

荔波少数民族人群 HBV 感染与 $ESR\alpha$ 基因 Pvu II 和 T29C 位点基因多态性研究*

左 娅**, 何 燕***, 赵孝梅, 张 婷, 王婵娟, 禹文峰, 官志忠

(贵阳医学院 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 了解贵州荔波少数民族人群雌激素受体($ESR\alpha$)基因 Pvu II 位点和 T29C 位点多态性与乙型肝炎病毒(HBV)易感性的关系。方法: 选取贵州荔波县少数民族健康对照 91 例和 HBsAg 携带者 80 例, 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法测定受检者基因组中 $ESR\alpha$ 基因 Pvu II 和 T29C 位点多态性, 分析两位点多态性与 HBV 易感性的关系。结果: 在荔波少数民族健康对照组和 HBsAg 携带组中均检出 $ESR\alpha$ 基因 Pvu II 和 T29C 位点 3 种基因型, 但 3 种基因频率和等位基因频率在两组间分布差异无统计学意义($P>0.05$)。结论: $ESR\alpha$ 基因的 Pvu II 和 T29C 基因多态性与荔波少数民族人群中乙肝感染无关。

[关键词] 少数民族; 基因; 雌激素受体; 乙型肝炎; 携带者; 感染; 多态性; 贵州荔波

[中图分类号] R394; R34-33; RZ273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)03-0222-03

Study on Association of $ESR\alpha$ Pvu II and T29C Gene Polymorphism with Susceptibility to Hepatitis B Virus Infection in Libo Minority Population of Guizhou Province

ZUO Ya, HE Yan, ZHAO Xiaomei, ZHANG Ting, WANG Chanjuan, YU Wenfeng, GUAN Zhizhong
(The Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** Analysis on the correlation of the polymorphism of estrogen receptor ($ESR\alpha$) gene Pvu II and T29C loci with hepatitis B virus (HBV) infection in Libo minority population of Guizhou province. **Methods:** Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to analyze the polymorphism of Pvu II and T29C loci in 91 healthy controls and 80 HBsAg carriers, the correlation of these two loci with susceptibility to HBV was analyzed. **Results:** Three genotypes of $ESR\alpha$ Pvu II and T29C loci were detected in both control group and HBsAg group. Between two groups, the three kinds of gene frequency and allele frequency distribution showed no statistical difference ($P>0.05$). **Conclusions:** The Pvu II and T29C loci gene polymorphism of ESR is not associated with HBV susceptibility in Libo minority nationality.

[Key words] ethnic minorities; gene; estrogen receptor; hepatitis B; carries; infection; polymorphism; Guizhou, Libo

全球约有 4 亿人为乙型肝炎病毒(HBV)携带者, 每年约有 25 万人死于慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌^[1-3]。HBV 感染的慢性化是一个多因素的结果, 除与 HBV 的变异、宿主的年龄、性别和免疫状

态等有关外, 机体遗传基因的多态性可能也是导致 HBV 感染慢性化的另一个重要原因^[4]。雌激素主要通过与其受体 α (estrogen receptor α , $ESR\alpha$) 结合发挥作用^[5-7], 而 $ESR\alpha$ 基因突变会导致雌激素

*[基金项目] 国家“十二·五”科技支撑计划项目(No:2013BAI05B03); 贵州省科技厅社会发展攻关项目[No:sy(2012)3135]

** 贵阳医学院 2010 级生物技术专业本科生

*** 通信作者 E-mail: annieheyan@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2015-03-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150319.0943.010.html>

素功能的下降,引起 HBV 感染人群不同的遗传易感性^[8],贵州是一个多民族省份,少数民族人口众多,且大多聚居于较封闭偏远的山区,形成了遗传学上相对隔离的人群。选用这样相对封闭的隔离自然人群作为研究对象,可以最大限度的排除基因流(gene flow)现象对该人群等位基因频率、基因型频率的影响,对多基因疾病研究具有独特的优势。

1 对象与方法

1.1 研究对象

按照知情同意原则,随机对贵州省荔波县少数民族进行问卷调查和抽样分析,根据乙肝血清标志物、肝功能指标及 HBV 病毒 DNA 定量结果分别选取健康对照 91 例,男性 45 例,女性 46 例,(47.8 ± 1.57)岁;HBsAg 携带者 80 例,男性 41 例,女性 39 例,(48.5 ± 1.42)岁。所选的研究对象 3 代内无族外通婚史,彼此间无直接血缘关系,性别、年龄匹配,无乙型肝炎疫苗接种史。

1.2 全血 DNA 提取与定量

采用 Qiagen 公司的 FlexiGene DNA 提取试剂盒提取全血 DNA;紫外吸收法测定 DNA 浓度,并标化 DNA 模板浓度为 100 mg/L。

1.3 *ESRα* 基因 *Pvu*II 和 T29C 多态性位点基因扩增

采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法,根据 GenBank 中 *ESRα* 基因 *Pvu* II 和 T29C 多态性位点的基因序列,设计 *Pvu* II 多态位点引物,上游系列为 5'-TCTCCACCT-CAGCCTTAC-3',下游系列为 5'-ACCAATGCTC ATCCCAAC-3',扩增产物长为 448 bp。参照文献[9]设计 T29C 多态位点引物,上游系列为 5'-GACCATGACCCTCCACACCAAAGGA TC-3',下游系列为 5'-ACCGTAGACCTGCGCGTTG-3',扩增产物长 218 bp。引物由上海生物工程技术有限公司合成。反应采用 Touch-down PCR 法:94 °C 变性 40 s、62 °C 退火 50 s(每个循环降低 0.5 °C)、72 °C 延伸 40 s,扩增 14 个循环后改为 94 °C 变性 40 s、55 °C 退火 50 s、72 °C 延伸 40 s 继续 20 个循环。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCR 产物的酶切

ESRα 基因 *Pvu* II、T29C 位点 PCR 产物分别以限制性核酸内切酶 *Pvu* II、*Msp* I 酶切,37 °C 恒温水浴过夜,酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定。

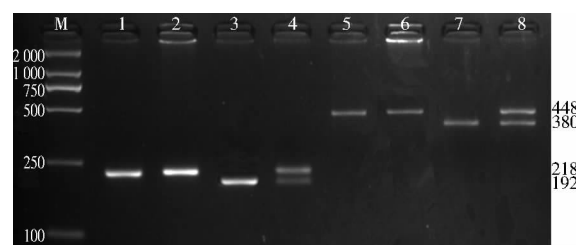
1.5 统计学方法

以 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验确定对照组遗传平衡状况,根据 PCR-RFLP 结果确定样本的基因型,用直接计数法计算基因型频率和等位基因频率;SPSS 19.0 统计软件的 χ^2 检验分析各基因型在 2 组人群中的分布。

2 结果

2.1 *ESRα* 基因 *Pvu* II 和 T29C 位点

PCR-RFLP 结果显示 *ESRα* 基因 *Pvu* II 位点的扩增产物长度为 448 bp,每例样本的目的条带清晰,适于后续 PCR 产物的 *Pvu* II 酶切反应。若 *ESRα* 基因 *Pvu* II 位点未发生突变,为野生型 CC,不产生酶切位点(仅见 448 bp 片段);若由野生型 C 突变成 T,为突变型 TT 片段中产生酶切位点,酶切后观察到 380 bp、68 bp 为突变型 TT,观察到 448 bp、380 bp、68 bp 3 个片段为杂合型 CT;因 68 bp 片段较小不易观察,故不作为观察项(见图 1)。*ESRα* 基因 T29C 位点的扩增产物长度 218 bp,每例样本的目的条带清晰,适于后续 PCR 产物的 *Msp* I 酶切反应。*ESRα* 基因 T29C 位点若为野生型 TT,无 *Msp* I 酶切位点(仅见 218 bp);若由野生型 T 突变成 C,片段中产生 *Msp* I 酶切位点,酶切后可为突变型 CC(观察到 192 bp、26 bp 2 个片段)、或杂合型 TC(观察到 218 bp、192 bp、26 bp 3 个片段);因 26 bp 片段较小不易观察,故不作为观察项。见图 1。



注:*ESRα* 基因 T29C 位点结果为 1、2、3、4,1 为 PCR 扩增产物,2-4 为酶切产物,2 为野生型 TT,3 为突变型 CC,4 为杂合型 TC;*ESRα* 基因 *Pvu* II 位点结果为 5、6、7、8,5 为 PCR 扩增产物,6-8 为酶切产物,6 为野生型 CC,7 为突变型 TT,8 为杂合型 CT

图 1 *ESRα* 基因 *Pvu* II 和 T29C 位点 PCR 扩增产物和酶切产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR amplification products and enzyme digestion products of *Pvu* II and T29C loci of *ESR* gene

2.2 HBV 感染与 *ESRα* 基因 *Pvu* II 和 T29C 位点的基因型频率和等位基因频率

ESRα 基因 *Pvu* II 和 T29C 位点基因型频率和

等位基因频率在贵州少数民族健康对照组和 HBsAg 携带组中的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1, 表 2。

表 1 HBV 感染与 *ESRα* 基因 *Pvu* II 多态性

Tab. 1 Analysis on the polymorphism of *ESRα* gene *Pvu* II locus and HBV infection

组数	<i>n</i>	基因型频率(<i>n</i> , %)			等位基因频率(<i>n</i> , %)	
		CC	TC	TT	C	T
健康对照组	91	15(16.5)	40(43.9)	36(39.6)	70(38.5)	112(61.5)
HBV 携带组	80	13(16.3)	34(42.5)	33(41.2)	60(37.5)	100(62.5)
χ^2			0.05			0.03
<i>P</i>			0.97			0.91

表 2 HBV 感染与 *ESRα* 基因 T29C 位点多态性

Tab. 2 Analysis on the polymorphism of *ESRα* gene T29C locus and HBV infection

组数	<i>n</i>	基因型频率(<i>n</i> , %)			等位基因频率(<i>n</i> , %)	
		TT	TC	CC	T	C
健康对照组	91	39(42.85)	39(42.85)	13(14.3)	117(64.3)	65(35.7)
HBV 携带组	80	34(42.5)	40(50.0)	6(7.5)	108(67.5)	52(32.5)
χ^2			2.24			0.33
<i>P</i>			0.39			0.57

3 讨论

雌激素受体是存在于靶器官的细胞内、可与激素发生特异性结合而形成激素-受体复合物、是使激素发挥其生物学效应的一种蛋白质分子,至今发现的 ESR 有 *ESRα* 和 *ESRβ* 两种亚型。人体中 *ESRα* 基因定位于第 6 号染色体短臂的第 2 区 5 号带中的第 1 亚带,由 140 kb 碱基构成,编码 595 个氨基酸的蛋白质,包括 8 个外显子和 7 个内含子^[10]。*ESR* 不同的基因型有可能决定不同个体间 ESR 的表达水平与功能差异,从而影响到病原体对宿主的易感性。1993 年,骆抗先等^[11]对中国 7 个民族的 HBV 感染调查发现 HBsAg 具有较高的阳性率,且这些民族间 HBV 感染存在差异。2006 年,谢建萍等^[12]研究发现,*ESRα* 基因 *Pvu* II 位点多态性与 HBV 感染后疾病进展密切相关;2009 年,郜玉峰等^[13]的研究显示 *ESRα* 基因 *Pvu* II 位点 C/T 基因型和 C 等位基因可能是乙型肝炎病毒感染慢性化的遗传易感基因。也有大样本研究发现,*ESRα* 基因 T29C 位点基因多态性与 HBV 持续性感染相关^[13];对甘肃地区人群的 *ESRα* 基因 T29C 位点基因多态性与 HBV 感染转归的研究结果也显示,*ESRα* 基因 T29C 位点 TT 基因型和 T 等位基因可能是 HBV 感染慢性化的遗传易感基因^[14]。但

本次研究结果却显示 *ESRα* 基因 *Pvu* II 和 T29C 位点基因多态性的分布在贵州荔波少数民族 HBV 感染组和健康对照组中差异无统计学意义,这与单可人等^[15]对贵州彝族 *ESRα* 基因 T29C 基因型分布与 HBV 感染研究结果一致,提示不同民族和城乡区域中 *ESRα* 基因 *Pvu* II 和 T29C 位点的分布存在差异,*ESR* 基因 *Pvu* II 和 T29C 位点基因多态性在 HBV 感染的发生发展中起主要作用还是辅助作用,或是协同作用,又或是 *ESR* 基因多态性是否真正与 HBV 感染密切相关,尚有待于进一步大样本的研究证实。

4 参考文献

- [1] Hvanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and eantrol measures [J]. J Viral Hepat, 2004 (2): 97 - 107.
- [2] 巫责成,周卫平,赵有蓉,等. 慢性乙型肝炎患者远期生存质量研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2003 (5): 275 - 277.
- [3] 苏勤. 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生[J]. 世界华人消化杂志, 2003 (6): 791 - 795.
- [4] Thursz M. Genetic susceptibility in chronic viral hepatitis [J]. Antiviral Res, 2001 (2): 113 - 116.

(下转第 228 页)