

· 重视 HBV 宫内传播 ·

细胞因子基因多态性与乙型肝炎病毒 宫内感染易感性的研究

朱启镛 顾绍庆 俞惠 王建设 顾新焕 董左权 费林娥

【摘要】 目的 对前期研究发现宫内乙型肝炎病毒(HBV)感染免疫失败儿童表达异常的细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10,研究其相关基因位点单核苷酸多态性与 HBV 宫内感染易感性的关系。方法 在确定时限内选择乙型肝炎疫苗随访门诊中符合纳入标准的高危儿童,系宫内感染 HBV 经免疫接种失败者为 I 组,免疫接种有效者为 II 组和非携带 HBV 母亲所生健康儿童作对照。应用实时荧光定量 PCR 技术检测 TNF- α 基因 - 238 位点、IFN- γ 基因 + 874 位点、IL-4 基因 - 590 位点和 IL-10 基因 - 1082 位点的单核苷酸多态性。结果 TNF- α 基因 - 238 位点 A 等位基因频率 I 组显著高于 II 组($\chi^2 = 6.797, P < 0.05$),并与对照组相比较差异有显著性($\chi^2 = 9.513, P < 0.05$),而 II 组与对照组比较 $\chi^2 = 0.047, P > 0.05$;IFN- γ 基因 + 874 位点 A 基因频率 I 组与 II 组比较 $\chi^2 = 7.238, P < 0.05$,与对照组比较 $\chi^2 = 5.199, P < 0.05$,II 组与对照组比较 $\chi^2 = 0.602, P > 0.05$;IL-4 基因 - 590 位点 C/T 等位基因频率 I 组与 II 组比较 $\chi^2 = 0.632, P > 0.05$,I 组与对照组比较 $\chi^2 = 0.584, P > 0.05$,II 组与对照组比较 $\chi^2 = 0.004, P > 0.05$;IL-10 基因 - 1082 位点 G 等位基因频率 II 组与 I 组比较 $\chi^2 = 10.359, P < 0.001$,II 组与对照组比较 $\chi^2 = 35.418, P < 0.001$,但是 I 组与对照组比较差异无显著性($\chi^2 = 1.759, P > 0.05$)。结论 TNF- α 基因 - 238 位点 A 等位基因和 IFN- γ 基因 + 874 位点 A 等位基因与 HBV 宫内感染易感性有关。IL-4 基因 - 590 位点 C/T 单核苷酸多态性与 HBV 宫内感染易感性无关,还提示 IL-10 基因 - 1082 位点 G 等位基因对于胎儿 HBV 宫内感染具有保护作用。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 宫内感染; 细胞因子; 基因多态性

Relationship between cytokine gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection ZHU Qi-rong, GU Shao-qing, YU Hui, WANG Jian-she, GU Xin-huan, DONG Zuo-quan, FEI Lin-e. Department of Infectious Disease, Children's Hospital, Fudan University; Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To explore the possible relationship between cytokines(TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 and IL-10), which were expressed abnormal quantity in the peripheral blood to intrauterine HBV infectious children, gene single nucleotide polymorphism(SNP) and susceptibility to HBV intrauterine infection. **Methods** A cross sectional study on molecular epidemiology was carried out. The subjects were selected from outpatients of the hepatitis B vaccine special clinics of our hospital. According to intrant criteria, children under high risk of HBV intrauterine infection were divided into immuno-failure group (group I) and immuno-effective group (group II) while children without high risk were included in the control group. Four gene SNP sites of TNF- α - 238、IFN- γ + 874、IL-4 - 590 and IL-10 - 1082 region were determined by real-time quantitative fluorescent PCR. **Results** Significant differences of TNF- α - 238 A allele frequency were found between group I and group II ($\chi^2 = 6.797, P < 0.05$) as well as between group I and control group($\chi^2 = 9.513, P < 0.05$). No evident difference of TNF- α - 238 A was found between group II and control group ($\chi^2 = 0.047, P > 0.05$). Significant differences of IFN- γ + 874 A allele frequency were found between group I and group II ($\chi^2 = 7.238, P < 0.05$), and between group I and the controls ($\chi^2 = 5.199, P < 0.05$) but no significant difference was found between group II and control group ($\chi^2 = 0.602, P > 0.05$). Significant differences of IL-4 - 590 C/T allele frequency were not found between group I and group II ($\chi^2 = 0.632, P > 0.05$), group I and control group ($\chi^2 = 0.584, P > 0.05$), or between group II and control group ($\chi^2 = 0.004, P > 0.05$) respectively. Significant differences

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271365)

作者单位:200032 上海,复旦大学附属儿科医院传染科

of IL-10 - 1082 G allele frequency were found between group II and group I ($\chi^2 = 10.359, P < 0.001$), and between group II and the controls ($\chi^2 = 35.418, P < 0.001$), but not found between group I and control group ($\chi^2 = 1.759, P > 0.05$). **Conclusion** This study suggested the possibility that TNF- α - 238 A allele and IFN- γ + 874 A allele were associated with HBV intrauterine infection. There was no evident relationship between IL-4 - 590 C/T allele SNP and susceptibility to HBV intrauterine infection, but the IL-10 - 1082 G allele seemed to be associated with preventive efficacy to HBV intrauterine infection.

【Key words】 Hepatitis B virus; Intrauterine infection; Cytokine; Gene polymorphism

母婴宫内和围产期传播乙型肝炎病毒(HBV)是高流行的主要原因之一,有50%左右的HBV携带者是母婴传播引起的。HBV宫内或幼龄期感染者可维持长期免疫耐受,表现为高水平的病毒血症(HBV-DNA高载量)和HBeAg的高滴度,ALT/AST可持续正常或轻度异常;肝组织学正常或轻度改变;对抗病毒治疗不敏感。因此阻断HBV母婴宫内和围产期传播是我国防治乙型肝炎(乙肝)战略的重要组成部分。HBV宫内感染免疫耐受的研究表明,主要存在T细胞水平、体液免疫水平低下。其原因与Th1和Th2细胞因子的分泌量多数呈低下及缺乏有效调节有关^[1,2]。近年人们逐渐认识到许多非遗传性疾病也存在遗传背景,这种认识有助于解释不同个体和群体对某些疾病的易感性、进程、疗效和转归上的差异。遗传背景差异的主要表现为染色体的变异和基因多态性,而非遗传性疾病常与基因多态性有关^[3,4]。我们针对乙肝筛选最有可能相关的基因进行研究,对母亲为HBV携带者的高危儿童选择其表达异常的细胞因子,研究其基因单核苷酸多态性与HBV宫内感染的相关关系。

对象与方法

1. 研究对象:选自2002年2月至2003年7月间横断面调查复旦大学附属儿科医院乙肝疫苗随访门诊HBV标志物包括HBsAg、HBeAg和HBV DNA单项或多项阳性的母亲,其中部分产前3个月多次注射过乙肝免疫球蛋白(HBIG),所生婴儿(属HBV可能感染的高危婴儿)出生后分别在0、1、6个月接种乙肝疫苗或乙肝疫苗联合HBIG进行免疫,并定期随访肝功能及HBV标志物。上述婴儿中凡出生时外周血即测到HBsAg阳性,并持续1个月以上为HBV宫内感染组(I组)^[2];其余为宫内未感染组(II组)。I组46例(男26例,女20例);II组出生及以后随访中未出现上述HBV标志,1岁时抗-HBs达到保护效果效价以上的正常免疫反应儿童,共有124例(男69例,女55例);对照组共127

名(男73名,女54名)系随机选取健康儿童接种疫苗要求随访及因外伤及患呼吸道感染来该院就诊儿童,其母亲均非HBV携带者。

2. 实验方法:

(1)样本采集和基因组DNA抽提:抽取静脉血1.5 ml,2.5% EDTA抗凝。基因组DNA抽提采用基因组DNA小量抽提试剂盒(上海生工生物工程公司),对实验方法作适当的修改。所提DNA样本-20℃保存。

(2)细胞因子基因多态性检测:应用实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative fluorescent PCR),结合MGB TaqMan荧光探针技术进行测定,实验结果通过随机附带的软件作出等位基因分布后分析判断。实时定量PCR采用ABI Prism™ 7900高通量荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。PCR反应体系为10 μ l,包括1 \times TaqMan buffer A, 3.5 mmol/L MgCl₂, dATP、dCTP、dGTP各200 μ mol/L, dUTP 400 μ mol/L, β -actin正向引物和反向引物各300 μ mol/L, β -actin探针200 μ mol/L, Ampli Taq Gold DNA 0.025 U/ μ l, UNG酶0.01 U/ μ l,正向、反向引物各900 nmol/L, MGB TaqMan探针250 nmol/L,模板DNA 20 ng。

(3)PCR引物设计:①肿瘤坏死因子(TNF)- α 基因-238位点:正向引物序列5'-TCA GTC AGT GGC CCA GAA GAC-3',反向引物序列5'-GAT ACC CCT CAC ACT CCC CAT-3'; TaqMan MGB探针序列Fam: CCC GTC CtC ATG CC, Vic: CCC GTC CcC ATG CC。②干扰素(IFN)- γ 基因+874位点:正向引物序列5'-ACA TTC CAC AAT TGA TTT TAT TCT TAC AAC A-3',反向引物序列5'-ACG AGC TTT AAA AGA TAG TTC CAA ACA-3'; TaqMan MGB探针序列Fam: AAA TCA AAT CtC ACA CAC ACA C, Vic: AAA TCA AAT CaC ACA CAC ACA C。③白细胞介素(IL)-4基因-590位点:正向引物序列5'-ACG ACC TGT CCT TCT CAA AAC ACT A-3',反向引物序列5'-AGA

GGC AGA ATA ACA GGC AGA CTC T-3'; TaqMan MGB 探针序列 Fam:AGA ACA TTG TtC CCC AGT G, Vic:AGA ACA TTG TtC CCC AGT。
④IL-10 基因 -1082 位点:正向引物序列 5'-CTC CCC TTA CCT TCT ACA CAC AC-3',反向引物序列 5'-CCT TAC TTT CCA CTT ACC TAT CCC-3'; TaqMan MGB 探针序列 Fam:CCC GTC CtC ATG CC, Vic:CCC GTC CcC ATG CC。以上引物和探针由上海基康生物基因有限公司提供。

(4)PCR 循环条件:预变性 50℃ 2 min、95℃ 10 min后,95℃ 30 s,60℃ 30 s,进行 45 个循环,每次检测至少设置 3 个空白对照。此外 IL-10 则预变性 98℃ 5 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,32 个循环,终末延伸 72℃ 5 min。

3. 统计学处理:采用 SPSS 11.0 软件进行 χ^2 检验,IFN- γ 采用 SAS 软件作 χ^2 检验。

结 果

1. TNF- α 基因 -238 位点基因型和等位基因频率:三组儿童的 TNF- α 基因 -238 位点三种基因型 GG、GA 和 AA 的数量及频率见表 1。妊娠末 3 个月使用过 HBIG 孕妇所生婴儿 44 例,其 TNF- α 基因 -238 位点 G/A 等位基因频率 G 为 0.920, A 为 0.080;未用 HBIG 孕妇所生婴儿 86 例,频率 G 为 0.890, A 为 0.110,此两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.618, P = 0.432$)。

表1 三组对象 TNF- α 基因 -238 位点基因型和 G/A 等位基因数及频率

组别	例数	基因型			等位基因频率*	
		GG	GA	AA	G	A
I + II	130	106	22	2	0.900	0.100
I	45	31	13	1	0.833	0.167
II	85	75	9	1	0.935	0.065
对照	126	114	9	3	0.940	0.060

* 频率比较, I 组: II 组 $\chi^2 = 6.797, P = 0.009$; I 组: 对照组 $\chi^2 = 9.513, P = 0.002$; II 组: 对照组 $\chi^2 = 0.047, P = 0.828$

2. IFN- γ 基因 + 874 位点基因型和等位基因频率:三组儿童的 IFN- γ 基因 + 874 位点三种基因型 AA、AT 和 TT 的数量及频率见表 2。I 组母亲产前注射过 HBIG 有 10 例, + 874 位点 A/T 等位基因频率 A 为 0.800, T 为 0.200; I 组未注射过 HBIG 取 30 例 A/T 频率 A 为 0.767, T 为 0.233, 两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.065, P = 0.7983$)。

3. IL-4 基因 -590 位点基因型和 C/T 等位基因

频率:三组儿童的 IL-4 基因 -590 位点三种基因型 TT、CT 和 CC 的数量及频率见表 3, 各组组间等位基因频率比较差异无统计学意义。

表2 三组对象 IFN- γ 基因 + 874 位点基因型和 A/T 等位基因数及频率

组别	例数	基因型			等位基因频率*	
		AA	AT	TT	A	T
I	46	31	9	6	0.772	0.228
II	73	33	22	18	0.603	0.397
对照	127	60	43	24	0.642	0.358

* 频率比较, I 组: II 组 $\chi^2 = 7.238, P = 0.0071$; I 组: 对照组 $\chi^2 = 5.199, P = 0.022$; II 组: 对照组 $\chi^2 = 0.602, P = 0.438$

表3 三组对象 IL-4 基因 -590 位点基因型和 C/T 等位基因数及频率

组别	例数	基因型			等位基因频率*	
		TT	CT	CC	T	C
I	36	25	8	3	0.806	0.194
II	102	67	21	14	0.760	0.240
对照	120	79	25	16	0.762	0.238

* 频率比较, I 组: II 组 $\chi^2 = 0.632, P = 0.426$; I 组: 对照组 $\chi^2 = 0.584, P = 0.445$; II 组: 对照组 $\chi^2 = 0.004, P = 0.947$

4. IL-10 基因 -1082 位点基因型和 G/A 等位基因频率:三组儿童的 IL-10 基因 -1082 位点基因型 GG、GA 和 AA 的数量及频率分布见表 4。妊娠末 3 个月使用和未使用 HBIG 母亲所生婴儿 IL-10 基因 -1082 位点 G/A 等位基因频率分布: I 组 11 例和 II 组 47 例产前使用过 HBIG, 共 58 例, G 为 0.793, A 为 0.207; I 组 32 例和 II 组 77 例共 109 例产前未使用 HBIG, G 为 0.839, A 为 0.161, 两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 1.118, P = 0.290$)。

表4 三组对象 IL-10 基因 -1082 位点基因型和 G/A 等位基因数及频率

组别	例数	基因型			等位基因频率*	
		GG	GA	AA	G	A
I	43	19	23	1	0.709	0.291
II	124	96	22	6	0.863	0.137
对照	123	37	81	5	0.630	0.270

* 频率比较, II 组: I 组 $\chi^2 = 10.359, P = 0.001$; II 组: 对照组 $\chi^2 = 35.418, P < 0.001$; I 组: 对照组 $\chi^2 = 1.759, P = 0.185$

讨 论

既往的流行病学研究显示不同种族和个体对 HBV 感染后有不同反应, 乙肝全球分布有很大差异; 高危因素的家庭所生婴儿有的呈慢性感染, 有的却产生保护性抗体; 乙肝的临床表现部分人无法阻止转呈慢性; 慢性感染对抗病毒治疗的反应差异很大; 健康人群对乙肝疫苗接种后反应也有很大差异,

强烈提示遗传因素对 HBV 易感性有重要影响^[5,6]。在遗传因素中,相关基因单核苷酸多态性占重要地位,位于基因表达调控区的启动子区或内显子有重要功能意义^[7,8]。

我们选择以往研究宫内感染免疫耐受而呈现表达低下的主要细胞因子(TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10),检测其基因功能位点的单核苷酸多态性。TNF- α 主要由活化的单核-巨噬细胞产生,起抗肿瘤、抗病毒的免疫调节活性作用^[9]。发现宫内感染组(I组)TNF- α 基因在启动子-238 位点 G/A 单核苷酸多态性分布频率出现 A 等位基因的频率显著高于宫内未感染组(II组), $\chi^2 = 6.797, P = 0.009$,说明存在 A 等位基因优势的胎儿更易在宫内感染 HBV。对照组与宫内未感染组儿童差异无统计学意义。IFN- γ 在 NK 细胞和 T 细胞(包括 CD4⁺ Th1 和 CD8⁺ T)都能产生,可作为抗原提呈细胞和 T 淋巴细胞的增殖、分化的调节剂,参与细胞炎症反应和抗病毒,高表达量对病毒清除有重要作用^[1,2]。IFN- γ 基因在第一内含子区 + 874 位点 A/T 单核苷酸多态性频率分布在宫内感染组是以 A 基因型占优势($\chi^2 = 7.238, P = 0.0071$),致使 IFN- γ 的表达量低下,削弱了 CD4⁺ Th 和 CD8⁺ CTL 的识别和清除 HBV 的能力。而 II 组与对照组 A 基因分布频率无差异。IL-4 主要由 Th2 细胞分泌,是体液免疫的重要调节因子,能促进 B 细胞增殖、特异性 IgG 和 IgE 的分泌,调节 Th1 和 Th2 细胞平衡等^[10]。IL-4 基因 - 590 位点 C/T 单核苷酸多态性频率在三组中比较,其差异无统计学意义(三组间检验 P 值均 > 0.05)。我们认为 IL-4 基因启动子区 - 590 位点单核苷酸 C/T 单核苷酸多态性与 HBV 宫内感染易感性无关。IL-10 主要由 Th2 细胞产生,作用复杂,一方面能有效刺激 B 细胞的增殖和分化,使之表达和产生 IgM、IgG 和 IgA;另一方面在细胞因子网络平衡中起重要作用,抑制 T 细胞和单核-巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12 和 IFN- γ 等细胞因子,并可削弱细胞毒 T 细胞的识别能力等^[11]。IL-10 基因启动子区 - 1082 位点 G/A 单核苷酸多态性频率, G 在 HBV 宫内感染免疫成功的儿童中显著高于免疫失败的儿童($\chi^2 = 10.359, P < 0.001$),也显著高于对照组儿童($\chi^2 = 35.418, P < 0.001$),而在免疫失败的儿童与对照组儿童比较差异无统计学意义($\chi^2 = 1.759, P > 0.05$),说明了高表达的 - 1082 G 对宫内感染免疫清除病毒有关。能高表达 IL-10 对

HBV 宫内感染儿童具有明显的保护作用。

HBV 感染儿童母亲产前是否注射 HBIG 在 TNF- α - 238、IFN- γ + 874、IL-4 - 590 和 IL-10 - 1082 基因型频率分布方面均无明显差异,说明并不影响其遗传因素。提示 TNF- α 基因 - 238 位点 A、IFN- γ 基因 + 874 位点 A 等位基因可能在决定个体宫内 HBV 感染遗传易感性方面有重要意义,可作为检测其遗传易感性的标志。而 IL-4 - 590C/T 等位基因多态性和 IL-10 - 1082 位点 G 等位基因并非是个体内 HBV 感染遗传易感性的危险因素,但 IL-10 - 1082 位点 G 等位基因对 HBV 宫内感染有保护作用,这与前期研究 IL-10 只有在宫内感染免疫有效组升高相符合,并与 Domenico 等的一项关于丙型肝炎病毒的研究相似^[1,12]。各细胞因子基因多态性与宫内感染 HBV 易感性之间的内在联系以及各细胞因子不同基因型的相互作用尚待更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 朱启镛,于广军,吕晴,等. 宫内感染乙型肝炎病毒儿童接种乙型肝炎疫苗免疫失败与其相关细胞因子关系研究. 中华儿科杂志, 1999, 37: 404-407.
- 2 王建设,朱启镛. 宫内感染乙型肝炎病毒免疫失败儿童 I 型和 II 型细胞因子研究. 中华儿科杂志, 2002, 40: 481-484.
- 3 Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, et al. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism association. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163: 1599-1604.
- 4 Quasney MW, Bronstein DE, Cantor RM, et al. Increased frequency of alleles associated with elevated tumor necrosis factor-alpha levels in children with kawasaki disease. Pediatr Res, 2001, 49: 686-690.
- 5 Kwiatkowski D. Genetic dissection of the molecular pathogenesis of severe infection. Intensive Care Med, 2000, 26 suppl: 289-297.
- 6 Ahn SH, Han KH, Park JY, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. Hepatology, 2000, 31: 1371-1373.
- 7 Van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. Intensive Care Med, 2001, 27: 98-102.
- 8 Mullikin JC, Hunt SE, Cole CG, et al. A single nucleotide polymorphism(SNP) map of human chromosome 22. Nature, 2000, 407: 516-520.
- 9 Wu MS, Huang SP, Chang YT, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 10 promoter polymorphisms in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. J Infect Dis, 2002, 185: 106-109.
- 10 Klein W, Tromm A, Griga T, et al. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphisms in inflammatory bowel disease. Gene Immunol, 2001, 2: 287-289.
- 11 Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, et al. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type I T regulatory cells. J Immunol, 2001, 166: 5530-5539.
- 12 Domenico L, Calogero C, Rosa DS, et al. IL-10 and TNF- α polymorphisms and recovery from HCV infection. Human Immunol, 2003, 64: 674-680.

(收稿日期: 2004-12-05)

(本文编辑: 张林东)