

· 临床论著 ·

白细胞介素-28B 基因多态性与新疆维吾尔族 HCV 感染的易感性研究

刘祥^{1,2} 张永萍¹ 张金颖¹

【摘要】目的 探讨白细胞介素-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型肝炎患者作为HCV组, 155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、肝功能和血脂水平等进行分析。**结果** rs8099917在HCV组和健康对照组中TT和TG/GG基因型频率在新疆维族HCV组与健康对照组中差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 11.627$, $P = 0.001$, $OR = 1.363$, 95%CI: 1.107~1.591); 两组间G等位基因率差异显著, HCV组中占13.3%, 健康对照组7.0% ($\chi^2 = 7.011$, $P = 0.008$, $OR = 0.658$, 95%CI: 0.512~0.905)。患者HCV RNA和肝功能血脂差异与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IL-28B rs8099917基因多态性有关联, rs8099917中等位基因G是新疆维族HCV患者的易感基因。

【关键词】 白细胞介素-28B; 病毒性肝炎, 丙型; 基因多态性; 易感性

Genetic polymorphisms of interleukin-28B associated with susceptibility to hepatitis C virus infection in Xinjiang Uighur population Liu Xiang^{1,2}, Zhang Yongping¹, Zhang Jinying¹. ¹People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumchi 830001, China; ²The Affiliated Xinjiang Hospital of Anhui Medical University, Urumchi 830001, China

Corresponding author: Liu Xiang, Email: liuxiang0113@sina.com

【Abstract】Objective To study the association between interleukin-28B (IL-28B) single nucleotide polymorphism and susceptibility to hepatitis C virus infection in Xinjiang Uighur population. **Methods** The IL-28B rs8099917 locus was genotyped in 180 patients infected with HCV and 150 healthy controls using the method of direct gene sequencing. The differences of SNPs genotypes and allele frequencies in the two groups were analyzed by statistics. The association between SNPs genotypes and allele frequencies and HCV RNA, liver function and blood lipid of chronic HCV were analyzed, respectively. **Results** 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: 1.107-1.591). 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: 0.512-0.905). **Conclusions** The IL-28B rs8099917 gene polymorphism correlates with susceptibility to HCV infection in Uighur patient. G allele is associated with a higher risk of HCV infection.

【Key words】 Interleukin-28B; Hepatitis C; Gene polymorphisms; Susceptibility

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, 发明了抗-HCV检测技术并用于筛选供血者, 从而使通过静脉输血感染丙型肝炎的人数明显下降。但是, 2011年全球

仍有大约1.3亿~1.7亿HCV慢性感染者^[1], 是导致肝硬化和肝癌的主要病因。2009年, 国外科学家研究报道了HCV感染者的白细胞介素-28B (interleukin-28B, IL-28B) (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^[2]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单核苷酸多态性与HCV的易感性最强^[2-3]。国内文献报道了汉族人群IL-28B基因多态性

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.05.009

基金项目: 新疆维吾尔自治区人民医院内科科研项目 (No. 20130304; No. 20130202)

作者单位: 830001 乌鲁木齐市, 新疆维吾尔自治区人民医院感染科¹; 830001 乌鲁木齐市, 安徽医科大学新疆临床学院²

通讯作者: 刘祥, Email: liuxiang0113@sina.com

与HCV易感性密切相关^[4],但是新疆维族人群HCV易感性是否与IL-28B基因多态性有关尚未见报道,该研究选取新疆维族HCV感染者和维族健康对照组,检测IL-28B基因rs8099917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、肝功能水平以及血脂的影响,探讨新疆维吾尔族HCV感染的影响因素。

资料与方法

一、病例资料

选择2010至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与HCV病毒核酸均为阳性。选择年龄、性别和体重指数等无差别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患者或其他感染性疾病患者,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。

二、方法

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(正向5'-ACTTGTTCCTTGTAAGATTCCA-3';

反向5'-AACCCACCTCAAATTATCCT-3'), 50 μl PCR反应体系: 2 × Taq PCR mix 25 μl, 10 μmol/L上下游引物各1 μl, 模板1 μl, 超纯水补足至50 μl。所用试剂购自北京鼎国生物工程公司。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s以及72 °C延伸20 s共35个循环; 然后72 °C延伸10 min, 最后4 °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。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 或中位数(四分位距)表达,中位数(四分位距)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,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、研究对象一般资料的比较

两组患者在性别、年龄和体重指数差异均无统计学意义,见表1。患者基线时HCV RNA、肝功能和血脂,见表2。

二、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哈迪温伯格遗传平衡定律($\chi^2 = 1.388$, $P = 0.239$; $\chi^2 = 3.022$, $P =$

表1 HCV组与健康对照组的一般资料

组别	例数	男性[例(%)]	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	BMI (kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)
HCV组	180	133 (74.3)	43.5 ± 11.8	23.4 ± 3.5
健康对照组	150	110 (73.9)	42.3 ± 12.2	23.1 ± 3.2
χ^2 值		0.417	-0.037	0.160
P值		0.663	0.971	0.716

表2 两组受试者基线时的HCV RNA、肝功能和血脂等生化指标[中位数(四分位距)]

组别	例数	HBV DNA (log ₁₀ IU/ml)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
HCV组	180	4.94 ± 1.70	85.4 (68.2)	62.9 (54.5)	1.5 (0.8)	4.8 (1.1)
健康对照组	150	—	31.7 (28.5)	27.6 (22.8)	1.3 (0.7)	4.9 (1.2)
统计量			$t = 25.302$	$\chi^2 = 19.813$	$\chi^2 = 1.097$	$\chi^2 = 0.997$
P值			< 0.001	< 0.001	0.274	0.461

0.082), 具有人群代表性, 见表3。

三、PCR产物电泳结果

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。

四、rs8099917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明显 ($\chi^2 = 7.011$ 、 $P = 0.008$), 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3。

五、中国维吾尔族HCV慢性感染者rs8099917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汉族人群、韩国朝鲜族人群、中国汉族人群、中国维吾尔族人群、日本大和族人群、欧洲高加索人群, 维吾尔族人群TT型与东亚人群较为接近, 高于欧洲人群, 见表4。

六、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



注: M: Marker; 1: 空白对照; 2~8: 阳性性检测样本

图1 PCR产物电泳图

表3 rs8099917位点基因型的判定和等位基因频率在两组间的分布 [例 (%)]

项目	例数	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)	312/360 (86.7)	48/360 (13.3)
健康对照组	150	135 (90.0)	9 (6.0)	6(4.0)	279/300 (93.0)	21/300 (7.0)
OR (95%CI)		1.363 (1.107 ~ 1.591)			0.658 (0.512 ~ 0.905)	
χ^2 值				11.627		7.011
P 值				0.001		0.008

表4 中国维吾尔族慢性肝炎患者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		
中国汉族人群	84.8	14.8	0.4	2.580	0.108
韩国朝鲜族人群	86.2	12.3	1.5	3.249	0.071
日本大和族人群	70.4	28.2	1.4	0.913	0.339
欧洲高加索人群	58.0	37.0	5.0	7.327	0.007
中国台湾汉族人群	89.6	10.3	0.1	6.945	0.008
中国维吾尔族人群	75.6	22.2	2.2	—	—

HCV组中对rs8099917分析发现, TT纯合子中的HCV RNA高于非TT型的人群, 二者差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 4.253$, $P = 0.032$); 分组比较中ALT、AST以及血脂差异均无统计学意义。

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的威胁^[1]。研究表明, 宿主因素可能在HCV感染发展过程中非常大的作用, 包括感染年龄、性别、体重指数、种族以及宿主基因等^[6]。近年有研究显示, 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^[2-3]。宿主遗传差异是HCV感染后转归的一个重要因素, 约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型肝炎^[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等^[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型基因被认为保护性基因, Thomas等^[3]研究验证了rs12978860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等^[7]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等^[8]在日本人群中发现HCV感染者rs8099917T等位基因显著低于健康人群; 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。日本学者发现rs8099917与日本HCV感染者疗效的关联性强于rs12979860^[8]。进一步研究发现,HCV易感性研究同样涉及IL-28B SNP位点^[10],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]。本研究也证实了rs8099917位点在维吾尔族健康人群和HCV感染人群中具有差异性。

此外,维吾尔族rs8099917基因型与其他种族分布具有差异,维吾尔丙型肝炎患者rs8099917基因型分布与中国汉族^[9]、日本大和族人群^[8]相似,保护基因型频率低于台湾汉族人群^[11]、韩国朝鲜族人群^[12]和中国汉族人群^[9]。然而在欧洲丙型肝炎患者中,TT基因型频率仅为58%^[7]。rs8099917 T等位频率^[10]在维吾尔族人群达到93%、中国汉族人群为92%、欧洲高加索人群为83%。可见,维吾尔族人群保护性基因型频率高于高加索人群,与汉族人群相当,维吾尔族人群和汉族人群的HCV易感性要低于欧洲高加索人群,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优于白种人^[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1b型的HCV患者进行分析显示TT基因型患者中HCV载量显著高于非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。研究中显示,携带rs8099917非TT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。

HCV感染后的各项生化指标和细胞炎症可能与IL-28B基因型有关^[14],Li等^[15]研究中报道了携带有TT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。对血脂等生化指标的研究更有助于HCV的防治,有研究表明,脂质代谢在丙型肝炎病毒感染中具有重要作用,胆固醇水平高的患者往往对于干扰素治疗应答效果要好于胆固醇水平低的患者^[15]。IL-28B基因多态性与肝纤维化的研究也有报道,其中有研究发现携带非保护性基因(非CC或非TT)患者已被证明出现HCV相关的肝硬化和更严重的纤维化的风险更高^[15-16],但Marabita等^[17]考虑HCV感染的时间后,这种关联就不存在了。

本研究选取了健康对照组与慢性丙型肝炎组进行对照,此前关于这两组对照研究的较少,最终得到维

族HCV感染易感性相关的等位基因。总之,IL-28B基因多态性与维吾尔族慢性丙型肝炎感染的易感性相关,G等位基因可能增加HCV持续感染的风险,这些发现可能有助于预测维吾尔族HCV感染的风险,使部分易感人群在一定程度上加强对HCV的预防。IL-28B在抗HCV感染中的具体机制仍然是将来研究的重点。

参考文献

- 1 World Health Organization. Haitian health care: a follow-up[S]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/zh/>(2011).
- 2 Ge D, Fellay J, Thompson A J, et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance[J]. *Nature*,2009,461(7262):399-401.
- 3 Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL-28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus[J]. *Nature*,2009,461(7265):798-801.
- 4 谈国蕾,孙梅,王建芳,等.江苏地区汉族人群白细胞介素28B基因多态性与丙型肝炎易感性的关系[J]. *临床肝胆病杂志*,2014,30(6):514-517.
- 5 中华医学会肝病学会,中华医学会传染病与寄生虫病学分会.丙型肝炎防治指南[J]. *中华肝病杂志*,2004,12(4):194-198.
- 6 Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update[J]. *Hepatology*,2009,49(4):1335-1374.
- 7 Rauch A, Kutilik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL-28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study[J]. *Gastroenterology*,2010,138(4):1338-1345.
- 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]. *Gen Virol*,2011,92(5):1071-1081.
- 9 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):182-187.
- 10 何登明,王宇明. 丙型肝炎病毒感染与IL-28B多态性遗传关联研究进展[J]. *中华临床感染病杂志*,2012,5(5):313-317.
- 11 Chen JY, Lin Y, Wang CM, 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):300-309.
- 12 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):363-366.
- 13 Imazeki F, Yokosuka O, Omata M, et al. 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):497-499.
- 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]. *Hepatology*,2010,53(3):439-443.
- 15 Li JH, Lao XQ, Tillmann HL, 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):1904-1911.
- 16 Falletti E, Bitetto D, Fabris C, et al. Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype[J]. *J Clin Immunol*,2011,31(5):891-899.
- 17 Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection[J]. *Hepatology*,2011,54(6):1127-1134.

(收稿日期:2014-11-25)

(本文编辑:孙荣华)