

扬州地区腹泻型肠易激综合征与HTR3A、HTR3E基因多态性关联研究

张瑜 黄瑶 卜平

【摘要】目的 探讨扬州地区门诊腹泻型肠易激综合征(D-IBS)与5-羟色胺受体3的亚型HTR3A、HTR3E基因非翻译区多态性的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)对450例D-IBS患者与300例健康对照者HTR3A基因5'端非翻译区c.-42C>T(rs1062613)和HTR3E基因3'非翻译区c.*76G>A(rs62625044)进行研究。**结果** 男女性患者c.-42C>T多态性位点基因型分布较正常对照的差异有统计学意义($P<0.05$),且T等位基因的频率与正常对照比较均有显著增高($P<0.05$);女性患者c.*76G>A多态性位点G/A基因型和A等位基因的频率较正常对照均显著升高($P<0.05$),男性两组间的差异无统计学意义($P>0.05$);与HTR3A基因的rs1062613位点CC基因型及HTR3E基因的rs62625044位点GG基因型相比,TT基因型及GA基因型与D-IBS密切相关,风险系数分别为0.29(95%CI:0.14~0.61)、0.62(95%CI:0.39~0.99),差异均有统计学意义。**结论** T等位基因和GA基因型可能分别是D-IBS患者和D-IBS女性患者的易感因素之一。

【关键词】 腹泻型肠易激综合征; 基因; 多态性; HTR3A; HTR3E

Association between diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and HTR3A, HTR3E gene polymorphism in Yangzhou, Jiangsu province, China ZHANG Yu¹, HUANG Yao², BO Ping¹.
1 Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2 Yangzhou Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: BO Ping, Email: yizhangyu@yzu.edu.cn

This work was supported by grants from the Graduate Student Innovation Projects in Jiangsu Province (No. CXZZ12_0918) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81173392).

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) and HTR3A, HTR3E gene polymorphism in Yangzhou, Jiangsu province. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique were used to detect the 5' -UTR variant c.-42C>T of HTR3A and 3' -UTR variant c.*76G>A of HTR3E on 300 healthy subjects and 450 patients with D-IBS. **Results** There was significant difference noticed between the D-IBS patients and the controls in the genotype of c.-42C>T sites ($P<0.05$), while the frequency of T allele was significantly higher in both female and male patients than that in the controls ($P<0.05$). The frequencies of G/A genotype and A allele of c.*76G>A sites were significantly higher in the female-patient group than that in the controls ($P<0.05$), however, there was no significant difference between those male patients and controls ($P>0.05$). When comparing to the CC genotype of rs1062613 site and GG genotype of rs62625044 site, the TT and GA genotype were closely related to the D-IBS, with the risk coefficients as 0.29 (95% CI: 0.14-0.61) and 0.62 (95% CI: 0.39-0.99), with statistically significant differences. **Conclusion** T allele and GA genotype might respectively serve as the predisposing factors of D-IBS and on the female D-IBS patients.

【Key words】 Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Gene; Polymorphism; HTR3A; HTR3E

腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant

irritable bowel syndrome, D-IBS)是一种广泛流行的功能性肠病,以女性患者居多^[1]。5-羟色胺(5-HT)作为脑-肠轴联系的关键递质,在肠易激综合征(IBS)的发病中有重要的意义。在5-HT的所有受体中,5-羟色胺受体3(5-HT₃)是其重要媒介,并已被证实在肠道感觉功能中发挥关键作用^[2]。HTR3A

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.07.014

基金项目:江苏省研究生创新工程项目(CXZZ12_0918);国家自然科学基金(81173392)

作者单位:225009 扬州大学医学院(张瑜、卜平);扬州市疾病预防控制中心(黄瑶)

通信作者:卜平, Email: yizhangyu@yzu.edu.cn

作为 5-HT3 亚单位之一在 5-HT3 受体功能的形成中起关键性作用,而 HTR3E 只在胃肠组织中表达^[3,4],表明 HTR3E 受体亚型可能在人胃肠道 5-HT3 受体的形成和功能中起特殊作用。国外有报道 HTR3A 的多态性可能与 IBS 的易感性有关^[5],但仍有争议。笔者研究 D-IBS 患者 HTR3A 基因 5' 端和 HTR3E 基因 3' 端非翻译区的多态性,旨在探寻其在我国人群中 D-IBS 发生和流行的意义。

对象与方法

1. 研究对象:收集 2010 年 4 月至 2012 年 3 月扬州大学医学院附属苏北人民医院、扬州市人民医院等扬州地区 5 家医院门诊病例。共 450 例(女性 294 例,男性 156 例),年龄 18~71 岁。所有患者均常规抽血检测血液生化,HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 检查均为阴性;粪便常规检查及培养和菌群分析未见异常;肠道内镜检查未见异常。健康对照选自上述医院的健康体检者,共 300 例(女性 207 例,男性 93 例)。对照入组条件:①无胃肠道症状和胃肠疾病;②排便习惯正常;③无腹部手术史;④无免疫性疾病、感染病史及近期服用药物史;⑤结肠镜检查肠黏膜无异常;⑥年龄、性别等一般资料与 D-IBS 组相匹配,具有可比性。病例组和对照组在性别、年龄、职业和体型上的差异无统计学意义($P>0.05$)。

2. 诊断标准:IBS 诊断采用文献[6]的标准。诊断前症状出现至少 6 个月,近 3 个月满足以下标准:反复发作的腹痛或不适,最近 3 个月内每个月至少有 3 d 出现症状,且合并以下 2 条或多条:①排便后症状缓解;②发作时伴有排便频率改变(每天>3 次);③发作时伴有大便性状(外观)改变。在病理生理学研究 and 临床试验中,筛选可评估的患者时,疼痛和(或)不适出现的频率至少为每周 2 d。

3. 研究方法:

(1)标本采集及 DNA 提取:所有患者入组当天抽取 2 ml 全血于 15 ml 的离心管(内有 1 ml 2% EDTANa₂ 抗凝剂)中混匀,置于-20℃的冰箱内保存,1 周内提取 DNA。采用 TIANGEN 公司血液基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。

(2)PCR 扩增:引物根据 GenBank 的序列用 DNASTar 软件设计及参考文献^[5],由上海生工生物工程公司合成。HTR3A 上游:5'-CAG CTG TCC CCT CCC CTT TCC T-3',下游:5'-AGA GCG GGC CTG GTG GTG TTT-3',HTR3E 上游:5'-CGT CAT ATG CCT CTG GAA CA-3',下游:5'-ATA GGC

GTG AAC CAC TGC AC-3',引物浓度均配为 5 μmol/L。PCR 反应总体积均为 20 μl,内含有 2×Taq PCR Master Mix 10 μl,ddH₂O 6 μl,引物各 1 μl,取模板 DNA 2 μl。HTR3A 反应条件为 94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,61℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min 进入 4℃。HTR3E 采用降落式 PCR,反应条件为 94℃ 预变性 2 min,(94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 30 s)×5,(94℃ 30 s,64℃ 30 s,72℃ 30 s)×5,(94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s)×25,72℃ 延伸 5 min 进入 4℃。产物检测用 2% 琼脂糖凝胶,80 V 电压电泳 40 min,溴化乙锭染色后,用凝胶成像仪观察照相。目的基因的片段长度为 HTR3A:348 bp,HTR3E:397 bp。

(3)酶切分析多态性:c.-42C>T 位点的酶切体系 20 μl,其中 ddH₂O 15.3 μl,10×NEB 2 μl,100×BSA 0.2 μl,限制性内切酶 Hpy188 III 0.5 μl,PCR 产物 2 μl。c.*76G>A 位点的酶切体系 20 μl,其中 ddH₂O 14.3 μl,10×NEB 2 μl,100×BSA 0.2 μl,限制性内切酶 Hpy188 III 0.5 μl,PCR 产物 3 μl。上述反应体系均于 37℃ 反应 12 h。取 15 μl HTR3A 酶切产物进行检测,2% 琼脂糖凝胶,80 V 电压电泳 50 min,溴化乙锭染色后,用凝胶成像仪观察并保存结果。取 10 μl HTR3E 酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶,70 V 电压电泳 80 min,用凝胶成像仪观察并保存结果。基因检测结果用测序方法验证(以上限制性内切酶购自上海 NEB 公司)。

4. 统计学分析:病例组和对照组人口学资料的分析用 χ^2 检验。采用 χ^2 吻合度检验分析基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg(H-W)定律,基因型和等位基因片段频率以百分比表示,差异显著性比较用 χ^2 检验。所有数据采用 SPSS 11.0 软件处理。

结 果

1. c.-42C>T 多态性分析:HTR3A 的 c.-42C>T 位点经限制性内切酶 Hpy188 III 酶切后电泳可发现 3 种类型的电泳带。C/C 型不存在酶切位点不能被切开,只有一条电泳带 348 bp;T/T 型被酶切后产物为 207 bp 和 141 bp;C/T 型酶切后产物为 348 bp、207 bp 和 141 bp。经测序验证后统计学分析 HTR3A 基因 5' 端非翻译区 c.-42C>T 多态性位点基因型分布和等位基因频率见表 1。从统计结果表明,男女患者与对照组相比,基因分型的差异均有统计学意义($P<0.05$),且 D-IBS 组男女患者 T 等位基因的频率与对照组比较均显著增高($P<0.05$)。

2. c.*76G>A多态性分析:HTR3E经PCR扩增的397 bp的片段被限制性内切酶Hpy188 III酶切后电泳可发现2种类型的电泳带。G/G型其含有G等位基因的397 bp的片段中有14、53和99三个酶切位点,由于酶切后有些片段太小,经过长时间电泳后已泳动至凝胶外,故最终图片中可见一条电泳带298 bp,G/A型其含有A等位基因的目的片段中有14和53两个酶切位点,同样酶切后由于有些片段太小泳动至凝胶外,故最终图片中可见344 bp和298 bp处各有一条带,未见344 bp的一条带的A/A型。经测序验证后统计学分析HTR3E基因3'非翻译区c.*76G>A多态性位点基因型分布和等位基因频率见表2。统计结果表明,D-IBS女性患者G/A基因型较对照组显著升高($P<0.01$),而男性的差异无统计学意义;女性患者A等位基因的频率较对照组显著升高($P<0.05$),男性的差异无统计学意义。

3. H-W平衡分析:应用拟合优度 χ^2 检验,病例组和对照组的基因型频数分布均符合H-W遗传平衡定律($P>0.05$),见表3、4。

4. HTR3A基因rs1062613位点和HTR3E基因rs62625044位点的不同基因型与D-IBS的联系强度分析:通过D-IBS组与对照组比较分析,与HTR3A基因的rs1062613位点CC基因型相比,TT基因型与D-IBS密切相关,与HTR3E基因的rs62625044位点GG基因型相比,GA基因型与D-IBS密切相关。风险系数OR值分别为0.29(95%CI:0.14~0.61)和0.62(95%CI:0.39~0.99),均有统计学意义(表5)。

讨 论

IBS是一种常见的功能性胃肠病。在发达国家

发病率高达10%~15%,而在发展中国家发病率也普遍上升^[7]。该病理机制目前尚不清楚,但普遍认为与脑-肠互动有关。5-HT是脑-肠轴联系的关键递质,人体中约5%存在于脑中,95%的5-HT分布于胃肠道,它在中枢内水平的改变,可导致失眠、焦虑等精神行为异常,在胃肠道可导致腹痛、腹泻等表现。

在5-HT的所有受体中,5-HT₃受体属于配体门控离子通道蛋白,是5-HT的重要媒介,并且已经被证实肠道感觉功能中发挥关键作用^[2]。目前5-HT₃受体分5种亚型(HTR3A、HTR3B、HTR3C、HTR3D、HTR3E),其中HTR3E存在异构体5-HT_{3Ea}^[8]。HTR3A在5-HT₃受体功能的形成起关键性作用,而HTR3E只在胃肠组织中表达,如结肠、小肠和胃^[3,4],而其他的受体亚型表达范围更加广泛,表明HTR3E受体亚型可能在人胃肠道5-HT₃受体的形成和功能中起着特殊的作用。Kapeller等^[5]对英国和德国人群HTR3A和HTR3E非翻译区多态性进行研究,认为遗传基因表型的变化为D-IBS的主要易感因素。但HTR3A在德国人群中的重复研究中未得到验证,仍存在争议。以上两个位点在中国人群中的研究也尚未见报道。

本研究旨在了解中国人群,尤其女性D-IBS患者HTR3A基因5'端非翻译区c.-42C>T和HTR3E基因3'非翻译区c.*76G>A多态性位点基因型分布及等位基因频率的特点。研究提示,D-IBS患者与对照组比较,男女患者HTR3A基因型分布的差异有统计学意义($P<0.05$),这与Kapeller等对英国人群的研究结果部分一致,并且男女患者T等位基因频率与对照组比较均显著升高($P<0.05$)。该结果说

表1 HTR3A基因5'端非翻译区c.-42C>T多态性位点基因型分布和等位基因频率(%)

组别	基因型						等位基因			
	女性			男性			女性		男性	
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C	T	C	T
D-IBS组(n=450)	168(57)	94(32)	32(11)	101(65)	46(29)	9(6)	430(73)	158(27)	248(79)	64(21)
对照组(n=300)	135(65)	63(31)	9(4)	69(74)	24(26)	0(0)	333(80)	81(20)	162(87)	24(13)
χ^2 值	7.743			6.408			7.139		4.638	
P值	0.021			0.041			0.008		0.031	

表2 HTR3E基因3'非翻译区c.*76G>A多态性位点基因型分布和等位基因频率(%)

组别	基因型						等位基因			
	女性			男性			女性		男性	
	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A	G	A	G	A
D-IBS组(n=450)	250(85)	44(15)	0(0)	136(87)	20(13)	0(0)	544(93)	44(7)	292(94)	20(6)
对照组(n=300)	192(93)	15(7)	0(0)	80(86)	13(14)	0(0)	399(96)	15(4)	173(93)	13(7)
χ^2 值	6.967			0.068			6.531		0.063	
P值	0.008			0.794			0.011		0.802	

表 3 HTR3A 基因 rs1062613 位点的 H-W 遗传平衡吻合度检验

组别	等位基因数	观察值			期望值			χ^2 值	P 值
		CC	CT	TT	CC	CT	TT		
D-IBS 组	900	269	140	41	255.150	167.390	27.450	5.630	0.060
对照组	600	204	87	9	204.187	86.625	9.187	0.000	1.000

表 4 HTR3E 基因 rs62625044 位点的 H-W 遗传平衡吻合度检验

组别	等位基因数	观察值			期望值			χ^2 值	P 值
		GG	GA	AA	GG	GA	AA		
D-IBS 组	900	386	64	0	388.37	59.36	2.27	2.980	0.225
对照组	600	272	28	0	272.46	26.87	0.66	1.404	0.495

表 5 不同基因型与 D-IBS 的联系强度分析

分组/基因型	D-IBS 组	对照组	OR 值(95%CI)	χ^2 值	P 值
HTR3A					
CC	269	204	1		
CT	140	87	0.82(0.59 ~ 1.13)	1.46	0.227
TT	41	9	0.29(0.14 ~ 0.61)	11.83	0.001
HTR3E					
GG	386	272	1		
GA	64	28	0.62(0.39 ~ 0.99)	3.99	0.046
AA	0	0			

明 HTR3A 的 5' 端非翻译区等位基因 T 的频率高可能是我国人群易感 D-IBS 的一个因素。有研究证实 HTR3A 的 5' 端非翻译区 c 端 42 位碱基等位基因 T 能够导致 HTR3A 受体密度的增高^[5], 而 HTR3A 受体亚型对于 5-HT3 受体的形成起着至关重要作用(形成功能异聚体的 5-HT3 亚型), 而其他亚型只有与 HTR3A 共表达时才能形成功能性异聚体^[9]。所以 T 等位基因可能会影响各种人体组织中固有的 5-HT3 受体组成和密度。前期研究还发现, T 等位基因与女性双相情感障碍、避免伤害以及杏仁核活动的调节有关^[10-12], 因此 T 等位基因所引起的 HTR3A 亚型的表达增高可能是引起 5-HT3 受体介导的脑功能障碍和肠道相关的血清素信号的原因。所以本文 D-IBS 患者 T 等位基因频率的显著升高可用于解释该患者所表现出的部分临床症状。

本研究还提示, D-IBS 女性患者与对照组比较 c. *76G>A 基因型的分布差异有统计学意义($P < 0.01$), A 等位基因的频率较对照组显著升高($P < 0.05$), 而男性患者与对照组比较, 无论基因分型还是等位基因频率其差异均无统计学意义($P > 0.05$)。这与 Kapeller 等对英国人群的研究结果基本一致, 说明 G/A 基因型可能是女性易感 D-IBS 的一个重要因素。为什么同样是 GA 基因型的男性却不存在这种易感风险, 可能与卵巢激素对内脏敏感性的影响有关^[13], 这是本研究需要进一步研究的内容。与英国人群相比, 我国扬州地区 D-IBS 女性患

者 GA 基因型与 D-IBS 的相关性更加密切。说明我国女性 D-IBS 的发生和流行可能与 HTR3E 的 3' 非翻译区 c. *76G>A 多态性位点等位基因 A 所决定的遗传易感素质密切相关。通过 D-IBS 组与对照组比较分析, 与 HTR3A 基因的 rs1062613 位点 CC 基因型相比, TT 基因型与 D-IBS 密切相关, 与 HTR3E 基因的 rs62625044 位点 GG 基因型相比, GA 基因型与 D-IBS 密切相关(OR 值分别为 0.29 和 0.62, 差异均有统计学意义)。说明我国人群 TT 基因型和 GA 基因型是罹患 D-IBS 的重要遗传因素。

参 考 文 献

- [1] Muller-Lissner SA, Bollani S, Brummer RJ, et al. Epidemiological aspects of irritable bowel syndrome in Europe and North American. *Digestion*, 2001, 64: 200-204.
- [2] Gershon MD. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39: S184-193.
- [3] Niesler B, Frank B, Kapeller J, et al. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT3 serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene*, 2003, 310: 101-111.
- [4] Karnovsky AM, Gotow LF, McKinley DD, et al. A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene*, 2003, 319: 137-148.
- [5] Kapeller J, Houghton LA, Monnikes H, et al. First evidence for an association of a functional variant in the micro RNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(19): 2967-2977.
- [6] Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, 2006, 130: 1480-1491.
- [7] Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, et al. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *Clin Microbiol*, 2007, 45(12): 3883-3890.
- [8] Niesler B, Kapeller J, Hammer C, et al. Serotonin type 3 receptor genes: HTR3A, B, C, D, E. *Pharmacogenomics*, 2008, 9: 501-504.
- [9] Davies PA, Pistis M, Hanna MC, et al. The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature*, 1999, 397: 359-363.
- [10] Niesler B, Flohr T, Nöthen MM, et al. Association between the 5' -UTR variant C178T of the serotonin receptor gene HTR3A and bipolar affective disorder. *Pharmacogenetics*, 2001, 11: 471-475.
- [11] Iidaka T, Ozaki N, Matsumoto A, et al. A variant C178T in the regulatory region of the serotonin receptor gene HTR3A modulates neural activation in the human amygdala. *J Neurosci*, 2005, 25: 6460-6466.
- [12] Melke J, Westberg L, Nilsson S, et al. A polymorphism in the serotonin receptor 3A (HTR3A) gene and its association with harm avoidance in women. *Arch Gen Psychiatry*, 2003, 60: 1017-1023.
- [13] Ouyang A, Wrzos HF. Contribution of gender to pathophysiology and clinical presentation of IBS: should management be different in women? *Am J Gastroenterol*, 2006, 101: S602-609.

(收稿日期: 2013-01-22)

(本文编辑: 张林东)