

## 云南汉族人群 IL-10 基因启动子多态性与 HCV 慢性感染的相关性研究

李莹<sup>1)</sup>, 张淑琼<sup>2)</sup>, 俞建昆<sup>1)</sup>, 汪亚玲<sup>2)</sup>, 姚宇峰<sup>1)</sup>, 史荔<sup>1)</sup>

(1) 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南昆明 650118; 2) 昆明市第三人民医院, 云南昆明 650041)

**[摘要]** **目的** 探讨 IL-10 基因启动子 SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871)、-592C/A (rs1800872) 位点与 HCV 慢性感染的相关性. **方法** 入选云南地区汉族人群 HCV 慢性感染患者 379 例, 健康对照 364 例. 采用 Taq Man 探针基因分型方法对 IL-10 基因启动子 SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871)、-592C/A (rs1800872) 的 3 个位点进行基因分型, 并构建单倍型, 评估上述 3 个 SNPs 及单倍型与 HCV 慢性感染的相关性. **结果** 在病例组和对对照组中, IL-10 基因启动子 SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871)、-592C/A (rs1800872) 基因型频率和等位基因频率差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 单倍型分析结果显示, SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871) 和 -592C/A (rs1800872) 构建的单倍型频率的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). **结论** 在云南汉族群体中, IL-10 基因启动子 SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871)、-592C/A (rs1800872) 与 HCV 慢性感染没有相关性.

**[关键词]** HCV; 慢性感染; 单核苷酸多态性; IL-10

**[中图分类号]** R392.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 01-0004-04

## Association Study between IL-10 Promoter Genetic Polymorphisms and Chronic HCV Infection in Yunnan Han Nationality

LI Ying<sup>1)</sup>, ZHANG Shu-qiong<sup>2)</sup>, YU Jian-kun<sup>1)</sup>, WANG Ya-ling<sup>2)</sup>, Yao Yu-feng<sup>1)</sup>, SHI Li<sup>1)</sup>

(1) Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Kunming Yunnan 650118; 2) The Third People's Hospital of Kunming City, Kunming Yunnan 650041, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the association between SNP-1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871), -592C/A (rs1800872) polymorphisms in the IL-10 promoter region and HCV chronic infection in Han nationality in Yunnan province. **Methods** 379 HCV chronic infectious patients and 364 healthy individuals of Han nationality in Yunnan province were recruited. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IL-10 promoter region, -1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871) and -592C/A (rs1800872) were determined by real-time TaqMan polymerase chain reaction. The haplotypes were constructed and the association between these three SNPs and haplotypes and HCV chronic infection were analyzed. **Results** The frequencies of SNPs -1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871), -592C/A (rs1800872) in the IL-10 promoter region between hepatitis C virus (HCV) chronic infectious patients and the healthy controls were not statistically significant ( $P > 0.05$ ) at both allele and genotypes levels. The frequencies of haplotypes constructed by SNP-1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871) and -592C/A (rs1800872) also showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** SNPs -1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871), -592C/A (rs1800872) in the IL-10 promoter region were not associated with HCV chronic infection in the Han nationality in Yunnan province.

**[Key words]** HCV; Chronic infection; SNPs; IL-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81160197)

**[作者简介]** 李莹 (1988~), 女, 山东枣庄市人, 在读硕士研究生, 主要从事免疫遗传研究工作.

**[通讯作者]** 史荔. E-mail: 88jiaying11@163.com

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染所致的一种世界范围的疾病。在中国, 大约有 3 800 万的 HCV 感染者, 感染率约为 3.2%<sup>[1]</sup>。HCV 感染主要通过输血传播、静脉吸毒传播、性传播和母婴传播等。近年来, 新发感染往往与静脉吸毒和不洁注射有关。在云南, 静脉用药人群中的 77.7% 可以检测到抗-HCV 抗体<sup>[2]</sup>。HCV 感染是引起慢性肝炎 (chronic hepatitis)、肝硬化 (liver cirrhosis) 和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的主要原因之一<sup>[3,4]</sup>。

作为免疫调节性细胞因子, IL-10 是一种主要由 Th2 细胞产生的、在调节细胞免疫和致炎细胞因子方面起重要作用的细胞因子。它的生物学功能主要是限制炎症反应, 调节免疫细胞的分化和增殖。IL-10 对炎症、恶性肿瘤、自身免疫性疾病起重要作用<sup>[5]</sup>。近年来, 一些研究发现血清 IL-10 水平与慢性 HCV 感染相关, 且慢性 HCV 感染者的血清 IL-10 水平明显高于健康人<sup>[6,7]</sup>。

IL-10 基因 5' 端侧翼区转录起始位上游的 3 个单核苷酸多态性位点 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871) 和 -592C/A (rs1800872) 及其组成的常见单倍型, 可以影响 IL-10 基因表达水平<sup>[8]</sup>。本研究对云南地区汉族人群 IL-10 基因启动子 SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871)、-592C/A (rs1800872) 上的 3 个 SNP 位点进行分析, 探讨 IL-10 基因启动子多态性与慢性 HCV 感染的遗传易感性关联。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

根据“知情同意”原则采集云南省的 379 名 HCV 慢性感染者为病例组。依据 2004 年公布的《丙型肝炎防治指南》<sup>[9]</sup>确定 HCV 慢性感染, 通过临床和实验室检查指标 (包括 ALT、AST、抗 HCV、HCVRNA 等) 的检测, 结果为阳性, 并排除其他肝炎的患者。

根据“知情同意”原则采集云南省的健康个体为对照组, 共 364 名。健康对照的纳入标准: HCV 诊断的临床和实验室检查指标 (包括 ALT、AST、抗 HCV、HCVRNA 等) 正常。所有参加者均是为居住于云南地区的彼此无血缘关系汉族个体。

### 1.2 样品处理

采集空腹静脉血 5 mL, 用 EDTA 或肝素抗凝, 使用 AxyPrep 血基因组 DNA 小量试剂盒提取

DNA。

### 1.3 IL-10 基因 SNP 位点基因分型

采用实时荧光定量 PCR 法进行 SNP 分型。由 Applied Biosystems 公司定制合成检测和 rs1800896 (G>A)、rs1800871 (T>C) 和 rs1800872 (A>C) 位点的引物及 TaqMan 探针。针对每个 SNP 位点所设计的双条探针分别用 VIC 和 FAM 进行荧光标记。罗氏 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪检测 SNP 位点, 并用 LCS480 1.5.1.62 软件进行基因分型。

PCR 反应体积为 20  $\mu$ L, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性, 92 $^{\circ}$ C 15 s 变性, 60 $^{\circ}$ C 1 min 退火, 共 40 个循环, 40 $^{\circ}$ C 5 min 长延伸。以 3 个已知基因型 (野生纯合子、突变纯合子、杂合子) 的标准样品作为对照。

采用测序的方法对 TaqMan 分型结果进行验证。针对各个 SNP 位点, 运用 DNASTAR 软件设计 3 对引物, 引物合成及 PCR 产物测序在上海生工生物技术有限公司完成。

### 1.4 统计学处理

Hardy-Weinberg 平衡检验基因型频率的代表性。 $\chi^2$  检验检测健康对照组与 HCV 慢性感染组 3 个 SNP 基因型、等位基因频率差异。SHEsis 软件程序计算连锁不平衡, 构建单倍型<sup>[10,11]</sup>。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究对象基本特征

病例组年龄为 (44.33  $\pm$  12.22) 岁, 对照组为 (44.67  $\pm$  9.31) 岁; 病例组男性 207 (54.6%) 例, 女性 172 例 (45.4%); 对照组男性 184 例 (50.5%), 女性 180 例 (49.5%)。2 组间的性别比例和年龄分布差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 IL-10 多态性位点在病例组与对照组中的等位基因频率与基因型频率

IL-10 基因 3 个 SNP 位点 rs1800896 (A>G)、rs1800871 (T>C)、rs1800872 (A>C) 和位点的基因型分布在病例组和对照组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P > 0.05$ )。在病例组和对照组中, rs1800896 (A>G) 等位基因 A 和 G 的频率分别为 92.3%、7.7% 和 92.2%、7.8%; AA、AG、GG 基因型频率分别为 85.2%、14.2%、0.5% 和 85.2%、14.0%、0.8%。rs1800871 (T>C) 等位基因 T 和 C 的频率分别为 68.5%、31.5% 和 70.6%、29.4%; TT、CT、CC 基因型频率分别为 46.4%、

44.1%、9.5% 和 48.9%、43.4%、7.70%。rs1800872 (A > C) 等位基因 A 和 C 的频率分别为 68.5%、31.5% 和 70.5%、29.5%；AA、AC、CC 基因型频率分别为 46.4%、44.1%、9.5% 和 48.6%、43.7%、7.7%。以上 3 个 SNP 位点的等位基因和基因型频率在病例和对照组中的分布无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

**2.3 IL-10 多态性位点在病例组与对照组中的连锁不平衡检测结果**

IL-10 基因启动子区域 3 个多态性位点的连锁不平衡分析显示: rs1800896 (A > G)、rs1800871 (T > C) 和 rs1800872 (A > C) 和位点之间存在强

连锁不平衡。rs1800871 (T > C) 与 rs1800872 (A > C) 之间的 D' 值为 0.997, rs1800872 (A > C) 和 rs1800896 (A > G) 位点间的 D' 值为 0.983, rs1800871 (T > C) 和 rs1800896 (A > G) 位点间的 D' 值为 0.967。

**2.4 IL-10 多态性位点在病例组与对照组中的单倍型构建及其频率**

根据 LD 结果构建 IL-10 基因启动子区域的 3 个 SNP 位点的单倍型, 结果显示, 单倍型的频率在病例和对照组中的分布无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 1 IL-10 基因 3 个 SNP 位点在病例组和对照组的基因频率及等位基因频率分布

**Tab. 1 Comparison of genotypic and allelic frequencies of three SNPs in IL-10 gene promoter between HCV chronic infection and control groups**

SNP 位点	基因型 [n(%)]			等位基因 [n(%)]		OR(95% CI)
	GG	AG	AA	G	A	
rs180089	2(0.6)	54(14.2)	323(85.2)	58(7.7)	700(92.3)	0.975(0.667~1.427)
	3(0.8)	51(14.0)	310(85.2)	57(7.8)	671(92.2)	
	TT	CT	CC	T	C	
rs1800871	176(46.4)	167(44.1)	36(9.5)	519(68.5)	239(31.5)	0.904(0.725~1.128)
	178(48.9)	158(43.4)	28(7.70)	514(70.6)	214(29.4)	
	CC	AC	AA	A	C	
rs180087	36(9.5)	167(44.1)	176(46.4)	519(68.5)	239(31.5)	1.098(0.881~1.371)
	28(7.7)	159(43.7)	177(48.6)	513(70.5)	215(29.5)	

表 2 病例组和对照组单倍型频率比较 (%)

**Tab. 2 Comparison of haplotypes in IL-10 gene promoter between HCV chronic infection and control groups (%)**

信型	病例组 (n = 758)	对照组 (n = 728)	OR (95%CI)
GTC	0	0.5	
ATC	0	0.5	
GTA	0	0.2	
ATA	68.5	70.2	0.906(0.726~1.130)
GCC	7.6	7.6	1.013(0.690~1.488)
ACC	23.9	21.7	1.120(0.879~1.428)
ACA	0	0.1	

**3 讨论**

HCV 属黄病毒科, 为单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 9.6 kb. HCV 感染后, 约 20% 急性感染者可自发清除 HCV, 其余发展为慢性持续感染。因此, 宿主遗传因素在 HCV 感染后的清除或持续感染中起到重要作用。

研究发现, IL-10 是炎症反应中的一个促炎因子, 理论上, IL-10 可通过下调针对病毒的 Th1 的

免疫反应而有利于病毒的免疫逃避从而形成慢性感染<sup>[12-15]</sup>。在 HCV 慢性感染发生过程中, 细胞因子是关键环节之一, 其基因序列的突变有可能影响该细胞因子的表达而导致针对 HCV 的免疫反应的改变, 进而影响 HCV 的清除。研究发现, HCV 的感染与 IL-10 表达水平相关。2005 年, 曾俊涛等<sup>[6]</sup>的研究显示, 慢性 HCV 感染者的血清 IL-10 水平明显高于健康对照并且与丙氨酸氨基转移酶的水平呈正的直线相关; 贾红宇等<sup>[7]</sup>的研究结果也显示, 慢性丙型肝炎患者血清中 IL-10 水平显著高于正常对照及 HCV 携带者, 且其值与血清丙氨酸转氨酶值呈显著正相关。

研究还发现, IL-10 启动子多态性与 IL-10 的表达水平相关。对 IL-10 启动子 SNP-592C/A (rs1800872) 与 HCV 感染相关性的多个研究表明, 在不同地区、不同群体中其相关性不同<sup>[16-21]</sup>。2010 年, Lu 等<sup>[22]</sup>对 IL-10 启动子 SNP-592C/A (rs1800872) 与 HCV 感染的相关性进行了 Meta 分析, 结果发现, 该位点在亚洲群体中与 HCV 感染相关。对 Lu 等的文章进行进一步分析后, 笔者发现, 其所研究的亚洲群体为中国人和日本人, 且其值与血清丙氨酸转氨酶值呈显著正相关。

除了 Kazunori 等的研究为日本人群, 其他的研究都为中国人, 而且尽管 Meta 分析提示 IL-10 启动子 SNP-592C/A (rs1800872) 与 HCV 感染有相关性, 但是只有 Kazunori 等的研究显示了 IL-10 启动子 SNP-592C/A (rs1800872) 与 HCV 慢性感染有相关性, 而其他中国群体的报道均显示该位点与 HCV 慢性感染无相关性<sup>[16-18]</sup>。鉴于此, 笔者推测 IL-10 启动子 SNP-592C/A (rs1800872) 与 HCV 慢性感染的相关性在不同群体有差异。2014 年, Samaneh Sepahi 等<sup>[19]</sup>也对 IL-10 基因启动子 SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871)、-592C/A (rs1800872) 与 HCV 感染的相关性进行研究, 其研究结果显示, 除 SNP-1082G/A (rs1800896) 在等位基因隐性分析模式下显示与 HCV 感染相关外, 其他等位基因, 基因型和单倍型均显示与 HCV 感染无相关性。本研究结果同样显示: 以上 3 个位点与 HCV 感染无相关性。同年, Soheir F. Helal 等<sup>[20]</sup>的研究表明, 在 HCV 4 型的感染中, IL-10 启动子 SNP-1082G/A (rs1800896) 与 HCV 的慢性感染无相关性。尽管笔者没有对 HCV 进行分型和分层分析, 但是笔者的研究也显示该位点与 HCV 的慢性感染的无相关性。

综上所述, 在云南汉族群体中, IL-10 基因启动子 SNP-1082G/A (rs1800896)、-819C/T (rs1800871)、-592C/A (rs1800872) 与 HCV 感染的无相关性。群体的遗传背景可能影响着关联研究的结果, 有必要对病例进行分层分析, 并和中国其他地区的研究进行比对, 从而, 有助于阐明 HCV 慢性感染的发生机制, 为 HCV 的治疗奠定基础。

#### [参考文献]

- [1] ZHANG C, WU N, LIU J, et al. HCV subtype characterization among injection drug users: implication for a crucial role of Zhenjiang in HCV transmission in China [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (2): e16 817.
- [2] ZHOU Y H, YAO Z H, LIU F L, et al. High prevalence of HIV, HCV, HBV and co-infection and associated risk factors among injecting drug users in Yunnan province, China [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e42 937.
- [3] DI BISCEGLIE A M. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management [J]. *Hepatology*, 2000, 31 (4): 1 014 - 1 018.
- [4] THOMAS D L, ASTEMBORSKI J, RAI R M, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors [J]. *JAMA*, 2000, 284 (4): 450 - 456.
- [5] 井申荣, 邹全明. 白细胞介素 10 的研究进展 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(3): 26 - 28.
- [6] 曾俊涛, 刘正稳, 韩群英, 等. 慢性 HCV 感染者血清白细胞介素-10 水平的变化及其意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(4): 548 - 550.
- [7] 贾红宇, 盛吉芳, 周林福, 等. 血清 IL-18 与 IL-10 在慢性丙型肝炎发病中作用的临床研究 [J]. *中国感染控制杂志*, 2006, 5(4): 303 - 305.
- [8] 王斌. 白细胞介素-10 基因 5' 端侧翼区单核苷酸多态性及其单倍型与系统性红斑狼疮易感性的相关性研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [9] 中华医学会肝病学会. 丙型肝炎防治指南 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(4): 7 - 11.
- [10] LI Z, ZHANG Z, HE Z, et al. A partition - ligation - combination - subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis [J]. *Cell Res*, 2009, 19 (4): 519 - 523.
- [11] SHI Y Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. *Cell Res*, 2005, 15 (2): 97 - 98.
- [12] ANAYA J M, CORREA P A, HERRERA M, et al. Interleukin 10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjogren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism [J]. *J Rheumatol*, 2002, 29 (9): 1 874 - 1 876.
- [13] BARRETT S, COLLINS M, KENNY C, et al. Polymorphisms in tumour necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ , interleukin-10, interleukin-6, interferon- $\gamma$ , and outcome of hepatitis C virus infection [J]. *J Med Virol*, 2003, 71 (2): 212 - 218.
- [14] ABBAS Z, MOATTER T, HUSSAINY A, et al. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3 [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11 (42): 6 656 - 6 661.
- [15] DOGRA G, CHAKRAVARTI A, KAR P, et al. Polymorphism of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 gene promoter region in chronic hepatitis C virus patients and their effect on pegylated interferon- $\alpha$  therapy response [J]. *Hum Immunol*, 2011, 72 (10): 935 - 939.
- [16] KUSUMOTO K, UTO H, HAYASHI K, et al. Interleukin-10 or tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan [J]. *Cytokine*, 2006, 34 (1-2): 24 - 31.
- [17] GAO Q J, LIU D W, ZHANG S Y, et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15 (44): 5 610 - 5 619.
- [18] CHUANG J Y, YANG S S, LU Y T, et al. IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients [J]. *Dig Liver Dis*, 2009, 41 (6): 424 - 430.
- [19] SEPAHI S, PASDAR A, AHADI M, et al. Haplotype analysis of interleukin-10 gene promoter polymorphisms in chronic hepatitis C infection: a case control study [J]. *Viral Immunol*, 2014, 27(8): 398 - 403.
- [20] HELAL S F, GOMAA H E, THABET E H, et al. Impact of IL-10 (-1082) promoter-single nucleotide polymorphism on the outcome of hepatitis C virus genotype 4 infection [J]. *Clin Med Insights Gastroenterol*, 2014, 7: 19 - 24.

(2014-11-09 收稿)