

核转录因子 κB 基因多态性与人群感染丙型肝炎病毒的关联性

樊圆圆 邵建国 黄鹏 田亭 李军 韩亚萍 岳明 章莉莉

210029 南京医科大学第一附属医院感染病科(樊圆圆、李军、韩亚萍、岳明、章莉莉);

226000 南通市第三人民医院消化科(邵建国); 211166 南京医科大学公共卫生学院流行病学系传染病重点实验室(黄鹏、田亭)

通信作者:岳明, Email:njym08@163.com; 章莉莉, Email: dr.zhanglili@gmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.09.022

【摘要】 目的 探索核转录因子 κB ($NF-\kappa B$)基因多态性与人群感染HCV的关联性。方法 本研究共纳入1 679位研究对象(503位吸毒者和1 176位高危血源性暴露者)。通过logistic回归分析人群感染HCV的相关因素,通过TaqMan-MGB探针法对 $NF-\kappa B1$ 基因rs72696119和 REL 基因rs13031237位点进行基因分型,并分析其与HCV易感性的相关性。**结果** 在吸毒人群中,女性吸毒者($OR=0.408, 95\%CI:0.308 \sim 0.767$)HCV易感性更低,而静脉注射吸毒($OR=8.817, 95\%CI:5.577 \sim 13.937$)以及吸毒时间 >5.5 年($OR=2.891, 95\%CI:1.824 \sim 4.583$)则是感染HCV的危险因素。在高危血源暴露人群中,小学以上文化程度($OR=0.613, 95\%CI:0.429 \sim 0.876$)是该高危人群感染HCV的保护因素,而女性($OR=3.431, 95\%CI:2.360 \sim 4.988$)则是感染HCV的危险因素。在总人群中,携带 $NF-\kappa B1$ rs72696119 GG基因型的个体更易感染HCV($OR=1.412, 95\%CI:1.035 \sim 1.927$)。总人群中的交互作用分析显示,rs72696119与HCV感染途径、性别均不存在交互作用($P>0.05$)。**结论** 在高危人群中,相关的行为因素和 $NF-\kappa B1$ 基因rs72696119多态性与HCV易感性相关。

【关键词】 丙型肝炎病毒;易感性;危险因素;核转录因子 κB 基因

基金项目:国家自然科学基金(81502853, 81773499, 81703273, 81473029);江苏省自然科学基金(BK20151026, BK20171054);江苏省卫计委“科教强卫工程”青年医学人才项目(QNRC2016616);江苏省卫计委医学创新团队项目(CXTDA2017023)

Association between nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells genetic polymorphisms and HCV susceptibility among the Chinese population under high-risk Fan Yuanyuan, Shao Jianguo, Huang Peng, Tian Ting, Li Jun, Han Yaping, Yue Ming, Zhang Lili

Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China (Fan YY, Li J, Han YP, Yue M, Zhang LL); Department of Digestive Medicine, The Third People's Hospital of Nantong City, Nantong 226000, China (Shao JG); Key Laboratory of Infectious Diseases, Department of Epidemiology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China (Huang P, Tian T)

Corresponding authors: Yue Ming, Email: njym08@163.com; Zhang Lili, Email: dr.zhanglili@gmail.com

【Abstract】 Objective To explore the association between nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated genetic polymorphisms in B cells ($NF-\kappa B$) and the HCV susceptibility, among the Chinese population. **Methods** A total of 1 679 participants were enrolled; including 503 drug users and 1 176 other participants at risk under the exposure for blood. By using the logistic regression analysis, related risk factors for HCV infection among subjects were analyzed. Two $NF-\kappa B$ pathway variants, $NF-\kappa B1$ rs72696119 and REL rs13031237 were then genotyped by TaqMan assay method. Logistic regression analysis was performed to analyze the association between gene polymorphisms and the susceptibility on HCV. **Results** Among the drug users, women ($OR=0.408, 95\%CI: 0.308-0.767$) appeared to be associated with the decreased risk for HCV infection, while factors as drug injection ($OR=8.817, 95\%CI: 5.577-13.937$) and the duration of drug-intake >5.5 years ($OR=2.891, 95\%CI: 1.824-4.583$) were associated with the increased risk for HCV infection. Among the participants who

had been exposed to blood, women ($OR=3.431$, 95% CI : 2.360–4.988) were associated with the increased risk for HCV infection, while the levels of education beyond elementary school ($OR=0.613$, 95% CI : 0.429–0.876) were associated with the decreased risk for HCV infection. Compared to the reference $NF-\kappa B$ rs72696119 CC genotype, the carriage of GG genotype was associated with an increased risk of susceptibility on HCV ($OR=1.412$, 95% CI : 1.035–1.927) among the total study population. Results from the interaction analysis showed that there was no interactive effects appeared between rs72696119 and route of infection, or between rs72696119 and gender among the total population under study (all $P>0.05$). **Conclusion** $NF-\kappa B$ polymorphism rs72696119 and related factors seemed associated with the susceptibility to HCV infection among high-risk Chinese populations.

【Key words】 Hepatitis C virus; Susceptibility; Risk factor; Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81502853, 81773499, 81703273, 81473029); Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK20151026, BK20171054); Jiangsu Program for Young Medical Talents (QNRC2016616); Medical Innovation Team Project of Jiangsu Province (CXTDA2017023)

丙型肝炎(丙肝)是由HCV感染引起的一系列以肝脏疾病和肝外疾病为特征的慢性进展性疾病,在全球范围内感染者超过1.85亿人^[1]。不同的个体感染HCV的易感性以及清除病毒的能力受到了宿主因素和环境因素的影响^[2]。

核转录因子 κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, $NF-\kappa B$)是一组核转录因子蛋白,通过和特定的核苷酸序列相结合,从而控制DNA的转录过程并调节免疫应答^[3]。机体感染HCV后,HCV激活 $NF-\kappa B$ 通路,广泛的影响了细胞因子的转录和表达,从而影响了机体对HCV的免疫能力,对HCV的结局产生了至关重要的影响^[4]。 $NF-\kappa B$ 家族 $NF-\kappa B1$ 和 REL 基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点和许多免疫相关疾病存在关联,其中 $NF-\kappa B1$ 上的rs72696119 GG基因型显著提升了溃疡性结肠炎的患病风险^[5],而位于 REL 上的rs13031237和系统性红斑狼疮以及类风湿性关节炎等相关^[6-7]。 $NF-\kappa B$ 信号通路在HCV免疫应答方面具有重要作用,且 $NF-\kappa B1$ 和 REL 基因的变异对HCV感染、免疫及转归可能产生影响。然而目前在人群中, $NF-\kappa B$ 基因多态性与HCV感染相关性的研究还未有报道。

丙肝通过危险血液暴露(包括不安全输血/献血行为)、危险性行为和母婴传播等^[8]。据估计全球范围内,吸毒人群的HCV患病率高达50%以上,并且合并较高的HIV感染^[9-10]。本研究选取了吸毒及血源性暴露人群的 $NF-\kappa B1$ 上的rs72696119和 REL 上的rs13031237位点,拟探索该高危人群感染丙肝的遗传因素及环境因素。

对象与方法

1. 研究对象:2008年10月至2012年5月纳入的

南京市公安局强制戒毒所吸毒人员,2015年10月至2016年5月纳入的江苏某地区既往不安全输血或有偿献血比例较高的自然行政村居民。江苏某地区自然行政村居民指的是自然村户籍居民,连续居住 ≥ 5 年。将所有研究对象分为两组,对照组为HCV抗体阴性,HCV RNA阴性;病例组为HCV抗体阳性,HCV RNA阴性或阳性。研究对象具有以下任意一项即予以排除:①年龄 <18 岁或 >80 岁;②合并HBV或HIV感染;③患有自免疫性、酒精性、药物性肝脏疾病;④患有其他严重疾病(肿瘤、代谢异常等);⑤入组前接受过抗-HCV药物治疗。所有的血清学结果基于12个月的随访,重复检测3次HCV抗体及HCV RNA。研究对象均签署知情同意书。

2. 流行病学调查:采用结构化问卷,由统一培训的调查员对参与者进行问卷调查,收集人口学(年龄、性别、婚姻状况等)和环境暴露(感染途径、吸毒方式、吸毒时间、文化程度等)信息。质量控制贯穿整个调查之中,保证数据的完整性和准确性。参与者完成调查问卷后,抽取5 ml静脉血备用。

3. HCV抗体检测:HCV抗体用第三代ELISA检测。

4. 位点筛选:从千人基因组数据库、NCBI dbSNP数据库、以及相关文献中进行 $NF-\kappa B$ 家族基因SNP位点筛选。筛选标准:①在中国汉族人群中最小基因频率(minor allele frequency, MAF) $> 5\%$;②有相关文献报道。由此筛选出2个SNP位点,即 REL 基因的rs13031237和 $NF-\kappa B1$ 基因的rs72696119。

5. 标本提取和基因分型:采用真空抗凝管采集空腹EDTA抗凝静脉血5 ml,4 000 r/min离心10 min,分离血浆、红细胞及白细胞;采用苯酚/氯仿抽提法提取DNA。应用TaqMan探针实时荧光定量PCR

技术对 rs13031237 和 rs72696119 位点进行基因分型。PCR 反应体系总量为 5 μl, 经历 40 个循环。PCR 反应后在 ABI QuantStudio7 荧光定量 PCR 仪上读取荧光信号, 提取相关信息后以备进一步分析。rs13031237 的引物序列: 正向为 5' -GCC TTT CCT TAC AAC TGA AAA CTT AAA-3', 反向为 5' -GCT TCG AAA ACT CTG ACT GCA ATA A-3'。rs72696119 的引物序列: 正向为 5' -GAA ACC TCC TCT TCC TGC CC-3', 反向为 5' -GTC TGT CTG TAT GCT CTC TCG AC-3'。

6. 统计分析: 使用 EpiData 3.10 软件建立数据库, 应用 SPSS 20.0 软件进行相关统计分析。对照组和病例组的年龄、性别和感染途径采用 χ^2 检验, 对 ALT 和 AST 采用 Mann-Whitney *U* 检验。对吸毒人群和高危血源性暴露人群感染丙肝的相关因素采用单因素和逐步 logistic 回归模型分析, 并计算 OR 值及其 95%CI, 双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况: 共纳入 1 679 名研究对象, 其中吸毒人群 503 人、血源性暴露人群 1 176 人, 不同感染途径人群的平均年龄差异有统计学意义(吸毒人群: 32.48 岁, 血源性暴露人群: 62.64 岁, $P < 0.001$)。按 HCV 暴露情况分为对照组与病例组, 组间年龄、感染途径、ALT、AST 水平差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (表 1)。

表 1 研究总人群的一般情况

变量	对照组	病例组	<i>P</i> 值
平均年龄(岁)	57.34	48.52	<0.001
性别			0.362
男	400(41.62)	283(39.42)	
女	561(58.38)	435(60.58)	
感染途径			<0.001
吸毒人群	196(20.40)	307(42.76)	
血源性暴露人群	765(79.60)	411(57.24)	
ALT(U/L)			<0.001
<40	901(93.76)	508(70.75)	
≥40	57(5.93)	210(29.25)	
缺失	3(0.31)	-	
AST(U/L)			<0.001
<40	921(95.84)	543(75.63)	
≥40	37(3.85)	175(24.37)	
缺失	3(0.31)	-	
合计	961(100.00)	718(100.00)	

注: 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%)

2. 吸毒人群感染 HCV 相关环境因素分析: 单因素 logistic 回归分析结果表明, 性别、吸毒方式和吸

毒时间是吸毒人群感染 HCV 的相关因素。将单因素分析有意义的变量纳入逐步回归后, 女性 ($OR = 0.408, 95\%CI: 0.308 \sim 0.767$) 是 HCV 感染的保护因素, 而静脉注射吸毒 ($OR = 8.817, 95\%CI: 5.577 \sim 13.937$) 以及吸毒时间 > 5.5 年 ($OR = 2.891, 95\%CI: 1.824 \sim 4.583$) 则是危险因素 (表 2)。

表 2 吸毒人群感染 HCV 逐步 logistic 回归分析

因素	对照组 ^b	病例组 ^b	OR 值(95%CI)	<i>P</i> 值
性别				
男	77(39.28)	208(67.75)	1.000	-
女	119(60.72)	99(32.25)	0.408(0.308 ~ 0.767)	0.002
静脉注射吸毒				
否	138(70.41)	55(17.92)	1.000	-
是	58(29.59)	252(82.08)	8.817(5.577 ~ 13.937)	<0.001
吸毒时间(年)				
≤5.5	141(72.68)	114(38.26)	1.000	-
>5.5	53(27.32)	184(61.74)	2.891(1.824 ~ 4.583)	<0.001

注: ^a 剔除吸毒时间信息缺失者; ^b 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%)

3. 既往血源性暴露人群感染 HCV 相关环境因素分析: 单因素 logistic 回归分析结果显示, 年龄、性别、文化程度以及 BMI 是既往血源性暴露人群感染 HCV 的相关因素。将单因素分析有意义的变量纳入逐步回归后, 结果显示小学以上文化程度 ($OR = 0.613, 95\%CI: 0.429 \sim 0.876$) 是感染 HCV 的保护因素, 而女性 ($OR = 3.431, 95\%CI: 2.360 \sim 4.988$) 则是危险因素 (表 3)。

表 3 血源性暴露人群感染 HCV 逐步 logistic 回归分析

因素	对照组 ^b	病例组 ^b	OR 值(95%CI)	<i>P</i> 值
性别				
男	323(42.22)	75(18.25)	1.000	-
女	442(57.78)	336(81.75)	3.431(2.360 ~ 4.988)	<0.001
文化程度 ^a				
小学及以下	460(62.76)	296(74.94)	1.000	-
小学以上	273(37.24)	99(25.06)	0.613(0.429 ~ 0.876)	0.007

注: ^a 已剔除相关信息缺失者; ^b 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%)

4. *NF-κB* 基因多态性与高危人群感染 HCV 的相关性: 将 rs13031237 和 rs72696119 的基因型在对照组和病例组中的分布进行比较, 采用多因素 logistic 回归分析, 校正年龄、性别和感染途径, 并采用相加、显性和隐性模型进行分析, 结果表明携带 rs72696119 GG 基因型的个体更易感染 HCV ($OR = 1.412, 95\%CI: 1.035 \sim 1.927$), 且在相加和隐性模型中仍有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 rs13031237 基因型与 HCV 易感性不相关 ($P > 0.05$)。在总人群中的交互作用分析表明, rs72696119 与 HCV 感染途径及性别之间不存在交互作用 (表 4)。

表4 rs13031237和rs72696119基因型在对照组、病例组中的分布

单核苷酸多态性	对照组 ^a	病例组 ^a	病例组 vs. 对照组	
			OR值(95%CI)	P值
rs13031237				
GG	840(87.41)	648(90.25)	1.000	-
GT	117(12.17)	68(9.47)	0.837(0.597 ~ 1.174)	0.304
TT	4(0.42)	2(0.28)	0.447(0.076 ~ 2.625)	0.373
相加模型	-	-	0.813(0.592 ~ 1.117)	0.202
显性模型	-	-	0.819(0.587 ~ 1.144)	0.242
隐性模型	-	-	0.455(0.078 ~ 2.670)	0.383
rs72696119				
CC	351(36.52)	242(33.70)	1.000	-
CG	473(49.22)	337(46.94)	1.056(0.836 ~ 1.336)	0.647
GG	137(14.26)	139(19.36)	1.412(1.035 ~ 1.927)	0.029
相加模型	-	-	1.164(1.001 ~ 1.355)	0.048
显性模型	-	-	1.139(0.913 ~ 1.422)	0.247
隐性模型	-	-	1.368(1.034 ~ 1.809)	0.028

注:^a括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%)

讨 论

本研究结果表明,与*NF-κB1*基因rs72696119 CC基因型携带者相比,GG基因型的个体感染HCV风险更高。rs72696119位点位于*NF-κB1*基因5' -非翻译区(untranslated regions, UTR)区域。5' -UTR始于基因转录起始位点,终于起始密码子AUG之前,位于编码区上游,不能翻译为蛋白质,但包含基因调控序列。5' -UTR可通过对前起始复合物的调控、闭环调控、铁蛋白调控等多种机制调控基因的表达^[11]。因此,位于5' -UTR区域的位点突变可能影响*NF-κB1*基因的表达调控,从而影响了*NF-κB*信号通路相关的免疫功能,继而与HCV易感性相关。

本研究还发现,在吸毒人群中,静脉注射吸毒方式和长时间吸毒是感染HCV的危险因素;而在高危血源性暴露人群中,小学以上文化程度是感染HCV的保护因素。HCV感染在吸毒人群中通常会在较短的时间内产生流行,尤其是静脉注射吸毒者中,HCV患病率高达50%~90%^[9,12],长时间吸毒也会带来更高的HCV暴露风险。此外,性别也是感染HCV的相关因素,本研究的吸毒人群中的女性人群不易感染HCV,既往研究也表明女性HCV患者更易发生病毒的自限清除^[13],但高危血源性暴露人群中的女性反而更易感染HCV。提取该部分人群献血次数的数据发现,在高危血源性暴露人群(1 176人)中,仅有248人有献血次数的记录,献血次数为男性(6.31±10.91)次,女性(9.02±20.58)次,差异无统计学意义。推测高危血源性暴露人群中女性成为感染HCV的危险因素,可能与该部分人群中女性性别与

献血次数正相关,HCV暴露风险更高,从而感染HCV风险更大。但由于该部分人群有献血次数记录的较少,结果差异无统计学意义。

综上所述,高危人群中的相关因素和*NF-κB1*基因rs72696119多态性与HCV感染易感性之间存在一定的关联。本研究结果有利于对高危人群进行针对性的预防和治疗,达到有效控制丙肝感染和传播的目的。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Mohd HK, Groeger J, Flaxman AD, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1333-1342. DOI: 10.1002/hep.26141.
- [2] Thrift AP, El-Serag HB, Kanwal F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(2): 122-132. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.176.
- [3] Gilmore TD. Introduction to *NF-κB*: players, pathways, perspectives [J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6680-6684. DOI: 10.1038/sj.onc.1209954.
- [4] Horner SM, Gale Jr M. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus [J]. *Nat Med*, 2013, 19(7): 879-888. DOI: 10.1038/nm.3253.
- [5] Hayashi R, Tahara T, Yamaaki T, et al. -449 C>G polymorphism of *NFKB1* gene, coding nuclear factor-kappa-B, is associated with the susceptibility to ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(47): 6981-6986. DOI: 10.3748/wjg.v18.i47.6981.
- [6] Varadé J, Palomino-Morales R, Ortego-Centeno N, et al. Analysis of the *REL* polymorphism rs13031237 in autoimmune diseases [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(4): 711-712. DOI: 10.1136/ard.2010.134593.
- [7] Ali FR, Barton A, Smith RLI, et al. An investigation of rheumatoid arthritis loci in patients with early-onset psoriasis validates association of the *REL* gene [J]. *Br J Dermatol*, 2013, 168(4): 864-866. DOI: 10.1111/bjd.12106.
- [8] Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of Hepatitis C virus genotypes [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1): 77-87. DOI: 10.1002/hep.27259.
- [9] Nelson P, Mathers B, Cowie B, et al. The epidemiology of viral hepatitis among people who inject drugs: results of global systematic reviews [J]. *Lancet*, 2011, 378(9791): 571-583. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61097-0.
- [10] Platt L, Easterbrook P, Gower E, et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(7): 797-808. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00485-5.
- [11] Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5' -untranslated regions of eukaryotic mRNAs [J]. *Science*, 2016, 352(6292): 1413-1416. DOI: 10.1126/science.aad9868.
- [12] 王昊鹏, 杨静静, 邓小昭, 等. 中国大陆吸毒人群HIV、HBV、HCV感染状况及其相关因素的Meta分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2010, 14(4): 300-304.
Wang HP, Yang JJ, Deng XZ, et al. HIV/HBV/HCV infection among drug users: a meta analysis of data collected in Chinese mainland [J]. *Chin J Dis Control Prev*, 2010, 14(4): 300-304.
- [13] Bakr I, Rekacewicz C, El Hosseiny M, et al. Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males [J]. *Gut*, 2006, 55(8): 1183-1187. DOI: 10.1136/gut.2005.078147.

(收稿日期: 2017-12-01)

(本文编辑: 李银鸽)