

新疆维吾尔族人类白细胞抗原 G 3' 非翻译区基因多态性调查

胡国龙¹, 邵雷², 林红^{2*}, 桂霞¹

(¹新疆医科大学附属肿瘤医院输血科, 新疆 乌鲁木齐 830011; ²江苏省血液中心输血研究室, 江苏 南京 210042)

[摘要] **目的:**了解新疆维吾尔族人群人类白细胞抗原 G(HLA-G)3'非翻译区(3'UTR)基因多态性。**方法:**提取 100 例维吾尔族基因组 DNA,采用 PCR 方法扩增 3'UTR,直接进行测序,分析基因多态性和单倍型分布情况。**结果:**100 例维吾尔族基因组 DNA 标本成功测序 98 人份,在 HLA-G 3'UTR 区检测到 10 个基因多态性,包括 14bpDel/Ins、+3003C/T、+3010C/G、+3027A/C、+3035C/T、+3092T/G、3121T/C、+3142C/G、+3187A/G、+3196C/G。这些基因位点之间强连锁,共有 20 个单倍型,其中单倍型 2 最多,占 24.9%。**结论:**新疆维吾尔族 HLA-G 3'UTR 的基因多态性和基因连锁情况具有独特性,为进一步研究 HLA-G 在遗传、进化、免疫功能和相关疾病中的作用机制提供了研究依据。

[关键词] 人类白细胞抗原;HLA-G;基因多态性;维吾尔族

[中图分类号] R392

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)10-1261-04

doi:10.7655/NYDXBNS20171007

Polymorphism in 3' untranslated regions of human leukocyte antigen G gene in Uygur, Xinjiang

Hu Guolong¹, Shao Lei², Lin Hong^{2*}, Gui Xia¹

(¹Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; ²Jiangsu Province Blood Center, Nanjing 210042, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate gene polymorphism of human leukocyte antigen G (HLA-G) 3' untranslated regions (3'-UTR) in Uygur, Xinjiang. **Methods:** Genomic DNA was extracted from 100 blood samples of Uygur population. Amplification of HLA-G 3'-UTR was performed by PCR. The productions were directly sequenced to analyze the frequency of genotypes and haplotypes. **Results:** There were 98 samples sequenced successfully. Ten single nucleic polymorphisms were found in HLA-G 3'UTR in Uygur populations consisting of 14bpDel/Ins, +3003C/T, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T, +3092T/G, 3121T/C, +3142C/G, +3187A/G and +3196C/G. Strong linkage disequilibrium existed among these SNPs. It showed a higher HLA-G 3'-UTR haplotype diversity including 20 haplotypes and UTR-2 was the most one (24.9%). **Conclusion:** Polymorphisms and haplotypes of HLA-G 3'-UTR were distinct in Uygur populations. The data provide fundamental and critical information to explore mechanism of HLA-G in the role of genetics, evolution, immunity function and related diseases.

[Key words] human leukocyte antigen; HLA-G; polymorphism; Uygur

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(10): 1261-1264]

人类白细胞抗原 G(human leukemia antigen G, HLA-G)属于非经典 HLA-I 类(HLA-I b)基因家族,定位于人第 6 号染色体短臂 6p21.3^[1]。HLA-G 基因包含 8 个外显子、7 个内含子以及两端的 5'调控区(5'URR)和 3'非翻译区(3'UTR)^[1]。HLA-G 基因具有低度多态性,即编码区的基因多态性少,编码的基因

型只有 21 种,通过选择性剪切,形成 7 种蛋白异构体^[2]。HLA-G 的表达具有局限性分布的特点,主要表达于绒毛外细胞滋养层、胸腺、指甲基质、表皮细胞和单核细胞^[2]。但 HLA-G 基因两端非翻译区,包括 5'URR^[3]和 3'UTR^[4],多态性则较为丰富,并且其多态性与 HLA-G mRNA 的稳定性和表达有关^[5]。本文利用 PCR 扩增和直接测序法对 HLA-G 3'UTR 基因多态性进行分析,了解新疆维吾尔族人群 HLA-G 3'UTR 的基因多态性和单倍型组成,为研究 HLA-G 在种群进化、免疫功能和疾病关联中的作用提供基础数据。

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目(2014-WSN-002)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: linhong712003@sina.com

1 对象和方法

1.1 对象

100 例维吾尔族健康人血液标本来自新疆肿瘤医院,其中男 59 例,女 41 例,年龄 33~65 岁。

1.2 方法

采用全血基因组 DNA 提取试剂盒(Axygen 公司,美国)分离样本外周静脉血基因组 DNA。Nanodrop®测定浓度和纯度,DNA 浓度为 50~100 ng/μL,纯度 D(260 nm)/D(280 nm)为 1.70~1.80。参考文献[4]并利用 Primer 5 软件进行 HLA-G 3'UTR 区域的 PCR 引物设计,引物序列:F:5'-GTGGGTTGTTGAGGGG-3',R:5'-GTCTTC-CATTTATTTGTCTCT-3'。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR 体系为 2×Buffer 15 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.4 μL,10 μmol/L 上下游引物各 2 μL,rTaq 酶 0.2 μL,DNA 3 μL,加 ddH₂O 至 30 μL。PCR 反应程序如下:预变性 94 ℃ 5 min;变性 94 ℃ 45 s,复性 58 ℃ 45 s,延伸 72 ℃ 60 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。测序产物大小为 357 bp,经 2%凝胶电泳检测后,纯化,直接反向测序。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件直接计算 HLA-G 3'UTR 突变位点的等位基因和基因型频率,应用拟合优度 χ^2 检验对检测到的突变位点基因型进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium,HWE)检验, $P>0.05$ 表示符合孟德尔遗传。应用 SHEsis 软件进行单倍型分析,并估计其比值(odd ratio,OR), $P\leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多态性位点的基因测序结果

对 PCR 产物进行纯化后,采用反向引物测序准确地读出了 3'UTR 的基因多态性,共有 10 个基因多

态性位点,分别为 HLA-G 基因 14bpDel/Ins、+3003C/T、+3010C/G、+3027A/C、+3035C/T、+3092 T/G、3121 T/C、+3142C/G、+3187A/G、+3196C/G。

2.2 HLA-G 3'UTR 等位基因和基因型分布

统计维吾尔族人群检出的 10 个基因多态性的基因型和等位基因频率(表 1),发现+3027A/C 在本研究的人群中没有 AA 纯合子基因型,仅有 AC 和 CC 2 种基因型,而+3092 T/G 和+3121T/C 也只有 2 种基因型,而且分别只有 1 个杂合子 TG 基因型和 TC 基因型,其余均为 GG 或者 TT 基因型;其他多态性位点在人群中均有 3 种基因型。

使用 SHEsis 软件对多态性位点等位基因和基因型频率进行计算,同时对两个组的 SNP 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验(表 1),除了+2960 14bp Del/Ins 和+3010 C/G 不符合 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.05$)外,其余各位点的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),说明本研究的人群遗传符合孟德尔遗传。

2.3 HLA-G 基因多态性位点连锁不平衡及单倍型分析

应用 SHEsis 软件计算 HLA-G 基因 3'UTR 区 8 个多态性位点(不包括+3092T/G 和+3121T/C)的连锁不平衡,得到不同基因位点间的 D'值(表示两位点间连锁不平衡程度的值)(表 2)。

$D'>0.7$ 认为是强连锁。根据表 2 中 D'值的结果,HLA-G 3'UTR 的 8 个多态性位点+2960 14bp Del/Ins、+3003C/T、+3010C/G、+3027A/C、+3035C/T、+3142C/G、+3187A/G 和+3196C/G 紧密连锁(图 1),可以进行单倍型构建。

根据图 1 的结果,对新疆维吾尔族人群的单倍型进行了分析,参考文献[6]进行统计共有 20 种,其中分布频率(f) >0.03 的有 8 种(表 3)。单倍型 UTR-2 在人群中所占比例最多(24.9%),其次是 UTR-3(18.1%)。

表 1 新疆维吾尔族人群 HLA-G 3'UTR 多态性位点等位基因和基因型频率分布

Table 1 Allele and genotype frequency distribution of HLA-G 3'UTR polymorphism of Uygur population in Xinjiang

类型	+2960 14bp Del/Ins	+3003C/T	+3010C/G	+3027A/C	+3035C/T	+3092C/G	+3121C/T	+3142C/G	+3187A/G	+3196C/G
等位基因	Del 0.490	C 0.122	C 0.342	A 0.097	C 0.153	C 0.005	C 0.005	C 0.347	A 0.184	C 0.684
	Ins 0.510	T 0.878	G 0.658	C 0.903	T 0.847	G 0.995	T 0.995	G 0.653	G 0.816	G 0.316
基因型	Del/Del 0.122	CC 0.010	CC 0.388	AA 0	CC 0.704	CC 0	CC 0	CC 0.082	AA 0.673	CC 0.459
	Del/Ins 0.735	CT 0.225	CG 0.541	AC 0.194	CT 0.286	CG 0.010	CT 0.010	CG 0.531	AG 0.286	CG 0.449
	Ins/Ins 0.143	TT 0.765	GG 0.071	CC 0.806	TT 0.010	GG 0.990	TT 0.990	GG 0.388	GG 0.041	GG 0.092
P 值*	<0.05	0.659	<0.05	0.288	0.313	0.960	0.960	0.091	0.640	0.706

*:Hardy-Weinberg 平衡检验的 P 值。

表 2 新疆维吾尔族人群 HLA-G 3'UTR 多态性位点的连锁不平衡分析

Table 2 Linkage disequilibrium of HLA-G 3'UTR polymorphism loci in Uygur population in Xinjiang (D')

SNPs	+3003C/T	+3010C/G	+3027A/C	+3035C/T	+3142C/G	+3187A/G	+3196C/G
+2960 14bp Del/Ins	0.999	0.651	0.999	0.665	0.613	0.562	0.646
+3003C/T	-	0.915	0.498	0.939	0.915	0.997	0.023
+3010C/G	-	-	0.998	0.999	0.977	0.785	0.608
+3027A/C	-	-	-	0.872	0.999	0.999	0.715
+3035C/T	-	-	-	-	0.999	0.996	0.808
+3142C/G	-	-	-	-	-	0.781	0.371
+3187A/G	-	-	-	-	-	-	0.651

表 3 新疆维吾尔族人群 HLA-G 3'UTR 单倍型组成

Table 3 Composition of HLA-G 3'UTR haplotype of Uygur population in Xinjiang

单倍型组成	单倍型	分布频率(%)
ITCCCCGAG*	UTR-2	24.9
DTCCCCGAG*	UTR-3	18.1
DTGCCCGC*	UTR-1	11.3
DCGCCCGC*	UTR-4	10.1
ITCATGAC*	UTR-7	8.6
ITCCCCGAC*	未知	4.4
ITGCCCGC*	未知	3.4
ITCCTGAC*	UTR-5	3.2

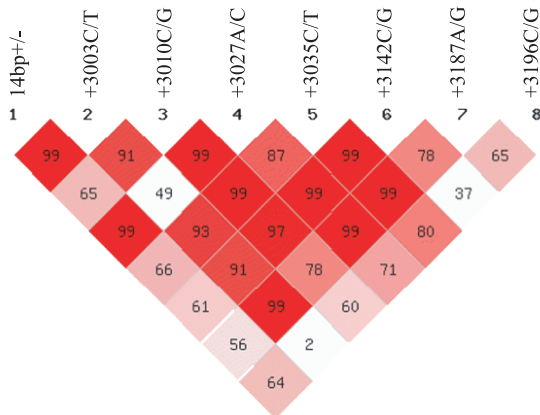


图 1 新疆维吾尔族人群 HLA-G 3'UTR 多态性位点的连锁不平衡分析

Figure 1 Linkage disequilibrium of HLA-G 3'UTR polymorphism loci in Uygur population in Xinjiang

3 讨论

HLA-G 3'UTR 区有多个多态性位点, 这些位于非编码区遗传多态性可能会影响转录中 mRNA 的剪切与稳定、翻译的起始和翻译起始速率等过程, 同时这些非编码区位点也可能和一些启动子区和外显子区位点存在连锁关系, 与 HLA-G 表达的转录后调控有关, 进而影响 HLA-G 分子的表达、结构和功能,

参与免疫调节作用^[7]。

本研究在新疆维吾尔族人群中检测到 HLA-G 3'UTR 共有 10 个多态性位点, 包括+2960 14 bp Del/Ins(rs 1704)、+3003 C/T(rs 1707)、+3010 C/G(rs 1710)、+3027 A/C(rs 17179101)、+3035 C/T (rs 17179108)、+3092CG(rs 29798699)、+3121T/C (rs 29798728)、+3142 C/G (rs 1063320)、+3187 A/G (rs 9380142)、+3196 C/G (rs 1610696)。孙浩等^[8]调查中国其他 5 个少数民族, 在蒙古族、柯尔克孜族和仫佬族的 HLA-G 基因 3'UTR 中检测到 8 个多态性位点, 在傣族和水族中有 7 个多态性位点, +3196 位点上没有检测到多态性。Wang 等^[9]对北方汉族和南方汉族人群的调查发现, HLA-G 3'UTR 有 9 个多态性位点, 其中+3183 A/G (rs187320344)在以上少数民族人群中均未检测到。说明不同民族 HLA-G 3'UTR 多态性位点存在差异性, 这种差异性可能是自然选择的结果。HLA-G 3'UTR 的 8 个多态性位点在 5 个少数民族群体中, 每个群体都大约有 4 个位点不符合 Hardy-Weinberg 平衡检测^[8], 而本研究维吾尔族人群中 14 bp Del/Ins 和+3010 C/G 两个位点不符合 Hardy-Weinberg 平衡。维吾尔族人群中 14 bp Del/Ins 两个等位基因频率几乎相等(Del 49.0%, Ins 51.0%), 在云南人群中为 Del 73.5%和 Ins 26.5%^[10], 日本人群中 Del 88.0%和 Ins 12.0%(数据来自网站: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), 与维吾尔族人群相比均具有统计学差异 ($P < 0.01$)。但维吾尔族人群的这个基因位点与欧洲人群^[11]比较, 没有统计学差异($P > 0.05$), 说明维吾尔族人群与欧洲人群的亲缘关系更近。

由于 HLA 不同基因座位的某些等位基因经常连锁在一起遗传, 而连锁的基因并非完全随机地组成单体型, 有些基因总是较多地一起出现, 致使某些单体型在群体中呈现较高的频率, 从而引起连锁不平衡。维吾尔族人群 HLA-G 3'UTR 的多态性位点之间具有强连锁, 且具有多样的单倍型组成。在全球范

围内,位于前 3 位的 3'UTR 单倍型是 UTR-1、3 和 2^[5],新疆维吾尔族人群也是这 3 种单倍型比例最多,但顺序不同,为 UTR-2、3 和 1,其中 UTR-2 为与 14bp 插入强连锁构成的单倍型,比例最多(24.9%)。在单倍型的组成中,还出现了 2 个分布频率较高的新的单倍型(ITCCCGAC 和 ITGCCCCG),说明新疆维吾尔族人群的单倍型构成具有独特性。

两个独立的研究发现,14bpDel^[12]和+3010C^[13]降低了 HIV 的感染风险,而 Segat 等^[14]发现+3010C 与人类免疫缺陷病毒(HIV)垂直传播没有相关性,但与 14bpDel 连锁时在保护个体免于 HIV 感染中发挥正面作用。而在人乳头瘤病毒(HPV)18 感染人群中,14bpDel 和+3010C 的频率均低于正常对照人群^[15]。Martinetti 等^[16]的研究表明 14bp Del 纯合子以及含有 14bp Del 的 HLA-G*01:04:01 都是丙型肝炎病毒(HCV)垂直感染的危险因素。更多研究还发现 HLA-G 的基因多态性、单倍型和基因型与肿瘤、病毒性肝炎以及寄生虫病等相关性^[17]。所以,研究 HLA-G 基因多态性将有助于揭示 HLA-G 在不同个体的感染、防御和疾病进展中的作用。本研究利用 PCR 和直接测序的方法,对 98 份新疆维吾尔族无关个体进行了 HLA-G 3'UTR 基因测序分型,获得了维吾尔族人群 HLA-G 3'UTR 基因分子遗传多态性。维吾尔族人群独特的 HLA-G 3'UTR 基因多态性和单倍型组为研究 HLA-G 在遗传、进化、免疫功能和相关疾病中的作用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Kovats S, Main EK, Librach C, et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts[J]. *Science*, 1990, 248(4952): 220-223
- [2] O'brien M, Mccarthy T, Jenkins D, et al. Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(12/13): 1943-1949
- [3] Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, et al. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(11): 3069-3086
- [4] Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, et al. The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes [J]. *Genes Immun*, 2010, 11(2): 134-141
- [5] Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3'UTR: translational control and development[J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(8): 626-637
- [6] Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, et al. Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 476
- [7] Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(3): 369-395
- [8] 孙浩, 孙倩倩, 黄铠, 等. 选择压力对五个少数民族群体 HLA-G 基因 3'非翻译区多态性的影响[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(4): 435-441
- [9] Wang WY, Tian W, Liu XX, et al. HLA-G coding region and 3' untranslated region (3'UTR) in two Chinese Han populations[J]. *Immunol Lett*, 2016, 176: 65-71
- [10] 陈婷婷, 林俊, 晋松, 等. 云南地区 HLA-G 基因 3'非翻译区三个位点多态性与系统性红斑狼疮的关联研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(4): 228-232
- [11] Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC, et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e71742
- [12] Aikhionbare FO, Kumaresan K, Shamsa F, et al. HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission[J]. *AIDS Res Ther*, 2006, 3: 28
- [13] Fabris A, Catamo E, Segat L, et al. Association between HLA-G 3' UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children[J]. *AIDS*, 2009, 23(2): 177-182
- [14] Segat L, Catamo E, Fabris A, et al. HLA-G 3' UTR haplotypes and HIV vertical transmission[J]. *AIDS*, 2009, 23(14): 1916-1918
- [15] 许惠惠, 陈莉莉, 章鸯, 等. HLA-G 基因多态性与高危型 HPV18 易感的相关研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(8): 595-599
- [16] Martinetti M, Pacati I, Cuccia M, et al. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2006, 19(2): 369-378
- [17] Dias FC, Castelli EC, Collares CV, et al. The role of HLA-G molecule and HLA-G gene polymorphisms in tumors, viral hepatitis, and parasitic diseases[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 9

[收稿日期] 2016-05-03