

甘露糖结合蛋白基因突变与肝硬化及肝癌关系的研究

郑瑞丹¹, 庄群瑛^{1,2}, 高建平³, 卢燕辉¹, 陈建能¹, 陈洁¹, 朱青川³, 林震群³ (1. 厦门大学附属东南医院肝病治疗中心, 漳州 363000; 2. 厦门大学公共卫生学院 08级预防医学系, 厦门 361005; 3. 福建省漳州市中医院 检验科, 漳州 363000)

摘要: 目的 探讨甘露糖结合蛋白(MBP)基因突变与肝硬化及肝癌的关系。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)技术针对代偿性肝硬化(CC)患者73例、失代偿性肝硬化(DC)患者78例、肝细胞癌(HCC)患者35例和对照组88例健康者的MBP基因第54位密码子多态性进行检测。结果 HCC组的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($P > 0.05$)。CC组、DC组MBP基因GGC/GAC基因型频率和GAC等位基因频率均显著高于HCC组和对照组($P < 0.05$), 其中DC组突变率最高(36.5%)。结论 MBP第54位密码子与肝硬化进展相关, 但可能并非HCC发展中的重要因素。

关键词: 甘露糖; 肝硬化; 肝肿瘤; 密码子

Relationship between mannose-binding protein polymorphism and patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma

ZHENG Rui-dan¹, ZHUANG Qun-ying^{1,2}, GAO Jian-ping³, LU Yan-hui¹, CHEN Jian-neng¹, CHEN Jie¹, ZHU Qing-chuan³, LIN Zhen-qun³ (1. Research and Therapy Center for Liver Diseases, Dongnan Affiliated Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, China; 2. Preventive Medicine Grade 2008, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Clinical Laboratory, Zhang Zhou Hospital of T.C.M, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between mannose-binding protein (MBP) codon 54 polymorphism and patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) were conducted on the MBP codon 54 polymorphism in 73 patients with compensated cirrhosis (CC), 78 with decompensated cirrhosis (DC), 35 with hepatocellular carcinoma (HCC) and 88 normal controls. **Results** The genotype frequency of GGC/GAC heterozygotes and GAC allele frequency were significantly higher in group CC and DC as compared with that of control group and HCC group ($P < 0.05$), while no difference was found between HCC group and normal subjects ($P > 0.05$). GAC allele frequency was also highest prevalence (36.5%) in DC group than that in CC group and HCC group ($P < 0.05$). **Conclusions** The MBP codon 54 polymorphism is associated with the progression of liver cirrhosis and might not play an important role in the development of hepatocellular carcinoma.

Key words: Mannose; Liver cirrhosis; Liver neoplasms; Codon

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是世界范围内主要的传染病之一, 但不同地区

HBV感染的流行强度差异很大, 全球约20亿人曾感染过HBV, 其中3.5亿人为慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者, 每年约有100万人死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。

CHB的发生与病程进展受多方面因素影响,如HBV基因型、宿主年龄、性别、免疫状态、生活习惯(吸烟、饮酒)等,而宿主遗传易感性可影响CHB病程的多阶段进展^[2]。

甘露糖结合蛋白(mannan-binding protein, MBP)是一种由肝脏合成和分泌的急性期蛋白,能选择性识别甘露聚糖,通过激活补体、调理吞噬作用杀灭病原体,在机体免疫防御和免疫复合物形成及清除中起重要作用^[3]。乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)上具有丰富的甘露糖末端碳氢链,是MBP结合的靶位,血清MBP与HBV结合后,可被补体中和,通过补体受体或直接通过细胞表面MBP受体从血液中清除,从而增强机体清除外周血中HBV的能力。本研究采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性方法(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)和实时荧光定量聚合酶链技术(fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR),分析MBP基因突变与肝硬化及HCC的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择厦门大学附属东南医院肝病治疗中心和漳州市中医院消化内科住院的肝硬化及HCC患者,肝硬化的诊断符合2010年中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会联合制定的《慢性乙型肝炎防治指南》^[4],肝癌的诊断经影像学检查、血清甲胎蛋白测定或肝组织活检确诊。其中代偿性肝硬化(compensated cirrhosis, CC)患者73例,失代偿性肝硬化(decompensated cirrhosis, DC)患者78例,HCC患者35例。选择同期健康体检者88例为对照组,其中男性56例,女性32例,排除甲、乙、丙、丁、戊型肝炎病毒感染,除外自身免疫性肝炎、脂肪肝及酒精性肝病。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 各组均取空腹肘静脉血2 ml,抗凝,按梯度密度离心法分离单个核细胞后,加蛋白酶K和裂解液消化,苯酚-氯仿-异丙醇法提取并纯化DNA,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位密码子的多态性。PCR引物由上海生物工程技术有限公司合成,正引物序列:5'-GTAGGACAGAGGGCATGCTC-3',负引物序列:5'-CAGGCAGTTTCTCTGGAAGC-3'。Taq DNA聚合酶和三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)为宝生物工程(大连)有限公司产品。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C初始变性3分钟,95 $^{\circ}$ C变性30秒,64 $^{\circ}$ C退火1分钟,72 $^{\circ}$ C延伸1分钟,35个循环,72 $^{\circ}$ C终末延伸5分钟。取PCR扩增产物6 μ l,加Ban I(美国Promega公司)5 U,10 \times 缓冲液2 μ l,37 $^{\circ}$ C温育酶切4小时。Ban I能够识别5'-GGYRCC-3'序列,当GGC变异为GAC时,该酶切位点消失。酶切产物经2.5%琼脂糖溴化乙锭电泳分离,紫外线灯下判断结果。

1.3 统计学处理 经Hardy-Weinburg遗传平衡定律检验,各基因型频率已达遗传平衡,具有群体代表性。采用SPSS 13.0统计软件包的 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MBP基因第54位密码子多态性 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 bp、245 bp、84 bp 3个片段,见图1。

2.2 MBP基因突变分布情况 对照组中MBP基因突变的分布频率分别为GGC/GGC(70.5%)、GGC/GAC(29.5%)、GAC/GAC(0),等位基因频率为GGC(85.2%)、GAC(14.8%);CC组、DC组的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DC组

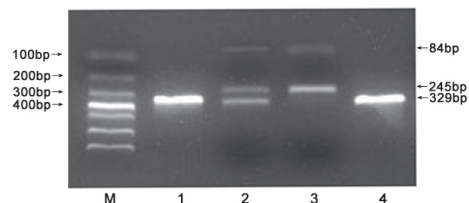


图1 甘露糖结合蛋白基因第54号密码子多态性电泳结果

注: M: 100 bp DNA相对分子质量标准; ①未经酶切的产物; ②GGC/GAC基因型; ③GGC/GGC基因型; ④GAC/GAC基因型

基因突变率最高,为36.5%,HCC组的MBP基因GGC/GAC基因型频率和GAC等位基因频率与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1、表2。

3 讨论

CHB的发生与发展,除受病毒及环境因素影响外,还与宿主的免疫遗传因素密切相关,天然免疫在CHB的进展中起着至关重要的作用。MBP是一种钙离子依赖性糖结合蛋白,主要由肝细胞合成,广泛存在于肝脏和血液中^[5],MBP能特异性地识别、结合多种病原微生物,在天然免疫防御中发挥重要作用^[6]。HBsAg含有丰富的甘露醇末端的碳氢链,是MBP结合的靶点,并能与MBP结合,因此机体可通过细胞表面的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。

国外研究表明,MBP基因外显子1区的第52、54和57位密码子均可发生突变,分别是密码子52(CGT→TGT)、密码子54(GGC→GAC)及密码子57(GGA→GAA)。MBP第54位密码子变异是亚洲人群中最常见的变异类型^[7]。第54位密码子变异可导致氨基酸改变,干扰其二级结构,使之不能形成完整的MBP蛋白,造成血清MBP水平降低,导致机体清除病原微生物能力下降;血清中MBP水平的下降,对多种感染性疾病的发生、发展和预后均产生重要影响^[8]。

本研究HCC组的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($P > 0.05$);CC组、DC组的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($P < 0.05$),CC组、DC组的MBP基因GGC/GAC基因型频率和GAC等位基因频率显著高于HCC组,提示MBP第54位密码子突变与肝硬化进展相关,但MBP第54位密码子突变在HCC发生中似乎并非重要的因素。国外学者研究认为,MBP基因发生突变,可干扰其胶原样区结构的重复系列,影响亚单位空间结构形成,使血清MBP质量发生变化,不能有效地清除HBV及循环免疫复合物,高病毒载量加重肝脏的免疫损害,大量的免疫复合物沉积在肝脏,加剧肝组织的炎症,造成肝细胞大量水肿变性、坏死,促使疾病向肝硬化方向发展^[9]。有研究表明MBP参与了丙型肝炎病毒相关性肝癌的发生^[10],而本研究显示MBP第54位密码子突变在HBV相关HCC发展中似乎并非重要因素,与国外报道相似^[11],但MBP基因第54位密码子突变率与肝脏疾病严重程度呈现一定的相关性,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,血清MBP低水平与肝硬化的发生有关,MBP基因突变患者应积极采取抗病毒治疗,以阻止病情进展。

MBP基因第54位密码子突变是决定CHB临床预后的一个重要因素,临床监测MBP第54位密码子可作为肝硬化与HCC预后的判断指标之一。

表 1 MBP基因突变基因型频率及比较

	基因型频率[例(%)]			与对照组相比	
	GGC/GGC	GGC/GAC	GAC/GAC	χ^2	P
CC组(n = 73)	33 (45.2)	40 (54.8)	0 (0)	10.53	< 0.05
DC组(n = 78)	22 (28.2)	55 (70.5)	1 (1.3)	30.05	< 0.05
HCC组(n = 35)	19 (54.3)	16 (45.7)	0 (0)	2.91	> 0.05
对照组(n = 88)	62 (70.5)	26 (29.5)	0 (0)	-	-

表 2 MBP基因突变等位基因频率及比较

	等位基因频率(%)		与对照组相比	
	GGC	GAC	χ^2	P
CC组(n = 73)	72.6	27.4	7.80	< 0.05
DC组(n = 78)	63.5	36.5	20.89	< 0.05
HCC组(n = 35)	77.1	22.9	2.31	> 0.05
对照组(n = 88)	85.2	14.8	-	-

由于本研究例数偏少，MBP基因突变与肝硬化及HCC的关系有待于临床扩大病例数进行深入研究。

参考文献

- [1] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med,2004,350:1118-1129.
- [2] Tong MJ, Pan CQ, Hann HW, et al. The management of chronic hepatitis B in Asian Americans[J]. Dig Dis Sci,2011,56:3143-3162.
- [3] Ruseva M, Kolev M, Dagnaes-Hansen F, et al. Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment[J]. Immunology,2009,127:279-288.
- [4] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 (2010年版)[J]. 中华肝脏病杂志,2011,19:13-24.
- [5] Nonaka M, Ma BY, Ohtani M, et al. Subcellular localization and physiological significance of intracellular mannan-binding protein[J]. J Biol Chem,2007,282:17908-17920.
- [6] Takahashi K, Ezekowitz RA. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity[J]. Clin Infect Dis,2005,15:41:S440-S444.
- [7] Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, et al. Mutations in the human mannose-binding protein gene: Frequencies in several population groups[J]. Eur J Hum Genet,1996,4:13-19.
- [8] Fletcher GJ, Gnanamony M, Samuel P, et al. Association of mannose-binding lectin polymorphisms and HBV outcome in a South Indian population[J]. Int J Immunogenet,2010,37:177-184.
- [9] Chong WP, To YF, Ip WK. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology,2005,42:1037-1045.
- [10] Eurich D, Boas-Knoop S, Morawietz L, et al. Association of mannose-binding lectin-2 gene polymorphism with the development of hepatitis C-induced hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int,2011,31:1006-1012.
- [11] Segat L, Fabris A, Padovan L, et al. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Viral Hepat,2008,15:387-391.

收稿日期: 2012-01-27

• 消息 •

《中国肝脏病杂志（电子版）》征稿启事

《中国肝脏病杂志（电子版）》为卫生部主管、人民卫生出版社主办、首都医科大学附属大学北京地坛医院承办的肝脏病学专业学术电子期刊，是一本在载体形式上与纸媒体相互补的多媒体光盘期刊（CD-ROM）。本刊以电子期刊特有的表现形式，运用影视语言和多媒体技术登载有关肝脏病的专业论著、专家讲坛、临床病理讨论及学术会议等，图文声像并茂，是广大肝脏病工作者了解当前学科前沿、掌握最新技术的有效工具。本刊内容主要包括各种肝脏病的病原学、流行病学、免疫学、临床诊断及预防的实践经验和研究成果，以及本领域新技术、新方法的重要进展。本刊常设的主要栏目有述评、专家讲座、论著、指南、继续医学教育、经验交流、短篇报道、综述、临床病理讨论、设备技术介绍、国内外学术动态等。

本刊特色栏目：

(1)继续医学教育（视频）；(2)临床病理讨论（病例分析、典型图像分析、专家点评）。

本刊的办刊宗旨是：贯彻党和国家的卫生工作方针政策，贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针，紧跟国际医学发展趋势，及时反映我国肝脏病临床和科研工作的重大进展，促进国内外肝脏病学学术交流。

本杂志为季刊，16开，64页，逢季末月20日出版。每期定价20元，全年定价80元。本刊已纳入“中国核心期刊（遴选）数据库”中进行论文统计和引证查询。

通讯地址：北京市朝阳区京顺东街8号《中国肝脏病杂志（电子版）》编辑部

邮编：100015

电话：010-84322058

传真：010-84322059

网址：www.j-ditan.com

Email: editor.ditan@gmail.com