

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.027

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190614.1326.029.html(2019-06-14)

不明原因复发性自然流产患者 HVEM 基因多态性检测研究*

肖海¹, 娄桂予¹, 张倩¹, 郭谦楠¹, 张照婧², 吴东¹, 张梦汀¹, 高越¹, 廖世秀^{1△}

(1. 河南省人民医院医学遗传研究所, 郑州 450003; 2. 郑州大学基础医学院
医学遗传与细胞生物学系 450003)

[摘要] **目的** 检测河南汉族不明原因复发性自然流产(URSA)患者疱疹病毒侵入介质(HVEM)基因 rs1886730 和 rs2234167 位点的多态性。**方法** 采用一代测序方法检测河南汉族 246 例 URSA 患者(病例组)和 256 例健康人(对照组)HVEM 基因 rs1886730 和 rs2234167 位点的多态性, 并进行基因频率、等位基因频率的比较。**结果** 河南汉族人群中 HVEM 基因 rs2234167 位点多态性与 URSA 无明显相关性($P>0.05$); rs1886730 位点 T 等位基因频率在病例组和对照组间差异有统计学意义($t=14.007, P<0.01$), CT、TT 基因型频率在病例组和对照组间差异有统计学意义($t=14.236, P<0.01; t=14.420, P<0.01$)。**结论** HVEM 基因 rs2234167 位点多态性与河南汉族人群 URSA 无关, rs1886730 位点 T 等位基因、CT 基因型、TT 基因型与河南汉族人群 URSA 有关。

[关键词] 河南; 汉族; 流产, 习惯性; 多态性, 单核苷酸; 疱疹病毒侵入介质

[中图分类号] R714.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2808-03

Detection of HVEM gene polymorphism in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion

XIAO Hai¹, LOU Guiyu¹, ZHANG Qian¹, GUO Qiannan¹, ZHANG Zhaojing²,
WU Dong¹, ZHANG Mengting¹, GAO Yue¹, LIAO Shixiu^{1△}

(1. Medical Genetics Institute, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China;
2. Faculty of Medical Genetics and Cell Biology, School of Basic Medical
Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between HVEM polymorphism at rs1886730 and rs2234167 and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) of Han population in Henan province. **Methods** A total of 246 cases of URSA (URSA group) and 256 healthy subjects (control group) were recruited in the study. The polymorphisms of rs1886730 and rs2234167 of HVEM gene were detected by Sanger Sequencing. **Results** There was no significant correlation between the rs2234167 polymorphism of HVEM gene and URSA in Han population of Henan province ($P>0.05$). T allele frequency on rs1886730 site was significantly different between the URSA group and the control group ($t=14.007, P<0.01$). The frequency of CT and TT genotypes on rs1886730 site was statistically significantly different between the URSA group and the control group ($t=14.236, P<0.01; t=14.420, P<0.01$). **Conclusion** The rs2234167 polymorphism of HVEM gene is not associated with URSA in Han population of Henan province. CT genotype, TT genotype, CT genotype and allele T on rs1886730 site are associated with URSA in Han population of Henan province.

[Key words] Henan; Han nationality; abortion, habitual; polymorphism, single nucleotide; herpes virus entry mediator

妊娠期间的胎儿和母体之间存在着复杂的免疫调节, 母-胎界面调节性 T 细胞(Treg)优势分化, 有利于妊娠的顺利进行。疱疹病毒侵入介质(herpes virus entry mediator, HVEM)基因上的一些单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点会对基因的表达或者功能造成影响, 目前在很多肿瘤的研究中发现 HVEM 基因多态性会影响 Treg 的分化, 进而影响疾病的发生发展^[1]。目前尚无 HVEM 基因多

态性与不明原因复发性自然流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)关系的相关报道。本文通过对河南汉族人群的 HVEM 基因 rs1886730 和 rs2234167 位点进行的研究, 探讨 HVEM 基因多态性与河南汉族人群 URSA 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组为 2017 年 1—12 月在河南省人民医院产前诊断中心就诊的 246 例复发性流产

* 基金项目: 河南省科技攻关计划项目(182102310218, 182102310503); 河南省医学科技攻关计划项目(2018020393)。 作者简介: 肖海(1988—), 实验师, 硕士, 主要从事单基因遗传病的产检诊断。 △ 通信作者, E-mail: xiaohai17@126.com。

女性。入选标准:自然流产大于或等于 3 次,排除感染、血型不合、生殖道畸形、免疫因素、内分泌异常、胚胎染色体异常等致病因素。对照组为 2017 年 1—12 月在河南诚信法医司法鉴定所进行亲子鉴定生育过 1 名及以上正常健康孩子且无复发性流产史的 256 例女性。本研究经河南省人民医院伦理委员会批准。所有研究对象知情同意后分别抽取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血 2 mL。

1.2 方法

1.2.1 rs1886730 和 rs2234167 位点 SNP 检测 采用厦门致善公司的 Lab-Aid 820 核酸提取 Mini 试剂提取样本基因组 DNA,PCR 扩增后利用 Sanger 法测序检测样本基因型。根据参考文献^[1]设计引物,引物序列见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。PCR 反应体系:模版 DNA 1.0 μL 2×PCR, Mix 12.5 μL,上、下游引物各 1.0 μL,去离子水 9.5 μL。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s, 58 °C 30 s,72 °C 60 s,35 个循环;72 °C 总延伸 10 min;4 °C 保存。

1.2.2 基因型判读 扩增产物电泳后,切胶回收,利用 Sanger 测序法进行测序。测序结果与 NCBI 中的野生型序列进行 Blast 比对分析,判断位点基因型。

1.3 统计学处理 应用 SHEsis 软件^[2-3]在线分析数

据,对 HVEM 基因 rs1886730 和 rs2234167 位点基因型分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,采用 χ^2 检验比较 2 组间基因型频率和等位基因频率的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因位点	方向	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
rs1886730	正向	ACAGATCTCTTCCCATGCC	500
	反向	CAGAGGCTCACAAGCCAGAC	
rs2234167	正向	GGTTGAATTAGGGTTAGTTATGCAC	604
	正向	AATGACTGTGGCCTCACCTTCT	

2 结果

通过 Sanger 测序发现 246 例病例组患者和 256 例对照组妇女 HVEM 基因的 rs1886730 位点有 3 种基因型,分别为 CC、CT、TT,rs2234167 位点有 2 种基因型,分别为 GG 和 GA。河南汉族人群中 HVEM 基因 rs2234167 位点多态性与 URSA 无明显相关性 ($P > 0.05$);rs1886730 位点 T 等位基因频率在病例组和对照组间差异有统计学意义 ($t = 14.007, P < 0.01$),CT、TT 基因型频率在病例组和对照组间差异有统计学意义 ($t = 14.236, P < 0.01; t = 14.420, P < 0.01$)。见表 2、3。

表 2 rs1886730 基因型和等位基因在病例组和对照组的分布[n(%)]

基因型/等位基因	对照组(n=256)	病例组(n=246)	t	P	OR(95%CI)
基因型					
CC	88(34.4)	44(17.9)			
CT	136(53.1)	154(62.6)	14.236	<0.01	2.265(1.474~3.478)
TT	32(12.5)	48(19.5)	14.420	<0.01	3.000(1.688~5.333)
等位基因					
C	312(60.9)	242(49.2)			
T	200(39.1)	250(50.8)	14.007	<0.01	1.612(1.254~2.070)

表 3 rs2234167 基因型和等位基因在病例组和对照组的分布[n(%)]

基因型/等位基因	对照组(n=256)	病例组(n=246)	t	P	OR(95%CI)
基因型					
GG	246(96.1)	230(93.5)			
GA	10(3.9)	16(6.5)	1.724	0.189	1.711(0.761~3.848)
AA	—	—			
等位基因					
G	502(98.0)	476(96.7)			
A	10(2.0)	16(3.3)	1.678	0.195	1.687(0.758~3.755)

—:无数据

3 讨论

自然流产是指妊娠在 28 周以前终止、胎儿体重在 1 000 g 以下者,发生率为 15%~20%^[4]。复发性自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续发生 3 次及以上自然流产的,是妊娠常见的并发症之一,发生率约为 1%^[5]。RSA 病因极其复杂,目前已知致病因素有染色体异常、内分泌失调、生殖器官畸形、感染、环境理化等。除上述病因以外,仍

有大约 50% 的 RSA 患者的致病因素不明,临床上称之为 URSA^[6-7]。URSA 会对广大妇女的身体和心理造成巨大的伤害。由于 URSA 致病因素复杂多样,且发病机制尚不明确,虽然目前有很多防治手段如:中西医结合方法、免疫抑制剂、抗凝疗法、主动免疫疗法及被动免疫疗法等,但疗效均不明确。因此,探索 URSA 的发病机制对其防治具有十分重要的意义。

妊娠类似于同种异体移植过程,带父系抗原的胚

胎不被母体免疫系统排斥,是因为胎儿与母体之间存在着复杂的免疫调节过程,通过这种相互作用建立的母-胎免疫耐受微环境保证了妊娠的顺利进行^[8-9]。代孕的胎儿所携带的人类白细胞抗原系统与母体的完全不同,进一步证实了母-胎免疫耐受微环境的存在^[10]。研究表明自然流产模型组 Treg 显著低于正常妊娠组,过继转输 Treg 至流产模型小鼠可改善其妊娠预后,提示 Treg 不但参与了母-胎免疫耐受机制的形成而且对其维持有重要作用。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是一种抗原递呈细胞,DCs 表面可表达 B 和 T 细胞衰减因子(B and T lymphocyte attenuator, BTLA)^[11-12]。DCs 可通过与广泛表达在 T 细胞表面的 HVEM 特异性结合对 T 细胞起到调节作用,达到母-胎界面 Treg 优势分化的状态,从而有助于维持母-胎界面免疫耐受状态。BTLA/HVEM 信号通路在肿瘤的 T 细胞抑制中发挥重要作用^[13]。BTLA⁺DEC205⁺CD8⁺DCs 可以通过 BTLA/HVEM 信号通路诱导 Treg 分化^[14-15]。胚胎作为一种半同种移植植物,能够不被排斥,有赖于母胎间的免疫耐受,特别是母-胎界面免疫微环境的形成和维持,这种耐受一旦被破坏,则导致病理性妊娠。基因多态性可引起蛋白结构和功能的改变,导致 DCs 无法通过 BTLA/HVEM 信号通路诱导 Treg 分化,即不同个体对 URSA 表现出不同的易感性。

有报道称 rs1886730 位点的基因多态性与乳腺癌的易感性相关^[1]。本研究结果显示 rs1886730 位点 CT、TT 基因型在 URSA 组中的分布频率显著高于对照组,且 T 等位基因在 URSA 中的分布频率高于对照组,提示此位点与河南汉族人群 URSA 的发病有关。rs1886730 位于 HVEM 基因内含子区域,内含子区域在转录过程中起重要作用,内含子区域发生基因突变,可能导致剪切位点的改变从而影响 mRNA 的二级结构,影响蛋白的功能。CT、TT 基因型为河南汉族人群 URSA 发病的风险基因型。T 等位基因为河南汉族人群 URSA 发病的风险等位基因。

rs2234167 位于 HVEM 基因的外显子区域,该位点基因突变导致编码的氨基酸由缬氨酸变为异亮氨酸。有报道 rs2234167 位点多态性会影响 HVEM 的功能和表达,进而对乳腺癌的发生发展产生影响^[1]。本研究结果显示病例组中的 GA 基因型频率和 A 等位基因的频率均略高于对照组,但两组数据差异无统计学意义($P>0.05$),并且本研究在河南汉族人群中未检测到 AA 基因型。推测该位点多态性存在种族差异,有必要扩大样本量,进一步确定该位点与 URSA 的关系。

参考文献

[1] DALIN L, ZHENKUN F, SHUANG C, et al. HVEM gene polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese women[J]. PLoS One, 2013, 8(8):

e71040.

- [2] YONG Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. Cell Res, 2005, 15(2):97-98.
- [3] LI Z Q, ZHANG Z, HE Z D, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [J]. Cell Res, 2009, 19(4):519-523.
- [4] ZHUANG X, XIA X, LIU L, et al. Expression of Tim-3 in peripheral blood mononuclear cells and placental tissue in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(38):e12099.
- [5] ZHAO L, LI J, HUANG S. Patients with unexplained recurrent spontaneous abortion show decreased levels of Microrna-146a-5p in the deciduae[J]. Ann Clin Lab Sci, 2018, 48(2):177-182.
- [6] XU G L, HU X F, HAN Y M, et al. Clinical efficacy of low molecular heparin on unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Clin Lab, 2018, 64(6):1037-1040.
- [7] ROOMANDEH N, SAREMI A, ARASTEH J, et al. Comparing serum levels of Th17 and Treg cytokines in women with unexplained recurrent spontaneous abortion and fertile women[J]. Iran J Immunol, 2018, 15(1):59-67.
- [8] OWEN R D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins [J]. Science, 1945, 102(2651):400-401.
- [9] ARCK P C, HECHER K. Fetomaternal immune crosstalk and its consequences for maternal and offspring's health[J]. Nat Med, 2013, 19(5):548-556.
- [10] UTIAN W H, SHEEAN L, GOLDFARB J M, et al. Successful pregnancy after in vitro fertilization and embryo transfer from an infertile woman to a surrogate[J]. N Engl J Med, 1985, 313(21):1351-1352.
- [11] XIN H M, ZHU J H, MIAO H C, et al. Adenovirus-Mediated CCR7 and BTLA overexpression enhances immune tolerance and migration in immature dendritic cells[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017:3519745.
- [12] YE Z, DENG B, WANG C, et al. Decreased B and T lymphocyte attenuator in Behcet's disease May trigger abnormal Th17 and Th1 immune responses[J]. Sci Rep, 2016, 6(6):20401.
- [13] LIU J, LI J, HE M, et al. Distinct changes of BTLA and HVEM expressions in circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells in hepatocellular carcinoma patients[J]. Clin Dev Immunol, 2018, 2018:4561571.
- [14] JONES A, BOURQUE J, KUEHM L, et al. Immunomodulatory functions of BTLA and HVEM govern induction of extrathymic regulatory T cells and tolerance by dendritic cells[J]. Immunity, 2016, 45(5):1066-1077.
- [15] SIMON T, BROMBERG J S. BTLA⁺ dendritic cells: the regulatory T cell force awakens[J]. Immunity, 2016, 45(5):956-958.