论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0832-04

白细胞介素-28B的基因多态性与干扰素抗丙型肝炎病毒治疗应答的关系

高晓娟[1],余祖江[1],刘翠萍[2] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院感染科[1];274000 山东 菏泽,菏泽市立医院肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 探讨IL-28B基因多态性与慢性丙型肝炎患者对干扰素治疗应答的关系。**方法** 采用分子生物学方法提取基因组DNA,PCR扩增后直接测序,对我院感染科门诊和住院的63例应答组(SVR)和34例无应答组(NVR)的HCV 1型患者的SNPs rs8099917和rs12980275位点进行检测分析。**结果** (1)rs12980275只检测到AA、AG,rs8099917只检测到TT、TG,二者均未发现GG型。(2)rs12980275、rs8099917基因型分布在SVR组和NVR组之间差异均具有统计学意义($OR=3.288$, 95% $CI=[1.171\sim9.234]$, $\chi^2=5.416$, $P=0.020$; $OR=2.865$, 95% $CI=[1.006\sim8.154]$, $\chi^2=4.081$, $P=0.043$)。(3)rs12980275等位基因频率在SVR组和NVR组之间差异具有统计学意义($OR=2.846$, 95% $CI=[1.086\sim7.464]$, $\chi^2=4.828$, $P=0.028$);rs8099917等位基因频率在SVR组和NVR组之间差异无统计学意义($OR=2.543$, 95% $CI=[0.953\sim6.785]$, $\chi^2=3.664$, $P=0.056$)。(4)rs12980275、rs8099917的基因型及等位基因频率在SVR、NVR组中的相关性分析r均大于0($r=0.236$, $r=0.205$, $r=0.158$, $r=0.137$),均呈正相关。**结论** rs12980275和rs8099917多态性对干扰素抗丙型肝炎病毒治疗应答有重要影响,可以预测抗病毒疗效,为实现个体化治疗提供依据。

[关键词] 丙型肝炎病毒;单核苷酸多态性;IL-28B基因多态性;干扰素持续性病毒应答

[中图法分类号] R392-33; R392.11; R512.63 [文献标志码] A

Relationship of interleukin 28B polymorphisms and response to interferon treatment in patients with hepatitis C infection

Gao Xiaojuan[1], Yu Zujiang[1], Liu Cuiping[2] ([1]Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052; [2]Department of Oncology, City Hospital of Heze, Heze, Shandong Province, 274000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the correlation between interleukin 28B (IL-28B) polymorphism in chronic hepatitis C patients and their response to interferon treatment. **Methods** A total of 97 cases of identified chronic hepatitis C 1 type, including 63 cases of sustained virological response (SVR) and 34 cases of null virological response (NVR), were collected from in-patient and out-patient of our department from 2009 to 2011. Their genomic DNA was extracted by molecular biology methods, and PCR directly sequencing was performed for SNPs genotyping of rs8099917 and rs12980275. The SNPs genotypes of the 2 sites were analyzed in the SVR and NVR group. **Results** Genotype of rs12980275 was only detected as AA, and AG, while that of rs8099917 was only TT and TG. There was no GG type found in both rs12980275 and rs8099917. Significant difference was found in the genotype distribution of rs12980275 and rs8099917 between the SVR group and NVR group ($OR=3.288$, 95% $CI=[1.171$ to $9.234]$, Pearson's *Chi* square $=5.416$, $P=0.020$; $OR=2.865$; 95% $CI=[1.006$ to $8.154]$, Pearson's *Chi* square $=4.081$, $P=0.043$). The frequencies of alleles of rs12980275 were significant difference between the 2 groups ($OR=2.846$, 95% $CI=[1.086$ to $7.464]$, Pearson's *Chi* square $=4.828$, $P=0.028$). The frequencies of alleles of rs8099917 had no significant difference between the 2 groups ($OR=2.543$, 95% $CI=[0.953$ to $6.785]$, Pearson's *Chi* square $=3.664$, $P=0.056$). The genotypes distribution and the frequencies of alleles of rs12980275 and rs8099917 had positive correlation between the 2 groups (Pearson's $r=0.236$; Pearson's $r=0.205$; Pearson's $r=0.158$; Pearson's $r=0.137$). **Conclusion** Polymorphism of SNPs rs8099917 and rs12980275 are associated with outcomes of patients' antiviral response to interferon. IL-28B genetic polymorphisms can provide a reliable basis for individual therapy and predicting treatment efficacy.

[**Key words**] hepatitis C virus; single nucleotide polymorphism; IL28B polymorphism; interferon; sustained virological response

Corresponding author: Yu Zujiang, Tel: 86-371-67966942, E-mail: johnyu@zzu.edu.cn

[通信作者] 余祖江,电话:(0371)67966942,E-mail:johnyu@zzu.edu.cn

丙型肝炎(hepatitis C)是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)引起的肝脏慢性炎症,HCV 是导致肝硬化和肝细胞癌的主要病原体之一[1]。目前以干扰素(interferon,IFN)为基础的治疗是丙型肝炎病毒感染唯一有效的治疗手段[2],但并不是患者都能达到持续病毒学应答(sustained virological response,SVR)。近年来,国内外关于宿主遗传基因多态性与 HCV 感染转归的研究成果不断涌现,相继报道了与丙型肝炎感染相关的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)、炎症趋化因子类、白细胞介素(interleukin,IL)和干扰素刺激基因(interferon stimulated genes,ISGs)等多个基因的多态性,都证实了宿主遗传基因变异可能导致机体免疫功能状态的差异,进而影响丙型肝炎病毒感染的不同临床结局[3]。在非洲、欧洲、东亚人群中进行的全基因组关联分析(Genome-wide Association Study,GWAS)研究发现 IL-28B 基因附近有一些单核苷酸的多态位点(single nucleotide polymorphisms,SNPs)与 HCV 病毒自发清除能力及对干扰素抗病毒治疗应答有关[4-7]。但目前国内有关 IL-28B 基因多态性与丙肝的研究很少,尤其是涉及 IL-28B 基因多态性与 HCV 基因型和 SVR 的关系。本研究对我院慢性丙型肝炎患者对干扰素治疗应答情况和 IL-28B 基因多态性进行回顾性分析,比较应答组与无应答组的 IL-28B 基因变异频率,为早期预测干扰素疗效提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2009 – 2011 年郑州大学第一附属医院感染科门诊及住院的慢性丙型肝炎(CHC)患者 97 例,其中男性 43 例,女性 54 例,年龄(40.34 ± 15.47)岁,诊断符合 2004 年 3 月中华医学会肝病学分会制定的《丙型肝炎防治指南》[8]。入组标准:基因型均为 HCV 1 型患者,且均接受标准干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗 1 年,半年后检测 HCV-RNA 是否阳性。SVR:完成抗病毒治疗疗程后随访 24 周以上血清 HCV-RNA 仍低于检测下限。无病毒学应答(null virological response,NVR):未获得治疗末病毒学应答(在抗病毒治疗 48 周时,血清 HCV-RNA 低于检测下限)。排除标准:妊娠及哺乳期的妇女,6 个月内接受过抗病毒或免疫抑制剂治疗的患者,失代偿性肝硬化的患者,合并乙型肝炎病毒(HBV)、丁性肝炎病毒(HDV)或人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的患者,及合并自身免疫性疾病、严重精神性疾病(如抑郁症)、恶性肿瘤、甲状腺疾病患者,有吸毒或酗酒史的患者等。用干燥管收集上述患者经 EDTA 抗凝的血液样本,– 20 ℃保存备用,其中 63 例来自 SVR,34 例来自 NVR。

1.2 rs12980275、rs8099917 引物设计

2 个 SNP 位点 rs12980275 和 rs8099917 的引物根据 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP 公布的参考序列应用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计。由上海的生工生物工程技术服务有限公司合成。rs12980275 引物序列:上游 5′-GACACATGCTACAATAAAAATGAAC-3′,下游 5′-GGATTACAGGTCTGGTCCTAGTG-3′,产物长度为 280 bp;rs8099917 引物序列:上游 5′-ACTTGTTCCTTGTAAAAGATTCCA-3′,下游 5′-AACCCCACCTCAAATTATCCT-3′,产物长度为 308 bp。

1.3 人体基因组 DNA 提取

采用血液基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取人体基因组 DNA,按试剂盒说明书操作,试剂盒购于上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.4 PCR 扩增目的基因

常规步骤操作,采用 1.2 步骤中所设计的引物,以步骤 1.3 中提取的人体基因组 DNA 为模板,利用 *Taq* DNA polymerase 进行 PCR 反应。

1.5 琼脂糖凝胶电泳

提取的人体基因组 DNA、PCR 产物分别在 1.0% 琼脂糖凝胶,150 V、100 mA、50 min 或 30 min 电泳下观察。

1.6 PCR 产物的纯化回收测序

采用 PCR 产物纯化回收试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司),按照试剂盒说明书操作,回收产物送上海生工公司应用 3730 测序列分析仪进行测序。

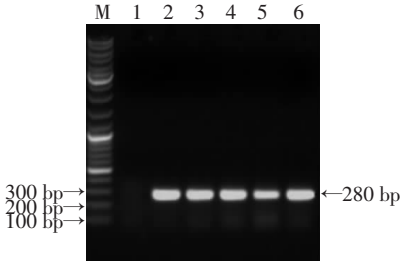
1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,对干扰素抗病毒治疗应答与不应答的慢性丙型肝炎患者的 IL28B 基因多态性 rs12980275 和 rs8099917 位点的基因表型及等位基因频率进行分析统计,采用 Pearson χ^2 和关联性检验进行等位基因单因素分析和关联分析,比较 SVR 组和 NVR 组患者之间的频率差异,以比值比(odds ratio,*OR*)及其 95% 可信区间(confidential interval,*CI*)表示相对风险度,以 *r* 表示关联性。

2 结果

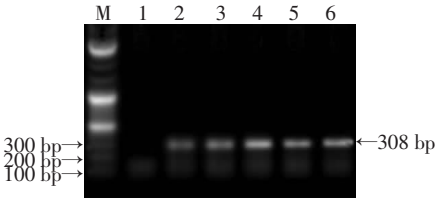
2.1 rs12980275、rs8099917 PCR 产物的电泳

PCR 产物结果均在 1.0% 琼脂糖凝胶,150 V、100 mA、30 min 电泳下观察,rs12980275 和 rs8099917 的 PCR 产物均获得高效和特异扩增,以样本 2 ~ 6 表示,见图 1、2。



M:DNA 标准;1:阴性对照;2 ~ 6:样本

图 1 rs12980275 的 PCR 产物电泳结果



M:DNA 标准;1:阴性对照;2~6:样本

图2 rs8099917 的 PCR 产物电泳结果

2.2 测序结果及同源性分析

2.2.1 测序结果 利用直接测序法对 SVR 和 NVR 两组患者的 rs12980275、rs8099917 位点进行检测,得知 rs12980275 位点基因型为 AA、AG、GG,等位基因为 A、G;rs8099917 位点基因型为 TT、TG、GG,等位基因为 T、G。rs12980275 只检测到 AA、AG, rs8099917 只检测到 TT、TG,二者均未发现 GG 型。

2.2.2 测序结果的同源性分析 rs12980275 AA、AG 基因型序列,rs8099917 TT、TG 基因型序列应用 BLAST 进行同源性分析,示其与 Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-246B18 同源性分别为 100%、99%、100%、99%。

2.3 SVR、NVR 中 rs12980275、rs8099917 位点基因型和等位基因频率比较

rs12980275、rs8099917 基因型分布在 SVR 组和 NVR 组之间差异均具有统计学意义($OR = 3.288$, 95% $CI = [1.171 \sim 9.234]$, $OR = 2.865$, 95% $CI = [1.006 \sim 8.154]$)。rs12980275 等位基因频率在 SVR 组和 NVR 组之间差异具有统计学意义($OR = 2.846$, 95% $CI = [1.086 \sim 7.464]$);rs8099917 等位基因频率在 SVR 组和 NVR 组之间差异无统计学意义($OR = 2.543$, 95% $CI = [0.953 \sim 6.785]$)。rs12980275、rs8099917 的基因型及等位基因频率在 SVR、NVR 组中的相关性分析 r 均大于 0,均呈正相关。见表 1、2。

表1 2组 rs12980275 位点基因型与等位基因分布频率比较[n(%)]

组别	n	基因型		等位基因	
		AA	AG	A	G
SVR	63	55(87.3)	8(12.7)	118(93.7)	8(6.3)
NVR	34	23(67.6)	11(32.4)	57(83.8)	11(16.2)
		$\chi^2 = 5.416$, $P = 0.020$, $r = 0.236$		$\chi^2 = 4.828$, $P = 0.028$, $r = 0.158$	

表2 2组 rs8099917 位点基因型与等位基因分布频率比较[n(%)]

组别	n	基因型		等位基因	
		TT	TG	T	G
SVR	63	55(87.3)	8(12.7)	118(93.7)	8(6.3)
NVR	34	24(70.6)	10(29.4)	58(85.3)	10(14.7)
		$\chi^2 = 4.081$, $P = 0.043$, $r = 0.205$		$\chi^2 = 3.664$, $P = 0.056$, $r = 0.137$	

3 讨论

抗病毒治疗是慢性病毒性丙型肝炎治疗的关键。干扰素(interferon, IFN)联合利巴韦林(ribavirin, RBV)方案是目前治疗 HCV 感染的有效方法,但是在宿主、病毒、药物等因素的影响下,大约只有一半的患者能够实现 HCV 的清除[9]。对于联合治疗失败的原因仍不清楚,但研究发现病毒(HCV 基因型、病毒载量)和宿主因素(人种、性别、年龄、单核苷酸多态性)可能影响患者的抗病毒疗效。抗 HCV 疗效的预测显得尤为重要,但抗病毒疗效的预测因子尚难明确。IL-28B 基因编码 IFN-λ3,为Ⅲ型干扰素[10-11],位于 19 号染色体上,包含 6 个外显子,属于 IFN-λs 家族。近年研究发现,IL-28B 基因多态性 SNP 可以预测接受聚乙二醇干扰素 α(PEG-IFN-α)联合利巴韦林(RBV)治疗的 HCV 1 型感染者的 SVR,其中 SNPs:rs12979860、rs8099917 在 HCV 1 型感染者早期病毒清除和 SVR 中具有最强的预测性,L28B 等位基因变异可能解释不同种族的 SVR 率的不同[12]。与携带保护性等位基因的纯合子比较,携带危险等位基因的杂合子或者纯合子较难清除 HCV 感染。携带 IFN-λ3 危险等位基因的治疗失败率是携带保护性等位基因的纯合子的 2~12 倍。IFN-λ3 等位基因的单独预测价值并不能完全决定治疗结果,但却可能是未来治疗策略很有帮助的组成部分[13]。本研究结果也在我院慢性丙型肝炎人群中证实了 IL-28B 基因多态性可有效地预测干扰素抗丙型肝炎病毒治疗应答效果。

目前国内对 IL-28B 多态性与 HCV 抗病毒治疗疗效关系的研究仍在探索中。对于 rs12979860 位点研究相对较多,发现 rs12979860 位点变异与病毒的清除与干扰素的治疗应答高度相关。Ge 等[4]发现 rs12979860 位点上的 C 等位基因与 SVR 有关,C 等位基因与 HCV RNA 高病毒载量有关。廖祥伟等[14]通过对 rs12979860 位点测序后对 IL-28B 基因进行分型,发现 HCV 基因型及宿主 IL28B 基因型对我国慢性丙型肝炎患者聚乙二醇干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗疗效具有重要影响。王东生等[15]研究发现 rs12979860 SNP 基因型不是 HCV 的易感基因,其 CC 基因型并不能预测丙型肝炎发生自愈的病程。而国内对 SNP rs8099917 和 SNP rs12980275 位点相关研究较少,本研究对 SNP rs8099917 和 SNP rs12980275 位点与干扰素治疗慢性丙型肝炎的应答效果进行了分析。Suppiah 等[6]以干扰素联合利巴韦林治疗 1 型基因型 HCV 慢性感染的澳大利亚和欧洲的患者,在获得 SVR 的 392 例患者中,SNP rs8099917 的基因型为 TT、GT 和 GG 的患者比例分别为 63.0%、33.2% 和 3.8%,而在 456 例对治疗无应答的患者中,这些基因型的患者比例分别为 42.7%、49.8% 和 7.5%。本研究 SVR 组中 SNP rs8099917 的基因型为 TT、GT 的比例分别为 87.3%、12.7%,而 NVR 组中这些基因型的患者比例分别为 70.6%、29.4%,未检测到 GG 型,提示我院 SNP

rs8099917 位点 GG 型所占比例较低。Tanaka 等[5]对 SNP rs12980275 进行了研究,该 SNP 的保护基因型为 AA,非保护基因型为 AG 和 GG。在上述日本患者中,获得了与 SNP rs8099917 十分相似的结果,在这些 SVR 患者中,基因型为 AA 和 AG 的患者比例分别为 90.2% 和 9.8%,没有基因型为 GG 的患者。而治疗无应答者中,患者比率分别为 25.6%、69.2% 和 5.1%。本研究结果中,在 SVR 组中 SNP rs12980275 的基因型为 AA、AG 的比例分别为 87.3%、12.7%,而 NVR 组中这些基因型的患者比例分别为 67.6%、32.4%,在 SVR 组和 NVR 组中均未检测到 GG 型,提示我院 SNP rs12980275 位点 GG 型所占比例较低。SNP rs8099917 和 SNP rs12980275 位点均未检测到 GG 型,可能与本实验样本数较少有关,有待进一步的大样本检测。我院经干扰素治疗的患者中 SVR 的 SNP rs12980275 位点的 A 等位基因频率为 93.7%,G 等位基因频率为 6.3%,而 NVR 患者中分别为 83.8%、16.2%,二者之间有显著差异($P<0.05$)。与 Tanaka 等[5]对日本人的研究相同,而携带 rs8099917 的危险性等位基因的感染者发生 NVR 的危险性与 SVR 无明显差异($P>0.05$),与日本患者不同,可能与研究分组、样本数较少、种族等多种因素相关,有待进一步研究。rs8099917 在 SVR 中 T 等位基因频率为 93.7%,G 等位基因频率为 6.3%,而在 NVR 患者中分别为 85.3%、14.7%,二者之间无显著差异。rs12980275 和 rs8099917 的基因型和等位基因频率在 SVR、NVR 组中的相关性分析 r 均大于 0,均呈正相关。则携带 rs12980275 的危险性等位基因的感染者发生 NVR 的危险性较高。

本研究结果显示 IL-28B 基因多态性 SNPs rs12980275 和 rs8099917 位点对我院慢性丙型肝炎患者干扰素联合利巴韦林治疗的疗效有重要影响。rs12980275 和 rs8099917 的基因型在 SVR、NVR 组中的相关性分析 r 均大于 0,均呈正相关。本研究中 rs12980275 基因型 AA 与 AG,rs8099917 基因型 TT 与 TG 在 SVR 和 NVR 患者中差异均有统计学意义($P<0.05$)。rs12980275 和 rs8099917 多态性可有效地预测干扰素抗病毒治疗应答效果,具有独立预测抗病毒治疗的特征。如果联合 HCV 基因型检测则更能优化治疗前的选择。

尽管宿主单核苷酸多态性是 SVR 的重要的阳性预测因子,rs12980275 和 rs8099917 多态性可有效地预测干扰素抗病毒治疗应答效果,但 IL-28B 的影响不是一个全或无现象。因此,虽然大部分应答良好基因型患者有应答,却不是全部患者;而应答不好基因型患者也不是全都对治疗失败。单纯依靠基因多态性来进行丙型肝炎抗病毒治疗的预测是不够的,应该结合临床、病毒、种族等多方面信息,以及基因变异的检测进行综合评判,才能更加可靠地对 HCV 感染患者的抗病毒治疗应答进行预测,从而有助于确定 HCV 感染者的个性化治疗方案。

参考文献:

[1] Bowen D G, Walker C M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection[J]. Nature, 2005, 436(7053): 946-952.

[2] NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consens State Sci Statements, 2002, 19(3): 1-46.

[3] 石晓东, 姜晶, 牛俊奇. 白细胞介素 28B 的基因多态性与丙型肝炎病毒感染转归的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(1): 28-31.

[4] Ge D, Fellay J, Thompson A J, *et al*. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance[J]. Nature, 2009, 461(7265): 399-401.

[5] Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, *et al*. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C[J]. Nat Genet, 2009, 41(10): 1105-1109.

[6] Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, *et al*. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy [J]. Nat Genet, 2009, 41(10): 1100-1104.

[7] Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, *et al*. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study[J]. Gastroenterology, 2010, 138(4): 1338-1345.

[8] 中华医学会肝病学分会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 194-198.

[9] Ghany M G, Strader D B, Thomas D L, *et al*. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update[J]. Hepatology, 2009, 49(4): 1335-1374.

[10] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, *et al*. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R[J]. Nat Immunol, 2003, 4(1): 63-68.

[11] Kotenko S V, Gallagher G, Baurin V V, *et al*. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex[J]. Nat Immunol, 2003, 4(1): 69-77.

[12] Gonzalez S A, Keeffe E B. IL-28B As a Predictor of Sustained Virologic Response in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection [J]. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2011, 7(6): 366-373.

[13] Kelly C, Klenerman P, Barnes E. Interferon lambdas: the next cytokine storm[J]. Gut, 2011, 60(9): 1284-1293.

[14] 廖祥伟, 凌云, 李新华, 等. 宿主 IL28B 基因型联合病毒基因型对慢性丙型肝炎抗病毒疗效的预测[J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(1): 35-40.

[15] 王东生, 潘煜, 牛俊奇, 等. IL-28B 基因变异与丙型肝炎的易感性及其自然清除的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2010, 26(5): 496-499.

(**收稿**:2011-12-09;**修回**:2012-01-31)

(编辑 王 红)