

雌激素受体基因多态性与乙型肝炎肝硬化的相关性研究

谢建萍*, 龚先琼, 谭德明, 刘菲, 周建亮

(中南大学湘雅医院感染病科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:探讨雌激素受体基因的 *Pvu* II, *Xba* I 多态性与乙型肝炎肝硬化的关系,从基因水平上进一步探讨肝硬化的发病机制。方法:采用聚合酶链反应(PCR)-限制性片段长度多态性(RFLP)方法检测并比较了98例乙型肝炎肝硬化患者,72例慢性乙型肝炎患者,84例健康对照组的雌激素受体基因 *Pvu* II 和 *Xba* I 多态性。结果:乙型肝炎肝硬化患者的雌激素受体基因的 *Pvu* II 多态性的 *Pp* 基因型和 *P* 等位基因频率明显高于健康对照组和慢性乙型肝炎组,*pp* 基因型和 *p* 等位基因频率明显低于健康对照组和慢性乙型肝炎组,差异有统计学意义($P < 0.05$),*Pp* + *Pp* 基因型患肝硬化的风险是 *pp* 基因型的 2.23 倍($OR = 2.23$)。雌激素受体基因的 *Xba* I 多态性分布在各组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论:雌激素受体基因 *Pp* 基因型和 *P* 等位基因可能是肝硬化发病的遗传易感基因,*pp* 基因型和 *p* 等位基因可能是肝硬化发病的保护基因。

[关键词] 雌激素受体; 基因多态性; 乙型肝炎; 肝硬化

[中图分类号] R512.62 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2006)03-0379-04

Estrogen receptor gene polymorphisms and HBV-induced liver cirrhosis

XIE Jian-ping*, GONG Xian-qiong, TAN De-ming, LIU Fei, ZHOU Jian-liang

(Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between estrogen receptor (ER) gene polymorphisms and HBV-induced cirrhosis. **Methods** *Xba* I and *Pvu* II polymorphisms of ER gene were analyzed in 98 patients with HBV-induced cirrhosis, 72 patients with chronic hepatitis B, and 84 healthy controls by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. **Results** The frequencies of *Pp* genotype and *P* allele of ER gene in patients with HBV-induced cirrhosis were higher than those in patients with chronic hepatitis B and controls, while the frequencies of *pp* genotype and *p* allele of ER gene in patients with HBV-induced cirrhosis were lower than those in patients with chronic hepatitis B and controls ($P < 0.05$). The risk of HBV-induced cirrhosis occurrence in carriers with *Pp* and *pp* genotype was 2.23 folds than that in carriers with *pp* genotype. There was no significant difference in frequencies of allele and genotype in *Xba* I polymorphism among the HBV-induced cirrhosis group, the chronic hepatitis B group, and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Pp* genotype and *P* allele might be the susceptibility gene for HBV-induced cirrhosis while *pp* genotype and *p* allele might be the protective gene.

Key words: estrogen receptor; gene polymorphism; hepatitis B; hepatocirrhosis

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(3):0379-04]

临床资料显示,在不同个体间肝纤维化的严重程度以及进展快慢差异显著。这种差异除了与病毒、环境、年龄、性别等有关外,还与感染者个体的遗传因素密切相关^[1]。大量研究表明,雌激素

对肝脏有保护作用,可以抑制肝纤维化的形成^[2,3]。雌激素主要通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)介导来发挥生物学效应。其最终效应不仅取决于雌激素本身的分泌与代谢,还与 ER 的表达与功能密切相关。目前国内外已有不少学者对 ER 基因 I 号内含子 *Pvu* II 和 *Xba* I 限制性内切酶多态性进行了深入分析,初步研究结果表明:ER 基因的 *Pvu* II 和 *Xba* I 多态性与多种雌激素依赖性疾病如冠心病^[4]、子宫内膜癌^[5]、骨质疏松^[6] 等的发生发展相关,但是关于 ER 基因的这两种多态性与肝炎肝硬化是否有相关性,目前国内外尚未见报道。本实验检测了湖南地区汉族人群中乙型肝炎肝硬化患者、慢性乙型肝炎患者和正常人群的 ER 基因 *Pvu* II 和 *Xba* I 多态性的分布,试图了解 ER 基因多态性与乙型肝炎肝硬化之间的相关性,以期能从基因水平上进一步探讨肝硬化的发病机制。

1 对象与方法

1.1 对象

慢性乙型肝炎组及乙型肝炎肝硬化组均来自 2004 年 4 月至 2005 年 2 月我院传染科住院病人和门诊病人,其中慢性轻、中度乙型肝炎组 72 例,男性 53 例,女性 19 例,年龄 14 ~ 70 (32.43 ± 12.38) 岁。乙型肝炎肝硬化组 98 例,男性 83 例,女性 15 例,年龄 25 ~ 70 (44.05 ± 9.57) 岁。诊断均符合 2000 年 9 月全国第十次病毒性肝炎及肝病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》^[7] 中的诊断标准。其中乙型肝炎肝硬化组的诊断符合肝硬化的影像学诊断:慢性轻、中度乙型肝炎组 B 超检查无肝硬化的影像学改变。健康对照组 84 例,来自同期健康献血人群,男性 56 例,女性 28 例,年龄 16 ~ 46 (30.37 ± 6.17) 岁。3 组都为湖南籍汉族人,均无亲缘关系;排除甲、丙、戊型肝炎病毒感染;慢性乙型肝炎组和肝硬化组乙型肝炎病毒标志物和 HBV-DNA 检测经统计学分析无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和基因组 DNA 抽提

清晨空腹取肘静脉血 3 ~ 5 mL,以 ACD(柠檬酸钠缓冲液)抗凝,-20 °C 冰箱保存,全血基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 引物和反应条件

PCR 扩增产物

为包括第 1 内含子和部分第 2 外显子,长度为 1.3 kb 的 DNA 片段。上游引物序列:5'-CTGCCAC-CCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3',下游引物序列:5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'。反应体系为 50 μL,含 DNA 模板 50 ~ 100 ng,40 pmol 的混合引物,200 μmol/L 的 dNTPs,5 μL 的 10 × 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,1.25 U Taq 酶。PCR 循环条件为 94 °C 预变性 300 s,继之 94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环后,72 °C 终末延伸 300 s。

1.2.3 扩增产物检测及分析

分别取 10 μL 反应产物用 10 U *Pvu* II 内切酶,15 U *Xba* I 内切酶于 37 °C 酶切消化过夜(12 h 以上),反应终止后产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,以 DNA 片段长度标准物为参考,紫外灯下照相观察结果。限制性片段长度多态性(RFLP)分析的结果用 *P* 或 *p* 和 *X* 或 *x* 表示,大写字母均表示酶切位点因突变而消失,小写字母表示酶切位点存在。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件录入临床资料,计量资料两组间比较用 *t* 检验或 *t'* 检验。基因型和等位基因频率采用基因计数法计算,研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、单个基因型及组间等位基因频率比较采用行 × 列的 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。应用非条件 Logistic 回归分析 ER 基因型与肝硬化的关联,结果以比值比(OR)和 95% 可信区间(confidence interval, CI)来表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ER 基因多态性类型分析

ER 基因型判定参照有关文献^[4],使用 *Pvu* II 酶切可区分出 3 种基因型:PP 型(终产物为 1.3 kb 大小的 1 条带),Pp 型(终产物为 1.3 kb,850 bp,450 bp 大小的 3 条带),pp 型(终产物为 850 bp,450 bp 大小的 2 条带);使用 *Xba* I 酶切也可区分出 3 种基因型:XX 型(1.3 kb),Xx 型(1.3 kb,910 bp,390 bp),xx 型(910 bp,390 bp)(图 1)。

2.2 ER 基因多态性在各组中分布的比较

用直接计数法计算出各组基因型及等位基因的检出频率,然后进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,各组的观察数与预期数比较,差异无统计学意义,即均已达到遗传平衡,具有群体代表性。

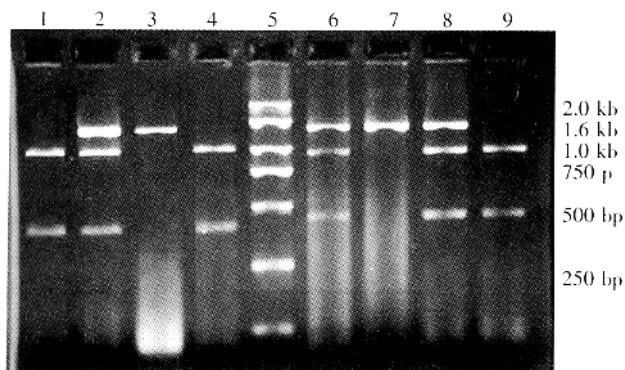


图1 ER基因 Pvu II Xba I 酶切电泳图 1 4 :xx 基因型 2 :Xx 基因型 3 :XX 基因型 6 8 :Pp 基因型 7 :PP 基因型 9 :pp 基因型 ; 5 :Marker

Fig. 1 The electrophoretic figure of the ER gene cut by Pvu II Xba I 1 , 4 xx genotype ; 2 :Xx genotype ; 3 :XX genotype ; 6 8 :Pp genotype ; 7 :PP genotype ; 9 :pp genotype ; 5 :Marker

2. 2. 1 ER 基因 Pvu II 多态性对肝硬化的影响

肝硬化组的 Pp 基因型和 P 等位基因的频率明显高于慢性乙型肝炎组和健康对照组(均 P < 0.05) ; 而 ER 基因的 Pvu II 多态性在慢性乙型肝炎组和健康对照组两组之间的分布无显著性差异(P >

0.05) , 两组均以 pp 基因型和 p 等位基因最多(表 1)。

2. 2. 2 ER 基因 Xba I 多态性对肝硬化的影响

ER 基因 Xba I 多态性在 3 组中的分布均无统计学意义 , 3 组中都以 xx 基因型和 x 等位基因的分布频率最高(表 2)。

2. 3 一般资料分析和相对危险度估计

肝硬化组患者的年龄明显高于健康对照组和慢性乙型肝炎组 , 且肝硬化组的男女性别比也高于健康对照组 , 分别是 5.53 : 1 和 2 : 1 , 差异有统计学意义。本实验中年龄和性别等主要混杂因素的分布具有差异性 , 因此采用非条件性 Logistic 回归分析将混杂因素进行调整 , 排除性别、年龄混杂因素对统计分析结果的干扰。调整前 PP + Pp 基因型发展成肝硬化的相对危险度(OR)是 pp 基因型的 1.60 倍(95% CI : 1.02 ~ 2.55) , 调整后 PP + Pp 基因型致肝硬化的危险性显著增加(OR = 2.23 , 95% CI : 1.07 ~ 4.67) 。经 Logistic 回归分析调整混杂因素后 , Xba I 多态性与肝硬化仍无显著性相关。

表 1 各组中 ER 基因 Pvu II 多态性基因型分布

组别	n	基因型			等位基因	
		PP	Pp	pp	P	p
健康对照组	84	9(10.71%)	31(36.90%)	44(52.38%)	49(29.17%)	119(70.83%)
慢性乙型肝炎组	72	8(11.11%)	28(38.89%)	36(50.00%)	44(30.56%)	100(69.44%)
乙型肝炎肝硬化组	98	13(13.27%)	55(56.12%) ^{△*}	30(30.61%) ^{△*}	81(41.33%) ^{△*}	115(58.67%) ^{△*}

与健康对照组比较 ,[△] P < 0.05 ; 与慢性乙型肝炎组比较 , * P < 0.05

表 2 各组中 ER 基因 Xba I 多态性基因型分布

组别	n	基因型			等位基因	
		XX	Xx	xx	X	x
健康对照组	84	3(3.57%)	27(32.14%)	54(64.29%)	33(19.64%)	135(80.36%)
慢性乙型肝炎组	72	4(5.56%)	23(31.94%)	45(62.50%)	31(21.53%)	113(78.47%)
乙型肝炎肝硬化组	98	5(5.10%)	45(45.92%)	48(48.98%)	55(28.06%)	141(71.94%)

3 讨 论

ER 基因的 1 号内含子位于转录激活功能域内 , 具有该基因的增强子和启动子等与基因转录调控密切相关的重要调节序列 , ER 基因 Pvu II 和 Xba I 多态性的发生可能导致了 ER 转录表达水平和功能差异 , 从而直接影响到雌激素的最终生理效应 , 进而对多种疾病的发生、发展和预后产生影响。因此 ER 基因的不同基因型有可能作为遗传背景 , 导致了不同人群对于某些疾病的易感性和临床特征的不同。初步的研究结果表明 : ER 基因

的 Pvu II 和 Xba I 多态性与多种疾病相关^[8] , 而且在不同种族间的分布存在差异 , 但在同地区的男性、女性间无明显差异^[9-11]。

临床和流行病学调查显示 , 男性和年龄是肝纤维化进展的独立危险因素 , 肝硬化患者中以男性和年老者多见。本实验也发现 , 肝硬化组中患者的年龄明显高于健康对照组和慢性乙型肝炎组 , 且肝硬化组中的男性患者明显多于女性 , 肝硬化组的性别比与健康对照组相比差异有统计学意义。Pvu II 多态位与肝硬化明显相关 , Pp 基因型和 P 等位基因在肝硬化的分布则明显高于其它两

组,提示 P_p 基因型可能是肝硬化的遗传易感基因型, P 等位基因可能是易感基因, pp 基因型可能是肝硬化的保护基因型, p 等位基因可能是保护基因。而 ER 的 Xba I 多态位与肝硬化无相关性,表明 ER 基因 Xba I 多态性可能对 ER 功能或者表达影响很小,需要足够大的样本才能显示出差异;或者是 ER 基因 Xba I 多态性不影响 ER 功能或者表达,从而不导致雌激素的生理学效应发生改变。慢性肝病雌激素水平发生改变,通常以雌酮和雌三醇升高为主,而雌二醇的变化差异比较大,而且雌激素水平的变化与乳腺增生、肝掌、蜘蛛痣无相关性^[12]。进一步说明雌激素的多态性影响雌激素的代谢。

国内外研究表明,我国和日本同属亚洲人种,基因多态性具有一致性^[13]。Kitawaki 等^[6]研究发现携带 PP 基因型的妇女子宫内膜异位症,子宫内膜癌的发病率较低;在一些 ER 基因与骨质疏松相关性研究^[4,14]中也发现, PP 和 P_p 基因型人群的骨密度明显低于 pp 基因型,本实验结果与以上结果一致,由此推测携带 P 等位基因所编码的 ER 表达或者功能减弱,从而使其对雌激素的反应降低,使得雌激素的生理学效应减弱,最终导致了某些雌激素相关疾病的发生。具体到本实验中则可认为携带 P 等位基因的慢性乙型肝炎患者易发展为肝硬化,可能是因为其编码的 ER 表达或者功能降低,减弱了由 ER 介导的雌激素的抗肝纤维化作用。

研究表明肝纤维化和动脉粥样硬化病因学千差万别,而发病机制却有本质上的相同之处^[15]:男性是肝纤维化和动脉粥样硬化发展的独立危险因素,在肝纤维化中扮演重要角色的肝星状细胞与动脉血管平滑肌细胞同属外膜细胞,具有相同的细胞学特征。因此,人们认为在动脉粥样硬化发生过程中发挥作用的因子,也许能以相似的机制作用于肝纤维化过程^[15]。吴赛珠等^[16]在对我国汉族人群中的 ER 分布及冠心病相关性研究中也发现 ER 的 P 等位基因是冠心病的易感基因。本实验结果进一步说明 Pvu II 基因多态性可能是肝硬化发病的危险因素之一。但是由于目前国内外对 ER 基因多态性与疾病的关系的研究结果存在相互矛盾的现象,所以对 ER 基因多态性与肝硬化的相关性仍需进行大样本、多地域、多民族广泛深入的协同研究,以及对乙型肝炎肝硬化患者的家系进行系统的分析,方能得出更为可靠的结论。

参考文献:

- [1] Wasmuth HE, Lammert F, Matern S. Genetic risk factors for hepatic fibrosis in chronic liver diseases[J]. *Med Klin (Munich)*, 2003, 98(12):754-762.
- [2] Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, et al. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats[J]. *Hepatology*, 1999, 29(3):719-727.
- [3] Shimizu I, Mizobuchi Y, Yasuda M, et al. Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells in vivo and in vitro[J]. *Gut*, 1999, 44(2):127-136.
- [4] Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, et al. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease[J]. *JAMA*, 2003, 290(17):2263-2270.
- [5] Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, et al. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(1):51-55.
- [6] Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene[J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(3):306-311.
- [7] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6):324-329.
- [8] Matsubara Y, Murata M, Kawano K, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(11):3006-3012.
- [9] 黄宪章. 雌激素受体基因多态性的研究进展[J]. *国外医学·临床生物化学与检验学分册*, 2000, 21(5):254-255.
- [10] 刘浩, 刘志红, 陈朝红, 等. 雌激素受体基因多态性与狼疮性肾炎临床病理的关系[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2000, 17(4):266-269.
- [11] 刘浩, 刘志红, 陈朝红, 等. 雌激素受体基因多态性在中国汉族人群中的分布特点[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 1999, 8(2):105-109.
- [12] Johnson PI. Sex hormones and the liver[J]. *Clin Sci*, 1984, 66(4):369-376.
- [13] 戚潜辉, 何凤仪, 宋绿茵, 等. 广东汉族人雌激素受体基因多态性研究[J]. *广州医药*, 2003, 34(4):3-5.
- [14] 黄琪仁, 王钦红, 张良平, 等. 绝经后健康妇女雌激素受体基因多态性与骨密度关系的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(2):38-41.
- [15] Shimizu I. Impact of oestrogens on the progression of liver disease[J]. *Liver Int*, 2003, 23(1):63-69.
- [16] 黄宪章, 张平安, 李艳, 等. 雌激素受体基因多态性与冠心病关系的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2002, 30(2):78-81.