

HTR3E基因多态性与中国女性IBS-D的发生及肠道症状的关联

张瑜, 廖月霞, 陶文华, 李瑶瑶, 郝臻凤, 卜平

张瑜, 廖月霞, 陶文华, 李瑶瑶, 郝臻凤, 卜平, 扬州大学医学院中西医结合研究所 江苏省扬州市 2005001
张瑜, 在读博士, 主要从事功能性胃肠病的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 81173392
江苏省研究生创新工程基金资助项目, No. CXZZ12_0918
作者贡献分布: 此课题由张瑜与卜平设计; 研究过程由张瑜、廖月霞、陶文华、李瑶瑶及郝臻凤操作完成; 数据分析与本文写作由张瑜完成; 论文由卜平审阅。
通讯作者: 卜平, 教授, 博士生导师, 225001, 江苏省扬州市淮海路11号, 扬州大学医学院中西医结合研究所。boping@yzu.edu.cn
电话: 0514-87978872
收稿日期: 2014-02-28 修回日期: 2014-04-08
接受日期: 2014-04-17 在线出版日期: 2014-06-18

Association between *HTR3E* gene polymorphism and intestinal symptoms of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in Chinese women

Yu Zhang, Yue-Xia Liao, Wen-Hua Tao, Yao-Yao Li, Zheng-Feng Hao, Ping Bo

Yu Zhang, Yue-Xia Liao, Wen-Hua Tao, Yao-Yao Li, Zheng-Feng Hao, Ping Bo, Department of Traditional Chinese and Western Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81173392; Graduate Student Innovation Project in Jiangsu Province, No. CXZZ12_0918
Correspondence to: Ping Bo, Professor, Department of Traditional Chinese and Western Medicine, 11 Huaihai Road, Yangzhou 225001, China. boping@yzu.edu.cn
Received: 2014-02-28 Revised: 2014-04-08
Accepted: 2014-04-17 Published online: 2014-06-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between 5-hydroxytryptamine-3 E receptor (*HTR3E*) gene polymorphism and intestinal symptoms of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) in Chinese women.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was used to detect the 3'UTR variant c.*76G>A of the *HTR3E* gene in 300 healthy female subjects and 294 female IBS-D patients.

RESULTS: There were significant differences between the IBS-D patients and controls in the frequencies of the GA genotype ($\chi^2 = 6.362$, $P = 0.012$) and the A allele ($\chi^2 = 5.970$, $P = 0.015$). Compared with the GG genotype of *HTR3E*, the patients with GA genotype had a higher frequency of defecation ($\chi^2 = 7.68$, $P = 0.021$) and more serious stool form ($\chi^2 = 6.225$, $P = 0.044$).

CONCLUSION: The GA genotype of *HTR3E* might be an important predisposing factor for IBS-D in Chinese females and might contribute to the deterioration of the intestinal symptoms.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; *HTR3E*; Polymorphism; Intestinal symptoms

Zhang Y, Liao YX, Tao WH, Li YY, Hao ZF, Bo P. Association between *HTR3E* gene polymorphism and intestinal symptoms of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in Chinese women. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(17): 2503-2507 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2503.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i17.2503>

摘要

目的: 探讨五羟色胺受体3(5-hydroxytryptamine-3 receptor, 5-HTR3)的亚型*HTR3E*基因非翻译区多态性与中国女性IBS-D的发生及肠道症状的关联。

方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)对294例IBS-D女性患者与300例健康对照者*HTR3E*基因3'端非翻译区c.*76G>A(rs62625044)进行研究。

结果: 女性患者c.*76G>A多态性位点GA基因型($\chi^2 = 6.362$, $P = 0.012$)和A等位基因($\chi^2 = 5.970$, $P = 0.015$)的频率较正常对照均显著升

■背景资料

五羟色胺3E受体亚型(5-hydroxytryptamine-3 E receptor, *HTR3E*)作为五羟色胺受体3(5-hydroxytryptamine-3 receptor, 5-HTR3)的亚型之一只在胃肠组织中表达, 英国遗传研究发现*HTR3E*基因的c.*76G>A(rs62625044)可能与女性腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)的易感性有关, 但其与我国IBS-D的关联尚未见报道。作者主要研究该单核苷酸的多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)与中国女性IBS-D的关联以及对患者肠道症状影响。

■同行评议者

袁建业, 副研究员, 上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所

■ 研发前沿

在IBS-D的机制研究中, 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)及其受体是研究的热点. 近年5-HT₃受体的五种亚型的分布和功能的研究日趋热门.

高($P < 0.05$), GA基因型患者较GG基因型排便频率更高($\chi^2 = 7.68, P = 0.021$), 两组患者排便性状也存在很大差异($\chi^2 = 6.225, P = 0.044$).

结论: *HTR3E*的GA基因型和A等位基因可能是中国IBS-D女性患者的易感因素之一; GA基因型的患者较GG基因型肠道症状更加严重.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 腹泻型肠易激综合征; *HTR3E*; 多态性; 肠道症状

核心提示: 5羟色胺3E受体亚型(5-hydroxytryptamine-3 E receptor)的GA基因型和A等位基因可能是我国腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome)女性患者的易感因素之一; GA基因型的患者较GG基因型肠道症状更加严重. 可能与等位基因A所引起的与microRNA-510结合障碍而导致的靶基因的蛋白表达增高有关.

张瑜, 廖月霞, 陶文华, 李瑶瑶, 郝臻凤, 卜平. *HTR3E*基因多态性与中国女性IBS-D的发生及肠道症状的关联. 世界华人消化杂志 2014; 22(17): 2503-2507 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2503.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i17.2503>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的, 以慢性腹痛、腹胀和肠道习惯改变为特征的功能性胃肠病^[1]. 文献资料显示欧洲IBS的发病率为2.5%-22%, 美国为7%-15%, 亚洲和其他发展中国家的发病率也普遍上升^[2,3]. 周小玲等^[4]报道, 中国青少年IBS的发生率约为6.7%. 在所有的IBS亚型中, IBS-D为最常见的一种^[5]. 在IBS-D的机制研究中, 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)及其受体是研究的热点, 5-HT₃作为5-HT的受体之一已经被证实肠道感觉功能中发挥重要的作用^[6]. 目前研究表明*HTR3E*作为5-HT₃的5种亚型之一只在胃肠组织中表达^[7,8], 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. 英国遗传研究发现*HTR3E*基因的c.*76G>A(rs62625044)可能与女性IBS-D的易感性有关^[9], 但*HTR3E*(rs62625044)与我国IBS-D患者的关联尚未见报道. 作者主要研究该SNP与中国女性IBS-D的关联以及对患者肠道症状的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-04/2012-03扬州大学医学院附属苏北人民医院等5家医院门诊女性病例294例, 年龄18-71岁. 所有患者均常规抽血检测生化未见异常; 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女性300例. 对照组年龄、性别、体型等一般资料与病例组相匹配, 所有入组对象进行问卷调查并且抽血前未服用任何药物. IBS-D诊断标准: 采用罗马III标准^[10].

1.2 方法

1.2.1 问卷调查: 根据疾病的特点结合文献资料自制量表, 包括一般情况: 年龄、民族、职业等. 肠道症状特点: 通常的排便频率(3-4次/d, 5-6次/d, ≥ 6 次/d)、排便时间(≤ 10 min, 10-20 min, ≥ 20 min)、通常的排便形式(水样便、片状或糊状、成形软便)、排便急迫感和不完全感(没有或偶尔、经常、总是)以及腹痛程度(没有或偶尔、经常、总是).

1.2.2 DNA的提取: 所有参与者入组当天抽取5 mL全血于15 mL的含有EDTA- Na_2 抗凝剂的离心管中混匀, 置于-20 °C的冰箱内保存, 1 wk内提取基因组DNA, 采用的是TIANGEN公司血液基因组DNA提取试剂盒.

1.2.3 基因分型: 设计*HTR3E* 3'UTR引物, 上游: 5'-CGT CATATG CCT CTG GAA CA-3', 下游: 5'-ATA GGC GTG AAC CAC TGC AC-3', 交由上海生工生物工程公司合成, 浓度5 $\mu\text{mol/L}$. 加2 \times Taq PCR Master Mix 10 μL , 上下游引物各1 μL , 取模板DNA 2 μL , 最后加ddH₂O至PCR反应总体积为20 μL . 采用降落PCR, 条件为94 °C预变性2 min, (94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 30 s) \times 5 cycle, (94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 30 s) \times 5 cycle, (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s) \times 25 cycle, 72 °C延伸5 min进入4 °C. 产物检测用1.5%琼脂糖凝胶, 90 V电压电泳40 min, 溴乙锭染色, 凝胶成像仪照相, 目的基因的片段为397 bp. 后用限制性内切酶*Hpy*188III进行酶切分型, 体系20 μL , 其中10 \times NEB 2 μL , 酶0.5 μL , 100 \times BSA 0.2 μL , PCR产物3 μL , 最后加ddH₂O至20 μL , 37 °C消化12 h. 取10 μL 酶切产物电泳, 用2.5%琼脂糖凝胶, 70 V电压, 80 min. 随机抽取送测序验证.

统计学处理 所有数据采用SPSS11.0软件处理. 所有研究对象的人口学资料的分析用 χ^2 检验, Hardy-Weinberg(H-W)平衡检验采用 χ^2 检验,

表 1 IBS-D 患者和健康对照者一般资料分析 [n(%)]

分组	n	年龄(岁)				职业		种族	
		18-30	31-45	46-60	61-71	脑力	体力	汉族	其他
IBS-D	294	115(39.1)	92(31.3)	78(26.5)	9(3.1)	202(68.7)	92(31.3)	287(97.6)	7(2.4)
对照	300	111(37.0)	89(29.7)	88(29.3)	12(4.0)	222(74.0)	78(26.0)	294(98.0)	6(2.0)
χ^2			1.091			2.036		0.101	
P值			0.779			0.154		0.751	

■ 相关报道

Kapeller 等研究证实 5-HT₃ 受体亚型 HTR3A 受体变异型基因 c.-42C>T (rs1062613) 和 HTR3E 受体变异型基因 c.*76G>A (rs62625044) 可能与英国女性 IBS-D 的易感性有关。

表 2 女性 IBS-D 患者 *HTR3E* 基因 c.*76G>A 多态性位点基因型分布和等位基因频率分析 [n(%)]

分组	n	女性基因型		女性等位基因		
		G/G	G/A	A/A	G	A
IBS-D	294	250(85)	44(15)	0(0)	544(93)	44(7)
对照	300	275(93)	25(7)	0(0)	575(96)	25(4)
χ^2			6.362		5.970	
P值			0.012		0.015	

表 3 不同基因型女性 IBS-D 患者肠道症状分析 [n(%)]

分组/基因型	HTR3E		χ^2	P值
	GA	GG		
n	44	250		
排便频率(次/d)			7.68	0.021
3-4	9(20.5)	97(38.8)		
5-6	25(56.8)	125(50)		
≥6	10(22.7)	28(11.2)		
排便时间(min)			2.481	0.289
≤10	27(61.4)	122(48.8)		
10-20	9(20.5)	74(29.6)		
≥20	8(18.1)	54(21.6)		
排便形状			6.225	0.044
水样便	14(31.8)	70(28)		
片状、糊状便	20(45.5)	76(30.4)		
成形软便	10(22.7)	104(41.6)		
排便急迫感和不尽感			4.623	0.099
没有或偶尔	6(13.6)	51(20.4)		
经常	21(47.7)	140(56)		
总是	17(38.6)	59(23.6)		
腹痛程度			0.644	0.725
没有或偶尔	13(29.5)	79(31.6)		
经常	23(52.3)	13(5.2)		
总是	8(18.2)	34(13.6)		

基因型和等位基因片段频率以%表示, 差异显著性比较用 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IBS-D 患者和健康对照者一般资料分析 统

计结果表明在年龄、职业和种族分布等一般资料上 IBS-D 组和健康对照组无显著性差异 ($P > 0.05$) (表1)。

2.2 *HTR3E* 基因 3' 端非翻译区 c.*76G>A 多态性分析 经过酶切电泳, *HTR3E* 分为 GG 型(298 bp)

■创新盘点

本研究国内首次运用PCR-RFLP方法证实HTR3E的GA基因型和A等位基因可能是我国IBS-D女性患者的易感因素之一; GA基因型的患者较GG基因型肠道症状更加严重, 为IBS-D的机制研究提供了新的思路与方向.

和GA型(344, 298 bp), 经测序验证后对HTR3E基因3'UTR c.*76G>A多态性位点基因型分布和等位基因频率进行分析如表2. 结果表明, IBS-D组GA基因型频率较对照组显著升高($P<0.01$), IBS-D患者A等位基因的频率较对照组显著升高($P<0.05$).

2.3 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率分布均符合H-W遗传平衡($P>0.05$).

2.4 不同基因型女性IBS-D患者肠道症状分析 从统计结果来看, GA组的患者排便频率较GG组更高($\chi^2 = 7.68, P = 0.021$), 79.5%的GA型患者每天排便达5次以上; GA组患者较GG组排便性状也存在很大差异($\chi^2 = 6.225, P = 0.044$), 31.8%和45.5%的GA型患者排便性状都成水样便或糊状便, 而GG型患者大便不成形, 成水样或糊状的分别只占28%和30.4%. 在排便时间的长短, 排便急迫感和不尽感以及腹痛程度上来看, 两者无显著性差异($P>0.05$)(表3).

3 讨论

IBS是一种常见的功能性胃肠病, 在英国, IBS-D影响了3%的普通人群的正常生活, 并且占据了胃肠病门诊量的20%^[11]. 虽然IBS-D不会导致像肠癌一样的严重疾病, 但是多数罹患人群必须通过应激的管理、饮食的控制等等来避免腹泻、腹痛的发生, 使得生活质量严重下降, 失业率严重上升, 增加了巨额医疗费用. 但目前病因和发病机制尚未明确, 成为有待解决的问题^[12-14].

5-HT₃受体目前分为5种亚型, HTR3A作为其中的一种亚型在5-HT₃受体功能的形成中起关键性的作用, 他与HTR3B、HTR3C一样广泛表达于外周和中枢神经系统, 而HTR3D少量表达于中枢, 主要在胃肠道表达^[15], 只有HTR3E只在胃肠道中表达^[7,8], 这表明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. 英国遗传研究发现, 5-HT₃受体亚型HTR3A受体变异型基因c.-42C>T (rs1062613)和HTR3E受体变异型基因c.*76G>A(rs62625044)可能与女性IBS-D的易感性有关^[9], 但在德国人群中HTR3A(rs1062613)与IBS-D易感性的关联没有得到证实, 可能与种族和遗传特性不同有关. 在中国女性人群中, 这种受体变异型基因与IBS及其亚型是否存在关联目前尚未见报道. 我们的研究与Kapeller等^[9]对

英国人群的研究结果相似, 与英国人群相比, 我国IBS-D女性患者GA基因型与IBS-D的相关性更加密切, 说明我国女性IBS-D的发生和流行可能与HTR3E的3'UTR(rs62625044)多态性位点等位基因A所决定的遗传易感素质密切相关.

从不同基因型女性IBS-D患者肠道症状的分析结果来看, GA基因型的患者排便频率较GG组更高, 两组人群排便性状也存在很大差异, 但在排便时间的长短, 排便急迫感和不尽感以及腹痛程度上来看, 两组人群无显著性差异. 也就是说GA基因型患者较GG基因型患者可能有更加严重的肠道症状, 但仍然需要大样本的统计数据来验证, 而GA基因型的这种肠道现象可能与GA基因型患者的等位基因A所引起的与microRNA-510结合障碍而导致的靶基因的蛋白表达增高有关^[9], 但具体的机制还需要进一步的实验验证.

4 参考文献

- 1 Agrawal A, Whorwell PJ. Irritable bowel syndrome: diagnosis and management. *BMJ* 2006; 332: 280-283 [PMID: 16455728 DOI: 10.1136/bmj.332.7536.280]
- 2 Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, Sanderson JD, Sechi LA, Dettori G, Zanetti S, Hermon-Taylor J. 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. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3883-3890 [PMID: 17913930 DOI: 10.1128/JCM.01371-07]
- 3 Lee OY. Prevalence and risk factors of irritable bowel syndrome in Asia. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 5-7 [PMID: 20535320 DOI: 10.5056/jnm.2010.16.1.5]
- 4 周小玲, 周立平, 蔡文智. 肠易激综合征的流行病学调查. *中医药导报* 2010; 16: 98-100
- 5 Olden KW. Targeted therapies for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Exp Gastroenterol* 2012; 5: 69-100 [PMID: 22754282 DOI: 10.2147/CEG.S290]
- 6 Gershon MD. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S184-S193 [PMID: 15798484 DOI: 10.1097/01.mcg.0000156403.37240.30]
- 7 Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 2003; 310: 101-111 [PMID: 12801637]
- 8 Karnovsky AM, Gotow LF, McKinley DD, Piechan JL, Ruble CL, Mills CJ, Schellin KA, Slightom JL, Fitzgerald LR, Benjamin CW, Roberds SL. A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene* 2003; 319: 137-148 [PMID: 14597179 DOI: 10.1016/S0378-1119(03)00803-5]
- 9 Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, Walstab J, Möller D, Bönisch H, Burwinkel B, Autschbach F, Funke B, Lasitschka F, Gassler N, Fischer C, Whor-

- well PJ, Atkinson W, Fell C, Büchner KJ, Schmidt-mann M, van der Voort I, Wisser AS, Berg T, Rappold G, Niesler B. First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2967-2977 [PMID: 18614545 DOI: 10.1093/hmg/ddn195]
- 10 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390 [PMID: 16678553 DOI: 10.1053/j.gastro.2006]
- 11 Tillisch K, Labus JS, Naliboff BD, Bolus R, Shetzline M, Mayer EA, Chang L. Characterization of the alternating bowel habit subtype in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 896-904 [PMID: 15784038 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41211.x]
- 12 Camilleri M, Williams DE. Economic burden of irritable bowel syndrome. Proposed strategies to control expenditures. *Pharmacoeconomics* 2000; 17: 331-338 [PMID: 10947488 DOI: 10.2165/00019053-200017040-00003]
- 13 De Giorgio R, Barbara G, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, De Ponti F, Corinaldesi R. Diagnosis and therapy of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 2: 10-22 [PMID: 15335409 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.020]
- 14 Garsed K, Chernova J, Hastings M, Lam C, Marciani L, Singh G, Henry A, Hall I, Whorwell P, Spiller R. A randomised trial of ondansetron for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhoea. *Gut* 2013 Dec 12. [Epub ahead of print] [PMID: 24334242 DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305989]
- 15 Niesler B, Walstab J, Combrink S, Möller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Göthert M, Rappold G, Brüss M. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT3C, 5-HT3D, and 5-HT3E. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 8-17 [PMID: 17392525 DOI: 10.1124/mol.106.032144]

■同行评价

先前未见关于中国女性 *HTR3E* c.*76G>A(rs62625044) 基因多态性与 IBS-D 关系的文献报道, 本研究进行了有益的探索。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

