

· 基础论著 ·

人白细胞抗原 DR 及肿瘤坏死因子 α 与乙型肝炎病毒慢性感染结局关系探讨

柳富会 李建忠 李长缨 王义成 李晓斐

【摘要】 目的 探讨人白细胞抗原 DR(HLA-DR)及肿瘤坏死因子 α (TNF α)与乙型肝炎病毒慢性感染结局的关系。**方法** 对 159 例 HBV 慢性感染者 HLA-DR 基因型及血清 TNF α 水平的差异及相关性进行分析,其中慢性乙型肝炎(CHB)87 例、乙型肝炎肝硬化(LC)38 例、HBV 相关肝细胞癌(HCC)34 例。HLA-DR 基因型检测采用 PCR-SSP 法,TNF α 采用 ELISA 法检测。**结果** 三组间 HLA-DR13 比较有统计学意义($P < 0.05$),LC 组和 HCC 组均高于 CHB 组($P < 0.01$),LC 组和 HCC 组间比较无统计学意义。其他 HLA-DR 基因型在三组间比较无统计学意义。三组间血清 TNF α 水平比较有统计学意义,LC 组和 HCC 组均高于 CHB 组($P < 0.01$),LC 与 HCC 间比较无统计学意义。携带 HLA-DR13 基因者与非携带者间血清 TNF α 水平比较无统计学意义。**结论** 在 HBV 慢性感染者中,HLA-DR13 基因和血清 TNF α 高水平可能是肝硬化和肝细胞癌的易发因素。

【关键词】 人白细胞抗原 DR;等位基因;肿瘤坏死因子 α ;乙型肝炎病毒

Relationship study on HLA-DR and serum levels of TNF α and the outcomes in chronic hepatitis B virus infected patients LIU Fu-hui, LI Jian-zhong, LI Chang-ying, WANG Yi-cheng, LI Xiao-fei. Qingdao Hospital of Infectious Diseases, Teaching Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266033, China

Corresponding author: LI Jian-zhong, Email: jzli531@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the relationship between HLA-DR genotypes, serum levels of TNF α and the outcomes in chronic HBV infected patients. **Methods** To analyze the difference and relationship of HLA-DR genotypes and serum levels of TNF α in 159 cases of chronic HBV infected patients, including 87 patients with chronic hepatitis B, 38 with liver cirrhosis and 34 with hepatocellular carcinoma. HLA-DR alleles were detected by PCR-SSP, serum TNF α levels were detected by ELISA assays. **Results** The frequencies of HLA-DR13 were significantly different

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.02.003

基金项目:青岛市卫生局科研指导计划项目(2005-wszd062)

作者单位:266033 青岛市,青岛大学医学院教学医院青岛市传染病医院(柳富会、李建忠、王义成、李晓斐);青岛市中心血站(李长缨)

通讯作者:李建忠,Email:jzli531@sohu.com

among the three groups ($P < 0.05$), which were significantly higher in LC and HCC groups than that in CHB group, but there were no significant differences between LC and HCC groups. Differences of the other HLA-DR genotypes among the three groups were not significant. Serum TNF α levels in LC and HCC groups were significantly higher than that in CHB group ($P < 0.01$), but no significant differences between LC and HCC group. And serum TNF α levels were not significantly different between the HLA-DR13 carriers and non-carriers in chronic HBV infected patients. **Conclusions** HLA-DR13 genotypes and high serum TNF α levels may be the susceptible factors of LC and HCC in chronic HBV infected patients.

【Key words】 Human leukocyte antigens DR; Alleles; Tumor necrosis factor α ; Hepatitis B virus

乙型肝炎病毒慢性感染可导致乙型肝炎病毒慢性携带、慢性乙型肝炎、肝硬化和肝细胞癌等差异很大的结局,不同结局的形成与病毒因素、环境因素和宿主因素等有关,但宿主因素在慢性乙型肝炎病毒感染形成中的作用最为重要。为此,笔者就 159 例慢性 HBV 感染者进行了 HLA-DR、血清 TNF α 水平的检测,并探讨二者与慢性 HBV 感染结局的关系,现报告如下。

材料与方法

一、研究对象

选择于青岛市传染病医院住院的慢性乙型肝炎病毒感染者 159 例,其中慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)87 例,乙型肝炎肝硬化(liver cirrhosis, LC)38 例,HBV 相关肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)34 例,诊断符合 2000 年西安会议制定的《病毒性肝炎防治方案》^[1],且病史均为 5 年以上。年龄在 35 ~ 65 岁之间,中位年龄为 51 岁,三组间年龄和性别比例均无统计学意义。所有患者均为山东省青岛地区汉族人,各患者间无亲缘关系。慢性乙型肝炎要求血清总胆红素低于正常值上限的两倍;ALT 80 ~ 400 U/L;肝硬化患者为 Child-Pugh B 级或 C 级;肝细胞癌患者经临床生物化学、影像学及病理学诊断明确。

二、试剂与方法

DNA 提取试剂盒为美国戴诺公司生产;Taq DNA 酶扩增试剂盒为 Promega 公司生产;HLA-DR 基因试剂盒为美国 Onelambda 公司生产;TNF α 试剂盒为美国 RapidBio 公司生产。HLA-DR 基因型采用 PCR-SSP 法检测,并根据 WHO 的 HLA 系统命名委员会规定将等位基因型转化为相应的表现型。TNF α 采用 ELISA 法检测。操作方法严格按说明书进行。

三、统计学方法

应用 Excel 软件和 SPSS 11.5 软件进行统计分析,计数资料比较采用卡方检验,计量资料比较进行秩和检验(TNF α 定量检测中有超出标准曲线范围的样品)。

结 果

一、HLA-DR 基因频率分布情况

HLA-DR 基因频率分布见表 1, 基因频率 = 基因型发生数/(组内病例总数 \times 2)。HLA-DR13 在 CHB、LC 和 HCC 三组间比较有统计学意义($P < 0.05$)。三组间进行两两比较, LC 和 HCC 组与 CHB 组比较连续校正 χ^2 值分别为 8.744 和 9.892, P 分别为 0.003 和 0.002, 具有统计学差异; LC 和 HCC 组比较 $\chi^2 = 0.023$, $P = 0.879$, 两组间比较无统计学意义; 其他 HLA-DR 基因在三组间比较无统计学意义。

表 1 慢性 HBV 感染者 HLA-DR 基因分布表

组别	DR1 (%)	DR4 (%)	DR7 (%)	DR8 (%)	DR9 (%)	DR10 (%)	DR11 (%)
CHB($n = 87$)	5(2.9)	19(10.9)	29(16.7)	11(6.3)	25(14.4)	3(1.7)	5(2.9)
LC($n = 38$)	5(6.6)	5(6.6)	11(14.5)	7(9.2)	8(10.5)	1(1.3)	5(6.6)
HCC($n = 34$)	5(7.4)	4(5.9)	14(20.6)	5(7.4)	7(10.3)	0(0)	1(1.5)
χ^2	3.107	2.392	1.230	0.716	1.309	1.188	3.318
P	0.211	0.302	0.541	0.699	0.520	0.552	0.190
组别	DR12 (%)	DR13 (%)	DR14 (%)	DR15 (%)	DR16 (%)	DR17 (%)	blank (%)
CHB($n = 87$)	30(17.2)	0(0)	10(5.7)	13(7.5)	2(1.1)	11(6.3)	11(6.3)
LC($n = 38$)	15(19.7)	3(3.9)	4(5.3)	7(9.2)	0(0)	3(3.9)	2(2.6)
HCC($n = 34$)	8(11.8)	3(4.4)	6(8.8)	7(10.3)	0(0)	3(4.4)	5(7.4)
χ^2	2.167	7.577	1.033	0.626	1.676	0.783	1.923
P	0.338	0.023	0.597	0.731	0.433	0.676	0.381

二、HBV 慢性感染者血清 TNF α 水平比较结果

CHB、LC 和 HCC 三组患者血清 TNF α 水平的中位数分别为 38.57 pg/ml、59.18 pg/ml 和 53.71 pg/ml, 四分位数间距分别为 20.11 pg/ml、28.62 pg/ml 和 39.6 pg/ml。三组间经 Kruskal-Wallis 检验: $\chi^2 = 28.971$, $P = 0.000$, 有统计学意义; 组间 Mann-Whitney 检验: LC 组高于 CHB 组($Z = 4.922$, $P = 0.000$); HCC 组高于 CHB 组($Z = 3.567$, $P = 0.000$), 均具有统计学意义; LC 与 HCC 间比较无统计学意义($Z = 0.673$, $P = 0.501$)。

三、慢性 HBV 感染者不同 HLA-DR 基因携带者的血清 TNF α 水平比较

对携带与非携带 HLA-DR13 基因患者的 TNF α 水平进行比较, 经 Mann-Whitney 秩和检验: $Z = 1.659$, $P = 0.097$, 无统计学意义。

讨 论

HBV 感染后可有多种临床表现, 包括急性乙型肝炎、慢性无症状携带者、慢性乙型肝炎和肝炎肝硬化, 甚至 HBV 相关肝细胞癌等多种结局。由于 HBV 本身并不引起感染肝细胞的病变, 但人体感染 HBV 后却能导致差别很大的疾病谱, 所以宿主对 HBV 反应的状态必定在其病理过程中发挥了关键作用。

目前研究发现 HLA-DR13 是影响 HBV 感染结局的遗传因素之一。Thursz 等^[2]对冈比亚儿童和成人急性和慢性 HBV 感染进行 HLA-DRB1 基因多态性研究发现, DRB1 * 1302 是不发生持续 HBV 感染的保护因素, 而 DRB1 * 1301 在儿童中与 HBV 慢性感染相关, 但在成人中无相关性。Höhler 等^[3]采用型特异 PCR 法检测发现, 在高加索人中 DRB1 * 1301-02 也是不发生慢性乙型肝炎的保护因素。李长缨等^[4]发现在中国北方汉族人群中 HLA-DR13 是 HBV 感染慢性化的拮抗因素。

本文通过对青岛地区不同结局的 HBV 慢性感染者检测发现, HBV 相关 LC 和 HCC 组 HLA-DR13 的发生频率显著高于 CHB 组, 但 LC 和 HCC 组间比较无统计学意义, 提示 HLA-DR13 可能是肝硬化和肝细胞癌等不良结局的易感因素。柳富会等^[5]报道健康骨髓捐献者 HLA-DR13 携带频率高于慢性乙型肝炎者, 而与 LC 和 HCC 组间携带频率比较无统计学意义, 提示 HLA-DR13 一方面有助于保护宿主不形成 HBV 慢性感染, 另一方面如果由于其他因素影响而形成 HBV 慢性感染, 则易出现肝硬化和肝细胞癌等不良结局。其机制可能是, HLA-DR13 限制了 CD4⁺ T 细胞对 HBcAg 的抗原肽具有更强的识别能力^[6], 这有利于宿主清除感染的 HBV, 但同时在已经形成 HBV 慢性感染的个体中, 由于宿主对 HBV 的强免疫应答而导致炎症持续存在, 最终可能更易于发生肝硬化和肝细胞癌。

TNF α 不仅是参与宿主抗 HBV 免疫应答的重要细胞因子之一, 而且参与肝内炎症反应和肝脏细胞损伤过程。适当水平的 TNF α 可抑制 HBV 复制和清除 HBV 感染, 但如果 TNF α 水平失调或过量分泌, 则可导致肝脏炎症持续和加重, 并使病理损伤不断进展。Zhang 等^[7]发现慢性乙型肝炎、肝硬化、肝硬化腹水三组患者中 TNF α 水平依次升高, 并且在慢性乙型肝炎组中 TNF α 含量与肝脏炎症程度呈正相关。Nagaki 等^[8]发现, 暴发型肝衰竭患者的血清 TNF α 水平显著高于急性乙型肝炎患者, 并且在肝衰竭病例中, 死亡组血清 TNF α 水平明显高于存活组。Odeh 等^[9]通过对 74 例肝衰竭肝性脑病患者的血清 TNF α 水平测定发现, 临床分级越高, 血清 TNF α 水平越高, 血清 TNF α 水平与肝性脑病严重程度呈正相关。

本文发现 HBV 相关 LC 组和 HCC 组血清 TNF α 水平均显著高于 CHB 组, 这表明血清 TNF α 水平与 HBV 感染者的临床转归存在相关性。LC 组血清 TNF α 水平略高于 HCC 组, 其原因可能与 LC 组病例选择标准有关, 本研究中选择肝硬化患者均为 Child-Pugh B 级或 C 级, 其肝脏损害均较重, 这也从另一方面表明血清 TNF α 水平与肝脏损害程度或临床转归具有相关性。

HLA 限制的免疫细胞活性决定其分泌细胞因子的水平, 如果细胞表面 HLA 分子表达低下或不表达, 则不能有效地提呈病毒抗原肽活化的免疫应答细胞, 从而分泌的细胞因子包括 TNF α 等, 也将呈低水平。同时, TNF α 可增强 HBV 感染肝细胞表面 HLA 分子的表达水平, 增强对感染细胞的免疫识别和免疫应答。这表明 HLA 和 TNF α 等因素在对 HBV 感染的免疫应答过程中是共同参与、相互影

响的,为此本研究对携带与非携带 HLA-DR13 基因的慢性 HBV 感染者血清 TNF α 水平进行比较,但未发现有统计学意义,可能受其他因素影响而使其差异不明显,也可能与本研究的样本量较小有关。因此,尚需大样本多因素的进一步研究以揭示其相互间的关系。

参 考 文 献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志,2000,8:324-329.
- 2 Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, et al. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. N Engl J Med,1995,332:1065-1069.
- 3 Hühler T, Gerken G, Notghi A, et al. HLA-DRB1 * 1301 and * 1302 protect against chronic hepatitis B. J Hepatol,1997,26:503-507.
- 4 李长缨,赵林,李建忠,等. 中国北方汉族人 HLA- I、II 类基因与 HBV 水平感染及预后相关性研究. 中国输血杂志,2005,18:459-463.
- 5 柳富会,李建忠,李长缨,等. HLA-DR 基因与乙型肝炎病毒慢性感染结局的相关性. 中国医疗前沿,2008,3:25-26.
- 6 Romero R, Lavine JE. Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. Hepatology,1996,23:17-23.
- 7 Zhang W, Yue B, Wang GQ, et al. Serum and ascites levels of macrophage migration inhibitory factor, TNF α and IL-6 in patients with chronic virus hepatitis B and hepatitis cirrhosis. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2002,1:577-580.
- 8 Nagaki M, Iwai H, Naiki T, et al. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor- α are associated with fatality in fulminant hepatitis. J Infect Dis,2000,182:1103-1108.
- 9 Odeh M, Sabo E, Srugo I, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. Liver Int,2004,24:110-116.

(收稿日期:2009-03-16)

(本文编辑:孙荣华)

柳富会,李建忠,李长缨,等. 人白细胞抗原 DR 及肿瘤坏死因子 α 与乙型肝炎病毒慢性感染结局关系探讨[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(2):133-137.