

IL-28B 基因多态性与新疆维吾尔族 HCV 易感性研究

刘 祥^{1,2} 张金颖² 张永萍² 仲英娜^{1,2}

摘要 目的 探讨白介素-28B(IL-28B)基因的多态性与新疆维吾尔族慢性丙型肝炎感染易感性的关联。方法 选取180例新疆维吾尔族慢性丙肝患者作为HCV组,150例维族健康体检者作为健康对照组,通过PCR产物测序法检测两组受试者IL-28B rs8099917、rs12979860基因型和等位基因分布频率,对两组基因型和等位基因差异进行分析;同时在HCV组中,对不同IL-28B基因型人群的HCV-RNA载量、肝功能、血脂等进行分析。结果 ①rs8099917在HCV组和健康对照组中TT和TG/GG基因型频率差异有统计学意义($\chi^2 = 11.627$, $P = 0.001$, $OR = 1.363$, 95% $CI: 1.107 \sim 1.591$);G等位基因率在两组间差异明显,HCV组中占10.6%,健康对照组0.17% ($\chi^2 = 7.011$, $P = 0.008$, $OR = 0.658$, 95% $CI: 0.512 \sim 0.905$);②rs12979860在两组间的基因型和等位基因频率差异无统计学意义;③rs12979860 TT型患者的HCV-RNA高于TG/GG型,差异有统计学意义($P = 0.032$);患者肝功血脂差异与IL-28B基因多态性中无关。结论 新疆维吾尔族人群中HCV的易感性与IL-28B rs8099917基因多态性有关联,rs8099917中等位基因G是新疆维吾尔族HCV患者的易感基因。

关键词 白介素-28B;丙型肝炎;基因多态性;易感性
中图分类号 R 512.62;R 394.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0437-04

1989年人类发现丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)为一种新的肝炎病毒,发明了HCV抗体检测技术并用于筛选供血者,从而使通过静脉输血感染丙肝的人数明显下降。但是,2011年全球仍有约1.3~1.7亿HCV慢性感染者^[1],是导致肝硬化和肝癌的主要病因。2009年,研究^[2]报道了HCV感染者的白介素-28B(interleukin-28B, IL-28B)(rs12979860、rs8099917)基因多态性与长效干扰素联合利巴韦林治疗的应答反应以及HCV感染后的自发清除率有明显的关联性^[3]。IL-28B基因的多

态性与HCV感染后的结局密切相关,其中,位于IL-28B基因rs8099917、rs12979860单核苷酸多态性与HCV的易感性最强^[2-3]。国内文献^[4]报道了汉族人群IL28B基因多态性与HCV易感性密切相关,但是新疆维吾尔族人群HCV易感性是否与IL-28B基因多态性有关尚未见报道,该研究选取新疆维吾尔族HCV感染者和维族健康对照组,检测IL-28B基因rs8099917、rs12979860两位点的基因型以及等位基因频率,并分析不同IL-28B基因型对HCV感染后HCV-RNA、肝功能水平、血脂的影响,探讨新疆维吾尔族HCV感染的影响因素。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2010年~2013年新疆维吾尔自治区人民医院肝病中心就诊的新疆维吾尔族HCV患者180例作为HCV组,均符合《丙型肝炎防治指南》诊治标准^[5]。所有患者确诊为慢性丙型肝炎,且抗HCV抗体与HCV-RNA均为阳性。选择年龄、性别、体重指数等差异无统计学意义的维吾尔族健康体检者150例作为健康对照组。排除标准:两组人群均排除妊娠及哺乳期的妇女,存在肝炎后肝硬化失代偿性的患者,合并乙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒或人类免疫缺陷病毒感染的患者或其他感染性疾病的患者,及合并自身免疫性疾病、严重精神性疾病(如抑郁症)、恶性肿瘤、甲状腺疾病患者,有吸毒或酗酒史的患者等。所有受试者来自新疆维吾尔自治区,无民族间遗传干扰(家族成员与其他民族人无通婚情况)、连续两代及以上长期居住于新疆的维吾尔族人群,均签署书面的知情同意书。本研究由新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会批准,符合伦理审查标准,符合赫尔辛基宣言。

1.2 主要试剂和仪器 采用病例对照研究,采集受试者外周静脉血(抗凝),使用基因组DNA提取试剂盒(北京东林昌盛生物科技有限公司)提取DNA。PCR扩增各个基因位点,设计引物rs8099917(F:5'-ACTTGTTCCTTGTAAGATTCCA-3', R:5'-AACCACCTCAAATTATCCT-3')、rs12979860(F:5'-ATTCCTGGACGTGGATGGGTAC-3', R:5'-AGCGCGGAGTGCAATTCA-3')。50 μ l PCR反应体系:2xTaq

2015-01-05 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区人民医院内科科研项目(编号:20130304、20130202)

作者单位:¹安徽医科大学新疆临床学院,乌鲁木齐 830001

²新疆维吾尔自治区人民医院感染科,乌鲁木齐 830001

作者简介:刘 祥,男,硕士研究生;

仲英娜,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhongyn2005@126.com

PCR mix 25 μ l, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ l, 模板 1 μ l, 超纯水补足至 50 μ l。所用试剂购自北京鼎国生物工程公司。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s 以及 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s 共 35 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 判定 PCR 产物扩增出目的条带的质量。测序 PCR 产物经纯化后由北京东林昌盛生物科技有限公司进行正向测序。HCV-RNA 采用全自动荧光定量 PCR 仪以及其配套试剂进行检测, 肝功能及血脂等生化指标由新疆维吾尔自治区人民医院临床检验中心进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表达;中位数(四分位数)表示, 定量资料比较采用两独立样本的 t 检验;定性资料采用数量(%)表示, 对 IL-28B 基因型和等位基因频率进行统计分析, 各组间基因型和等位基因频率的比较采用 χ^2 检验, 对等位基因频率进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验。基因型和等位基因与疾病的关联强度用 OR 和 95% CI 表示, 计算 OR 及 95% CI 检验均为双侧。

2 结果

2.1 一般资料的比较 两组患者性别、年龄、体重指数差异均无统计学意义。见表 1。患者基线时 HCV-RNA、肝功能、血脂等生化指标见表 2。

表 1 一般资料

项目	HCV 组	健康对照组	χ^2 值	P 值
男性[n(%)]	133(73.9)	110(73.3)	0.417	0.663
年龄(岁) $\bar{x} \pm s$	43.5 $\pm$ 11.8	42.3 $\pm$ 12.2	-0.037	0.971
体重指数(kg/m ²) $\bar{x} \pm s$	23.4 $\pm$ 3.5	23.1 $\pm$ 3.2	0.160	0.716

表 2 基线时的 HCV-RNA、肝功能、血脂等生化指标[n(%)]

项目	HCV 组	健康对照组
HCV-RNA [lg10(IU/ml)] $\bar{x} \pm s$	4.94 $\pm$ 1.70	-
ALT(IU/L)	85.4(68.2)*	31.7(28.5)
AST(IU/L)	62.9(54.5)*	27.6(22.8)
TG(mmol/L)	1.5(0.8)	1.3(0.7)
TC(mmol/L)	4.8(1.1)	4.9(1.2)

与健康对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 对 HCV 组和健康对照组基因多态性进行遗传平衡检验 HCV 组和健康对照组均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P = 0.26, 0.43$), 具有人群代表性。见表 3。

表 3 基因型和等位基因 Hardy-Weinberg 平衡定律检验

位点名称	HCV 组		健康对照组	
	χ^2 值	P 值	χ^2 值	P 值
rs8099917	1.388	0.239	3.022	0.082
rs12979860	2.897	0.089	0.415	0.520

2.3 PCR 产物电泳 PCR 产物结果均在 1.0% 琼脂糖凝胶, 150 V、100 mA、30 min 电泳下观察, PCR 产物均获得高效和特异扩增。见图 1。

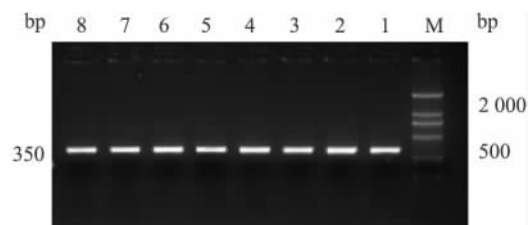


图 1 PCR 产物电泳图

M: Marker; 1~4 阳性检测样本; 5~8: 阴性检测样本

2.4 rs8099917、rs12979860 位点基因型的判定和等位基因频率在两组间的分布 rs8099917 在 HCV 组中 TG/GG 基因型频率高于健康对照组($\chi^2 = 11.627, P = 0.001$), G 等位基因频率在两组间差异有统计学意义($\chi^2 = 7.011, P = 0.008$), 通过计算 OR 和 95% CI 显示其与 HCV 发病关联强度, 结果表明与 TG/GG 型相比, TT 型可以降低 HCV 的易感风险;与 T 等位基因相比, G 等位基因为 HCV 的易感基因。见表 4。rs12979860 CC、CT/TT 基因型和 HCV 易感性无关联($\chi^2 = 0.043, P = 0.835$), C 等位基因频率和 T 等位基因频率与 HCV 易感性差异无统计学意义($\chi^2 = 0.280, P = 0.596$)。见表 5。

表 4 rs8099917 位点基因型的判定和等位基因频率在两组间的分布

项目	n	基因型频率			等位基因频率	
		TT	TG	GG	T	G
HCV 组	180	136(75.6%)	40(22.2%)	4(2.2%)	86.7%(312/360)	13.3%(48/360)
健康对照组	150	135(90.0%)	9(6.0%)	6(4.0%)	93.0%(279/300)	7.0%(21/300)
OR(95% CI)		1.363(1.107~1.591)			0.658(0.512~0.905)	

表 5 rs12979860 位点基因型的判定和等位基因频率在两组间的分布

项目	n	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
HCV 组	180	112(62.2%)	53(29.4%)	15(8.4%)	79.6%(277/360)	23.1%(83/360)
健康对照组	150	95(63.3%)	46(30.7%)	9(6.0%)	78.7%(236/300)	21.3%(64/300)
OR(95% CI)		1.146(0.789~1.391)			1.065(0.843~1.335)	

2.5 分析中国维吾尔族 HCV 慢性感染者 rs8099917、rs12979860 基因型频率与其他民族的差

异 rs8099917TT 基因型频率从高到低依次是台湾^[9]、韩国^[7]、中国汉族^[9]、中国维吾尔族、日本^[8]、欧洲^[2]。见表 6。rs12979860CC 型频率在中国维吾尔族患者中相对较低,与欧洲人群相当,明显低于亚洲 HCV 肝炎人群。见表 7。

表 6 中国丙型肝炎患者 rs8099917 基因型频率与其他民族的差异

种族	rs8099917 (%)			χ^2 值	P 值
	TT	TG	GG		
中国汉族 ^[6]	84.8	14.8	0.4	2.580	0.108
韩国 ^[7]	86.2	12.3	1.5	3.249	0.071
日本 ^[8]	70.4	28.2	1.4	0.913	0.339
欧洲 ^[2]	58.0	37.0	5.0	7.327	0.007
中国台湾 ^[9]	89.6	10.3	0.1	6.945	0.008
中国维吾尔	75.6	22.2	2.2	-	-

表 7 中国维吾尔族丙型肝炎患者 rs12979860 基因型频率与其他民族的差异

种族	rs12979860 (%)			χ^2 值	P 值
	TT	TG	GG		
中国汉族 ^[6]	88.7	8.6	2.7	19.705	<0.001
韩国 ^[7]	82.5	16.3	1.2	10.108	0.001
日本 ^[8]	81.1	14.4	4.5	8.858	0.003
欧洲 ^[2]	60.4	33.5	6.1	0.041	0.840
中国台湾 ^[9]	85.2	11.1	3.7	13.580	<0.001
中国维吾尔	62.2	29.4	8.4	-	-

2.6 HCV 组中不同 IL-28B 基因型的人群中 HCV-RNA 载量、肝功能和血脂分析 HCV 组中, rs12979860CC 纯合子中的 HCV-RNA 高于 CT/TT 型的人群,二者间差异有统计学意义($P=0.032$);对 rs8099917 分析时发现,其与 HCV 病毒载量无关联;两位点分组比较中 ALT、AST 以及血脂差异均无统计学意义。

3 讨论

全球约有 3% 的人口感染 HCV,是慢性肝病的主要病因,这些患者面临着肝硬化和肝细胞癌威胁^[1]。研究^[10]表明,宿主因素可能在 HCV 感染发展过程中起非常大的作用,包括感染年龄、性别、体重指数、种族以及宿主基因等。近年有研究^[2-3]显示,位于人 19 号染色体上 IL-28B 与 HCV 易感性以及治疗应答密切相关。宿主遗传差异是 HCV 感染后转归的一个重要因素,约有 20~30% 的急性 HCV 感染者能够自发的清除病毒,但是大部分感染者仍然会发展成慢性丙肝患者^[3]。即使外来的 HCV 感染源相同,对病毒的清除能力也有明显的个体差异,宿主基因在 HCV 易感性方面起到很大作用。

GWAS 研究将与 HCV 感染预后关联的基因锁定在 IL-28B,其中 rs8099917 和 rs12979860 是最受关注的两个位点。

Ge et al^[2]发现欧洲人群中携带 rs12979860 非 CC 型基因更易发展为慢性 HCV,CC 型基因被认为是保护性基因,Thomas et al^[3]验证了 rs12979860 与病毒清除存在着关联,然而本研究中 rs12979860 在 HCV 慢性感染人群和健康人群的分布差异无统计学意义。Rauch et al^[11]发现携带 rs8099917TT 型的患者较非 TT 型患者在 HCV 易感性方面有明显的优势;亚洲人群的研究中,Ochi et al^[8]在日本人群中发现 HCV 患者 rs8099917T 等位基因明显低于健康人群;米寅等^[9]研究内地汉族 HCV 人群与健康人群发现 rs8099917G 为 HCV 感染的风险等位基因,这都与本研究得出的结论一致,即 rs8099917T 等位基因在 HCV 人群中的分布低于健康人群,T 等位基因可能为 HCV 感染的保护性基因。日本学者^[8]发现 rs8099917 与日本 HCV 感染者疗效的关联性强于 rs12979860。进一步研究^[12]发现,HCV 易感性研究同样涉及 IL-28B SNP 位点,这表明 HCV 易感性与抗病毒治疗清除涉及同样的遗传背景,而相比 rs12979860 而言,rs8099917 似乎更适用于亚洲人群^[10]。

此外,rs12979860 在维吾尔族 HCV 慢性感染人群与其他种族的对比分析中发现,维吾尔族慢性 HCV 患者 rs12979860TT 型明显低于东亚人群,与欧洲人群^[2]的基因型频率相近,在健康人群的研究^[7]中显示 rs12979860 分型显示东亚人 C 等位基因频率达 92%,欧洲人群中 70%;而维吾尔族人群为 78%,同样介于东亚人群和欧洲人群之间。还比较了维吾尔族 rs8099917 基因型与其他种族分布的差异,维吾尔丙型肝炎患者 rs8099917 基因型分布与中国汉族^[6]、日本人群^[8]相似,保护基因型频率低于台湾^[9]、韩国^[7]和中国汉族人群^[6]。然而在欧洲丙型肝炎患者中,TT 基因型频率仅为 58%^[11]。rs8099917 T 等位频率^[12]在维吾尔族人群达到 93%、亚洲人为 92%、欧洲人为 83%。可见,维吾尔族人群保护性基因型频率高于白种人,与东亚人群相当,维吾尔族人群和东亚人群的 HCV 易感性要低于欧洲人群,这种现象也许可以在某种程度上解释亚洲人群 HCV 患者抗病毒治疗应答效果好于白种人^[13]。

对 IL-28B 位点的多态性与 HCV 病毒核酸的关系进行了研究,对基因 lb 型的 HCV 患者进行分析

显示 CC 基因型患者中 HCV 载量明显高于 CT/TT 基因型患者,而对感染 HCV 基因型 2a 型的患者进行分析尚未发现有差异。本研究中显示携带 rs12979860 非 CC 基因型的患者,HCV 病毒载量低于携带 CC 基因型的患者,这可能是由于维吾尔族 HCV 感染者大多为 1b 型有关。但实验中并未对 HCV 基因分型进行研究,故结论尚需要进一步调查和证实。有研究^[14]证实 HCV 感染后的各项生化指标和细胞炎症证明与 IL-28B 基因型可能有关,研究^[15]中报道了携带有 CC 基因型的人群有更高的低密度脂蛋白胆固醇和总胆固醇水平,但本研究中发现并未发现上述关联。

参考文献

- [1] World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/zh/> (2011).
- [2] Ge D, Fellay J, Thompson A J, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance [J]. *Nature* 2009, 461 (7262):399–401.
- [3] Thomas D L, Thio C L, Martin M P, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus [J]. *Nature*, 2009, 461 (7265):798–801.
- [4] 王东生, 潘煜, 牛俊奇, 等. IL-28B 基因变异与丙型肝炎的易感性及其自然清除的关系 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2010, 26 (5):496–9.
- [5] 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12 (4):194–8.
- [6] 米寅, 高英堂, 焦晓磊, 等. IL-28B 基因多态性与丙型肝炎易感性的关系 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21 (2):182–7.
- [7] Lyoo K, Song M J, Hur W, et al. Polymorphism near the IL28B gene in Korean hepatitis C virus-infected patients treated with peg-interferon plus ribavirin [J]. *J Clin Virol* 2011, 52(4):363–6.
- [8] Ochi H, Maekawa T, Abe H, et al. IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy-fine-mapping and replication study in Asian populations [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(5):1071–81.
- [9] Chen J Y, Lin C Y, Wang C M, et al. IL-28B genetic variations are associated with high sustained virological response (SVR) of interferon- α plus ribavirin therapy in Taiwanese chronic HCV infection [J]. *Genes Immun*, 2011, 12(4):300–9.
- [10] Ghany M G, Strader D B, Thomas D L, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update [J]. *Hepatology*, 2009, 49(4):1335–74.
- [11] Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(4):1338–45.
- [12] 何登明, 王宇明. 丙型肝炎病毒感染与 IL28 B 多态性遗传关联研究进展 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2012, 5(5):313–7.
- [13] Imazeki F, Yokosuka O, Omata M. Impact of IL-28B SNPs on control of hepatitis C virus infection: a genome-wide association study [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, 8(5):497–9.
- [14] Abe H, Ochi H, Maekawa T, et al. Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients [J]. *J Hepatol* 2010, 53(3):439–43.
- [15] Li J H, Lao X Q, Tillmann H L, et al. Interferon-lambda genotype and low serum low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C infection [J]. *Hepatology* 2010, 51(6):1904–11.

Genetic polymorphisms of interleukin-28B associated with susceptibility to hepatitis C virus infection

Liu Xiang^{1,2}, Zhang Jinying², Zhang Yongping², et al

(¹The Affiliated Xinjiang Hospital of Anhui Medical University, Urumchi 830001;

²People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumchi 830001)

Abstract Objective To study the association between interleukin-28B (IL-28B) single nucleotide polymorphism and susceptibility to hepatitis C virus (HCV) infection in Xinjiang Uyghur population. **Methods** In this study, the IL-28B rs8099917 and rs12979860 locus were genotyped in 180 patients infected with HCV and 150 healthy controls using the method of direct gene sequencing. To analyze the differences of SNPs genotypes and allele frequencies in two groups, SPSS 13.0 was used. **Results** ① TT and TG/GG genotype frequencies of rs8099917 differed significantly between patients with chronic HCV and healthy controls ($\chi^2 = 11.627$, $P = 0.001$, $OR = 1.363$, 95% $CI: 1.107 \sim 1.591$). Patients with HCV infection had a higher G allele frequency than healthy controls ($\chi^2 = 7.011$, $P = 0.008$, $OR = 0.658$, 95% $CI: 0.512 \sim 0.905$). ② rs12979860 polymorphisms was not significantly associated with the susceptibility to HCV infection in Xinjiang Uyghur population. **Conclusion** The IL-28B rs8099917 gene polymorphism correlates with susceptibility to HCV infection in Uyghur patient. G allele is associated with a higher risk of HCV infection.

Key words interleukin-28B; hepatitis C; gene polymorphisms; susceptibility