

IL-10R 基因多态性与乙型肝炎病毒感染慢性化的相关性

郑 亢 郜玉峰 潘高峰 殷宏娟 邹桂舟

摘要 目的 探讨 IL-10R 基因多态性与乙型肝炎病毒 (HBV) 感染后慢性化的相关性。方法 收集 501 例慢性 HBV 感染患者和 301 例急性自限性 HBV 感染患者外周血标本, 两组患者的年龄、性别和地区来源均相互匹配。Snapshot 方法检测 IL-10R 两个 tag SNP (rs2228055、rs2256111) 的基因型; χ^2 检验用于比较两组间基因型及等位基因频率分布。结果 IL-10R 基因 rs2228055、rs2256111 多态等位基因和基因型频率在两组中的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。IL-10R 基因 rs2228055 位点 G/G 基因型频率 (7.2%) 明显低于急性自限性 HBV 感染患者 (13.0%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); GG 基因型在 HBV 感染慢性化的风险是 AG + AA 基因型的 0.52 倍 ($OR = 0.52$, 95% $CI: 0.32 \sim 0.84$)。结论 IL-10R rs2228055 位点 GG 基因型在 HBV 感染后的慢性化中发挥保护作用。

关键词 乙型肝炎病毒; 单核苷酸多态性; IL-10R; 易感性

中图分类号 R 512.6 + 3

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2015)05 - 0632 - 03

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染慢性化的原因非常复杂, 除与 HBV 的变异、宿主的年龄、性别和免疫状态有密切关系外, 遗传基因的多态性可能是导致 HBV 感染慢性化的另一个重要原因^[1]。HBV 感染后, 机体对病毒的清除能力与机体的免疫功能密切相关, 而病毒的清除与否决定着疾病的转归和预后^[2]。白细胞介素 10 受体 (interleukin-10 receptor, IL-10R) 是重要免疫调节基因, 通过其配体 IL-10 参与免疫负性调节, 在免疫反应中发挥抗炎的作用, 从而维持机体内部免疫平衡^[3-4]。最新的研究^[5]显示 IL-10R 多态性与泰国人群 HBV 的易感性相关。由于不同人种存在遗传异质性, 且目前尚未见 IL-10R 基因多态性与汉族慢性 HBV 感染相关性研究报道。该研究选取 IL-10R 基因为候

选基因, 探讨 IL-10R 基因 rs2228055、rs2256111 多态位点与 HBV 感染的遗传关联性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究收集了安徽医科大学第二附属医院肝病科门诊和住院的患者, 无血缘关系的汉族人。慢性乙型肝炎患者 501 例, 男 284 例, 女 217 例, 年龄 19 ~ 65 (45.8 ± 14.9) 岁, 自愈性乙型肝炎病毒感染者 301 例, 其中男 166 例, 女 135 例, 年龄 19 ~ 69 (44.3 ± 15.8) 岁。患者的临床资料如表 1 所示。慢性乙型肝炎患者为有乙型肝炎病史或 HBsAg 阳性超过 1 年, 血清 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 阳性者, 1 年内连续随访 4 次以上均显示谷丙转氨酶和谷草转氨酶均在正常范围内。自愈性乙型肝炎病毒感染者为无乙肝疫苗接种史, HBsAg 阴性, 血清抗-HBs、血清抗-HBc 阳性者, 谷丙转氨酶和谷草转氨酶均在正常范围内。诊断符合国际慢性乙型肝炎诊断标准。该研究得到了安徽医科大学伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 实验步骤 用抗凝的外周血标本 2 ml 提取基因组 DNA, 通过 PCR 扩增目的基因, PCR 产物分离纯化, 采用 Snapshot 延伸反应, 然后进行测序、分析。IL-10R 基因 SNP 位点的选择: 根据 HapMap 数据中的信息, 选择 TagSNP 中 $r^2 > 0.8$, 微等位基因 $MAF > 0.1$, 可能发挥功能的 SNP 作为候选的 SNP 位点。本研究选择了 rs2228055、rs2256111 位点。

1.2.2 PCR 引物的设计、扩增及基因分型 PCR 扩增 SNP 位点所用是通过 primer primer5.0 设计, 于上海生工科技生物公司合成, rs2228055 上游引物: 5'-TGTCCGTGTGCCATGAAATAAAA-3', 下游引物: 5'-CTGAGAGCAGCCCAGCTGAC-3'; rs2256111 上游引物: 5'-CCTCCTCAGCCCTCAAGTCTCA-3', 下游引物: 5'-GGGAACCCCATACCGTGAAGTT-3'。PCR 产物通过延伸引物进行基因分型, rs2228055 位点延伸引物为 CACTGCCTGGTGAGGGAGA, rs2256111 位点延伸引物为 TTTTGGCCCAAGATGGCCCCCGC。

2015 - 02 - 09 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81273142)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院肝病科, 合肥 230601

作者简介: 郑 亢, 女, 硕士研究生;

邹桂舟, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

ayzouguizhou@sina.com

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 进行统计学分析。本研究两组患者的年龄等计量资料运用 t 检验, 基因型及等位基因的比较及 Hardy-Weinberg 平衡检测均运用 χ^2 检验或是 Fisher 确切概率法, 基因型及等位基因的比较运用 Bonferroni 校正, 单倍体由 SHEsis 统计软件分析。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检测 IL-10R 基因 rs2228055、rs256111 多态位点的基因型及等位基因在两组患者中的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。两组患者的年龄、性别差异均无统计学意义。

2.2 两组患者 IL-10R 基因多态位点基因型及等位基因的比较 IL-10R 基因 rs2228055、rs256111 多态位点的基因型及等位基因频率情况见表 1。rs2228055 位点 GG 基因型在慢性 HBV 感染患者中显著低于自限性 HBV 感染患者 ($OR = 0.52$, 95% $CI: 0.32 \sim 0.84$)。rs2228055 位点 GA 基因型及 rs2256111 位点 GA 基因型在慢性 HBV 感染患者中有升高的趋势, 但经 Bonferroni 校正后两组患者之间差异无统计学意义。两个多态位点的其他基因型与等位基因在两组患者中差异均无统计学意义。

表 1 两组患者 IL-10R 的基因型及等位基因的频率比较 [n (%)]

位点	慢性 HBV 感染患者($n=501$)	自限 HBV 感染患者($n=301$)	χ^2 值	P 值	P_c 值	$OR(95\% CI)$
rs2228055						
AA	250(49.9)	155(51.5)	0.191	0.662	NS	0.94(0.71-1.24)
GA	215(42.9)	107(35.5)	4.246	0.039	NS	1.36(1.02-1.83)
GG	36(7.2)	39(13.0)	7.388	0.007	0.028	0.52(0.32-0.84)
A	715(71.4)	417(69.3)	0.790	0.374	NS	1.11(0.89-1.38)
G	287(28.6)	185(30.7)	0.790	0.374	NS	0.91(0.73-1.13)
rs2256111						
AA	53(10.6)	47(15.6)	4.369	0.037	NS	0.64(0.42-0.98)
GA	231(46.1)	114(37.9)	5.201	0.023	NS	1.40(1.05-1.88)
GG	217(43.3)	140(46.5)	0.779	0.378	NS	0.88(0.66-1.17)
A	337(33.6)	208(34.6)	0.707	0.085	NS	0.96(0.78-1.19)
G	665(66.4)	394(65.4)	0.707	0.085	NS	1.04(0.84-1.29)

NS: 差异无统计学意义

2.3 两组患者的单倍体比较 两个多态位点通过 SHEsis 软件进行单倍体构建, 两组患者单倍体类型的比较见表 2。结果显示, 两个多态位点构成的单倍体在两组之间差异均无统计学意义。

3 讨论

HBV 感染人体后, 由于机体对病毒的清除能力

表 2 慢性乙型肝炎患者和自限性肝炎患者的 IL-10R 单倍体频率比较 (n)

单倍体	慢性 HBV 感染患者	自限 HBV 感染患者	χ^2 值	P_c 值	$OR(95\% CI)$
AA	51	25	0.747	0.387	1.24(0.76-2.02)
AG	664	394	0.131	0.718	1.04(0.84-1.29)
GA	286	183	0.609	0.435	0.92(0.73-1.14)

不同, 会导致不同的转归。若免疫功能低下或是免疫缺陷, 不能彻底地清除病毒, 病毒潜伏于肝脏, 经过长期的免疫耐受期的沉寂后开始发病, 即导致慢性乙型肝炎^[1]。在我国, 慢性乙型肝炎的患者人数众多, 发病率较高, 且目前尚无特效的治疗方式, 主要是抗病毒及对症治疗。慢性乙型肝炎的发病机制复杂, 免疫和遗传因素参与其发病。多种免疫相关基因多态与 HBV 的遗传易感性相关, 这些基因在 HBV 感染的预后过程中发挥着重要作用。IL-10、GTP 结合核蛋白等多种基因的多态性与慢性乙型肝炎显著相关, 而已发现的基因只能解释慢性乙型肝炎的易感性^[3,6]。基于遗传、免疫因素的共同作用, 因此免疫相关的基因与慢性 HBV 感染的遗传易感性研究是当前研究的热点。本研究结果表明 IL-10R 基因 rs2228055 位点 GG 基因型与慢性乙型肝炎显著相关; 而 rs2228055 位点 GA, rs2256111 位点 GA 和 AA 基因型在慢性 HBV 感染中有升高趋势, 经校正后与疾病无相关性; 单倍体未发现与该病存在相关性。研究^[6-9]表明, rs2228055 位点与慢性丙型肝炎和早期溃疡性结肠炎显著相关; 而 rs2256111 位点在韩国人群中与高血压及前列腺肥大相关。这些不同的结果可能是由于不同的种族在遗传上具有异质性所致, 不同疾病存在不同的遗传易感性位点。

IL-10 是重要的抗炎因子, 主要由调节 T 细胞、巨噬细胞和 Th2 细胞分泌的, IL-10 发挥抗炎及免疫调节作用是通过与其配体 IL-10R 结合^[2,4]。在 HBV 感染的患者中, IL-10 的表达水平明显增加。IL-10 及 IL-10R 的基因多态性是炎症性疾病研究的热点, 这些基因某些单核苷酸的多态性可能影响基因的表达或是功能, 从而调控免疫反应。本研究显示, IL-10R 基因 rs2228055 多态位点 GG 基因型在慢性乙型肝炎患者中显著降低, 在该病中发挥保护作用。根据该多态位点的位于 IL-10R 基因的外显子区段, IL-10R 基因的 rs2228055A/G 位点会导致氨基酸合成的改变: 异亮氨酸和缬氨酸。当此位点等位基因为 A 碱基时, 该位点编码的氨基酸为异亮氨

酸;而当该位点等位基因为 G 碱基时,编码的氨基酸为缬氨酸。由此可知,此位点的多态性导致了氨基酸的改变,进而影响 IL-10R 基因的表达或功能。在此基础上,可推测 IL-10R 基因的 rs2228055A/G 位点对疾病的影响:可能因为该多态位点通过改变编码的氨基酸影响 IL-10R 的功能及表达水平,进而引起免疫平衡打破,机体清除 HBV 能力的改变,从而影响疾病的发生。

同其他的病例对照研究一样,本文的不足之处主要有以下几个方面^[10]:首先,在于患者仅来自于汉族人群,需要其他多种族、大样本的标本验证。其次,没有对本研究显示的与 HBV 感染慢性化相关的多态位点 rs2228055 进行功能研究。

参考文献

- [1] Kim B K, Kim H S, Yoo E J, et al. Risk assessment of clinical outcomes in asian patients with chronic hepatitis B using enhanced liver fibrosis test [J]. *Hepatology* 2014, 60(6): 27389-95.
- [2] Fung J, Lai C L, Yuen M F. Hepatitis B virus DNA and hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 8(6): 717-26.
- [3] 刘娟娟,高英堂,杜智,等. IL-10 基因启动子区单核苷酸多态性与乙型肝炎病毒感染后疾病转归的关系 [J]. *世界华人消化杂志* 2010, 18(16): 1656-63.

- [4] Dimitropoulou D, Karakantza M, Theodorou G L, et al. Serum cytokine profile in patients with hepatitis B antigen-negative chronic active hepatitis B and inactive hepatitis B virus carriers [J]. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2013, 4(1): 24-7.
- [5] Romporn S, Hirankarn N, Tangkijvanich P, et al. Association of IFNAR2 and IL-10RB genes in chronic hepatitis B virus infection [J]. *Tissue Antigens* 2013 82(1): 21-5.
- [6] 孟金凤,李佩尧,张红星,等. RAN 基因多态性与广西人群乙型肝炎病毒相关肝细胞癌的遗传关联研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2012 47(9): 1070-4.
- [7] Moran C J, Walters T D, Guo C H, et al. IL-10R polymorphisms are associated with very-early-onset ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2013, 19(1): 115-23.
- [8] Yoo K H, Kim S K, Chung J H, et al. Association of IL-10, IL-10RA, and IL-10RB polymorphisms with benign prostatic hyperplasia in Korean population [J]. *J Korean Med Sci* 2011 26(5): 659-64.
- [9] Park H K, Kim D H, Yun D H, et al. Association between IL-10, IL-10RA, and IL-10RB SNPs and ischemic stroke with hypertension in Korean population [J]. *Mol Biol Rep* 2013 40(2): 1785-90.
- [10] Zhou H, Jiang Z, Yang P, et al. Polymorphisms of IL23R and Fuchs' syndrome in a Chinese Han population [J]. *Mol Vis*, 2010, 16(275-76): 2585-9.

Association between IL-10R gene polymorphisms and spontaneous clearance of hepatitis B virus infection

Zheng Kang, Gao Yufeng, Pan Gaofeng, et al

(Dept of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To examine whether IL-10R polymorphisms were associated with susceptibility to chronic hepatitis B virus (HBV) infection in a Chinese Han population. **Methods** A total of 501 chronic HBV-infected patients as cases and 301 age-, sex-, and ethnically matched self-limiting HBV-infected individuals as controls were recruited in this study. Two tag SNPs (rs2228055 and rs2256111 of IL-10R) were genotyped in all subjects by using Snapshot method. The frequencies of alleles and genotypes between the two groups were analyzed by χ^2 analysis. **Results** All genotype and allele distributions in patients with C-HBV and patients with SL-HBV were in Hardy-Weinberg equilibrium. The frequency of the rs2228055 GG genotype (7.2%) was significantly decreased in patients with C-HBV as compared to SL-HBV patients (13.0%). In patients with chronic HBV infection, the risk of GG genotype in patients is 0.52 times of that of the AG, AA genotypes patients ($OR = 0.52$, 95% $CI: 0.32 \sim 0.84$). **Conclusion** In this study, the results suggest that the rs2228055 GG genotype of IL-10R is associated with the susceptibility to chronic HBV infection in the Chinese Han population.

Key words hepatitis B virus; single polymorphism; interleukin-10 receptor; gene susceptibility