

广西地区人群 IL-6 及 IL-10 单核苷酸多态性与 HBV 相关肝癌关联研究

仇小强 贝春华 余红平 曾小云 钟秋安

【摘要】 目的 探讨广西地区人群 IL-6 和 IL-10 基因单核苷酸多态性(SNP)与 HBV 相关肝癌的关系。方法 采用以医院为基础的病例对照研究方法,以 381 例肝癌患者为病例组,340 例 HBsAg 携带者及 359 例健康体检者为对照组。应用荧光定量 PCR 对 IL-6 基因-572 位点,IL-10 基因-819 和-592 位点进行基因分型,采用非条件 logistic 回归模型分析比较携带不同基因型人群罹患肝癌的风险。结果 IL-6 基因-572 位点 G/C 等位基因在病例组、HBsAg 携带组及健康对照组中分布差异有统计学意义($P < 0.05$),与 CC 基因型相比,携带 GG 基因型个体慢性 HBV 感染危险性增加($OR = 2.171, 95\% CI: 1.068 \sim 4.415$)。IL-10 基因-819 位点 T/C 等位基因在三组的分布差异有统计学意义($P < 0.05$),与 CC 基因型相比,携带 TT 基因型健康个体罹患肝癌的危险性增加($OR = 2.791, 95\% CI: 1.326 \sim 5.874$),携带 TT 基因型的 HBsAg 携带者罹患肝癌的风险也增加($OR = 3.522, 95\% CI: 1.707 \sim 7.266$)。IL-10 基因-592 位点 A/C 等位基因在三组中的分布差异无统计学意义($P > 0.05$),与 CC 基因型相比,携带 AA 基因型健康个体罹患肝癌的危险性降低($OR = 0.389, 95\% CI: 0.173 \sim 0.875$),携带 AA 基因型的 HBsAg 携带者肝癌的罹患风险也降低($OR = 0.336, 95\% CI: 0.154 \sim 0.734$)。结论 IL-6 基因-572 位点 SNP 与广西地区人群慢性 HBV 感染有关,IL-10 基因-819 位点 TT 基因型个体罹患肝癌的风险增加,IL-592 位点 AA 基因型个体罹患肝癌的风险降低。

【关键词】 肝细胞癌; 细胞因子; 基因多态性

Study on the relationship between single-nucleotide polymorphisms in IL-6, IL-10 genes and HBV-related hepatocellular carcinoma QIU Xiao-qiang¹, BEI Chun-hua², YU Hong-ping², ZENG Xiao-yun², ZHONG Qiu-an². 1 Guilin Medical University Guilin 541004, China; 2 Department of Epidemiology, School of Public Health, Guangxi Medical University

Corresponding author: QIU Xiao-qiang, Email: xqiu9999@sina.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30860247) and Guangxi Foundation for Nature (No. 0832017Z, 0991126).

【Abstract】 Objective To investigate the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine IL-6, IL-10 genes and HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A hospital-based case-control study was conducted in 381 cases with HBV-related HCC, 340 HBsAg carriers and 359 non-tumor controls. Genotypes of -572 site of IL-6 gene and -819, -592 sites of IL-10 gene were determined by real-time polymorphism chain reaction. Unconditional logistic regression was used to estimate the odds ratios (ORs) and 95 confidence intervals (CIs). **Results** For the G/C alleles of -572 loci on IL-6 gene, there were significant differences between the three groups ($P < 0.05$). Compared with CC genotype, GG genotype increased the risk of HBV infection ($OR = 2.171, 95\% CI: 1.068-4.415$), but did not seem to be associated with HCC. For the alleles of -819 and -592 site of IL-10 gene, there were significant differences between the three groups ($P < 0.05$). Compared with CC genotype, TT genotype increased the risks of both HCC ($OR = 2.791, 95\% CI: 1.326-5.874$), and HCC in HBsAg carriers ($OR = 3.522, 95\% CI: 1.707-7.266$). When compared with CC genotype on -592 site, the AA genotype reduced the risk of both HCC ($OR = 0.389, 95\% CI: 0.173-0.875$), and HCC in HBsAg carriers ($OR = 0.336, 95\% CI: 0.154-0.734$). **Conclusion** The SNPs in -572 site of IL-6 gene might be associated with the risk of HBV infection. The SNPs in -819 site of IL-10 gene increased the risk of HCC, but -592 site of IL-10 gene decreased the risk of HCC.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Cytokine; Gene polymorphism

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.05.020

基金项目:国家自然科学基金(30860247);广西壮族自治区自然科学基金(0832017Z, 0991126)

作者单位:541004 桂林医学院(仇小强);广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室(贝春华、余红平、曾小云、钟秋安)

通信作者:仇小强, Email: xqiu9999@sina.com

近年来,通过对HBV诱导肝癌发生机制的研究发现,宿主的免疫应答能力是HBV感染结局的重要影响因素^[1]。研究表明,一些细胞因子基因单核苷酸多态性(SNP)可导致不同个体之间免疫功能的差异,从而影响HBV感染者的不同临床转归^[2,3]。IL-6和IL-10作为多功能的炎症细胞因子,在调节免疫应答、参与炎症反应等过程中起着重要作用。基于IL-6和IL-10的免疫调节功能,本研究选择IL-6基因启动子区-572位点和IL-10基因启动子区-819、-592位点,分析其与HBV相关肝癌遗传易感性的相关性。

对象与方法

1. 研究对象:所有研究对象为相互间无血缘关系的广西地区人群,选择2008年1月至2010年6月在广西医科大学附属第一医院、广西医科大学肿瘤医院、柳州市第一人民医院就诊和治疗的经肝组织病理学诊断为肝癌、HBsAg阳性且无其他器官恶性肿瘤史的患者作为病例组,同期来自上述医院就诊和治疗无肿瘤病史的HBsAg携带者(HBsAg携带组)及健康体检者(健康对照组)作为对照组。诊断标准符合2000年西安第十次全国病毒性肝炎学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》(试行)标准。HBV相关肝癌患者和HBsAg携带者均排除HCV感染和其他原因导致肝脏病变的疾病,如酒精性及代谢性肝病等。

2. 现场调查:采用统一的流行病学调查问卷,经患者知情同意后,由专门培训的调查员对研究对象进行面对面调查,内容包括基本情况、家族史、吸烟史、饮酒史等。调查完成后采集研究对象外周血4 ml,采用常规酚-氯仿法提取全基因组DNA。

3. 基因分型:基因分型采用美国应用生物系统(ABI)公司7500 Fast高通量荧光定量PCR仪和TaqMan SNP基因分型试剂盒。对IL-6基因-572位点(rs1800796)和IL-10基因-819位点(rs1800871)、-592位点(rs1800872)进行基因分型,实验结果应用7500 Fast System V1.3.1 SDS软件进行分析。PCR反应体系为25 μ l:2 \times Universal PCR Master mix(无AmpErase UNG酶,购自美国ABI公司)0.625 μ l,20 \times SNP Genotyping Assay Mix 12.5 μ l,DNA(1~10 ng/ μ l)1 μ l,去离子水10.875 μ l。PCR反应条件为90 $^{\circ}$ C 10 min,92 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,40个循环。为进行质量控制,基因分型操作者不知道标本分组情况;每次检测设置2个空白对照及2个重复

样本作为阳性对照;随机抽取5%的样本进行盲法复测,检测结果一致率为100%;对荧光定量PCR仪不能自动分型的样本,进行重复检测,重复检测仍无法分型的样本全部剔除。

4. 统计学分析:数据录入与分析分别采用EpiData 3.0和SPSS 13.0软件,计量资料和计数资料分别采用 t 检验和 χ^2 检验。以哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)遗传平衡定律检验确认研究样本是否具有群体代表性。非条件logistic回归模型计算比值比(OR)及其95%可信区间(CI)。所有的统计学检验均为双侧概率检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 一般情况:调查共收到符合要求、资料完整的HBV相关肝癌新发病例381例、HBsAg携带者340例、健康对照359人。病例组、HBsAg携带组及健康对照组人群在性别、年龄以及民族方面差异均无统计学意义($P>0.05$),三组均衡可比。但是吸烟史、饮酒史、家族史在三组中分布差异均有统计学意义($P<0.001$),结果见表1。

表1 广西地区肝癌病例组、HBsAg携带组和健康对照组的基本情况

特征	病例组 (n=381)	携带组 (n=340)	健康组 (n=359)	χ^2 值	P值
性别				4.449	0.108
男	293	271	262		
女	88	69	97		
年龄				4.895	0.086
<50	260	250	270		
≥ 50	121	90	89		
民族				4.561	0.102
汉族	268	263	265		
壮族	113	77	94		
吸烟史				59.867	<0.001
是	123	58	36		
否	258	282	323		
饮酒史				69.026	<0.001
是	134	58	40		
否	247	282	319		
家族史				98.768	<0.001
是	60	4	1		
否	321	336	358		

2. 基因型分布频率:IL-6基因-572、IL-10基因-819、-592位点各基因型进行Hardy-Weinberg平衡吻合度检验,结果表明,各基因型分布频率均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律($P>0.05$),说明研究对象具有人群代表性。

3. IL-6和IL-10各基因型、等位基因频率分布

与肝癌的关系:IL-6 基因-572 位点 CC、CG、GG 基因型在病例组、HBsAg 携带组、健康对照组中的分布差异无统计学意义($P>0.05$),C/G 等位基因在三组中分布差异有统计学意义($P<0.05$)。IL-10 基因-819 位点 CC、CT、TT 基因型在三组中分布差异无统计学意义($P>0.05$),C/T 等位基因在三组中的分布差异有统计学意义($P<0.05$)。IL-10 基因-592 位点 CC、AC、AA 基因型三组中分布差异无统计学意义($P>0.05$),等位基因 C/A 在三组中的分布差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 IL-6 及 IL-10 基因各基因型、等位基因在肝癌组、HBsAg 携带组及健康对照组中的分布

基因	病例组	携带组	健康组	χ^2 值	P 值
IL-6-572					
基因型	CC	259(67.98)	210(61.76)	241(67.13)	7.782 0.100
	CG	110(28.87)	107(31.48)	105(29.25)	
	GG	12(3.15)	23(6.76)	13(3.62)	
等位基因	C	628(82.41)	527(77.50)	587(81.75)	6.405 0.041
	G	134(17.59)	153(22.50)	131(18.25)	
IL-10-819					
基因型	CC	170(44.62)	184(54.12)	181(50.42)	8.699 0.069
	CT	158(41.47)	124(36.47)	143(39.83)	
	TT	53(13.91)	32(9.41)	35(9.75)	
等位基因	C	498(65.35)	492(72.35)	505(70.33)	8.894 0.012
	T	264(34.65)	188(27.65)	213(29.67)	
IL-10-592					
基因型	CC	179(46.98)	171(50.29)	180(50.14)	3.233 0.520
	AC	172(45.14)	135(39.70)	144(40.11)	
	AA	30(7.87)	34(10.00)	35(9.75)	
等位基因	C	530(69.55)	477(70.23)	504(70.20)	0.090 0.956
	A	232(30.45)	203(29.77)	214(29.80)	

注:括号外数据为病例数,括号内数据为百分比(%)

4. IL-6 和 IL-10 SNP 与慢性 HBV 感染风险的关系:与 CC 基因型相比,IL-6 基因-572 位点携带 GG 基因型个体慢性 HBV 感染风险增加($OR=2.171, 95\% CI: 1.068 \sim 4.415$),携带 CG 基因型个体与慢性 HBV 感染无统计学关联($OR=1.245, 95\% CI: 0.894 \sim 1.735$)。IL-10 基因-819、-592 位点基因多态性与慢性 HBV 感染风险无统计学关联,见表 3。

5. IL-6 和 IL-10 SNP 与肝癌患病风险的关系:将病例组与健康对照组进行比较,IL-6 基因-572 位点携带 GG 基因型个体与肝癌的患病风险无统计学关联($OR=0.981, 95\% CI: 0.407 \sim 2.363$)。IL-10 基因-819 位点携带 TT 基因型个体罹患肝癌的风险增加($OR=2.791, 95\% CI: 1.326 \sim 5.847$)、CT 基因型与肝癌的患病风险无统计学关联($OR=1.090, 95\% CI: 0.696 \sim 1.708$)。IL-10 基因-592 位点携带 AA 基因

表 3 IL-6 和 IL-10 基因多态性与慢性 HBV 感染风险的多因素 logistic 回归分析

基因型	β	Wald/ χ^2 值	P 值	OR ^a 值(95%CI)
IL-6-572				
GG	0.775	5.587	0.032	2.171(1.068 ~ 4.415)
CG	0.219	1.685	0.194	1.245(0.894 ~ 1.735)
CC	0 ^b			
IL-10-819				
TT	-0.233	0.349	0.554	0.792(0.366 ~ 1.714)
CT	-0.278	1.573	0.210	0.757(0.491 ~ 1.169)
CC	0 ^b			
IL-10-592				
AA	0.153	0.153	0.695	1.165(0.542 ~ 2.508)
CA	0.156	0.503	0.478	1.169(0.759 ~ 1.801)
CC	0 ^b			

注:^a调整了吸烟史、饮酒史、家族史等环境危险因素;^b3 个位点均以 CC 基因型作为参照,所以其参数默认为 0

型则可降低肝癌的罹患风险($OR=0.392, 95\% CI: 0.175 \sim 0.880$)、AC 基因型与肝癌的患病风险无统计学关联($OR=1.142, 95\% CI: 0.733 \sim 1.780$),见表 4。将病例组与 HBsAg 携带组进行比较,IL-10 基因-819 位点携带 TT 基因型的 HBsAg 携带者罹患肝癌的风险增加($OR=3.522, 95\% CI: 1.707 \sim 7.266$)、CT 基因型与 HBV 携带者肝癌的罹患风险无统计学关联($OR=1.439, 95\% CI: 0.925 \sim 2.241$)。IL-10 基因-592 位点携带 AA 基因型则可降低 HBsAg 携带者肝癌的罹患风险($OR=0.336, 95\% CI: 0.154 \sim 0.734$),见表 5。

表 4 IL-6 和 IL-10 基因多态性与肝癌患病风险的多因素 logistic 回归分析(一)

基因型	β	Wald/ χ^2 值	P 值	OR ^a 值(95%CI)
IL-6-572				
GG	-0.019	0.020	0.966	0.981(0.407 ~ 2.363)
CG	0.058	0.104	0.747	1.059(0.746 ~ 1.503)
CC	0 ^b			
IL-10-819				
TT	1.026	7.308	0.007	2.791(1.326 ~ 5.847)
CT	0.086	0.142	0.706	1.090(0.696 ~ 1.708)
CC	0 ^b	0		
IL-10-592				
AA	-0.937	5.155	0.023	0.392(0.175 ~ 0.880)
AC	0.133	0.346	0.556	1.142(0.733 ~ 1.780)
CC	0 ^b			

注:^{a,b}同表 3

讨 论

既往的研究提示个体遗传因素影响 HBV 感染结局,在遗传因素中,SNP 位于基因表达调控启动子区或编码区具有重要功能^[4,5]。广西不仅是我国肝

表5 IL-6和IL-10基因多态性与肝癌患病风险的多因素logistic回归分析(二)

基因型	β	Wald χ^2 值	P值	OR ^a 值(95%CI)
IL-6-572				
GG	-0.795	3.842	0.050	0.452(0.204~1.000)
CG	-0.162	0.840	0.359	0.851(0.602~1.202)
CC	0 ^b			
IL-10-819				
TT	1.259	11.611	0.001	3.522(1.707~7.266)
CT	0.364	2.601	0.107	1.439(0.925~2.241)
CC	0 ^b			
IL-10-592				
AA	-1.090	7.502	0.006	0.336(0.154~0.734)
CA	-0.023	0.011	0.917	0.997(0.632~1.511)
CC	0 ^b			

注:^a、^b同表3

癌高发地区,也是HBV感染的高流行区。本研究利用病例对照研究方法并结合实验室研究,探讨了细胞因子IL-6及IL-10基因多态性与HBV相关肝癌遗传易感性的关系。

IL-6作为一种多功能的炎症细胞因子,在调节免疫应答、参与炎症反应等过程中起着重要作用。IL-6基因启动子区SNP能影响IL-6转录,并与肝癌、前列腺癌、乳腺癌等多种疾病患者中IL-6水平特征性升高密切相关^[1]。Song等^[6]的研究发现,慢性乙型肝炎患者血清中IL-6水平显著升高。本研究结果显示,IL-6基因多态性与HBV感染有关,而与肝癌无关,与Park等^[7]研究结果一致。意大利Falletti等^[8]的研究显示,IL-6基因-597、-174位点SNP可使IL-6表达降低,与肝硬化患者肝癌的患病风险相关。由于研究方法及人群的不同,同类研究结果存在差异,因此IL-6基因多态性与肝癌的关系尚需要进一步研究。

IL-10是一种强有力的免疫抑制因子和协同刺激分子,并具有B细胞激活活性,在很多人类肿瘤组织中过量表达。IL-10基因-819和-592位点位于启动子区,SNP可影响转录和翻译^[2]。台湾Tseng等^[9]的研究结果显示,与CC基因型个体相比,携带IL-10基因-592位点携带AA基因型个体患肝癌的风险降低,与本研究结果一致。韩国Shin等^[10]研究报告,携带IL-10单倍体ht2(-1082A/-819C/-592C/+117T)的慢性乙肝患者外周血IL-10表达增加,IL-10的上调可加快慢性HBV感染-肝硬化-肝细胞

癌的病理进程,与本研究结果相似。可见,IL-10基因SNP可能在HBV感染引起的炎症反应和肝癌的发生中起重要作用。

本研究分析广西地区人群细胞因子IL-6和IL-10基因SNP与HBV相关肝癌易感性的关系,结果提示细胞因子IL-6和IL-10基因多态性在HBV相关肝癌的发生过程中可能具有重要作用。目前,国内外关于细胞因子基因多态性与HBV相关肝癌易感性关系的研究工作相对较少,样本量相对偏小,同时由于不同种族或地域人群差异、实验对照的设计等因素不同,研究结果存在一定程度的分歧,要确定细胞因子基因多态性与肝癌的关系需要进一步应用大样本的前瞻性研究予以证实。

参 考 文 献

- [1] Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukocyte Biol*, 2006, 80(6): 1197-1213.
- [2] Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*, 1999, 1(1): 3-19.
- [3] Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, et al. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments, 1998. *Eur J Immunogenet*, 1998, 25(2-3): 83-256.
- [4] van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Med*, 2001, 27(1): 98-102.
- [5] Mullikin JC, Hunt SE, Cole CG, et al. A single nucleotide polymorphism (SNP) map of human chromosome 22. *Nature*, 2000, 407(6803): 516-520.
- [6] Song W, Zhang F, Li Z, et al. A quantitative analysis of IL-6 mRNA expression of peripheral blood monocyte cell in patients with chronic hepatitis B. *Chin J Hepatol*, 2008, 8(6): 346-347.
- [7] Park BL, Lee H, Kim YJ, et al. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progress. *Exp Mol Med*, 2003, 35(2): 76-82.
- [8] Falletti E, Fabris C, Toniutto P, et al. Interleukin-6 polymorphisms and gender: relationship with the occurrence of hepatocellular carcinoma in patients with end-stage liver disease. *Oncology*, 2009, 77(5): 304-313.
- [9] Tseng LH, Lin MT, Shau WY, et al. Correlation of interleukin-10 gene haplotype with hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Tissue Antigens*, 2006, 67(2): 127-133.
- [10] Shin HD, Park BL, Kim LH, et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(8): 901-906.

(收稿日期:2010-10-28)

(本文编辑:万玉立)