

慢性丙型肝炎男性患者体内雌雄激素 与抗黏病毒基因表达的关系*

邓 刚, 张平安 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

摘要:目的 探讨血清雌雄激素与慢性丙型肝炎(CHC)患者外周血单个核细胞(PBMC)中抗黏病毒基因 A(MxA)mRNA 表达和肝功能的关系。方法 选择慢性丙型肝炎男性患者 51 例, 健康人群 49 例。采用酶法检测肝功能指标; 采用化学发光检测雌雄激素; 用实时荧光定量 PCR 检测 MxA 基因 mRNA 表达。结果 CHC 患者血清睾酮、雌二醇、ALT、AST 和 MxA 基因 mRNA 表达量与健康人群比较, 差异均有统计学意义($t = -4.69, 11.34, 7.79, 7.87, 4.28; P < 0.05$)。对 CHC 患者 MxA 基因表达量与血清中雌雄激素、肝功能进行相关性分析, 结果发现 MxA 基因表达量仅与雌二醇呈反比($r = -0.479, P < 0.05$)。结论 HCV 患者雌雄激素发生紊乱并且雌激素与 MxA 基因表达呈负相关。

关键词:慢性丙型肝炎; 抗黏病毒基因 A; 雌雄激素; 肝功能; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R512.63; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)05-053-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.016

Role of Estrogen and Androgen on Gene Expression of Myxovirus Resistance A in Male Patients with Chronic Hepatitis C

DENG Gang, ZHANG Ping-an

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of Estrogen and Androgen on gene expression of myxovirus resistance A of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), liver function in patients with chronic hepatitis C (CHC) infection. **Methods** Peripheral blood was collected from 51 male patients with chronic hepatitis C infection, 49 healthy individuals. Liver function was detected using enzymatic. Estrogen and Androgen were detected by Chemiluminescence. The expression of MxA mRNA was detected by real-time quantitative PCR. **Results** Serum estrogen, androgen, ALT, AST and expression of MxA mRNA were significant difference between CHC patients and healthy people ($t = -4.69, 11.34, 7.79, 7.87, 4.28; P < 0.05$). Correlation analysis of MxA gene expression with serum estrogen and androgen, liver function in CHC patients was found that the expression of MxA mRNA was only negative correlation with estrogen ($r = -0.479; P < 0.05$). **Conclusion** Serum estrogen and androgen were disorder and MxA gene expression was negative correlation with estrogen in CHC patients.

Keywords: chronic hepatitis; myxovirus resistance A; estrogen and androgen; liver function; real-time quantitative PCR

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 归属黄病毒科, 单链正链 RNA 的病毒, 宿主仅局限在人类和黑猩猩, 可引起人类丙型病毒性肝炎。据世界卫生组织统计, 全球 HCV 的感染率约为 3%^[1], 其中男性感染率高于女性, 并且男性丙型肝炎患者相对于女性患者更容易发展为肝纤维化、肝硬化和肝癌^[2], 这可能与男性体内较高雌雄激素有关。

抗黏病毒 A (myxovirus resistance A, MxA) 基因属于干扰素诱导基因 (interferon stimulated gene, ISG), 其表达的蛋白质具有抗病毒效应。Mekky 等^[3]人研究发现, 绝经前女性 MxA 基因表达量较高, 而绝经后女性 MxA 基因表达量较低。这可能暗示性激素对 MxA 基因表达量具有一定影响。目前关于男性体内雌雄激素与 MxA 基因表达之间关系的研究较少。本文通过检测男性血清雌雄激素和 MxA 基因表达量, 分析雌雄激素水

平对 MxA 基因表达的影响, 为临床治疗提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2013 年 3 月~2014 年 8 月在武汉大学人民医院感染科门诊就诊及住院的未治疗慢性丙型肝炎 (chronic hepatitis C, CHC) 男性患者 51 例, 年龄 23~52 岁, 平均年龄 (37±6) 岁, 诊断符合《丙型肝炎防治指南》^[4], 并排除自身免疫系统疾病, 其他系统严重疾病及感染性疾病, 本实验 CHC 患者血清 HCV RNA 中位数是 3.52×10^5 copy/ml。对照组为同期来我院进行体检的健康人群共 49 名, 年龄 21~57 岁, 平均年龄 (35±9) 岁。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 淋巴细胞分离液由天津美德太平洋科技有限公司提供, Trizol 和 SYBR Premix Ex Taq II 由 TaKaRa 公司提供, 反转录试

* 作者简介: 邓 刚 (1981-), 男, 在读研究生, 研究方向: 感染性疾病的免疫遗传学检验, Tel: 15072218855, E-mail: 93541637@qq.com。

通讯作者: 张平安, E-mail: zhangpingan@aliyun.com。

试剂盒由 Thermo SCIENTIFIC 公司提供。PCR 分析仪由 Applied Biosystem Inc 公司生产; VII7 荧光定量分析仪由 ABI 公司生产; 全自动生化分析仪由 SIEMENS 公司生产。

1.3 研究方法

表 1

MxA 和 GAPDH 的上下游引物及产物长度

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	大小(bp)
MxA(NM_005962.4)	GCGCCTTTGTTTGAACGCTT	GTCAGTGATGCTGGTGGTACT	355
GAPDH(NM_002046.5)	AACGGATTGGTCGTATTGG	AGATGATGACCCTTTTGGCT	340

1.3.2 mRNA 提取和逆转录: 采集所有研究对象空腹静脉血 2 ml 于 EDTA 抗凝的采血管中, 按照淋巴细胞分裂液说明书(天津美德太平洋科技有限公司)提取单个核细胞。Trizol 法提取总 mRNA。取 11 μ l RNA 模板进行逆转录, 加入 1 μ l oligo 引物混匀并瞬时离心, 65 $^{\circ}$ C 5 min, 反应体系: 4 μ l Reaction Buffer, 2 μ l Mix, 1 μ l RI, 1 μ l RT。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 60 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。得到的 cDNA 产物放置在 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测: 反应体系为 cDNA 1 μ l, 上下游引物各 1 μ l, SYBR Premix Ex Taq II 10 μ l, ROX II 0.4 μ l, ddH₂O 7.6 μ l, 总体积为 20 μ l。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s 预变性, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 50 个循环, 溶解曲线条件: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。扩增效率验证: 本实验对 MxA 和 GAPDH 基因进行了 10 倍稀释, 稀释 5 个梯度, 目的基因和内参基因扩增效率相差 $\leq 5\%$, 且在 98%~102% 之间, 可以认为扩增效率近似相等^[5]。

1.3.4 HCV-RNA 含量的测定: 据试剂盒的操作说明, 采用荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA。HCV-RNA 最低检测限为 1×10^3 copy/ml。

1.3.5 雌雄激素和肝功能指标检测: 采用化学发光法检测血清中雌激素和雄激素水平, 由 Siemens CENTUAR XP 全自动生化分析仪测定。采用酶法检测血清中 ALT 和 AST 水平, 由 Siemens ADVIA 2400 全自动生化分析仪及配套试剂测定。

1.4 统计学分析 用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析, 正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组均数间比较采用 t 检验。采用 Pearson 进行相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHC 患者和健康组外周血 MxA 基因表达量和血清中雌雄激素、肝功能的比较 见表 1。CHC 患者 MxA 基因 mRNA 表达量与健康人群比较, 差异有统计学意义($t = 4.28, P < 0.05$); CHC 患者 ALT 和 AST 与健康人群比较, 差异均

1.3.1 引物设计: 利用美国国立生物技术信息中心(national center of biotechnology information, NCBI)网站中提供的 MxA mRNA 序列和 BLAST 进行引物设计, 见表 1。所有引物均由上海维基生物科技有限公司合成。

有统计学意义($t = 7.79, 7.87; P < 0.05$); CHC 患者睾酮和雌二醇与健康人群比较, 差异均有统计学意义($t = -4.69, 11.34; P < 0.05$)。

表 2 CHC 患者和健康组外周血 MxA 基因

表达量和血清中雌雄激素、肝功能的比较

指标	CHC 组	健康组	t	P
睾酮(ng/dl)	37.91 \pm 12.79	52.36 \pm 17.75	-4.69	0.000 1
雌二醇(pg/ml)	53.99 \pm 16.68	23.35 \pm 9.07	11.34	0.000 1
ALT(U/L)	62.86 \pm 37.51	19.92 \pm 9.19	7.79	0.000 1
AST(U/L)	56.69 \pm 30.76	21.61 \pm 5.41	7.87	0.000 1
MxA 基因表达	5.37 \pm 1.05	4.63 \pm 0.65	4.28	0.000 1

注: CHC: 表示慢性丙型肝炎患者; ALT: 表示丙氨酸氨基转移酶; AST: 天门冬氨酸氨基转移酶。

2.2 CHC 患者外周血 MxA 基因表达量与血清中雌雄激素、肝功能相关性分析 对 CHC 患者 MxA 基因表达量与血清中雌雄激素、肝功能进行相关性分析, 结果发现 MxA 基因表达量与雌二醇呈反比($r = -0.479, P < 0.05$), 而与睾酮、ALT 和 AST 无相关性($r = 0.236, 0.125, 0.218; P > 0.05$)。

2.3 CHC 患者外周血 MxA 基因表达量与血清中雌雄激素、肝功能回归分析 对 CHC 患者 MxA 基因表达量与血清中雌雄激素、肝功能进行回归分析, 结果发现雌二醇是影响 MxA 基因表达量的一个因素($\beta = -0.027, P < 0.05$), 而睾酮、ALT 和 AST 不影响 MxA 基因表达量($\beta = 0.014, 0.003, 0.004; P > 0.05$)。

3 讨论 人 Mx 基因位于第 21 号染色体长臂上, 经 I-型干扰素诱导产生 MxA 和 MxB 蛋白^[6]。MxB 蛋白目前未发现有抗病毒活性, 而 MxA 蛋白具有广谱的抗病毒效应。MxA 蛋白只有在与病毒的核糖核蛋白体中的核衣壳紧密结合后才能使 MxA 的结构发生活化, 活化的 MxA 发挥对病毒核衣壳的水解作用以阻止病毒对细胞的吸附与穿入, 从而阻止病毒基因组在核内的复制^[7], 释放出来的 RNA 核酸很快被胞浆中的核酸内切酶降解。也有研究表明 dsRNA 也可作为 MxA 基因表达的诱导剂。少量的病毒即可诱导 Mx 蛋白的表达, 而

细菌、寄生虫及其它微生物感染细胞并不能诱导表达 Mx 蛋白,因此,细胞中 Mx 蛋白表达水平的高低可以作为病毒感染的一个标志,用来与细菌等其它微生物的感染做鉴别诊断^[8]。

研究表明^[9,10],女性体内拥有强大的体液免疫和细胞免疫应答,性别差异在病毒感染中起重要作用。性激素已经被证明在病毒感染的免疫应答中发挥关键的作用,比如 Fawzy 等^[8]人研究发现,他莫昔芬(Tamoxifen)作为雌激素受体激动剂,具有抑制 MxA 基因表达量的效应。本实验研究发现,CHC 患者 MxA 基因表达量、血清睾酮较健康人群低,但是肝功能和血清雌二醇水平较健康人高。更重要的是,血清雌二醇与 MxA 基因表达量呈反比。这可能是因为雌二醇具有抑制 STAT1 蛋白的磷酸化,导致 STAT1 蛋白的活性降低,从而使 JAK-STAT 信号通路下游信号的传递减弱,导致了 MxA 基因的表达降低^[11]。Lasarte 等^[12]人研究发现,雌二醇能够下调核转录因子 κ b(NF- κ b)的转录从而抑制浆样树突细胞(pDCs)的成熟。目前发现,pDCs 是 I 型干扰素的主要分泌者^[13],I 型干扰素可激活下游干扰素诱导基因 MxA 的表达^[14],这有利于 HCV 的清除。而受到抑制的 pDCs 停留在未成熟阶段,可导致 I 型干扰素分泌降低,从而使机体的抗病毒能力下降以至于处于持续感染阶段。目前有关雌二醇与 MxA 基因表达的具体机制仍然不是很清楚,这需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection[J]. Liver Int, 2011, 31(suppl 2):1-3.
- [2] Baden R, Rockstroh JK, Buti M. Natural history and management of hepatitis C: does sex play a role? [J]. J Infect Dis, 2014, 209(suppl 3):S81-85.
- [3] Mekky RY, Hamdi N, El-Akel W, et al. Estrogen-related MxA transcriptional variation in hepatitis C virus-infected patients[J]. Transl Res, 2012, 159(3):190-196.
- [4] 中华医学会肝病学会,中华医学会传染病与寄生虫病学会.丙型肝炎防治指南[J].中华传染病杂志, 2004, 22(2):131-136.
- [5] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9):e45.
- [6] Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity[J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(1):79-87.
- [7] Shaker O, Ahmed A, Doss W, et al. MxA expression as marker for assessing the therapeutic response in HCV genotype 4 Egyptian patients[J]. J Viral Hepat, 2010, 17(11):794-799.
- [8] Fawzy IO, Negm M, Ahmed R, et al. Tamoxifen downregulates MxA expression by suppressing TLR7 expression in PBMCs of males infected with HCV [J]. J Med Virol, 2014, 86(7):1113-1119.
- [9] Klein SL. Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and treatments for viral diseases[J]. Bioessays, 2012, 34(12):1050-1059.
- [10] Howie SE. Go girls! Efficient female innate immunity[J]. Blood, 2011, 118(22):5718-5719.
- [11] Fawzy IO, Negm M, Ahmed R, et al. Tamoxifen alleviates hepatitis C virus-induced inhibition of both toll-like receptor 7 and JAK-STAT signalling pathways in PBMCs of infected Egyptian females[J]. J Viral Hepat, 2012, 19(12):854-861.
- [12] Lasarte S, Elsner D, Sanchez-Elsner T, et al. Estradiol downregulates NF- κ b translocation by Ikbkg transcriptional repression in dendritic cells [J]. Genes Immun, 2013, 14(7):462-469.
- [13] Hagberg N, Berggren O, Leonard D, et al. IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 β and LFA-1[J]. J Immunol, 2011, 186(9):5085-5094.
- [14] Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways[J]. Front Immunol, 2014(5):461.

收稿日期:2015-03-15

修回日期:2015-05-21

(上接 52 页)

- Jiao LY, Guo QH, Lu GJ. The application of combination detection of serum CA199, CA125, CEA and AFP in diagnosis of ovarian cancer[J]. Modern Preventive Medicine, 2012, 39(21):5636-5637.
- [8] 周萍. 卵巢肿瘤患者中 5 种肿瘤标志物检测的临床意义[J]. 中国现代医生, 2012, 50(5):80-81.
- Zhou P. Detection and its clinical significance of five kinds of tumor markers in ovarian cancer[J]. China Modern Doctor, 2012, 50(5):80-81.
- [9] 邓雪红, 叶小清, 徐迎春, 等. 血清 CA125, CEA 与卵巢癌的相关性分析[J]. 中国当代医药, 2012, 19(14):92-93.
- Deng XH, Ye XQ, Xu YC, et al. Serum correlation analysis about CA125 and CEA with ovarian cancer [J]. China Modern Medicine, 2012, 19(14):92-93.

- [10] 王珂, 汪丽, 程苏晶, 等. 血清 CA125 和 CA199 检测对卵巢癌诊断应用价值的探讨[J]. 中国实验诊断学 2014, 18(4):574-576.
- Wang K, Wang L, Cheng SJ, et al. Diagnostic value of combined detection of serum CA125 and CA199 for ovarian cancer[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2014, 18(4):574-576.
- [11] 闫先侠, 孙晓, 张华, 等. 血清人附睾蛋白 4 联合 CA125 检测在卵巢癌诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志 2015, 30(1):134-136.
- Yan XX, Sun X, Zhang H, et al. Serum human epididymis protein 4 combined CA125 detection in the diagnosis of ovarian cancer [J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(1):134-136.

收稿日期:2015-05-12

修回日期:2015-08-18