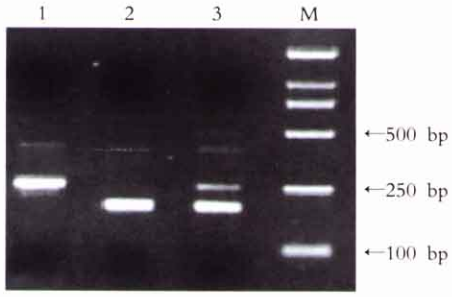
2.1　慢性 HBV 感染者人口学资料

670 例慢性无症状 HBV 携带者与 533 例 HBV 感染相关的慢性肝病患者中男性所占比例分别为 70.1%（476/670）和 84.6%（451/533），两者间相差非常显著（$\chi^2=30.923$，$P=0.000$）；携带者与发病组平均年龄分别为（38±11）岁和（35±11）岁，两者间相差非常显著（$P=0.000$）。

2.2　SSP-PCR 分型结果鉴定

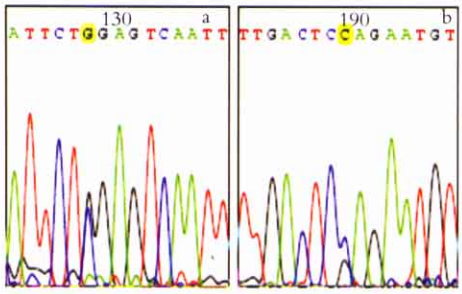
采用盐析法可以提取冻存全血基因组 DNA，方便，经济，所提 DNA 质量稳定，足以满足 PCR 扩增的需要。我们选择用 SSP-PCR 分型方法对 CⅡTA 基因启动子Ⅳ区 G-944C 位点进行分型鉴定，在所采用的 PCR 体系和条件下结果稳定，条带清

晰，无非特异性杂带。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后的条带模式为：GC 杂合子出现 185、240、380 bp 3 条带，CC 纯合子出现 185 bp 和 380 bp 2 条带，GG 纯合子呈现 240 bp 和 380 bp 2 条带（图 1）。经 G-944C 位点不同基因型个体样本验证，PCR-SSP 分型结果与测序结果完全相符（图 2）。



1：GG；2：CC；3：GC；M：PL 2000 标准

图 1 C Ⅱ TA 基因启动子Ⅳ区 G-944C 位点电泳分型图



a：G 等位基因；b：C 等位基因

图 2 C Ⅱ TA 基因启动子Ⅳ区 G-944C 位点测序峰图

2.3 C Ⅱ TA 不同基因型在慢性 HBV 感染无症状携带与发病患者群中的分布

在 1 203 例慢性 HBV 感染者中 C Ⅱ TA 启动子Ⅳ G-944C 位点基因型为 CC 的 277 例、GC 的 558 例、GG 的 368 例，由 Hardy-Weinberg 平衡公式 $CC = p^2N$，$GC = 2pqN$，$CC = q^2N$（p 为 C 等位基因频率，q 为 G 等位基因频率，N 为总样本量）得出理论人数分别为 257、598、348 例，χ^2 检验显示 SNP 位点各基因型的观察频数与理论频数之间的差异无统计学意义（$\chi^2 = 4.142$，$P = 0.126$），说明符合 Hardy-Weinberg 平衡，样本人群具有代表性，无选择偏倚，见表 2。

表 2 无症状携带与发病患者群中 G-944C 位点基因型与等位基因频率分布

组别	例数	基因型频率（%）			等位基因频率（%）	
		CC	GC	GG	C	G
无症状携带	670	25.7	43.6	30.7	47.5	52.5
发病组	533	19.7[a]	49.9[a]	30.4	44.7	55.3
合计	1 203	23.0	46.4	30.6	46.2	53.8

a：$P < 0.05$，与无症状携带者比较

在 C Ⅱ TA 基因启动子Ⅳ G-944C 位点，慢性 HBV 感染无症状携带与发病组人群中 GG 基因型频率分别为 30.7% 和 30.4%，两者相差不显著（$\chi^2 = 0.017$，$P = 0.895$）；CC 基因型频率在 2 组人群中分别为 25.7% 和 19.7%，彼此间相差显著（$\chi^2 = 5.560$，$P = 0.018$），而 GC 基因型频率分别为 43.6% 和 49.9%，彼此间相差显著（$\chi^2 = 4.774$，$P = 0.029$）。经多元 Logistic 回归分析去除年龄、性别影响后，CC 和 GC 2 种基因型频率在携带与发病组人群中的分布也存在非常显著性差异（$P = 0.007$）。在 C 基因显性模式下（G 基因隐性模式），即 CC + GC 基因型频率在无症状携带和发病组人群中分别为 69.3% 和 69.7%，两者相差不显著（$\chi^2 = 0.017$，$P = 0.895$）。而在 G 基因显性模式下（C 基因隐性模式），即 GG + GC 基因型频率在无症状携带和发病组人群中分别为 74.3% 和 80.3%，两者相差显著（$\chi^2 = 5.560$，$P = 0.018$），经多元 Logistic 回归分析去除年龄、性别影响后，仍发现其在携带与发病 2 组人群中存在显著性差异（$P = 0.015$）。

2.4 不同基因型在 HBV 感染相关的慢性肝患者群中的分布

在慢性肝炎、慢性重型肝炎和肝炎肝硬变 3 组人群中，C 与 G 等位基因频率及 CC、GC 与 GG 3 种基因型频率之间均相差不显著（$P > 0.05$）。原发性肝癌患者中 C 等位基因频率为 34.2%，低于慢性肝炎组（44.1%）、慢性重型肝炎组（45.8%）和肝炎肝硬变组（45.0%），但统计学上无显著性差异（P 值分别为 0.252、0.174 和 0.198）。原发性肝癌患者中 CC 基因型频率为 10.5%，低于慢性肝炎组（19.3%）、慢性重型肝炎组（21.1%）和肝炎肝硬变组（19.7%），但统计学上无显著性差异（P 值分别为 0.355、0.274 和 0.380）；原发性肝癌患者中 GG 基因型频率为 65.8%，高于慢性肝炎组（55.9%）、慢性重型肝炎组（54.2%）和肝炎肝硬变组（55.0%），但统计学上无显著性差异（P 值分别为 0.355、0.274 和 0.380），见表 3。

表 3 HBV 感染相关的慢性肝病患者中 G-944C 位点基因型与等位基因频率分布

组别	例数	基因型频率（%）			等位基因频率（%）	
		CC	GC	GG	C	G
慢性肝炎	119	19.3	49.6	31.1	44.1	55.9
重型肝炎	156	21.1	49.4	29.5	45.8	54.2
肝炎肝硬变	239	19.7	50.6	29.7	45.0	55.0
原发性肝癌	19	10.5	47.4	42.1	34.2	65.8
合计	533	19.7	49.9	30.4	44.7	55.3

3 讨论

PCR-RFLP 法、直接测序法、引物延伸法、荧光定量 PCR 法、PCR-SSP 法是研究基因多态性的常用方法。对于 C Ⅱ TA 基因启动子Ⅳ区 G-944C，由于无合适的酶切位点而无法采用 PCR-RFLP 方法，测序法则成本太高，且测序法、引物延伸法及荧光定量 PCR 法操作较复杂，并要求具备相应的昂贵仪器。因而我们

选用了特异性强，准确性高，操作简单快速，适合大样本分型的 PCR-SSP 法。经过直接测序对 PCR-SSP 法的分型结果进行验证，发现两者结果完全相符，进一步证实了该方法的可靠性。

在我国，慢性 HBV 感染者高达 1.2 亿人，其中部分人终身表现为无症状携带状态，而另一部分人会发展成慢性乙型肝炎，有的甚至发展成肝硬变、重型肝炎和原发性肝癌。慢性 HBV 感染的临床表型如此复杂多样，其形成机制至今尚未阐明。HBV 本身不直接导致肝细胞损伤，HBV 感染相关性肝损伤是由宿主对 HBV 感染产生免疫应答所致。近年研究表明，与宿主免疫功能相关基因的多态性在 HBV 感染相关性肝病的发病机制中起重要作用[4-6]。CⅡTA 基因也是一种决定宿主免疫功能状态的重要基因。该基因是否存在多态性，及其与疾病的关系，也逐渐受到国内外学者关注[7,8]，其中 Koizumi 等研究发现人 CⅡTA 基因存在单个核苷酸多态性（SNP）、并在系统性红斑狼疮的发病机制中起重要作用。Swanberg 等[9]研究发现，CⅡTA 基因启动子Ⅲ（A-168G）多态性影响 MHCⅡ分子表达的质和量，且与炎性疾病的易感性相关。我们前期的研究发现中国人 CⅡTA 基因也存在 SNPs（未发表），其中启动子Ⅳ区有 4 个，与 Zhao 等[10]的研究结果有差异。

本研究对 1 203 例不同临床表型的慢性 HBV 感染人群中 CⅡTA 基因启动子Ⅳ区 G-944C 位点多态性进行了分析。结果显示：①慢性 HBV 感染的无症状携带者中 CC 基因频率显著高于发患者群（HBV 感染相关的慢性肝病），而 GC 基因型在无症状携带者中的频率显著低于发患者群；②GG + GC 基因型（G 基因显性模式）在无症状携带者中的频率显著低于发病组人群；③在慢性肝炎、慢性重型肝炎和肝炎肝硬变 3 组人群中，C 与 G 等位基因频率及 CC、GC 与 GG 3 种基因型频率之间均相差不显著；④原发性肝癌患者中 C 等位基因频率与 CC 基因型频率虽然低于慢性肝炎、慢性重型肝炎和肝炎肝硬变，但统计学上无显著差异。该结果提示，CⅡTA 基因启动子Ⅳ中的 G-944C 位点多态性与慢性 HBV 感染者是否发病存在一定的相关性，而与疾病的严重程度无明显相关性；基因型为 CC 纯合子的慢性 HBV 感染者不容易发展成慢性肝病；相反，在 G 基因显性模式下（基因型为 GG + GC），慢性 HBV 感染者更容易发展成慢性肝病。推测 CⅡTA 基因启动子Ⅳ中-944 位点变异可能影响 CⅡTA 基因的表达水平，-944 位点多态性对其功能的影响有待进一步的研究证实。本组资料显示 C 等位基因与 CC 基因型频率在肝癌组中的频率低于非肝癌组，但由于原发性肝癌组样本量太少，未能发现-944 位点等位基因频率与基因型在肝癌组与非肝癌组中存在统计学上的差异，有待进一步扩大原发性肝癌组样本量后再进行分析比较。

参考文献：

[1] 徐宝艳，王宇明，邓国宏，等. 乙型肝炎病毒感染孪生子宿主遗传因素与临床表型关系的初步研究[J]. 中华医学杂志，2004，84(3)：189 - 193.

[2] PISKURICH J F, GILBERT C A, ASHLEY B D, *et al*. Expression of the MHC class II transactivator (CⅡTA) type IV promoter in B lymphocytes and regulation by IFN-gamma[J]. Mol Immunol, 2006, 43(6): 519 - 528.

[3] CHANG C H, FONTES J D, PETERLIN M, *et al*. Class II transactivator (CⅡTA) in sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes [J]. J Exp Med, 1994, 180(4): 1367 - 1374.

[4] 张绪清. 基因多态性与乙型和丙型肝炎病毒感染的关系[J]. 中华肝脏病杂志，2003，11(11)：698 - 700.

[5] MIGITA K, MIYAZOE S, MAEDA Y, *et al*. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF-bate1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2005, 42(2): 505 - 510.

[6] CHONG W P, TO Y F, IP W K, *et al*. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2005, 42(5): 1037 - 1045.

[7] JANITZ M, REINERS-SCHRAMM L, MUHLETHALER-MOTTET A, *et al*. Analysis of the sequence polymorphism within class II transactivator gene promoters[J]. Exp Clin Immunogenet, 2001, 18(4): 199 - 205.

[8] KOIZUMI K, OKAMOTO H, IIKUNI N, *et al*. Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding the major histocompatibility complex class II transactivator (CⅡTA) in systemic lupus erythematosus[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(6): 947 - 950.

[9] SWANBERG M, LIDMAN O, PADYUKOV L, *et al*. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction[J]. Nat Genet, 2005, 37(5): 486 - 494.

[10] ZHAO Y R, GONG L, HE Y L, *et al*. Relationship between polymorphism of class II transactivator gene promoters and chronic hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(6): 854 - 857.

（编辑　薛国文）