

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.016

文章编号: 1005-8982(2016)15-0087-04

论著

肿瘤坏死因子 - α 基因多态性与中国汉族 人群乙肝病毒感染的相关性研究*

刘丽军

(西藏民族大学医学院, 陕西 咸阳 712082)

摘要: **目的** 探讨中国汉族人群肿瘤坏死因子 - α (*TNF- α*) 基因单核苷酸多态性 (rs1800629 和 rs361525) 与乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的相关性。 **方法** 用 TaqMan 探针对纳入的 1 097 例样本进行 *TNF- α* 、rs1800629 和 rs361525 位点多态性检测, 血样本包括 429 例慢性 HBV 感染者 (CH 组)、429 例乙肝感染后自发清除者 (SR 组) 及 239 例健康对照者 (HC 组)。 **结果** ① CH 组与 SR 组比较, rs1800629 GA 基因型与 G 等位基因与感染后病毒的自发清除有关 [基因型: $\hat{O}R=0.369, P=0.000$; 等位基因: $\hat{O}R=2.210, P=0.000$; 显性模型 (GG vs GA+AA): $\hat{O}R=0.536, P=0.000$]。 ② CH 组与 SR 组比较, SNP rs361525 GA 基因型或 A 等位基因与感染后病毒的自发清除密切相关 [基因型: $\hat{O}R=0.288, P=0.000$; 等位基因: $\hat{O}R=0.549, P=0.000$; 显性模型 (GG vs GA+AA): $\hat{O}R=0.634, P=0.000$]。 **结论** *TNF- α* 基因多态性与中国汉族人群 HBV 病毒感染后的自发清除密切相关。

关键词: 乙型肝炎; 单核苷酸多态性; 肿瘤坏死因子 - α 基因

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

Association between *TNF- α* gene polymorphisms and chronic hepatitis B virus infection*

Li-jun Liu

(Medical College of Xizang Minzu University, Xianyang, Shannxi 712082, China)

Abstract: Objective To assess the relation between two single nucleotide polymorphisms (rs1800629 and rs361525) of *TNF- α* gene and the outcomes of HBV infection in Chinese Han population. **Methods** *TNF- α* (rs1800629 and rs361525) was genotyped by TaqMan probe method in 1,097 subjects, including 429 patients with chronic HBV infection (CH), 429 HBV spontaneous clearance subjects (SR) and 239 healthy control individuals (HC). **Results** rs1800629 GA genotype and G allele showed significant protective effect on HBV spontaneous clearance [CH vs SR: genotype: $\hat{O}R = 0.369, P = 0.000$; allele: $\hat{O}R = 2.210, P = 0.000$; dominant model (GG vs GA+AA): $\hat{O}R = 0.536, P = 0.000$]. SNP rs361525 showed a significant association with HBV spontaneous clearance. The rs361525 GA genotype and A allele played a protective role [CH vs SR: genotype: $\hat{O}R = 0.288, P = 0.000$; allele: $\hat{O}R = 0.549, P = 0.000$; dominant model (GG vs GA+AA): $\hat{O}R = 0.634, P = 0.000$]. **Conclusions** *TNF- α* gene polymorphisms are associated with HBV spontaneous clearance.

Keywords: hepatitis B; single nucleotide polymorphism; tumor necrosis factor- α gene

慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是我国面临的一个严峻的卫生问题。尽管大部分

收稿日期: 2016-01-06

* 基金项目: 西藏自治区科技厅重点项目 (No: Z2014A09G2-3); 西藏自治区科技厅项目 (No: 2015ZR-13-19)

的感染者能自发清除病毒,但仍有约 5%~10%的感染者发展为慢性感染^[1]。半数以上慢性 HBV 感染患者病情稳定,可表现为无症状携带或轻度慢性肝炎。部分患者则会进展为肝硬化或肝癌等严重的肝病^[2]。影响 HBV 感染结局的因素主要是宿主、病毒及环境 3 大因素,越来越多的证据表明宿主遗传因素在慢性 HBV 感染中发挥重要作用^[3]。

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)作为一种重要的细胞因子,被证实参与 HBV 病毒清除的过程^[4]。近年来有报道称,TNF- α 启动子区单核苷酸多态性位点 rs1800629 与 rs361525 与 HBV 慢性感染有关^[5-7],但结论不一致。因此,本研究通过病例对照方法来探讨 TNF- α 启动子区基因多态性(rs1800629 和 rs361525)与乙型肝炎病毒感染结局的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 1 月-2015 年 6 月就诊于西藏民族大学附属医院的无血缘关系的患者。其中包括正常对照组(HC 组)、自发清除组(SR 组)、慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B,CHB)(CH 组)、乙型肝炎肝硬化(cirrhosis of liver,LC)、乙型肝炎肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)。诊断标准参见《慢性乙型肝炎防治指南》。排除标准:①HBV 血清两对半标志物不明确者;②仅有乙型肝炎表面抗体阳性(+)的 HBV 疫苗接种者;③艾滋病或其他非 HBV 肝炎病毒感染者;④严重的系统性疾病如系统性红斑狼疮、非 HCC 肿瘤等其他肝脏疾病;⑤如自身免疫型肝炎、原发性胆汁性肝硬化等;⑥非汉族人。本研究得到西藏民族大学附属医院医学伦理委员会的批准,所有受试者签署书面的知情同意书。

1.2 样本及生化指标的采集

采集每个受试者血液约 3 ml,置于 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。通过问卷调查方式收集其年龄、性别等基本情况。乙肝两对半、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、血清总胆红素(total bilirubin,TBIL)及乙肝病毒的脱氧核糖核酸(hepatitis B virus-deoxyribonucleic acid,HBV-DNA)水平的测定由本院检验科完成。

1.3 DNA 的提取与基因型分析

使用 Wizard Genomic DNA 纯化试剂盒(美国

Promega 公司)提取外周血基因组 DNA。NanoDrop 2000(美国 Thermo Scientific 公司)测定 DNA 浓度及光密度值,并稀释成 30 ng/ μ l 备用。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)rs1800629 与 rs361525 分型采用 TaqMan 探针法(美国 Applied Biosystems 公司)。TaqMan 等位基因鉴别实验由 ABI 7500 快速实时荧光聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction,Real-time qPCR)系统完成(美国 Applied Biosystems 公司)。其中每 96 孔设置 1 个阴性对照和 1 个阳性对照。聚合酶链式反应扩增反应体系为 20 μ l,含 30ng/ μ l DNA 2 μ l, master mix 10 μ l, primer-probe mix 0.5 μ l 及 DNAase-free water 7.5 μ l。PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min, 92℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 1 min, 共 39 个循环。随机选取 10% 样本用同一方法重复验证以保证分型准确,基因分型错误率 <0.1%。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,Hardy-Weinberg 遗传平衡由 HWE 软件完成,用 Student's *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验,3 组计量资料比较用方差分析;计数资料以用百分比或率表示,用 χ^2 检验;基因型及基因模型使用二分类 Logistic 回归校正年龄与性别后进行比较。使用 Haploview software(v4.2)软件进行单体型分析。考虑到多重检验的问题, $P < 0.0125(0.05/4)$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料及 Hardy-Weinberg 遗传平衡

2.1.1 基本资料 本研究共纳入 1 097 例患者,其中 CH 组 429 例,SR 组 429 例,HC 组 239 例。各组年龄比较,经方差分析,差异无统计学意义($F=0.080$, $P=0.923$)。3 组男女比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=63.210$, $P=0.000$),CH 组男性比例高于 SR 组与 HC 组。3 组 ALT、AST、TBIL、HBV-DNA 定量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=15.049$, $P=0.005$; $F=49.216$, $P=0.000$; $F=7.594$, $P=0.023$; $F=15.004$, $P=0.005$),CH 组高于 SR 组及 HC 组。见表 1。

2.1.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡 rs1800629 与 rs361525 均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡(SR 组:rs1800629 位点 $P=0.085$, rs361525 位点 $P=0.199$; HC 组:rs1800629 位点 $P=0.136$, rs361525 位点 $P=0.451$)。

2.2 TNF- α rs1800629 基因型与乙肝感染结局的关系

rs1800629 G 是各组中最常见的等位基因。携带 rs1800629 GA 基因型与 G 等位基因有利于感染后病毒的自发清除,该保护性作用在显性遗传模型中仍存在[CH 组 vs SR 组基因型: $\hat{OR}=0.369, P=0.000$;等位基因: $\hat{OR}=2.210, P=0.000$;显性模型(GG vs GA+AA): $\hat{OR}=0.536, P=0.000$](见表 2)。在疾病进展方面,未发现多态性与疾病相关(见表 3)。

2.3 TNF- α rs361525 基因型与乙肝感染结局的关系

关系

携带 GA 基因型或 A 等位基因有利于感染后病毒的自发清除[CH 组 vs SR 组基因型: $\hat{OR}=0.288, P=0.000$;等位基因: $\hat{OR}=0.549, P=0.000$;显性模型(GG vs GA+AA): $\hat{OR}=0.634, P=0.000$](见表 2)。在疾病进展方面,未发现多态性与疾病相关(见表 3)。

2.4 TNF- α 基因单体型与乙肝病毒感染结局的关系

考虑到单体型在解释多态性与疾病相关性上有更好的说服力,本研究以 TNF- α 两位点为基础构建

表 1 各组纳入研究者的人口学及临床特征比较

组别	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	男 / 女 / 例	ALT / (IU/L)	AST / (IU/L)	TBIL / (μ mol/L)	HBV-DNA / (IU/L)
CH 组 ($n=429$)	51.54 \pm 16.40	314/115	56.9 \pm 16.5	58.5 \pm 8.1	23.5 \pm 7.1	2.46E-4 \pm 1.10E-4
SR 组 ($n=429$)	51.11 \pm 13.41	221/208	14.1 \pm 4.2	22.2 \pm 3.2	9.9 \pm 3.5	-
HC 组 ($n=239$)	51.23 \pm 11.96	109/130	19.5 \pm 6.1	19.5 \pm 3.3	9.5 \pm 3.7	-

表 2 慢性乙肝感染与 TNF- α 基因型的关系

组别	rs1800629								rs361525							
	GG	GA	AA	G	A	显性模型	隐性模型	GG	GA	AA	G	A	显性模型	隐性模型		
SR 组 ($n=429$)	395	26	5	816	36	-	-	378	50	0	856	50	-	-		
CH 组 ($n=429$)	361	62	6	784	74	-	-	413	16	0	842	16	-	-		
HC 组 ($n=239$)	212	23	2	447	27	-	-	216	22	0	454	22	-	-		
CH 组 vs SR 组																
P 值	-	0.000	0.639	-	0.000	0.000	0.755	-	0.000	-	-	0.000	0.000	-		
\hat{OR}	-	0.369	0.746	-	2.210	0.536	0.907	-	0.288	-	-	0.549	0.634	-		
CH 组 vs HC 组																
P 值	-	0.115	0.815	-	0.230	0.163	0.779	-	0.013	-	-	0.015	0.013	-		
\hat{OR}	-	0.612	1.123	-	1.387	0.814	1.130	-	0.417	-	-	0.656	0.646	-		

表 3 慢乙肝进展与 TNF- α 基因多态性的关系

组别	rs1800629								rs361525							
	GG	GA	AA	G	A	显性模型	隐性模型	GG	GA	AA	G	A	显性模型	隐性模型		
CHB 组 ($n=160$)	151	7	1	309	9	-	-	155	5	0	315	5	-	-		
LC 组 ($n=170$)	151	13	4	315	21	-	-	167	3	0	337	3	-	-		
HCC 组 ($n=99$)	93	60	0	246	60	-	-	91	8	0	190	8	-	-		
LC 组 vs CHB 组																
P 值	-	0.226	0.215	-	0.047	0.101	0.226	-	0.443	-	-	0.446	0.443	-		
\hat{OR}	-	1.797	4.044	-	1.499	1.440	1.977	-	0.567	-	-	0.756	0.753	-		
HCC 组 vs LC+CHB 组																
P 值	-	0.765	0.999	-	0.310	0.355	0.999	-	0.026	-	-	0.028	0.026	-		
\hat{OR}	-	0.863	0.000	-	0.791	0.670	0.000	-	3.302	-	-	1.788	3.302	-		

单体型。但未发现两个位点之间能够构建单体型。

3 讨论

TNF- α 是由单核巨噬系统细胞产生的细胞因子,具有免疫调节作用,增加 IL-1、IL-8 和粒-巨噬细胞集落刺激因子的分泌,提高 IL-2R 基因表达的水平,促进 T 细胞增殖,增强抗体依赖细胞介导的细胞毒作用,促进 B 淋巴细胞增殖、分化和产生抗体等作用。

有研究发现,TNF- α 基因启动子区域内 rs1800629 和 rs361525 等 SNP 与丙型肝炎病毒感染、HBV 感染及其抗病毒治疗应答相关^[8-10]。本研究主要探讨 TNF- α 基因启动子区 rs1800629 和 rs361525 位点多态性与 HBV 感染结局的相关性。

结果显示,我国人群 TNF- α 基因 rs1800629 和 rs361525 位点基因型均以 GG 为主,等位基因频率 G>A,与相关研究结果一致^[6,11]。在 HBV 病毒感染后的自发清除方面,携带 rs9275572 G 等位基因表现出保护作用,且该效应在显性模型中也有体现。携带 rs361525 GA 基因型或 A 等位基因有利于感染后病毒的自发清除,且该效应在显性模型中同样得到印证。本实验结果与前人的研究一致^[12-14]。rs1800629 和 rs361525 位于 TNF- α 基因的启动子区,不同的等位基因,可能会影响 TNF- α 启动子的活性,进而影响 TNF- α 的表达,从而对 HBV 感染后的清除过程产生作用。

本研究将 rs1800629 和 rs361525 结合探讨 TNF- α 基因多态性与乙肝感染结局的关系。然而,对于这 2 个位点来说,本研究较之其他研究仍有相悖之处^[6,11],考虑可能存在以下原因:①SNP 受种族、地域等因素的影响,导致其遗传差异显著,这也是导致该研究与其他文献报道差异的原因之一。②样本量与其他混杂因素的存在,例如基因或者环境因素。本研究也存在一定的不足之处,例如纳入研究的样本量不够多,这在一定程度上降低实验的信度。今后需要更大样本量、设计更严谨的实验进一步验证。

总之,本研究表明,中国人 TNF- α 基因多态性与 HBV 病毒感染后病毒的自发清除有关,一定程度上为慢性乙型肝炎的早预防和高应答率的治疗奠定基础。

参 考 文 献:

[1] ZHANG Y, ZHANG H, ELIZABETH A, et al. Epidemiology of

hepatitis B and associated liver diseases in china[J]. Chin Med Sci J, 2013, 27(4): 243-248.

- [2] KEW M C. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 273-277.
- [3] FRODSHAM A J. Host genetics and the outcome of hepatitis B viral infection hepatitis B hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Biol, 2010, 58(4): 273-277.
- [4] JUNG M C, PAPE G R. Immunology of hepatitis B infection[J]. the Lancet Infectious Diseases, 2002, 2(1): 43-50.
- [5] CHEONG J Y, CHO S W, HWANG I L, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(7): 1163-1169.
- [6] DU T, GUO X H, ZHU X L, et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population[J]. J Viral Hepat, 2006, 13(9): 618-624.
- [7] KAO P C, WU J F, NI Y H, et al. Tumour necrosis factor-alpha promoter region polymorphisms affect the course of spontaneous HBsAg clearance[J]. Liver Int, 2010, 30(10): 1448-1453.
- [8] BASTURK B, KARASU Z, KILIC M, et al. Association of TNF-alpha-308 polymorphism with the outcome of hepatitis B virus infection in Turkey[J]. Infect Genet Evol, 2008, 8(1): 20-25.
- [9] DOGRA G, CHAKRAVARTI A, KAR P, et al. Polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene promoter region in chronic hepatitis C virus patients and their effect on pegylated interferon-alpha therapy response[J]. Hum Immunol, 2011, 72(10): 935-939.
- [10] ZHANG T C, ZHAO Y Q, HU G L, et al. The relationship between tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism and susceptibility and clearance of the persistent hepatitis B virus infection in a Chinese population: a meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(3): 227-234.
- [11] FLETCHER G J, SAMUEL P, CHRISTDAS J, et al. Association of HLA and TNF polymorphisms with the outcome of HBV infection in the South Indian population[J]. Genes Immun, 2011, 12(7): 552-558.
- [12] CHEN D Q, ZENG Y, ZHOU J, et al. Association of candidate susceptible loci with chronic infection with hepatitis B virus in a Chinese population[J]. J Med Virol, 2010, 82(3): 371-378.
- [13] LI H Q, LI Z, LIU Y, et al. Association of polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcome of hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(33): 5213-5217.
- [14] XU J, ZHANG S, ZHANG Z, et al. TNF-alpha promoter region polymorphisms affect HBV virus clearance in southern Chinese[J]. Clin Chim Acta, 2013, 425(21): 90-92.

(童颖丹 编辑)