

贵州省侗族、汉族人群乙型肝炎病毒感染结局与趋化因子 *RANTES* 基因-403G/A 及-28C/G 位点多态性研究

张婵 单可人 何燕 王婵娟 张婷 李毅 邓婕 李林洁 欧阳凯 官志忠

【摘要】 目的 探讨贵州省世居侗族和汉族人群趋化因子 *RANTES* 基因 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) -403G/A 和 -28C/G 位点多态性与乙型肝炎病毒 (HBV) 感染后结局的相关性。方法 采取病例对照方法, 募集侗族和汉族共计 229 例 HBV 持续感染者、161 例 HBV 清除者作为研究对象, 同时选取 200 例正常者作为对照组。应用 TaqMan-MGB 探针实时荧光聚合酶链反应 SNP 分型技术对趋化因子 *RANTES* 基因 -403G/A 和 -28C/G 位点进行分型测定。结果 趋化因子 *RANTES* 基因 -403G/A 和 -28C/G 基因型频率在侗族汉族 HBV 持续感染组、HBV 清除组和正常对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 单因素分析发现 -403AG 和 -28GG 增加 HBV 持续感染的危险度 ($OR = 1.292, OR = 1.151$)。趋化因子 *RANTES* -28C/G 基因型频率在侗族和汉族 HBV 持续感染组分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 *RANTES* -403G/A 各基因型在两族人群中分布的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 携带趋化因子 *RANTES* -403AG 和 -28GG 基因型 HBV 持续感染风险性高。*RANTES* -403A 有助于 HBV 清除。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 趋化因子 *RANTES*; 基因多态性

Study on the association between *RANTES*-403G/A as well as -28C/G gene polymorphism and their susceptibility to the hepatitis B virus infections in Dong and Han ethnicities in Guizhou, China

ZHANG Chan¹, SHAN Ke-ren², HE Yan², WANG Chan-juan², ZHANG Ting², LI Yi², DENG Jie², LI Lin-jie², OU YANG Kai², GUAN Zhi-zhong². 1 Reproductive IVF Center of Luoyang Central Hospital, Luoyang 471002, China; 2 Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical University

Corresponding author: SHAN Ke-ren, Email: 420578427@qq.com

This work was supported by grants from the Science and Technology Program of Guizhou Science and Technology Department (No. SY[2010]3001 and No. LG[2011]024).

【Abstract】 **Objective** To investigate the association between both regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (*RANTES*) -403G/A, -28C/G gene polymorphism and the susceptibilities to hepatitis B virus (HBV) infection, among people with Dong and Han ethnicities, in Guizhou. **Methods** A total of 229 individuals with HBV persistence infection, 161 HBV cleared patients and another 200 controls were recruited to conduct a case-control study among residents with Dong or Han ethnicities. Allelic frequencies of both *RANTES*-403G/A and -28C/G were identified by TaqMan-MGB probe. **Results** Both *RANTES*-403G/A and -28C/G polymorphism in the HBV-persistent group, when compared to the HBV-clearances group, no significant difference was found ($P > 0.05$). Results from the univariate analysis showed that subjects carrying -403AG and -28GG genotype had higher risk on the susceptibility to HBV persistence infection. The distributions of *RANTES*-28C/G gene polymorphism between Dong minority and Han ethnicities regarding HBV persistence showed statistically significant difference ($P < 0.05$). There was no difference on the distributions of *RANTES*-403G/A gene polymorphism between Dong minority and Han ethnicities. **Conclusion** Patients that carrying both *RANTES*-403AG and -28GG genotype had higher risk on the persistence to HBV, while *RANTES*-403A had contributed to the clearance of HBV infection.

【Key words】 Hepatitis B virus; Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted; Gene polymorphism

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.12.019

基金项目: 贵州省科技计划(黔科合SY[2010]3001、LG[2011]024)

作者单位: 471002 洛阳市中心医院生殖助孕中心(张婵); 贵阳医学院分子生物重点实验室(单可人、何燕、王婵娟、张婷、李毅、邓婕、李林洁、欧阳凯、官志忠)

通信作者: 单可人, Email: 420578427@qq.com

乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)感染常导致肝组织中大量炎性细胞聚集,肝内炎症和肝细胞损伤是慢性乙肝的特点,趋化因子 *RANTES* 可以趋化、激活炎性细胞,同时也可与炎症因子相互作用,延长并加重炎症反应^[1-2]。趋化因子 *RANTES* 存在多个多态性位点,其中包括2个在启动子区的多态位点-403G/A、-28C/G以增加 *RANTES* 表达^[3-5]。尽管有研究报道慢性HBV感染者的趋化因子 *RANTES* 高表达与慢性化有关^[6,7],但趋化因子 *RANTES* 多态性影响HBV感染机体过程在不同民族人群间由于不同遗传背景造成HBV感染率是否存在差异尚不明确。因此本研究选取贵州省少数民族遗传学上相对隔离的人群——侗族与汉族人群进行趋化因子 *RANTES* 多态性及HBV感染相关性检测。

材料与方法

1. 研究对象及分组:在知情同意的原则上,抽取贵州省世居少数民族中较封闭的自然人群——侗族和汉族人群,样本总量为590份。所选研究对象三代之内无族外通婚,彼此间无直接血缘关系,性别、年龄匹配,无乙肝疫苗接种史。

由于样本人群无乙肝疫苗接种史,结合乙肝血液学及生化指标判断标准分组①HBsAg阴性、抗-HBs以及抗-HBc阳性者为HBV清除组;②HBsAg阳性、HBeAg阴性、谷丙及谷草转氨酶正常或HBeAg阳性、谷丙及谷草转氨酶大于正常高值的2倍者为HBV持续感染组。侗族人群样本325份,其中HBV持续感染组99份,HBV清除组126份,正常对照100份;汉族人群样本265份,HBV持续感染组130份,HBV清除组35份,正常对照100份。侗族人群HBV感染率为30.5%,汉族人群为49.6%。

2. 研究方法:

(1)乙肝血液学检测:采血样后离心取血浆,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙肝血清学标志[表面抗原(HBsAg)、表面抗体(抗-HBs)、e抗原(HBeAg)、e抗体(抗-HBe)、核心抗体(抗-HBc)]及血液生化指标(谷丙转氨酶、谷草转氨酶)。试剂盒由北京万泰生物药物股份有限公司生产(批号X20100804),按说明书操作,采用美国BiotecELX800酶标仪判断结果。

(2)基因组DNA提取:根据乙肝血液学检测结果,选取样本并使用常规酚、氯仿抽提DNA。取2 μl进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测其质量,DU-640核酸蛋白定量仪(美国贝克曼公司)测定DNA浓度,后

统一将样本DNA浓度标化为20 ng/μl。

(3)PCR扩增:参照TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol(美国应用生物系统公司),PCR扩增体系为10 μl,含DNA模板1.5 μl、2 × TaqMan Genotyping Master Mix 5 μl、40 × TaqMan SNP Genotyping Assay Mix(-403G/A:rs2107538;-28C/G:rs2280788)0.25 μl,ddH₂O 3.25 μl补足体系。采用ABI Stepone Plus Real-time PCR仪进行扩增,每96孔板设置3个空白对照(NTC),反应条件为:95℃热变性10 min;92℃变性15 s,60℃退火1 min,共40个循环。

(4)趋化因子 *RANTES*-403G/A、-28C/G基因型检测:在上述PCR基础上,利用ABI Stepone Plus Real-time PCR进行等位基因识别分析,2个位点均设置FAM、VIC探针和样品孔、3个NTC空白对照。读取荧光信号,通过X、Y轴散点图分析各样本的基因型。

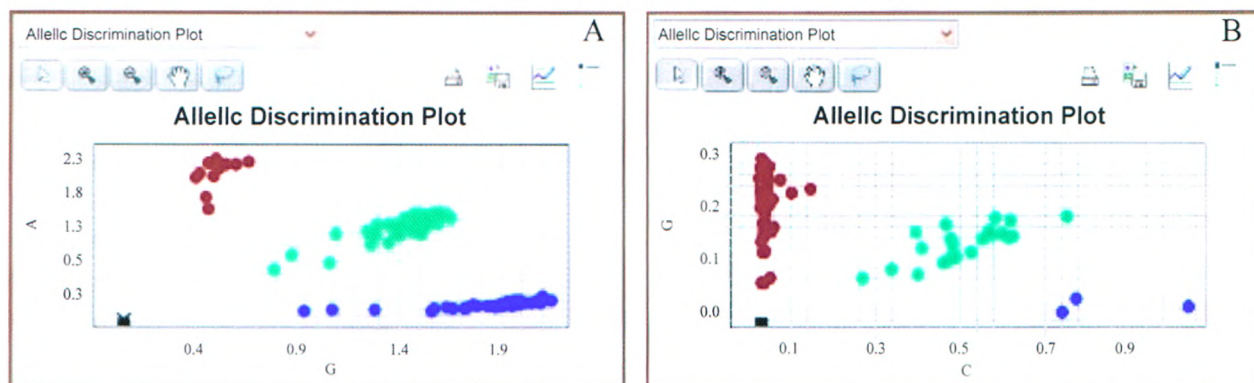
(5)DNA测序分析:为验证TaqMan® SNP基因分型方法的准确性,随机挑取不同基因型的16个样品进行测序。

3. 统计学分析:采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。以行×列或连续校正卡方(χ^2)检验分析基因型和等位基因在不同组别及民族间的差异。双侧检验 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. PCR扩增和SNP分析:SNP基因分型见图1。根据美国应用生物系统公司提供的信息,等位基因分析图谱中X轴代表VIC探针(CCL5-403G或趋化因子 *RANTES*-28C),Y轴代表FAM探针(趋化因子 *RANTES*-403A或趋化因子 *RANTES*-28G),样品集中分布在4个区域,3个NTC空白对照组在接近原点的对角线上,靠近X轴的代表趋化因子 *RANTES*-403GG或趋化因子 *RANTES*-28CC纯合子,靠近Y轴的代表趋化因子 *RANTES*-403AA或趋化因子 *RANTES*-28GG纯合子,对角线上的一组为杂合子趋化因子 *RANTES*-403AG或趋化因子 *RANTES*-28CG。参照空白对照,各样本均能明确分析基因型。为验证TaqMan® SNP基因分析方法的准确性,随机挑取4个位点16份样本进行PCR产物直接测序,结果与TaqMan® SNP基因分型结果完全一致。

2. 各组基因型分析:由表1可见,趋化因子 *RANTES*-403G/A、-28C/G的基因频率在HBV持续



注: ●趋化因子RANTES-403GG或-28CC; ●趋化因子RANTES-403AG或-28CG; ●趋化因子RANTES-403AA或-28GG; ■ NTC空白对照

图1 采用TaqMan-MGB探针SNP基因分型方法检测趋化因子RANTES-403G/A分型(A)和RANTES-28C/G分型(B)

感染组、清除组与正常对照组差异无统计学意义 ($P=0.525, P=0.458$)。HBV持续感染组与HBV清除组比较差异无统计学意义 ($P=0.837, P=0.164$); HBV持续感染组和正常对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.389, P=0.596$); HBV清除组与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.268, P=0.659$)。单因素结果分析显示携带RANTES-403GA、-28GG基因型发生HBV持续感染风险大 ($OR=1.292, 95\% CI: 0.877 \sim 1.903; OR=1.151, 95\% CI: 0.782 \sim 1.694$)。由表2可见,趋化因子RANTES-403G/A各基因型在侗族和汉族人群的HBV持续感染组、清除组和正常对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.125, P=0.464, P=0.443$)。RANTES-403G/A位点基因型分别在侗族和汉族人群的HBV持续感染组、清除组和正常对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.915, P=0.419$);趋化因子RANTES-28C/G各基因型在侗族和汉族的HBV清除组分布的差异有统计学意义 ($P=0.029$),而在HBV持续感染组和正常对照组间差异无统计学意义 ($P=0.608, P=0.443$)。RANTES-28C/G位点基因型分别在侗族和汉族人群的HBV持续感染组、清除组和正常对照组

表1 趋化因子RANTES-403A/G、-28C/G位点在HBV持续感染组和清除组的分布

SNP位点	基因型	HBV持续感染组 (n=229)	HBV清除组 (n=161)	正常对照组 (n=200)	χ^2 值	P值
RANTES-403G/A	AA	47(21)	34(21)	49(25)	3.198	0.525*
	AG	100(44)	74(46)	75(37)	1.889	0.837*
	GG	82(35)	53(33)	76(38)	2.636	0.268*
RANTES-28C/G	CC	34(14)	34(21)	36(18)	3.633	0.458*
	CG	57(25)	44(27)	52(26)	3.615	0.164*
	GG	138(61)	83(52)	112(56)	1.035	0.596*
					0.833	0.659*

注:括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%);*总体HBV持续感染组、HBV清除组与对照组比较;†HBV持续感染组与HBV清除组比较;‡HBV持续感染组与正常对照组比较;§HBV清除组与正常对照组比较

分布的差异无统计学意义 ($P=0.500, P=0.886$)。

讨论

HBV感染后的免疫学应答是控制感染的主要因素,不同的免疫学应答导致预后的差异,而不同的免疫学应答可能是免疫遗传学差异所致。本研究前期发现侗族人群中乙肝感染率为30.5%,汉族人群为49.1%。并发现参与HBV免疫调节的IL-10在不

表2 趋化因子RANTES-403G/A、-28C/G位点在侗汉两族HBV清除组和HBV持续感染组分布

组别	RANTES-403G/A基因型			χ^2 值	P值	RANTES-28C/G基因型			χ^2 值	P值
	AA	AG	GG			CC	CG	GG		
HBV清除组(n=161)				4.161*	0.125*				7.113*	0.029*
侗族	30	53	43	0.963†	0.915†	30	38	58	3.357†	0.500†
汉族	4	21	10	3.904‡	0.419‡	4	6	25	1.151‡	0.886‡
HBV持续感染组(n=229)				1.535*	0.464*				0.996*	0.608*
侗族	24	42	33			16	27	56		
汉族	23	58	49			18	30	82		
正常对照组(n=200)				1.627*	0.443*				1.627*	0.443*
侗族	22	48	30			23	30	47		
汉族	15	52	33			16	22	64		

注:‡各组侗族与汉族比较;†侗族HBV清除组、HBV持续感染组和正常对照组比较;‡汉族HBV清除组、HBV持续感染组和正常对照组比较

同民族间分布存在差异^[8]。有研究发现^[9,10],在慢性乙肝患者体内多种免疫细胞和一些正常情况下无趋化因子分泌活性的细胞均能分泌多种趋化因子,且在病毒感染局部含量增高,可产生方向性迁移信号,对循环中各种炎性细胞起趋化作用。Duan等^[7]研究认为慢性HBV感染者的趋化因子*RANTES*可作为反映HBV慢性感染肝细胞损伤的指标,在鉴别急性慢性炎症时具有重要意义。本研究结果显示总体人群趋化因子*RANTES*-403G/A、-28C/G的基因型在HBV持续感染组、清除组和正常对照组间的差异无统计学意义。单因素分析显示携带-403AG和-28GG基因型的人群如暴露在HBV环境中较易持续感染HBV。HBV感染动物模型实验发现,IFN- γ 可诱导趋化因子*RANTES*表达,募集抗原非特异性炎症细胞到肝脏中,参与HBV的清除^[11]。研究发现趋化因子*RANTES*-403A启动子多态性可上调趋化因子*RANTES*的表达,从而使大量NK细胞聚集在肝脏参与病毒清除^[12]。因此携带趋化因子*RANTES*-403A等位基因可协助清除HBV。趋化因子*RANTES*-403G/A和趋化因子*RANTES*-28C/G基因多态性可能不是影响中国人群HBV感染后结局的遗传易感因素,但由于乙肝是一种多因素、多基因疾病,既定的某一或者几个位点的作用对疾病发生可能只产生微弱影响。

本研究还发现在侗族和汉族人群中,*RANTES*-403G/A基因型分布的差异无统计学意义,但*RANTES*-28C/G基因型在上述两人群的HBV持续感染组分布具有统计学意义,而在HBV清除组与正常对照组的分布差异无统计学意义,可能因为样本量偏少,对统计结果有一定影响,因此需加大样本证实。综上所述,趋化因子*RANTES*-403A等位基因有利于乙肝患者体内HBV清除。

参 考 文 献

- [1] Sigrest S, Oberholzer J, Bohhot A, et al. Activation of human macrophages by allogeneic islets preparations: inhibition by AOP-*RANTES* and parinoids. *Immunology*, 2004, 111 (4): 416-421.
- [2] Vielhauer V, Beming E, Eis V, et al. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomeriosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2004, 66(6):2264-2278.
- [3] Nickel RG, Casolaro VU, Wahn K, et al. Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine *RANTES*. *J Immunol*, 2000, 164:1612-1616.
- [4] An P, Nelson GW, Wang L, et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting *RANTES* gene variants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:10002-10007.
- [5] Liu HD, Chao EE, Taguchi NH, et al. Polymorphism in *RANTES* chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:4581-4585.
- [6] Ma K, Xu W, Shao X, et al. Coimmunization with *RANTES* plasmid polarized Th1 immune response against hepatitis B virus envelope via recruitment of dendritic cells. *Antiviral Res*, 2007, 76(2):140-149.
- [7] Duan ZP, Zhao XY, Huang DZ, et al. *RANTES* gene single nucleotide polymorphism and expression in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(11): 909-914.
- [8] Wang CJ, Shan KR, He Y, et al. Study on the association of IL-10-819 polymorphism with susceptibility to Hepatitis B viral infection in Yi, Yao and Han ethnic groups in Guizhou province. *Chin J Public Health*, 2011, 27(1):54-56. (in Chinese)
王婵娟,单可人,何燕,等. 贵州彝、瑶族及汉族HBV感染与IL-10-819相关性. *中国公共卫生*, 2011, 27(1):54-56.
- [9] Niro GA, Fontana R, Gioffreda D, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection. *Liver Int*, 2005, 25:1175-1181.
- [10] Suneetha PV, Sarin SK, Gollapudi AG, et al. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF- α and TNF- β gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *Hepatology*, 2006, 44: 856-863.
- [11] Wieland SF, Chisari FV. Hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol*, 2005, 79(15):9369-9380.
- [12] Thio CL, Astemborski J, Thomas R, et al. Interaction between *RANTES* promoter variant and CCR5 Δ 32 favors recovery from hepatitis B. *Immunology*, 2008, 181: 7944-7947.

(收稿日期:2012-06-05)

(本文编辑:张林东)