MICA 基因第 5 外显子与乙肝后肝硬变的相关性研究

姜孝新 蒋艳 李艳雯 伍小平

基金项目:国家自然科学基金项目资助(31200141);湖南省教育厅项目资助(11C1110);湖南省自然科学基金项目资助(08JJ3060)

作者单位:421001 衡阳市,南华大学附属第一医院检验科

【摘要】 目的 研究 MICA 基因多态性、sMICA 分子与乙肝后肝硬化(liver cirrhosis, LC)的相关性。方法 采用 MICA-STR 微卫星基因分型技术检测 101 例 HBsAg 阳性 LC 患者和 141 例健康对照者 MICA 基因第 5 外显子的基因多态性,并进行统计学分析。结果 在 101 例湖南汉族 HBsAg 阳性 LC 患者中检测到 5 种 MICA 基因第 5 外显子等位基因,频率分别为:MICA * A4 (10.9%),MICA * A5 (37.1%),MICA * A5.1(34.2%),MICA * A6(7.4%),MICA * A9(10.4%)。15 种基因型分别为 MICA * A4/A4,MICA * A4/A5,MICA * A4/A5.1,MICA * A4/A6,MICA * A4/A9,MICA * A5/A5,MICA * A5/A5.1,MICA * A5/A6,MICA * A5/A9,MICA * A5.1/A5.1,MICA * A5.1/A6,MICA * A5.1/A9,MICA * A6/A6,MICA * A6/A9,MICA * A9/A9。MICA * A5.1 基因与 LC 发病正相关($P=0.042$),OR 值为 1.398,与患者性别无关($\chi^2=0.08$, $P=0.778$)。结论 MICA * A5.1 基因与乙肝后 LC 发病正相关,提示该基因可能是乙肝后出现 LC 的重要易感基因。

【关键词】 MICA 基因;可溶性 MICA;肝硬化;乙型肝炎病毒

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.003

The correlation between liver cirrhosis by hepatitis B and MICA exon 5 gene

JIANG Xiao-xin, JIANG Yan, LI Yan-wen, et al. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China

【Abstract】 Objective To study MICA gene polymorphism and the correlation of sMICA with HBsAg positive liver cirrhosis (LC). **Methods** MICA-STR microsatellite genotyping was used to characterize the polymorphism of MICA exon 5 in 101 patients with HBsAg positive LC and 141 normal controls, and the relevance index between them was calculated. **Results** 5 kinds allelic gene and their frequencies were identified in MICA exon 5 and showed as below: MICA * A4(10.9%), MICA * A5(37.1%), MICA * A5.1(34.2%), MICA * A6(7.4%), MICA * A9(10.4%). 15 genotypes including MICA * A4/A4, MICA * A4/A5, MICA * A4/A5.1, MICA * A4/A6, MICA * A4/A9, MICA * A5/A5, MICA * A5/A5.1, MICA * A5/A6, MICA * A5/A9, MICA * A5.1/A5.1, MICA * A5.1/A6, MICA * A5.1/A9, MICA * A6/A6, MICA * A6/A9, MICA * A9/A9. Only MICA * A5.1 was positively associated with LC onset($P=0.042$), OR was 1.398, but was not associated with gender ($\chi^2=0.08$, $P=0.778$). **Conclusion** MICA * A5.1 gene may be an important susceptibility gene leading to LC after infected with hepatitis B according to the positive correlation between MICA * A5.1 and hepatitis B induced LC.

【Key words】 MICA gene; sMICA; Liver cirrhosis; HBV

乙型肝炎报告病例以慢性居多,且慢性乙型肝炎所致的肝硬化(liver cirrhosis, LC)即乙肝后 LC 是乙型肝炎的主要转归之一。MIC 基因家族包括 MICA、MICB、MICC、MICD、MICE、MICF 等基因,其中只有 MICA 和 MICB 基因编码 mRNA 为功能基因,其余均为假基因。MICA 基因在第 2 至第 5 外显子具有高度的多态性,其中第 5 外显子存在(GCT)_n

序列多态性^[1]。本文研究采用 MICA-STR 微卫星基因分型技术,对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)所致 LC 患者 MICA 基因第 5 外显子跨膜区(GCT)_n 遗传多态性进行了分析,研究 MICA 基因与 LC 的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选自我院 2007 年 10 月-2009 年

12 月的无亲缘关系的住院 LC 患者 101 例, 经 B 超或 CT 显示肝脏纤维化, 乙型肝炎表面抗原检测阳性, HBV-DNA 检测高拷贝阳性, 天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶增高; 年龄 25~59 岁, 平均年龄 (43.4±9.6) 岁。其中男性 57 例, 女性 44 例。另选择来我院体检的无亲缘关系的健康者 141 例, 作为对照组, 年龄 22~70 岁, 平均年龄 (44.0±11.4) 岁, 其中男性 81 例, 女性 60 例, 受试者均为湖南籍汉族人。两组间经平衡检验, 差异无统计学意义, 具有可比性。本研究通过我院伦理委员会批准, 所有受试人员签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 外周血基因组 DNA 提取 按照北京天根生物公司外周血基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 加以改良提取。

1.2.2 MICA-STR 的 PCR 扩增并测序 根据 MICA 基因组 DNA 序列 (GenBank accession number: X92841) 和参考文献^[2]设计 PCR 引物, 序列分别为: 上游引物序列 5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3'; 下游引物序列 5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3'; 内对照采用人生长激素基因, 其中上游引物序列为 5'-GCCTTCCCAACCATTCCTTA-3'; 下游引物序列为 5'-GAGAAAGGCCTGGAGGATTC-3'。扩增片段大小为 834 bp。PCR 扩增产物通过 ABI 3730 核酸分析仪检测, 并经过 ABI 3730 数据收集 V3.0 和 ABI 基因分型软件 (Genemapper 4.0) 分析得到 PCR 产物片段大小信息 (由北京三博远志生物公司完成)。

1.3 统计学处理 等位基因频率通过计数法直接得出, 对各等位基因的数据采用 Genepop v3.4 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验^[3]; 利用 SPSS 17.0 软件进行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验 所选择的研究对象经 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验, 各种基因型的观察频率与理论频率之间的差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.732, P > 0.05$), 符合 Hardy-Winberg 平衡的随机群体。

2.2 MICA 基因第 5 外显子 PCR 产物 ABI 3730 STR 检测 通过 MICA-STR 分析, 在受检人群中检出 MICA * A4、MICA * A5、MICA * A5.1、MICA * A6 和 MICA * A9 5 种等位基因, 15 种基因型, MICA * A4/A4, MICA * A4/A5, MICA * A4/A5.1, MICA * A4/A6, MICA * A4/A9, MICA * A5/A5, MICA * A5/

A5.1, MICA * A5/A6, MICA * A5/A9, MICA * A5.1/A5.1, MICA * A5.1/A6, MICA * A5.1/A9, MICA * A6/A6, MICA * A6/A9, MICA * A9/A9。

2.3 LC 组与对照组的 MICA-STR 等位基因及基因型频率分布 与对照组相比, MICA * A5.1 等位基因在 LC 组中分布频率更高, 两组间差异有统计学意义 ($P = 0.042$), 进一步分析得比值比 (odds ratio, OR) 为 1.398, 见表 1。

表 1 LC 组与对照组的 MICA-STR 等位基因及基因型频率比较 [n(%)]

MICA 等位基因	对照组 n= 141	LC 组 n= 101	P 值
A4	40(14.2)	22(10.9)	> 0.05
A5	112(39.7)	75(37.1)	> 0.05
A5.1	76(26.9)	69(34.2)	0.042
A6	25(8.9)	15(7.4)	> 0.05
A9	29(10.3)	21(10.4)	> 0.05

2.4 男性 LC 患者组和男性对照组 MICA-STR 等位基因及基因型频率比较 与对照组相比, MICA * A5.1 等位基因在男性 LC 中分布频率更高, 两组间差异有统计学意义 ($P = 0.048$), 进一步分析得 OR = 1.302, 见表 2。

表 2 男性 LC 组与对照组的 MICA-STR 等位基因及基因型频率比较 [n(%)]

MICA 等位基因	男性对照组 n= 81	男性 LC 组 n= 57	P 值
A4	26(16.0)	12(10.5)	> 0.05
A5	62(38.2)	43(37.7)	> 0.05
A5.1	40(24.7)	38(33.3)	0.048
A6	16(9.9)	9(7.9)	> 0.05
A9	18(11.1)	12(10.5)	> 0.05

2.5 女性 LC 患者组和女性对照组 MICA-STR 等位基因及基因型频率分布比较 与对照组相比, MICA * A5.1 等位基因在女性 LC 患者组中分布频率更高, 两组间差异有统计学意义 ($P = 0.039$), 进一步分析得 OR = 1.442。其余 4 种 MICA 等位基因在两组间差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见表 3。

2.6 女性和男性 LC 患者 MICA * A5.1 等位基因频率比较 不同性别 LC 患者中, MICA * A5.1 等位基因分布频率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.08, P = 0.778$), 见表 4。

3 讨论

MICA 基因定位于 HLA-B 近着丝粒端 46 kb 处, 具有高度多态性, 其多态性主要分布在三个区

表 3 女性 LC 组与女性对照组的 MICA-STR 等位基因及基因型频率比较[n(%)]

MICA 等位基因	女性对照组 (n=60)	女性 LC 组 (n=44)	P 值
A4	14(11.7)	10(11.3)	>0.05
A5	51(42.5)	32(36.4)	>0.05
A5.1	35(29.2)	31(35.2)	0.039
A6	9(7.5)	6(6.8)	>0.05
A9	11(9.2)	9(10.2)	>0.05

表 4 女性和男性 LC 患者 MICA * A5.1 等位基因频率比较[n(%)]

组别	MICA * A5.1 等位基因	非 MICA * A5.1 等位基因
男性 LC 组	38(33.3)	76(66.7)
女性 LC 组	31(35.2)	57(64.8)

域:(1)外显子 2~4 区,根据该区域核苷酸序列差异已发现多达 73 个等位基因;(2)外显子 5 区,该区域存在微卫星结构,共发现了 A4、A5、A5.1、A6、A6V、A7、A9 和 A10 八种等位基因;(3)编码 MICA 分子第 129 位氨基酸残基(Val/Met)核苷酸序列的变化,该残基(Val/Met)变异能显著影响与 NKG2D 之间的亲和力^[4]。研究^[5-9]发现 MICA 基因多态性与肿瘤、器官移植、白塞氏病、I 型糖尿病、强直性脊柱炎以及机体对某些病毒的易感性相关。

NKG2D 是表达在 NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和 CD8⁺ $\alpha\beta$ T 细胞表面的一种 C 型凝集素样受体^[7]。MICA 基因编码的膜型 MICA 分子可通过与 NKG2D/DAP10 的结合传递活化信号,激活 T 细胞和 NK 细胞而发挥天然免疫效应;而 sMICA 分子则通过与 NKG2D/DAP10 的结合传递抑制信号,抑制 T 细胞和 NK 细胞活化而导致免疫抑制。Zou 等^[8]发现某些 MICA 基因型的宿主细胞感染 HCMV 与导致不孕不育相关。Gupta 等^[9]发现柯萨奇病毒感染和 HLA-DR3-MICA5.1 阳性的糖尿病相关。这些研究提示,机体对某种病毒的易感性与宿主 MICA 基因多态性有关,且其机制可能与应激状态下不同等位基因型的 MICA 基因的蛋白分子表达量差异有关。

HBV 感染是一个严重的全球性公共卫生问题。全球至少有 20 亿人感染过 HBV,约 3.5 亿人成为慢性感染者。HBV 是引起慢性肝炎、LC、肝癌的最常见病毒之一,每年约 32 万人死于 HBV 相关的慢性肝炎、LC 和肝细胞肝癌等肝病。我国人群 HBV 携带率为 9.75%,据此推算全国 1.2 亿人长期携带 HBV^[10]。Karacki 等^[11]研究发现慢性乙肝患者中 MICA * 015

基因增高,MICA 多态性影响 HBV 和 HCV 病毒感染的治愈。体外肝细胞培养研究显示:细胞膜型 MICA/B 表达高的,HBV 病毒感染减弱,这说明 MICA 与肝细胞的免疫损伤密切相关^[12]。在这些研究基础上,分析 MICA 基因在乙肝后 LC 人群中的分布特征,可为进一步研究 MICA 与乙肝性 LC 的相关性,以及为防治乙肝后 LC 等提供必要的实验数据。

本文研究主要采用 MICA-STR 微卫星基因分型技术对湖南汉族人群 LC 患者 MICA 基因第 5 外显子区域多态性进行检测,检出 MICA * A4、MICA * A5、MICA * A5.1、MICA * A6 和 MICA * A9 共 5 种等位基因,MICA * A4/A4、MICA * A4/A5、MICA * A4/A5.1、MICA * A4/A6、MICA * A4/A9、MICA * A5/A5、MICA * A5/A5.1、MICA * A5/A6、MICA * A5/A9、MICA * A5.1/A5.1、MICA * A5.1/A6、MICA * A5.1/A9、MICA * A6/A6、MICA * A6/A9、MICA * A9/A9 共 15 种基因型。LC 患者组中 5 种 MICA 等位基因以 MICA * A5 分布频率最高(37.1%),其次为 MICA * A5.1(34.2%),在 LC 患者组与对照组之间仅 MICA * A5.1 等位基因分布差异有统计学意义,且该等位基因在男、女性 LC 患者与男、女性健康对照者间分别比较,差异也具有统计学意义(P 均<0.05),进一步分析得 OR 值均大于 1,提示 MICA * A5.1 基因与 LC 发病正相关。但 MICA * A5.1 在男女性 LC 患者中的分布差异无统计学意义,说明该基因型分布与患者性别无关。

综上所述,MICA 第 5 外显子等位基因型 A5.1 与 LC 发病正相关,表明 MICA * A5.1 基因可能是乙肝后出现 LC 的重要易感基因。

4 参考文献

- Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94:1298-1303.
- Chen A, Shen Y, Xia M, et al. Expression of the nonclassical HLA class I and MICA/B molecules in human hepatocellular carcinoma. Neoplasma, 2011,58:371-376.
- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics, 1992,48:361-372.
- Steinle A, Li P, Morris DL, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. Immunogenetics, 2001,53:279-287.
- Zou Y, Stastny P, Süsal C, et al. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. N Engl J Med,

(下接第 108 页)

社会工业化的不断发展, 重金属铅在环境中污染日益严重, 给人们的健康带来严重的威胁; 铅及其化合物主要以粉尘、烟或蒸汽的形式经呼吸道、消化道进入机体, 其有机物还能通过完整的皮肤进入机体, 血液中的铅大约有 90% 与红细胞结合, 故血铅水平是反映儿童近期铅接触的指标。铅过量以神经系统症状最突出, 其次为影响造血系统和消化系统, 对儿童的智力和生长发育影响尤为严重, 尤其对智力的影响是不可逆的, 所以早发现铅中毒, 并对其进行治疗能减少其对婴幼儿的伤害。

随着生活水平的提高, 儿童营养不良的发病率逐渐降低, 但儿童正处于生长发育的旺盛期, 对各种营养物质及微量元素的需求较多, 摄入不足、吸收不良及某些遗传性疾病的存在, 都会导致营养不良的发生^[9]。据谢存芝等^[10]的研究, 营养不良儿童与锌等元素缺乏有密切关系, 且补充锌元素后, 其锌水平明显升高, 营养不良明显改善, 提示营养不良儿童补充相关缺乏微量元素的必要性。但本文研究进一步表明, 营养不良组中除锌缺乏外, 铅中毒患儿比率也明显高于对照组, 提示对营养不良患儿补锌的同时, 排铅也应引起重视。

RRI 是由不同病原微生物引起的一组反复发作的呼吸道疾病总称, 其发病涉及小儿营养、免疫等内部因素及病原微生物、环境等外部因素两大方面, 两者相互作用决定了 RRI 的发生。据邹艳等^[11]的研究表明, RRI 患儿锌含量下降, 有害元素铅含量上升, 与本文研究结果一致, 提示对 RRI 患儿补锌的同时, 也要进行排铅治疗, 以改善患儿免疫力, 减少患儿患病次数。

营养不良合并 RRI 的患儿也存在低锌高铅, 但

进一步的分析表明营养不良合并 RRI 的患儿低锌较单纯的营养不良与 RRI 患儿明显, 铅中毒较单纯的营养不良患儿明显, 这是否与患儿疾病叠加有关, 还有待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 郝翠莲, 郭兴东. 儿童营养不良原因分析与对策. 中外医疗, 2008, 24: 99.
- 2 张建裕, 龚华. 2094 例儿童微量元素铅、镉、铜含量分析. 中国妇幼保健, 2012, 27: 69-70.
- 3 刘晓鸥. 670 例儿童营养不良末梢血微量元素含量分析. 中国妇幼保健, 2009, 24: 2225-2226.
- 4 戴蕾蕾, 郑跃杰. 微量元素锌对小儿反复呼吸道感染的影响. 当代医学, 2010, 10: 6-7.
- 5 盛晓阳, 薛敏波, 沈理笑, 等. 小剂量补充锌剂对学龄前儿童血清锌水平及细胞免疫功能的影响. 临床儿科杂志, 2002, 20: 221-223.
- 6 李晓君, 李光华. 锌缺乏与儿科疾病. 中国保健营养: 临床医学学刊, 2008, 17: 93-94.
- 7 谭美珍, 陈力, 彭静宜, 等. 佝偻病婴幼儿血微量元素测定及临床研究进展. 微量元素与健康研究, 2006, 23: 34-36.
- 8 张红艳, 闵秀全. 微量元素与儿童佝偻病. 中国儿童保健杂志, 2005, 3: 241-243.
- 9 曾造, 赵云强. 微量元素的缺乏对儿童健康的影响. 微量元素与健康研究, 2007, 24: 14-16.
- 10 谢存芝, 王淑娥, 郭东梅, 等. 儿童营养不良与微量元素含量相关性分析. 中国卫生检验杂志, 2008, 18: 2516-2634.
- 11 邹艳, 金洪星, 李海峰. 反复呼吸道感染患儿血微量元素的 Meta 分析. 浙江预防医学, 2010, 22: 7-9.

(收稿日期: 2013-04-28)

(本文编辑: 李霖)

(上接第 78 页)

- 2007, 357: 1293-3000.
- 6 Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. Hum Immunol, 2006, 67: 230-237.
- 7 Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science, 1999, 285: 727-729.
- 8 Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, et al. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. J Immunol, 2005, 174: 3098-3104.
- 9 Gupta M, Nikitina-Zake L, Landin-Olsson M, et al. Coxsackie virus

- B antibodies are increased in HLA DR3-MICA5.1 positive type 1 diabetes patients in the Linkoping region of Sweden. Hum Immunol, 2003, 64: 874-879.
- 10 中华人民共和国卫生部. 2006 年-2010 年全国乙型病毒性肝炎防治规划. 中国实用乡村医生杂志, 2006, 13: 1-4.
- 11 Karacki PS, Gao X, Thio CL, et al. MICA and recovery from hepatitis C virus and hepatitis B virus infections. Genes Immun, 2004, 5: 261-266.
- 12 Chen M, Peng ML, Shi QF, et al. Establishing a LO2 cell model with whole HBV gene transfection and analyzing its expressions of HLA-A, B, C and MICA/B. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2007, 15: 417-421.

(收稿日期: 2013-04-02)

(本文编辑: 杨军)