

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.043

精神分裂症患者甘露糖结合凝集素基因启动子区多态性及血清浓度的研究*

郭静 韩冰 邱锦云 侯鸾鸾 冯芳波[△]

(中国人民解放军联勤保障部队第九八四医院检验科 北京 100094)

摘要 目的:探讨精神分裂症患者甘露糖结合凝集素(MBL)的血清浓度和启动子区基因多态性的相关性及在患者免疫病理机制中的作用。**方法:**选取2018年6月至2018年12月在我院就诊的精神分裂症患者为54例为观察组,另选取同时期本院健康体检中心志愿者56例为正常对照组,采用合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)技术分析MBL基因启动子区H/L(-550bp G/C)和X/Y(-221bp C/G)的多态性,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清MBL的浓度。**结果:**观察组血清MBL浓度(1367.218±1277.429) ng/mL 低于正常对照组(1987.781±976.748)ng/mL,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组HY/HY基因型频率低于对照组($P<0.05$),HY/LY型频率高于对照组($P<0.05$)。观察组HY/HY基因型血清MBL浓度明显高于HY/LX、LY/LX型($P<0.05$);观察组MBL基因启动子区突变型纯合子的血清MBL水平均与对照组差异无统计学意义($P>0.05$),而MBL基因型杂合子的MBL水平则差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**精神分裂症患者MBL水平低下与患者MBL基因启动子区各基因型的综合调控有关。MBL浓度低下是精神分裂症患者循环免疫复合物(CIC)滞留或清除障碍的分子机制之一。

关键词:精神分裂症;甘露糖结合凝集素;启动子;基因变异;血清浓度

中图分类号:R749.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)07-1393-04

Study on the Polymorphism of Mannose Binding Lectin Gene Promoter Region and Serum Concentration in Schizophrenia*

GUO Jing, HAN Bing, QIU Jin-yun, HOU Luan-luan, FENG Fang-bo[△]

(Department of laboratory, No.984 Hospital of Joint Service Support Force of People's Liberation Army, Beijing, 100094, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship between serum concentration of mannose binding lectin (MBL) and gene polymorphism of promoter region in schizophrenia and its role in immunopathology. **Methods:** From June 2018 to December 2018, 54 schizophrenics in our hospital were selected as the observation group, and 56 volunteers in our health examination center at the same period were selected as the normal control group. The polymorphism of H/L (-550bp G/C) and X/Y (-221bp C/G) promoter regions of MBL gene was analyzed by PCR-SSP, and the concentration of MBL in serum was detected by ELISA. **Results:** The serum MBL concentration in the observation group (1367.218±1277.429) ng/ml was lower than that in the normal control group (1987.781±976.748) ng/mL, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The frequency of HY/HY genotype in the observation group was lower than the control group ($P<0.05$), and the frequency of HY/LY genotype was higher than the control group ($P<0.05$). The serum MBL concentration of HY/HY genotype in the observation group was significantly higher than HY/LX,LY/LX genotype ($P<0.05$). The serum MBL level of homozygous mutant in the promoter region of MBL gene in the observation group was no significant difference from that in the control group ($P>0.05$), but the difference of MBL level of MBL genotype heterozygotes was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The low level of MBL in schizophrenics is related to the comprehensive regulation of each genotype in the promoter region of MBL gene. The low concentration of MBL is one of the molecular mechanisms for the retention or removal of CIC in schizophrenia.

Key words: Schizophrenia; Mannose binding lectin; Promoter; Gene variation; Serum concentration

Chinese Library Classification(CLC): R749.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1393-04

前言

精神分裂症发病机制具有明显的遗传倾向及免疫功能障碍,被认为是以循环免疫复合物(CIC)作为发病机理的一种自

身免疫性疾病^[1]。患者体内大量CIC的存在是导致精神分裂症患者免疫功能异常的直接原因。甘露糖结合凝集素(MBL)是机体天然免疫的关键分子,其血清浓度的缺陷可导致体内的CIC清除障碍^[2-4]。近年来的研究表明MBL的基因突变率很高,是血

* 基金项目:北京市自然科学基金项目(7102104)

作者简介:郭静(1972-),女,本科,主任技师,研究方向:临床免疫检验,E-mail: 13311581225@sina.com

△ 通讯作者:冯芳波(1946-),男,本科,主任技师,研究方向:临床免疫检验,E-mail: 105176797@qq.com

(收稿日期:2019-11-28 接受日期:2019-12-23)

清中 MBL 水平低下的重要原因。MBL 基因启动子区多态性位点 H/L(-550bp G/C)和 X/Y(-221bp C/G)可影响 MBL 基因的转录,降低血清中 MBL 的浓度,MBL 基因启动子的单倍型 LX, LY, HY 分别与血清中低、中、高水平的 MBL 相关^[9]。本研究采用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)技术分析正常对照组及精神分裂症患者 MBL 基因启动子区的多态性分布及频率,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测正常对照组及患者血清中的 MBL 浓度,进一步研究 MBL 基因突变和血清含量的变化在精神分裂症免疫病理机制中的作用。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

选取 2018 年 6 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日在我院就诊的精神分裂症患者为 54 例为观察组,所有患者均符合《国际疾病分类第十版(ICD-10)》的诊断标准,均为汉族,排除心肝肾等脏器疾病、自身免疫性疾病和感染性疾病;年龄 18-50 岁,平均(29.6±9.2)岁,其中男性 44 名,女性 12 名;另选取同时期本院健康体检中心志愿者 56 例为正常对照组,均为汉族,排除感染性、自身免疫性疾病及心肝肾等脏器疾病和精神疾患;年龄 18-50 岁,平均(29.6±9.2)岁,其中男性 44 名,女性 12 名。本研究已经通过我院伦理委员会审查,符合入排标准的入组人均需本人或监护人签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 Taq DNA 聚合酶、Buffer、MgCl₂、dNTP(三磷酸脱氧核苷酸)为 TAKARA 公司产品,引物序列为上海生工生物工程技术有限公司合成;PCR 扩增仪为 MI RsearchPTC-100 Thermal Cycler PCR。

1.2.2 标本采集 取受试者晨间空腹血 3 mL,其中 1 mL EDTA 抗凝血采用低渗溶血法^[9]富集白细胞提取基因组 DNA,另外 2 mL 用于制备配对血清。

1.2.3 DNA 提取 DNA 提取使用北京全式金生物技术有限公司 EasyPure Blood Genomic DNA kit 试剂盒(批号 Lot#K41215),严格按照试剂盒使用说明提取。^① 在白细胞富集的样品中添加 500 μL BB3 和 20 μL prok,旋涡 15 秒至充分混匀,室温孵育 10 分钟。^② 短暂离心后,全部溶液加入离心柱,离心 1 分钟,离心力为 12000×g,弃去流出液。^③ 加入 500 μL 溶液 CB3,12000×g 离心 30 秒,弃流出液。^④ 加入溶液 WB3500 μL 后离心 30 秒,离心力为 12000×g,弃流出液。^⑤ 重复步骤^③ 一次。^⑥ 12000×g 离心 2 分钟,彻底去除残留 WB3。^⑦ 将离心柱置于干净的离心管中,在柱的中央加入 60℃-70℃预热的 EB 液 50-200 μL,室温静置 1 分钟后以 12000×g 离心 1 分钟,洗脱 DNA。放入冰箱 4℃备用。

1.2.4 MBL 基因启动子多态性分析 MBL 基因启动子序列在 -550 位点(H/L)和 -221 位点(X/Y)存在突变,针对启动子的单倍型 HY、LY、LX 分别采用了三种引物序列,即 HY 引物 1:5'-GCTTACCCAGGCAAGCCTGTG-3',引物 2:5'-CTGGAA-GACTATAAACATGCTTTCC-3',LY 引物 1:5'-GCTTAC-CCAGGCAAGCCTGTC-3',引物 2:5'-CTGGAAGACTATAAA-CATGCTTTCC-3';LX 引物 1:5'-GCTTACCCAGGCAAGCCT-GTC-3',引物 2:5'-GGAAGACTAAACATGCTTTCC-3';均采用

SSP-PCR 方法检测每个启动子的等位基因。PCR 反应体积为 50 μL,内含 dNTP 4 μL,10× Buffer 5 μL,MgCl₂ 4 μL,Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,前向导引物 2 μL,后向导引物 2 μL,H₂O 30 μL,样品染色体 DNA 2.5 μL。PCR 循环参数为 95℃,5 分钟。预热变性后,进行 30 个循环:95℃ 30 秒,54℃ 30 秒,72℃ 1 分钟。循环完毕 72℃再延伸 10 分钟。产物经 2%琼脂糖溴化乙锭电泳,在紫外灯下判读结果。

1.2.5 血清 MBL 浓度的测定 用 ELISA 法检测血清 MBL 浓度,由上海江莱实业有限公司提供试剂,操作应严格按照说明书进行。

1.3 统计学分析

使用 SPSS17.0 软件进行数据处理,MBL 基因型用%表示, χ^2 检验统计结果;血清 MBL 浓度用($\bar{x} \pm s$)表示,t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 MBL 浓度测定结果

观察组血清 MBL 浓度(1367.218±1277.429)ng/mL 低于正常对照组(1987.781±976.748)ng/mL,差异有统计学意义($t=2.888, P=0.047$)。

2.2 电泳结果

MBL 启动子单倍型 H/Y, L/Y 和 L/X 的 PCR 扩增产物大小(bp)分别为 373、373 和 370。各基因型(HY/HY, HY/LY, HY/LX, LY/LY, LY/LX, LX/LX)电泳结果见图 1。

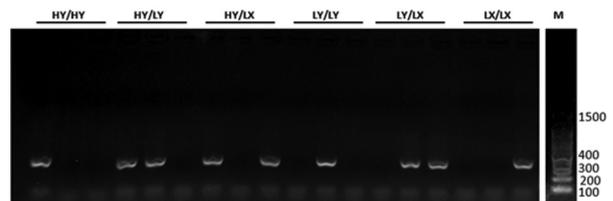


图 1 MBL 基因启动子等位基因型电泳结果

Fig. 1 Results of allele electrophoresis of MBL promoter

2.3 精神分裂症患者 MBL 基因启动子区多态性位点分布频率与对照组比较

观察组 HY/HY 基因型频率低于对照组($P < 0.05$),HY/LY 型频率高于对照组($P < 0.05$),其余各型频率两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 精神分裂症患者 MBL 启动子不同基因型血清 MBL 含量与对照组比较

观察组 HY/HY 基因型血清 MBL 浓度明显高于 HY/LX、LY/LX 型($P < 0.05$);观察组 MBL 基因启动子区突变型纯合子的血清 MBL 水平均与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。而 MBL 基因型杂合子的 MBL 水平则差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。对照组和观察组中不同基因型的血清 MBL 水平低于 1000 ng/mL 者^[7]分别为 4 例和 28 例,两组比较差异有统计学意义($\chi^2=42.157, P=0.000$)。

3 讨论

通常认为,MBL 具有自身的免疫功能,需依靠完整的多聚体结构及足够的血清水平。研究表明,MBL 的血清水平与

MBL 的基因多态性关系密切,且 MBL 基因的突变可影响稳定和具有功能的蛋白多聚体的生成,导致体内 MBL 水平的严重不足^[8]。血清 MBL 水平低下被认为是机体患病的危险因素之一^[8,9],研究表明在红斑狼疮患者^[10]、糖尿病肾病^[11]、肺炎支原体患儿^[12]、肺曲霉菌患者^[13]、ITP 患者^[14]、手足口病患儿^[15]、肿瘤患者^[16-18]、类风湿关节炎患者^[19]、婴儿巨细胞病毒肺炎^[20]、糖尿病患

者体内 MBL 水平均有所降低^[21],而且在其他疾病的治疗前后也有明显的变化^[22],表明 MBI 水平的变化可以用于疾病的诊断以及监测疗效。本研究通过分析比较正常人及患者血清中的 MBL 浓度,进一步研究 MBL 基因突变和血清含量的变化在精神分裂症患者其免疫病理机制中的作用。

表 1 观察组 MBL 基因启动子区多态性位点分布频率与对照组比较(%)

Table 1 The distribution frequency of MBL gene promoter polymorphism in the observation group compared with control group (%)

Groups	Haplotype			Genotype					
	HY	LY	LX	HY/HY	HY/LY	HY/LX	LY/LY	LY/LX	LX/LX
Observation group (n=54)	50.92%	34.26	14.81%	12.96% (7/54)	62.96% (34/54)	12.96% (7/54)	0	5.56% (3/54)	5.56% (3/54)
Control group (n=56)	60.71%	28.57%	10.71%	32.14% (18/56)	46.43% (26/56)	10.71% (6/56)	3.57% (2/56)	3.57% (2/56)	3.57% (2/56)
χ^2	2.029	0.579	0.707	10.351	5.827	0.189	-	0.421	0.421
P	0.213	0.543	0.529	0.002	0.023	0.828	-	0.748	0.748

表 2 观察组 MBL 启动子不同基因型血清 MBL 含量与对照组比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The serum MBL levels of different genotypes of MBL promoter in the observation group compared with control group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Genotype						
	Homozygote			Heterozygote			
	HY/HY	LY/LY	LX/LX	HY/LY	HY/LX	LY/LX	
Observation group (n=54)	Case number (n)	7	0	3	34	7	3
	genotype frequency (%)	12.96	-	5.56	62.96	12.96	5.56
	MBL(ng/mL)	1352.19± 549.8	-	2169.27± 1391.71	1320.496± 1112.302	1016.17± 673.03	660.373± 193.16
Control group (n=56)	Case number (n)	18	2	2	26	6	2
	genotype frequency (%)	32.14	3.57	3.57	46.43	10.71	3.57
	MBL(ng/mL)	1867.63± 1001.12	3174.76± 164.07	2379.64± 1014.14	1907.79± 1025.76	2109.57± 933.96	2119.61± 159.84
T value	1.639	-	0.113	2.118	2.45	8.75	
P value	0.117	-	0.917	0.039	0.032	0.003	

本次研究结果显示,与其他疾病相似,精神分裂症启动子基因型频率虽显示高低各异,但血清 MBL 水平整体呈下降趋势。进一步研究发现,患者 MBL 各基因型纯合子的血清 MBL 水平均与对照组无明显差异,而 MBL 基因型杂合子的血清 MBL 水平则明显低于对照组。提示 MBL 启动区的纯合子基因突变对其血清浓度的影响有限。患者 MBL 水平低下可能与 MBL 基因型的杂合子 HY/LY、HY/LX、LY/LX 频率改变有关。精神分裂症患者这种 MBL 血清水平与调控基因相关性不协调的现象可能是由于 MBL 血清浓度对 MBL 基因启动子区的基因突变依赖程度不同造成的。研究表明,血清 MBL 水平高度依赖的突变结构基因 A 和 B,适度依赖基因 X 和 Y,而基因 H 和 L 的启动子区域对其有轻度影响,P 和 Q 基因则与血清 MBL 水平无关^[23,24]。根据 MBL 的基因型可以大致预测整个人群的 MBL 水平,但不能精确地地预测个体的。同一基因型的不同个体,其 MBL 水平的差异可以高达 10 倍^[25]。相同的基因型也可

以产生不同的表型^[26],因为环境因素和多个基因都会对复杂性状和对疾病的易感性产生影响。精神分裂症是一种中枢神经系统功能紊乱性疾病,由于多基因遗传,多因素诱发,以及患者致病因素的多样性决定了其临床表型的复杂性,患者低浓度 MBL 水平可能是诱发患者免疫功能异常的始动因素。研究结果提示,精神分裂症患者血清低水平的 MBL 与 MBL 基因启动子区基因突变有一定的相关性,也可能与其它基因位点的变异如 MBL 结构基因外显子 I 区 52、54、57 位密码子位点变异有关^[27],或是因为受其他机制的影响,患者 MBL 产生不足或过度消耗造成的。相关研究工作正在进行中。近年来也有文献报道,精神分裂症患者其免疫病理机制与 IgG 糖链结构异常有关^[28-30],患者血清 IgG 的 N 糖链末端半乳糖(GaI)缺失后(该糖链称为 IgG-Go)可成为一种自身抗原,IgG-Go 被免疫系统识别而产生自身抗体。自身抗原、抗体可形成免疫复合物参与患者的病理进程。而 MBL 可特异的识别外周缺失 GaI 的糖链而与 IgG 的

FC 段结合,并激活补体系统进入 CIC 清除程序。患者低浓度的 MBL 造成 CIC 清除能力不足致使患者血循环中的 CIC 滞留,亦可增加 MBL 的消耗、损伤其功能,激活补体和调理能力减弱,而加重患者的免疫病理损伤过程。

综上所述,本项研究初步证实精神分裂症患者 MBL 血清浓度降低与 MBL 启动子区基因多态性的关联及参与了患者的免疫病理机制,提示 MBL 是患者体内 CIC 滞留或清除障碍的分子机制之一。MBL 可能是精神分裂症患者免疫功能异常的潜在风险因子,又受多种相关因素影响而因不同个体而异,其确切机制尚需加大样本量,密切结合临床多因素深入研究。

参考文献(References)

- [1] 刘海军,谢祖勤,郭霞,等.贵州部分地区精神分裂症患者血清 PBMC 博尔纳病毒 CIC 及抗体的检测[J].贵州医药,2015,(3): 203-206
- [2] 程少文,陈扬平,张安强,等.MBL2 与 MASPs 家族蛋白质相互作用的生物信息学分析[J].海南医学院学报,2019,25(15): 1121-1124, 1129
- [3] Hwang HJ, Han JW, Jeon H, et al. Characterization of a Novel Mannose-Binding Lectin with Antiviral Activities from Red Alga, *Grateloupia chiangii*[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2). pii:E333
- [4] Kieninger-Gräfitzsch A, Vogt S, Ribl C, et al. No association of complement mannose-binding lectin deficiency with cardiovascular disease in patients with Systemic Lupus Erythematosus [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3693
- [5] 郭静,韩冰,冯芳波,等.精神分裂症免疫球蛋白 N-糖链半乳糖基化水平及临床意义[J].中华检验医学杂志,2017,40(11): 876-879
- [6] 赵领军.EDTA 抗凝血样对凝聚胺交叉配血结果的影响[J].河北医药,2010,32(9): 1155-1156
- [7] Albert RK, Connett J, Curtis JL, et al. Mannose-binding lectin deficiency and acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2012, 7(7): 767-777
- [8] 朱朝阳,董青,董言斌,等.MBL 启动子区 -221 位点的多态性和血清 MBL、白细胞介素 17 水平与儿童支气管哮喘的相关性研究[J].检验医学与临床,2018,15(16): 2401-2404
- [9] 杨春娥,冯喜英.甘露聚糖结合凝集素基因多态性与疾病关系的研究进展[J].山东医药,2016,56(2): 99-101
- [10] 刘林林.甘露聚糖结合凝集素在 IgA 肾病中作用及其分子机制的初步研究[D].辽宁:中国医科大学,2013
- [11] 张亚芬,陈婧,陈钰,等.血清甘露聚糖结合凝集素在糖尿病肾病早期诊断中的价值[J].疑难病杂志,2017,16(10): 997-1000
- [12] 李明勇,庞福珍,陈中件,等.肺炎支原体肺炎患儿血清 MBL 和唾液酸水平的变化研究[J].浙江医学,2016,38(11): 852-853, 856
- [13] 杨燕,滕隔玲,吴艳华,等.探讨肺曲霉病患者甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 及 T 细胞亚群的变化 [J]. 中国真菌学杂志,2017,12(6): 328-331, 336
- [14] 张兴利,吴鹏飞,孔荣,等.激素治疗前后 ITP 患者血清 CXCL10 与 MBL 表达水平的变化研究[J].重庆医学,2015,(32): 4568-4569
- [15] 陈洁,周爱华,陈晓晴,等.手足口病患儿甘露聚糖结合凝集素基因多态性与其蛋白水平的研究 [J]. 中华医院感染学杂志,2015,(11): 2405-2407
- [16] 李捷,朱玲燕,左大明,等.肝细胞肝癌患者血浆中甘露聚糖结合凝集素和甘露聚糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶-2 的表达水平[J].南方医科大学学报,2017,37(12): 1667-1672
- [17] Epskamp C, Goudzwaard JA, Fiets E, et al. Mannose binding lectin and prediction of risk for chemotherapy induced febrile neutropenia in patients with a solid tumor[J]. *Cancer Invest*, 2019, 37(3): 156-162
- [18] Maestri CA, Nishihara R, Ramos GP, et al. Mannose-Binding Lectin Does Not Act as a Biomarker for the Progression of Preinvasive Lesions of Invasive Cervical Cancer [J]. *Med Princ Pract*, 2017, 26(6): 530-534
- [19] 陈思,马宝良,曹明强,等.类风湿关节炎患者血清 MBL、MASP-2、HsCRP 与 C3 水平的相关性[J].南方医科大学学报,2016,36(10): 1340-1344, 1356
- [20] 张治勤,李兴鑫,刘冰,等.婴儿巨细胞病毒肺炎血清 SP-D 和 MBL 水平变化及意义[J].国际儿科学杂志,2015,42(6): 698-700
- [21] 温楚玲.甘露聚糖结合凝集素与糖尿病的研究进展[J].国际检验医学杂志,2016,37(4): 512-514
- [22] 赵娜,吴洁,吴奇峰,等.矽肺患者血清甘露聚糖结合凝集素与 Th17/Treg 关系[J].中国职业医学,2019,46(3): 263-268
- [23] Bałk-Romaniszyn L, Świerczko AS, Sokołowska A, et al. Mannose-binding lectin (MBL) in adult patients with inflammatory bowel disease[J]. *Immunobiology*, 2020, 225(1): 151859
- [24] Pilely K, Rosbjerg A, Genster N, et al. Cholesterol Crystals Activate the Lectin Complement Pathway via Ficolin-2 and Mannose-Binding Lectin: Implications for the Progression of Atherosclerosis [J]. *J Immunol*, 2016, 196(12): 5064-5074
- [25] Pradhan V, Surve P, Rajadhyaksha A, et al. Mannose binding lectin (MBL) 2 gene polymorphism & its association with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus (SLE) patients from western India[J]. *Indian J Med Res*, 2015, 141(2): 199-204
- [26] Puente M, Fariñas-Alvarez C, Moreto A, et al. Low pre-transplant levels of mannose-binding lectin are associated with viral infections and mortality after haematopoietic allogeneic stem cell transplantation[J]. *BMC Immunol*, 2019, 20(1): 40
- [27] 郭静,韩冰,侯鸾鸾,等.精神分裂症患者 MBL 基因 Exon1 54 位密码子点突变频率与血清水平的研究[J].标记免疫分析与临床,2019,26(9): 1547-1551, 1569
- [28] 郭静,邱锦云,郭航,等.精神分裂症血清免疫球蛋白的糖链分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(7): 795, 797
- [29] 郭静,郭航,邱锦云,等.精神分裂症患者血清 IgG0、总 IgG 及 CIC 水平的相关性[J].医学综述,2013,19(21): 4001-4002
- [30] 郭静,邱锦云,冯芳波.精神分裂症免疫球蛋白核心岩藻糖糖基化水平的检测分析[J].现代检验医学杂志,2014,29(2): 105-107