

· 实验研究 ·

干扰素 γ 基因内含子 1 + 874 位点多态性与乙型肝炎病毒感染关系的研究

张平安 吴健民 李艳

【摘要】 目的 研究干扰素 γ (IFN- γ)基因内含子 1 + 874 位点多态性与乙型肝炎病毒(HBV)感染、转归的关系,探讨慢性 HBV 感染的遗传易感因素。方法 采用序列特异性引物-聚合酶链反应(PCR-SSP)技术检测 231 例慢性 HBV 携带患者、165 例自限性 HBV 感染者和 135 名正常对照者 IFN- γ 基因内含子 1 + 874 位点 T/A 单核苷酸多态性。结果 慢性 HBV 感染组 IFN- γ 基因 + 874 位点 AA 基因型频率(TT、TA、AA 频率分别为 9.1%、12.1%、78.8%)高于正常对照组(TT、TA、AA 频率分别为 12.6%、23.0%、64.4%)($\chi^2 = 9.60, P = 0.008$);而自限性 HBV 感染组(TT、TA、AA 频率分别为 13.9%、23.7%、62.4%)和对照组之间差异无显著性($\chi^2 = 0.16, P = 0.92$)。结论 IFN- γ 基因内含子 1 + 874 位点多态性与慢性 HBV 感染有关,该位点多态性可能在决定个体 HBV 感染遗传易感性方面有一定意义。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 干扰素 γ 基因; 多态现象(遗传); 易感性

Relationship between genetic polymorphisms of Interferon-gamma gene intron 1 + 874 site and susceptibility of hepatitis B virus infection ZHANG Ping-an¹, WU Jian-min, LI Yan. ¹Department of Laboratory Science, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To explore the possible relationship between the polymorphisms of interferon-gamma (IFN- γ) gene intron 1 at position + 874 and the susceptibility of hepatitis B virus infection. **Methods** IFN- γ gene single nucleotide polymorphism (intron 1 at position + 874) were detected in 531 subjects including 231 chronic carrier of hepatitis B virus (group CC), 165 individuals who spontaneously recovered from HBV infection (group SR) and 135 healthy controls, by polymerase chain reaction with sequence specific primers. **Results** Significant difference of IFN- γ + 874 AA genotype frequency was found between group CC (TT, TA and AA frequencies were 9.1%, 12.1% and 78.8%, respectively) and control group (TT, TA and AA frequencies were 12.6%, 23.0% and 64.4%, respectively) ($\chi^2 = 9.60, P = 0.008$), but no significant difference found between group SR (TT, TA and AA frequencies were 13.9%, 23.7% and 62.4%, respectively) and control group ($\chi^2 = 0.16, P = 0.92$). **Conclusion** There was association between IFN- γ gene polymorphism (intron 1 at position + 874) and chronic HBV infection. This study suggested the possibility that IFN- γ gene polymorphism (intron 1 at position + 874) might be important in determining an individual's susceptibility in the development of chronic HBV infection.

【Key words】 Hepatitis B virus; Interferon-gamma gene; Polymorphism (Genetics); Susceptibility

干扰素 γ (interferon-gamma, IFN- γ) 由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,具有抗病毒和免疫调节功能。IFN- γ 基因具有 6 个多态性位点,分别位于启动子、内含子 1、内含子 3 及 3' 端非编码区。IFN- γ 基因多态性通过改变转录因子结合位点影响 IFN- γ 表达^[1,2]。IFN- γ 基因多态性与人类某些肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病的关系已成为国内外学者研究的热点。鉴于 IFN- γ 在机体抗乙型肝炎病毒

(HBV) 感染中的作用,我们采用序列特异性引物-聚合酶链反应(PCR-SSP)技术分析 IFN- γ 基因内含子 1 + 874 位点 T/A 单核苷酸多态性(SNP)的分布情况,探讨该位点多态性与中国汉族人 HBV 感染、转归的关系。

对象与方法

1. 研究对象: HBV 感染者 396 例,选自于 2004 年 3 月至 2004 年 9 月武汉大学人民医院门诊患者。其中自限性 HBV 感染者(SR 组)165 例,男性 99 例,女性 66 例,平均年龄(50.8 ± 14.2)岁,未接种过

作者单位: 430060 武汉大学人民医院检验科(张平安、李艳); 华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(吴健民)

HBV 疫苗,仅 HBsAb 或 HBcAb 阳性;慢性 HBV 感染者(CC 组)231 例,男性 156 例,女性 75 例,平均年龄(52.5±12.6)岁。所有病例的诊断均符合 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订的病毒性肝炎诊断标准,并排除其他病毒性肝炎合并感染。正常对照组 135 名,男性 84 名,女性 51 名,平均年龄(47.0±13.5)岁,未接种过 HBV 疫苗,HBV 免疫学标志物均为阴性,血常规、生化指标均在参考范围内,排除肝脏、肾脏、内分泌和心血管疾病。

2. 实验方法:

(1)标本采集:取肘静脉外周血 2 ml,EDTA-K₂ 抗凝。用改良的碘化钠方法从外周血白细胞中提取基因组 DNA,-20℃ 保存备用。

(2)PCR 引物设计与合成:参照文献[3]设计 IFN-γ 基因内含子 1 + 874T/A 位点的 PCR 引物,特异正向引物 1:5'-TTCTTACAACACAAA ATCAAATCT-3';特异正向引物 2:5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3';内参照正向引物:5'-TATGATTCTGGCTAAGGAATG-3';通用反向引物:5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3',由上海生工生物技术有限公司合成。

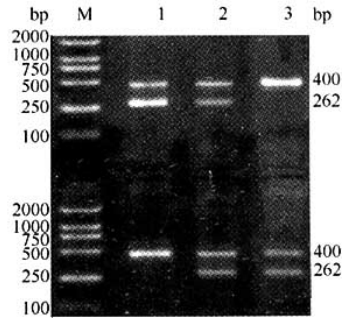
(3)PCR 扩增:PCR-SSP 反应体系为:基因组 DNA 3 μl(约 30 ng)、10×PCR buffer 1.5 μl、dNTPs 200 μmol/L、通用反向引物和特异性正向引物 1(或 2)各 0.6 μmol/L、质控正向引物 0.15 μmol/L、Taq DNA 聚合酶 0.5 U,补充灭菌双蒸水至 15 μl。所有试剂均为宝生物工程(大连)有限公司产品。PCR 反应条件:95℃ 2 min、94℃ 30 s、60℃ 40 s、72℃ 40 s,10 个循环;然后 94℃ 30 s、56℃ 40 s、72℃ 50 s,25 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

3. 统计学分析:应用 SPSS 11.5 软件包计算各组 IFN-γ 基因内含子 1 + 874T/A 位点基因型和等位基因频率,然后经 Hardy-Weiberg 遗传平衡定律检验;基因型和等位基因频率在各组中分布差异用

χ² 检验。

结 果

1. IFN-γ 基因 + 874T/A 位点多态性检测:531 例研究对象 IFN-γ 基因内含子 1 + 874T/A 位点存在 TT、TA 和 AA 3 种基因型(图 1)。



M:DL2000 DNA Marker; 1:TT 型; 2:TA 型; 3:AA 型

图 1 IFN-γ 基因内含子 1 + 874 位点 T/A 多态性电泳结果

2. IFN-γ 基因 + 874T/A 位点多态性与 HBV 感染的关系:计算 CC 组、SR 组和对照组人群 IFN-γ 基因内含子 1 + 874T/A 位点基因型和等位基因频率,经 Hardy-Weiberg 遗传平衡定律检验,达到遗传平衡,具有群体代表性。经 χ² 检验,在 CC 组和对照组中 IFN-γ 基因内含子 1 + 874T/A 位点基因型和等位基因的分布差异具有统计学意义(P < 0.05);而 SR 组和对照组间基因型和等位基因的分布差异无统计学意义(P > 0.05)。基因型频率的相对风险分析显示,AA 基因型患 HBV 慢性感染的风险是 TT 和 TA 基因的 2.05 倍(χ² = 8.9, P = 0.003, OR = 2.05, 95% CI: 1.28~3.29)(表 1)。

讨 论

HBV 感染后的表现是由病毒和宿主的相互作用决定的,细胞介导的免疫反应参与病毒的清除,其中 T 淋巴细胞分泌的 IFN-γ 具有重要的作用,IFN-γ 作为抗原提呈细胞和淋巴细胞增殖、分化的调节剂,参与细胞炎症反应和抗病毒免疫,高表达量的

表 1 IFN-γ 基因内含子 1 + 874T/A 位点多态性与 HBV 感染的关系

组别	例数	基 因 型			χ ² 值	P 值	等位基因		χ ² 值	P 值
		TT	TA	AA			T	A		
CC 组	231	21(9.1)	28(12.1)	182(78.8)	9.60	0.008	70(15.2)	392(84.8)	9.00	0.003
SR 组	165	23(13.9)	39(23.7)	103(62.4)	0.16	0.920	85(25.8)	245(74.2)	0.22	0.640
对照组	135	17(12.6)	31(23.0)	87(64.4)			65(24.1)	205(75.9)		

注:括号内数据为构成比(%)

IFN- γ 对病毒的清除有重要作用。然而细胞因子的表达是受基因调控的,位于基因表达调控区的 SNP 影响基因的表达,在疾病的个体差异方面有重要意义^[3]。

研究表明,IFN- γ 基因内含子 1 区存在 CA 重复序列,其中 CA 重复为 12 次的个体,其外周血单个核细胞 IFN- γ 表达量最高。在 CA 重复序列 5' 末端 +874 位点 T/A 多态性与 CA 重复次数相关,即 TT 为高表达基因型,AA 为低表达型基因型,TA 为中等表达基因型。由于内含子 1 +874 位点正好位于转录因子 NF-kappa B 的结合位点,此处出现 SNP 直接影响与转录因子的结合能力,从而直接影响 IFN- γ 的转录^[4]。因此,IFN- γ 基因内含子 1 +874 位点多态性与某些疾病的发生相关。Jahromi 等^[5]发现 1 型糖尿病患者中 IFN- γ 基因内含子 1 +874 位点 AA 型(低表达型)出现频率显著高于健康人群。还有研究发现,结核病患者 IFN- γ 基因内含子 1 +874 位点 TT 型(高表达型)频率较正常对照组低;IFN- γ +874 位点 TT 基因型肺移植患者较 AA、AT 基因型者更易患支气管炎性闭塞综合征^[6]。但有关 IFN- γ 基因内含子 1 +874 位点 T/A 多态性与 HBV 感染易感性的研究,国内外鲜见报道。

不同个体在 HBV 感染后临床表型复杂多样,从一过性抗原血症、自限性的急性肝炎、慢性病毒携带、进行性肝损害乃至肝硬化,形成了复杂的疾病谱。这些不同的临床发展过程,除了与病毒本身的因素有关外,更重要的是由于不同个体对 HBV 感染所发生的免疫反应的不同^[7]。本研究所选择三组人群,在种族、年龄、性别、生活习惯等方面无显著性差异,有可比性。本文对中国汉族 231 例慢性 HBV 感染者、165 例自限性 HBV 感染者和 135 名正常对照者 IFN- γ 基因内含子 1 +874T/A 位点多态性研究,发现 IFN- γ 基因内含子 1 +874T/A 位点基因型和等位基因分布频率在慢性 HBV 感染者与对照组之间差异有统计学意义,慢性 HBV 感染者中产生低水平 IFN- γ 能力的 AA 基因型频率(78.8%)显著高于正常对照组(64.4%);而自限性 HBV 感染组 IFN- γ 基因内含子 1 +874T/A 位点多态性分布与正常对照组相似,差异无统计学意义。因此,通过三组人群 IFN- γ 基因内含子 1 +874T/A 位点基因型和等位基因频率分析,提示 IFN- γ 基因内含子 1

+874T/A 位点多态性可能在决定个体 HBV 感染遗传易感性方面有重要意义。而且,基因型频率的相对风险分析表明,IFN- γ 基因 +874 AA 基因型是慢性 HBV 感染的易感基因型($\chi^2 = 8.9, P = 0.003, OR = 2.05, 95\% CI: 1.28 \sim 3.29$)。进一步比较不同人群 IFN- γ 基因内含子 1 +874T/A 位点多态性发现,中国湖北地区汉族人群 IFN- γ 基因 +874 位点 AA 基因型和 A 等位基因频率分布明显高于意大利和以色列人群(资料待发表)。由于 AA 基因型的个体显示产生低水平 IFN- γ 的能力,这是否与乙型病毒性肝炎存在地域和人种间流行差异有关,值得探讨。

由于 IFN- γ 基因还存在其他位点的 SNP,且这些多态性与 IFN- γ 表达和分泌的关系还不明确;同时,乙型病毒性肝炎是一种由遗传、机体免疫和环境因素共同作用所致的复杂的感染性疾病,因此,要确切了解 IFN- γ 基因 +874 位点多态性与 HBV 感染之间的内在联系以及该位点不同基因型与其他细胞因子的相互作用,还需要更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Chevillard C, Henri S, Stefani F, et al. Two new polymorphisms in the human interferon gamma (IFN-gamma) promoter. *Eur J Immunogenet*, 2002, 29:53-56.
- 2 Henri S, Stefani F, Parzy D, et al. Description of three new polymorphisms in the intronic and 3' UTR regions of the human interferon gamma gene. *Genes Immun*, 2002, 3:1-4.
- 3 Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun*, 2001, 2:61-70.
- 4 Pravica V, Perrey C, Stevens A, et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ gene. *Hum Immunol*, 2000, 61:863-866.
- 5 Jahromi M, Millward A, Demaine A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20:187-190.
- 6 王小众,陈立. 细胞因子多态性与肝炎病毒感染的关系. *世界华人消化杂志*, 2004, 12:2778-2781.
- 7 Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2003, 9:641-644.

(收稿日期:2005-04-11)

(本文编辑:孙强正)