

# 白细胞介素-28B和平衡性核苷转运载体1基因多态性与HIV/HCV合并感染者HCV自发清除的关系研究

彭瑾瑜 陈曦 贺健梅 郑军 覃碧云 江洋

**【摘要】** 目的 分析湖南省HIV/HCV合并感染者的白细胞介素-28B(IL-28B)和平衡性核苷转运载体1(ENT1)基因多态性与HCV自发清除的关系。方法 对湖南省107例HIV/HCV合并感染者的IL-28B和ENT1基因位点(rs12980275、rs12979860、rs8099917和rs760370)进行分型,比较其在慢性肝炎组和自发清除组的基因多态性分布。结果 在HIV/HCV合并感染者中,IL-28B基因rs12980275、rs12979860和rs8099917位点的主要基因型分别为AA、CC和TT型,均占84.1%。3个位点高度连锁不平衡( $r^2 > 0.94$ ),慢性肝炎组和自发清除组基因型分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),携带IL-28B主要基因型的感染者更易发生HCV自发清除。ENT1基因的rs760370位点基因型分布在两组间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 IL-28B基因AA、CC和TT型与HCV自发清除有关。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒;人类免疫缺陷病毒;白细胞介素-28B;平衡性核苷转运载体1;自发清除;单核苷酸多态性

**Relationship between interleukin 28B, equilibrative nucleoside transporters 1 gene polymorphisms and spontaneous clearance of HCV in HIV/HCV co-infectors** Peng Jinyu, Chen Xi, He Jianmei, Zheng Jun, Qin Biyun, Jiang Yang. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China

Corresponding author: Chen Xi, Email: chenxi161@sohu.com

This work was supported by a grant from the Hunan Provincial Science and Technology Department (No. 2012SK3267).

**【Abstract】 Objective** To explore the association between interleukin 28B (IL-28B), equilibrative nucleoside transporters 1 (ENT1) gene polymorphisms and spontaneous clearance of HCV in HIV/HCV co-infectors in Hunan province. **Methods** Genotypes of IL-28B and ENT1 (rs12980275, rs12979860, rs8099917 and rs760370) were analyzed in 107 HIV/HCV co-infectors in Hunan province and the distributions of gene polymorphisms were compared between chronic hepatitis and spontaneous clearance groups. **Results** The major genotypes in rs12980275, rs12979860 and rs8099917 of IL-28B were AA, CC and TT in HIV/HCV co-infectors, which accounted for 84.1% of each. The three single nucleotide polymorphisms were highly linkage disequilibrium ( $r^2 > 0.94$ ) and the differences of genotype distribution were statistically significant between chronic hepatitis and the spontaneous clearance groups ( $P < 0.05$ ). Infectors which carrying the major genotypes were more susceptible to spontaneous clearance of HCV. Differences of the genotype distributions in rs760370 of ENT1 were not statistically significant between the two groups. **Conclusion** Genotypes AA, CC and TT of IL-28B were related to spontaneous clearance of HCV in HIV/HCV co-infectors.

**【Key words】** Hepatitis C virus; Human immunodeficiency virus; Interleukin 28B; Equilibrative nucleoside transporters 1; Spontaneous clearance; Single nucleotide polymorphism

研究显示,白细胞介素-28B(IL-28B)基因的一

些单核苷酸多态性(SNP)位点与HCV感染者的HCV自发清除、慢性感染和治疗效果密切相关<sup>[1-3]</sup>。细胞膜上的一种载体蛋白-平衡性核苷转运载体1(equilibrative nucleoside transporters 1, ENT1)对利巴韦林在肝细胞中的转运和摄入起重要作用,ENT1

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.04.018

基金项目:湖南省科技厅课题(2012SK3267)

作者单位:410005长沙,湖南省疾病预防控制中心

通信作者:陈曦, Email: chenxi161@sohu.com

基因多态性可能影响抗 HCV 治疗效果<sup>[4]</sup>。

HIV/HCV 合并感染已成为艾滋病患者死亡的主要原因之一<sup>[5]</sup>。本研究对湖南省 HIV/HCV 合并感染者 IL-28B 和 ENT1 基因多态性进行研究。

### 对象与方法

1. 研究对象: 湖南省 HIV-1/HCV 合并感染者, 共 107 例。将研究对象分为两组: ①慢性丙肝组: 诊断标准符合卫生部颁布的《丙型肝炎病毒诊断标准》(WS 213-2008), HCV 抗体阳性超过 6 个月, HCV-RNA 仍为阳性。②自发清除组: HCV 抗体阳性, 而 HCV-RNA 阴性, 没有慢性丙肝病史。两组均未接受干扰素联合利巴韦林抗病毒及抗反转录病毒治疗。同时收集两组人群人口学、感染途径、肝功能、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞资料。

2. 实验室检测: 收集两组研究对象 EDTA 抗凝血, 检测 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞后分离血浆和淋巴细胞富集液, -70 °C 保存待检。

(1)HCV 抗体检测: 用酶联免疫吸附试验检测, 试剂为珠海丽珠试剂股份有限公司的 HCV 抗体诊断试剂盒。

(2)HCV 核酸定量和基因分型: 采用实时荧光定量 PCR 方法检测, 检测下限为 15 IU/ml。试剂由上海复星长征医学科学有限公司提供, 仪器为美国 ABI 公司的 7500Fast 荧光定量 PCR 仪。

(3)IL-28B 和 ENT1 基因多态性分析: 采用德国 Qiagen 公司的全血 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 利用多重 PCR 扩增目的基因、多重连接酶检测反应连接基因片段, 测序, 然后对 IL-28B 基因的 3 个 SNPs 位点 (rs12980275、rs12979860 和 rs8099917) 和 ENT1 基因的 1 个 SNP 位点 (rs760370) 进行分型。引物 rs12980275 (FP: 5' -CTA TTA ACC CCT CCC GCT AC-3' 和 RP: 5' -ATG AGG TGC TGA GAG AAG TC-3'); rs12979860 (FP: 5' - TCG TGC CTG TCG TGT ACT GA-3' 和 RP: 5' -AGC GCG GAG TGC AAT TCA AC-3'); rs8099917 (FP: 5' -CAA TTT GTC ACT GTT CCT CC-3' 和 RP: 5' -ACT GTA TAC AGC ATG GTT CC-3'); rs760370 (FP: 5' - TTT AGG GAA CGT GTA TGG TG -3' 和 RP: 5' - CCA AGC TTA CTT GGG TGG AG -3')。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 94 °C 30 s, 53 °C 1 min, 65 °C 30 s, 35 个循环; 65 °C 10 min。

(4)CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞计数: 采用美国 BD 公司生产的 FACSCalibur 流式细胞仪和相关试剂。

3. 统计学分析: 用 SPSS 19.0 软件处理数据, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验; 计数资料用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义, 理论频数  $< 5$  时使用 Fisher 精确检验。对样本人群中 IL-28B 和 ENT1 基因的 SNPs 进行 H-W 遗传平衡分析使用  $\chi^2$  检验。SNPs 间的连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 用 Haploview 4.2 软件分析<sup>[6]</sup>。

### 结 果

1. 一般特征: 107 例 HIV/HCV 合并感染者中, 男性 83 例, 女性 24 例, 年龄为 (36.84 ± 7.2) 岁, 平均 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞数为 (282.0 ± 196.7) cells/μl, 主要为静脉吸毒途径感染 (83 例, 占 77.5%)。其中慢性肝炎组 80 例; 自发清除组 27 例, 两组年龄、性别、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞数和感染途径差异无统计学意义, 肝功能指标 ALT 和 AST 差异有统计学意义, 总胆红素 (Total Bilirubin, TB) 和血小板 (Platelet, PLT) 差异无统计学意义。慢性肝炎组的平均 HCV-RNA ( $\log_{10}$ ) 含量为 5.90 IU/ml, 其中 18 例为 HCV 基因 1 型感染, 见表 1。

表 1 107 例 HIV/HCV 合并感染者的一般特征

变 量	慢性肝炎组 (n=80)	HCV 自发清除组 (n=27)	P 值
年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	37.4 ± 7.5	35.3 ± 6.2	0.201
性别			0.300
男	64(80.0)	19(70.4)	
女	16(20.0)	8(29.6)	
感染途径			0.614*
静脉吸毒	63(78.8)	20(74.1)	
异性性传播	11(13.8)	3(11.1)	
输血或单采血浆	6(7.5)	3(11.1)	
不详	0(0.0)	1(3.7)	
CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> T 淋巴细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ , cells/μl)	290.7 ± 196.0	256.1 ± 200.1	0.432
ALT ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)	60.0 ± 44.6	26.3 ± 22.8	0.000
AST ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)	53.5 ± 35.1	33.2 ± 17.3	0.025
TB ( $\bar{x} \pm s$ , μmol/L)	14.4 ± 5.4	15.5 ± 6.6	0.543
PLT ( $\bar{x} \pm s$ , × 10 <sup>9</sup> /L)	161.8 ± 77.2	161.3 ± 57.1	0.981
HCV 基因型 (1 型/非 1 型)	18/62	未检出	-
HCV-RNA ( $\log_{10}$ ) ( $\bar{x} \pm s$ , IU/ml)	5.90 ± 1.07	未检出	-

注: \* 由于例数太少, 将静脉吸毒与其他 3 种途径合并进行 2 × 2 的  $\chi^2$  检验; 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比 (%)

2. IL-28B 和 ENT1 基因 SNPs 位点 H-W 遗传平衡分析: 107 例 HIV/HCV 合并感染者中, rs12980275 位点 AA 型 90 例 (84.1%), AG 型 15 例 (14.0%), GG 型 2 例 (1.9%); rs12979860 位点 CC 型 90 例 (84.1%), CT 型 16 例 (15.0%), TT 型 1 例 (0.9%);

rs8099917 位点 TT 型 90 例 (84.1%), TG 型 16 例 (15.0%), GG 型 1 例 (0.9%); rs760370 位点 AA 型 60 例 (56.1%), AG 型 39 例 (36.4%), GG 型 8 例 (7.5%)。H-W 遗传平衡检验显示,慢性肝炎组和自发清除组均  $P > 0.05$ , 4 个基因型频率符合遗传平衡法则,分布均匀,具有群体代表性。

3. IL-28B 和 ENT1 基因的 SNPs 与 HCV 自发清除的相关性分析:对慢性肝炎组和自发清除组 IL-28B 基因的 3 个 SNPs 位点 rs12980275、rs12979860 及 rs8099917 的基因型和 3 者的单体型 (AA, CC, TT) 进行比较,均  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义,在自发清除组中 rs12980275 位点的 AA 基因型、rs12979860 位点的 CC 基因型、rs8099917 位点的 TT 基因型以及 3 者的单体型 (AA, CC, TT) 频率均为 100%, 高于慢性肝炎组, 差异有统计学意义。而 rs760370 的基因型在两组间差异无统计学意义,  $P > 0.05$ , 见表 2。

表 2 IL-28B 和 ENT1 基因的 4 个 SNPs 位点与 HCV 自发清除的关系

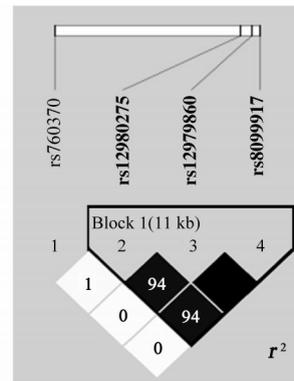
SNP	慢性肝炎组	自发清除组	P 值
<b>基因型</b>			
rs12980275/rs12979860/rs8099917			0.006
AA/CC/TT	63(78.8)	27(100.0)	
AG+GG/CT+TT/TG+GG	17(21.2)	0	
rs760370			0.700
AA	44(55.0)	16(59.3)	
AG+GG	36(45.0)	11(40.7)	
<b>单体型</b>			
rs12980275, rs12979860, rs8099917			0.006 <sup>a</sup>
AA, CC, TT	63(78.8)	27(100.0)	
AG, CT, TG	15(18.8)	0	
GG, TT, GG	1(1.3)	0	
GG, CT, TG	1(1.3)	0	

注:<sup>a</sup> 由于例数太少,将 AA, CC, TT 组与其他 3 组合并进行  $2 \times 2$  的  $\chi^2$  检验;其余同表 1

4. IL-28B 和 ENT1 基因 4 个 SNPs 的 LD 分析:在 IL-28B 基因 3 个位点 rs12980275、rs12979860 和 rs8099917 的基因型分别以 AA、CC 和 TT 为主, rs12980275 和 rs12979860、rs12980275 和 rs8099917 的  $r^2 = 0.94$ , rs12979860 和 rs8099917 的  $r^2 = 1.00$ , 3 个位点间存在高度 LD。ENT1 基因的 rs760370 位点与这 3 个位点的  $r^2$  远小于 0.50, LD 程度低,见图 1。

### 讨 论

本研究显示,湖南省 HIV/HCV 合并感染人群的 IL-28B 的 rs12980275、rs12979860 和 rs8099917 主要



注:方格中数字代表  $r^2$  值,其中空方格  $r^2 = 1.00$

图 1 IL-28B 和 ENT1 基因 4 个 SNPs 位点的 LD 分析

基因型分别为 AA、CC 和 TT 型, 均占 84.1%, 次要基因型分别为 AG/GG、CT/TT 和 TG/GG。在 HCV 自发清除组, 3 个 SNPs 位点均为主要基因型, 未发现其他基因型。而在慢性肝炎组, 主要基因型频率均  $< 80\%$ , 提示 IL-28B 的 rs12980275、rs12979860 和 rs8099917 主要基因型 (AA、CC 和 TT 型) 可能与 HCV 自发清除相关。本研究还显示, IL-28B 基因的 3 个 SNPs 存在着高度 LD ( $r^2 > 0.94$ ), 提示可选择某个位点作为标签 SNP 预测 HCV 感染后的转归。

国内外关于中国人群的 IL-28B 基因型分布与本研究稍有所不同<sup>[1,7-9]</sup>。Thomas 等<sup>[1]</sup>发现在华裔人群中 rs12979860 的 CC 基因型约占 93.6% ~ 97.5%, 而非裔裔人群只占 23.1% ~ 54.8%。而 Rao 等<sup>[8]</sup>发现在中国河北省有偿献血人群中 rs12980275 的 AA 基因型和 rs8099917 的 TT 基因型分别占 86.0% 和 86.7%, 与本研究基本一致, 但是 rs12979860 的 CC 基因型只占 48.5%, 远低于本研究数据, 可能与研究人群来源、地区和种族等因素有关。Rao 等<sup>[8]</sup>的研究显示, rs12980275、rs12979860 和 rs8099917 呈现高度 LD, 与本研究一致。国外对 HCV 感染人群进行全基因组关联分析, 研究发现宿主基因 IL-28B 变异在 HCV 感染后的自发清除方面起到关键作用<sup>[1,10-12]</sup>。Rauch 等<sup>[11]</sup>对 347 例 HCV 自发清除者和 1 015 例慢性 HCV 感染患者研究显示, 在 IL-28B 附近有 7 个 SNPs 位点与 HCV 自发清除相关, 最有意义的能强烈预测 HCV 自发清除的位点是 rs8099917。IL-28B 编码的干扰素- $\lambda 3$  主要功能包括抗病毒、抗细胞增值和调节适应性免疫应答, 而 IL-28B 基因编码区上游的位点 rs12980275、rs12979860 和 rs8099917 的主要基因型携带者有较高的 HCV 自发清除率, 一般认为在 DNA 的启动子或增强子附近位点对基因转录有很大影响, 推测这 3 个 SNPs 可能影响了 IL-28B

基因的表达水平,从而影响宿主干扰素- $\lambda$ 的合成有关。但是本研究也发现,即使在IL-28B基因的3个SNPs的主要基因型中,也只有30.0%(27/90)的携带者发生了HCV自发清除,所以不能只依靠基因多态性进行HCV感染后转归预测,应结合病毒基因型、病毒载量、种族、临床症状等进行综合评判。

Morello等<sup>[4]</sup>发现ENT1基因rs760370位点的GG基因型更容易获得抗HCV治疗的快速应答。但在本研究中,rs760370的基因型分布在慢性肝炎组和自发清除组中的差异无统计学意义,提示其与HCV自发清除无关。

对于HIV/HCV合并感染者来说,首先进行抗HIV治疗还是抗HCV治疗一直存在争议。在HCV单独感染者有20%~30%会发生自发清除<sup>[13]</sup>,本研究中有25.2%(27/107)的HIV/HCV合并感染者发生了HCV自发清除,提示即使感染了HIV,HCV感染仍有一定比例自愈,所以应进一步开展研究,比较HIV/HCV合并感染者和HCV单独感染者的HCV自发清除率及影响因素。本研究显示,IL-28B基因多态性对HCV自发清除具有很强的预测价值,建议针对携带IL-28B次要基因型的HIV/HCV合并感染者立即开展抗HCV治疗,因为该人群不太可能发生HCV自发清除,而对携带主要基因型的感染者可以根据临床症状和CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞数首先开展抗反转录病毒治疗,确定HCV无法自发清除后再进行抗HCV治疗。

#### 参 考 文 献

- [1] Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL-28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus [J]. *Nature*, 2009, 461(7265): 795-801.
- [2] Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance [J]. *Nature*, 2009, 461(7262): 399-401.
- [3] de Castellarnau M, Aparicio E, Parera M, et al. Deciphering the interleukin 28B variants that better predict response to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy in HCV/HIV-1 coinfecting patients [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31016.
- [4] Morello J, Cuenca L, Soriano V, et al. Influence of a single nucleotide polymorphism at the main ribavirin transporter gene on the rapid virological response to pegylated interferon-ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(8): 1185-1191.
- [5] Matín-Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M, et al. Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C: a European collaborative study [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(1): 128-133.
- [6] Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(2): 263-265.
- [7] Shi X, Pan Y, Wang M, et al. IL-28B genetic variation is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus, treatment response, serum IL-28B levels in Chinese population [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37054.
- [8] Rao HY, Sun DG, Jiang D, et al. IL-28B genetic variants and gender are associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus infection [J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(3): 173-181.
- [9] Liao XW, Ling Y, Li XH, et al. Association of genetic variation in IL-28B with hepatitis C treatment-induced viral clearance in the Chinese Han population [J]. *Antivir Ther*, 2011, 16(2): 141-147.
- [10] Grebely J, Petoumenos K, Hellard M, et al. Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection [J]. *Hepatology*, 2010, 52(4): 1216-1224.
- [11] Rauch A, Kotalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL-28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(4): 1338-1345, e7.
- [12] Zheng MH, Li Y, Xiao DD, et al. Interleukin-28B rs12979860 C/T and rs8099917T/G contribute to spontaneous clearance of hepatitis C virus in Caucasians [J]. *Gene*, 2013, 518(2): 479-482.
- [13] Marcellin P. Hepatitis B and hepatitis C in 2009 [J]. *Liver Int*, 2009, 29 Suppl 1: S1-8.

(收稿日期:2014-10-09)

(本文编辑:万玉立)