

IL-4 基因启动子 SNP-1098T>G 和 -590C>T 多态性与云南汉族人群 HCV 慢性感染的相关性研究

戴书颖¹⁾, 戴书朋²⁾, 喻箴³⁾, 张才军⁴⁾, 吴虢东¹⁾, 宝福凯¹⁾

(1) 昆明医科大学基础医学院病原生物学与免疫学系, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学第一附属医院肝胆外科, 云南昆明 650032; 3) 昆明医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系; 4) 基础医学院病原生物学与免疫学实验中心, 云南昆明 650500)

[摘要] 目的 探讨 IL-4 基因启动子区 SNP-1098T>G 和 -590C>T 位点与 HCV 慢性感染的相关性. 方法 采用 TaqMan 探针基因分型方法对 HCV 慢性感染患者 192 例和健康体检人群 170 例 IL-4 基因启动子 SNP-1098T>G 和 -590C>T 位点进行基因分型, 计算 2 个 SNP 位点的连锁不平衡, 并构建单倍型, 获得以上 2 个 SNP 位点及其单倍型与 HCV 慢性感染的相关性数据. 结果 IL-4 基因启动子 SNP-1098T>G 和 -590C>T 位点基因型和等位基因频率分布差异在病例组和对照组中无统计学意义 ($P>0.05$). 连锁不平衡结果显示, SNP-1098T>G 和 -590C>T 位点为连锁不平衡, D' 值为 0.937. 构建单倍型后发现, SNP-1098T>G 和 -590C>T 位点构建的单倍型频率分布差异在病例组和对照组中无统计学意义 ($P<0.05$). 结论 IL-4 基因启动子区 SNP-590C>T 和 -1098T>G 多态性与云南汉族人群 HCV 慢性感染的无相关性.

[关键词] HCV; 单倍型; IL-4; 单核苷酸多态性

[中图分类号] R392 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2015)03-0009-04

Association of SNP -1098T > G and -590C > T in IL-4 Gene Promoter with Chronic HCV Infection in Yunnan Han Population

DAI Shu-ying¹⁾, DAI Shu-peng²⁾, YU Zhen³⁾, ZHANG Cai-jun⁴⁾, WU Guo-dong¹⁾, BAO Fu-kai¹⁾

(1) Dept. of Pathogen Biology and Immunology, School of Basic Sciences, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 3) Dept. of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health; 4) Laboratory of Pathogen Biology and Immunology, School of Basic Sciences, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between the allele polymorphisms SNP-1098T > G and -590C > T in interleukin-4 gene promoter and HCV chronic infection in Han population in Yunnan province. **Methods** Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IL-4 promoter region, -1098T > G and -590C > T in 192 HCV chronic infected patients and 170 healthy person were determined by real-time TaqMan polymerase chain reaction. We calculated the linkage disequilibrium of the two SNPs, and then constructed haplotypes, obtained correlative data between SNP-1098T > G, -590C > T and HCV chronic infection, and the correlation between haplotype frequency and HCV chronic infection. **Results** IL4-1098T > G and -590C > T genotype and haplotypes frequency showed no significant association with HCV infected patients and healthy person ($P>0.05$).

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81060134,81371835);云南省自然科学基金资助项目(2010CD221,2011FB244,2012FB011,2013FZ057,2014FA011,2014FB001)

[作者简介] 戴书颖 (1977~), 女, 云南昆明市人, 硕士, 讲师, 主要从事热带传染病研究工作.

[通讯作者] 宝福凯. E-mail:baofukai@126.com

There was linkage disequilibrium of IL-4 gene between SNP-1098T > G and -590C > T. The frequency of haplotypes constructed by SNP-1098T > G and -590C > T showed no significant difference between HCV infected patients and healthy person ($P > 0.05$). **Conclusion** SNPs-1098T > G and -590C > T in IL-4 gene promoter has no association with chronic HCV infection in Yunnan Han population.

[**Key words**] HCV; Haplotype; IL-4; SNPs

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是引起丙型肝炎的病原体, 主要通过血液或血制品传播, 感染面广, 呈全球性分布. HCV 感染的特点是易转为慢性, 最终形成肝硬化或纤维化. 约有 20% 左右的患者在 HCV 感染后, 机体免疫系统可彻底清除 HCV, 其主要赖于特异性的细胞免疫应答, 而 Th1 型和 Th2 型细胞因子间的相互作用在此过程中就显得尤为突出.

IL-4 由活化的 T 细胞产生, 并促进 Th2 细胞的分化, 是 Th2 型细胞因子. 研究显示, 慢性丙型肝炎患者血清 IL-4 水平明显高于健康人群^[1,2]. IL-4 启动子区域变异与血清 IL-4 水平相关, 且 IL-4 基因启动子 SNPs-589 基因多态性与肝脏炎性损伤密切相关^[3]. 因此, 为进一步阐明 IL-4 基因启动子多态性与 HCV 感染的关系, 本文进行了云南省汉族人群 IL-4 基因启动子 SNP-1098T>G 和 -590C>T 位点与 HCV 慢性感染的相关性研究, 本研究结果可为进一步阐明 HCV 感染后宿主的免疫遗传机制提供重要数据.

1 材料与方法

1.1 标本来源

根据“知情同意”原则采集昆明医科大学第一附属医院 2011 年 9 月至 2013 年 12 月期间就诊的 192 名 HCV 慢性感染者. HCV 慢性感染的纳入标准为《病毒性肝炎防治指南》诊断标准(2004 年)^[4]. 随机选择同期到医院体检中心体检的健康人群 170 人作为健康对照. 病例组和对照组均为居住于昆明地区且无血缘关系的汉族人群.

1.2 样品处理

采集空腹静脉血 5 mL, 使用天根生化科技(北京)有限公司血液基因组提取试剂盒提取 DNA.

1.3 IL-4 基因 SNP 位点基因分型

采用 TaqMan 探针基因分型方法, 运用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪对 IL-4 启动子 SNP-1098T>G 和 -590C>T 位点进行基因分型. 检测引物及探针来自 Applied Biosystems 公司定制合成. PCR 反应体积为 10 μ L, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C

10 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s 变性, 60 $^{\circ}$ C 1 min 退火, 共 40 个循环. 每一反应均包括 3 个已知基因型(野生纯合子、突变纯合子、杂合子)的标准样品作为阳性对照.

1.4 统计学处理

采用 SHEsis 软件程序进行 Hardy-Weinberg 平衡检验、连锁不平衡和单核苷酸构建^[4,5]. χ^2 检验检测对照组与病例组 2 个 SNP 基因型、等位基因和单倍型频率差异. $P < 0.05$ 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 (36.78 \pm 12.21) 岁, 对照组为 (37.03 \pm 12.87) 岁; 病例组男性 102 (53.1%) 例, 女性 90 例 (46.9%); 对照组男性 88 例 (51.8%), 女性 82 例 (48.2%). 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-4 基因启动子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-4 基因 SNP-1098T>G 和 -590C>T 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, SNP-1098T>G 等位基因 T 和 G 的频率分别为 93.2%、6.8%、和 94.7%、5.37.8%; TT、TG、GG 基因型频率分别为 86.5%、13.5%、0.0% 和 89.4%、10.6%、0.0%. SNP-1098T>G 等位基因和基因型频率分布差异在病例和对照组中无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1. 在病例组和对照组中, SNP-590C>T 等位基因 C 和 T 的频率分别为 18.8%、81.2% 和 15.9%、84.1%; CC、CT、TT 基因型频率分别为 3.6%、30.2%、66.1% 和 3.5%、24.7%、71.8%. SNP-590C>T 等位基因和基因型频率分布差异在病例和对照组中无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2.

2.3 IL-4 启动子 SNP-590C>T 和 -1098T>G 连锁不平衡检测结果

IL-4 基因启动子 SNP-590C>T 和 -1098T>G 位点的连锁不平衡分析显示: SNP-590C>T 和 -1098T>G 位点之间存在强连锁不平衡, D' 值为

0.937.

2.4 IL-4 启动子 SNP-590C>T 和 -1098T>G 单倍型构建及其频率

根据 LD 结果, 构建 IL-4 基因启动子 SNP-590C>T 和 -1098T>G 单倍型. 在病例和对照

组中, SNP-590C>T 和 -1098T>G 位点共发现 4 种和 3 种单倍型. 经统计检验后发现, 所构建的单倍型的频率分布差异在病例和对照组中无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3.

表 1 IL-4 基因启动子 SNP-1098T>G 位点基因频率及等位基因频率分布

Tab. 1 Comparison of genotypic and allelic distribution of SNP-1098T>G in IL-4 promoter between HCV chronic infection and control groups

| SNP位点 | 基因型 [n (频率)] | | | P | 等位基因 [n (频率)] | | P | OR (95%CI) |
|----------|--------------|-----------|------------|-------|---------------|------------|-------|-----------------------|
| | G/G | G/T | T/T | | G | T | | |
| -1098T>G | | | | | | | | |
| 病例组 | 0(0.000) | 26(0.135) | 166(0.865) | 0.391 | 26(0.068) | 358(0.932) | 0.407 | 1.299 (0.699 ~ 2.414) |
| 对照组 | 0(0.000) | 18(0.106) | 152(0.894) | | 18(0.053) | 322(0.947) | | |

表 2 IL-4 基因启动子 SNP-590C>T 位点基因频率及等位基因频率分布

Tab. 2 Comparison of genotypic and allelic distribution of SNP-590C>T in IL-4 promoter between HCV chronic infection and control groups

| SNP 位点 | 基因型 [n (频率)] | | | P | 等位基因 [n (频率)] | | P | OR (95% CI) |
|---------|--------------|-----------|------------|-------|---------------|------------|-------|--------------------|
| | C/C | C/T | T/T | | C | T | | |
| -590C>T | | | | | | | | |
| 病例组 | 7(0.036) | 58(0.302) | 127(0.661) | 0.496 | 72(0.188) | 312(0.812) | 0.310 | 1.222(0.829~1.801) |
| 对照组 | 6(0.035) | 42(0.247) | 122(0.718) | | 54(0.159) | 286(0.841) | | |

表 3 病例组和对照组单倍型频率比较及 OR 值和 95%的可信区间

Tab 3 Different haplotypes analysis of SNP-590C>T and-1098T>G in IL-4 gene promoter between HCV chronic infection and control groups

| 单倍型 SNP-1098T>G 和 -590C>T | 病例组 | 对照组 | P | OR (95%CI) |
|---------------------------|---------------|---------------|-------|----------------------|
| GC | 23.66(0.062) | 18.00(0.053) | 0.602 | 1.182(0.629 ~ 2.223) |
| TC | 48.34(0.126) | 36.00(0.106) | 0.386 | 1.225(0.774 ~ 1.937) |
| TT | 309.66(0.806) | 286.00(0.841) | 0.292 | 0.812(0.551 ~ 1.197) |
| GT | 2.34(0.006) | 0.00(0.000) | | |

3 讨论

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 是基因组中存在的一种很广泛的变异形式, 占人类基因组中遗传多态性的 90%以上, 而它也作为一种稳定的遗传标记, 成为关联分析研究中最常用的遗传标记^[6]. 研究表明, 细胞因子基因启动子的 SNPs 调控着细胞因子的表达, 进而对机体抗 HCV 感染免疫产生着影响^[7].

IL-4 作为一种重要的 Th2 型免疫调节因子, 在 Th2 细胞参与的免疫应答中发挥主导作用. 研究显示, 慢性丙型肝炎患者血清 IL-4 水平升高, 而 IFN- γ 水平降低, 提示了 Th1 与 Th2 细胞的失衡^[8,9]. Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子失衡显示出

机体免疫系统在清除 HCV 感染过程中的不彻底, 导致了 HCV 的持续性感染, 这也使得疾病向肝硬化, 肝癌发展^[10].

目前 IL-4 基因内已报道了包括 SNP-590 C>T 和 -1098 T>G 在内的多个多态性位点^[11]. 2012 年, Ramos 等^[12]的研究发现, IL-4 (+33) TT 基因型产生的高水平 IL-4 通过下调 Th1 细胞应答而导致 HCV 清除的减少. 其他多项研究中也显示 IL-4 启动子基因多态性与 IL-4 的表达及 HCV 引起的肝细胞炎性损伤具有相关性^[3,12,13]. 从而提示 IL-4 启动子基因多态性与 IL-4 的表达在 HCV 引起的肝细胞炎性损伤中起到重要作用. 2013 年, Zheng 等^[14]对 IL-4 启动子 SNPs-590C>T 多态性与肝脏疾病的易感性进行了 Meta 分析, 结果显示, IL-4 启动子 SNPs-590C>T 基因多态性增加了白种人群中 HBV

和 HCV 感染的风险,而在亚洲人群中没有发现此相关性. 笔者的研究结果也显示 IL-4 启动子 SNPs-590C>T 基因多态性与 HCV 感染无相关性. Chen 等对台湾地区 HCV 患者 IL-4 启动子 SNPs-589 基因多态性与慢性 HCV 感染也进行了研究,表明 IL-4 启动子 SNPs-589 基因多态性与慢性 HCV 感染无相关性^[5]. 作为 IL-4 启动子中的另一个重要问题,笔者对 SNPs-1098T>G 基因多态性与 HCV 慢性感染进行了研究,研究结果显示 IL-4 启动子 SNPs-1098T>G 基因多态性与 HCV 感染亦无相关性. 鉴于此结果,笔者推测由于环境和遗传等因素使得每个多态位点的突变在疾病的发生中并非发挥唯一的主导作用. 而笔者所构建的 IL-4 基因启动子 SNP-590C>T 的 4 种单倍型 (GC, TC, TT, GT) 和 -1098T>G 的 3 种单倍型 (GC, TC, TT) 的基因频率分布在病例和对照组中亦无差异. 这就表明云南汉族人群 IL-4 基因启动子 SNPs-1098T>G 和 -590C>T 基因多态性和白种人群在 HCV 慢性感染相关性中显示的不一致存在明显的种族和地域差异.

总之, Th 细胞产生的细胞因子在机体清除 HCV 感染的过程中具有重要的作用,而对其相关细胞因子的基因研究,将有助于进一步探讨 HCV 慢性感染的免疫遗传及免疫功能紊乱的机制.

[参考文献]

- [1] 苏崢,姚希贤,王军民,等. 慢性丙型肝炎患者血清 IL-4、IFN- γ 水平与病毒基因型、病毒量等抗病毒治疗影响因素的关系 [J]. 临床肝胆病杂志,2007,23 (3): 185 - 186.
- [2] SOFIAN M, AGHAKHANI A, FARAZI A A, et al. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in hepatitis C virus infected patients [J]. Hepat Mon, 2012, 12 (12): e6156.
- [3] 高秋菊,孙殿兴,张宇辉,等. 慢性乙型和丙型肝炎病毒感染与白细胞介素-4-589基因多态性的关系 [J]. 解放军医药杂志,2012,24 (6):8 - 10.
- [4] 丙型肝炎防治指南 [J]. 中华肝脏病杂志,2004,12 (4):194 - 198.
- [5] LI Z, ZHANG Z, HE Z, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers:update of the S HESis (<http://analysis.bio-x.cn>) [J]. Cell Res, 2009, 19 (4): 519 - 523.
- [6] 何云刚,金力,黄薇. 单核苷酸多态性与连锁不平衡研究进展 [J]. 基础医学与临床,2004,24 (5):487 - 490.
- [7] 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.
- [8] 陈志刚,杨军,周婷,等. 慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA 含量与IFN- γ 及IL-4的变化关系 [J]. 临床检验杂志,2007,25 (2):146.
- [9] 苏崢,徐国光,徐俊,等. 丙型肝炎病毒基因型与Th1/Th2淋巴细胞亚群功能的关系 [J]. 肝脏,2007,12 (5):384 - 386.
- [10] ZEKRI A R, ASHOUR M S, HASSAN A, et al. Cytokine profile in Egyptian hepatitis C virus genotype-4 in relation to liver disease progression [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11 (42):6 624 - 6 630.
- [11] NASLEDNIKOVA IO, KONENKOV VI, RYAZANTSEVA NV, et al. Role of genetically determined production of immunoregulatory cytokines in immunopathogenesis of chronic viral hepatitis [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2007, 143 (6):706 - 712.
- [12] RAMOS J A, SILVA R, HOFFMANN L, et al. Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro [J]. BMC Res Notes, 2012, (5):508.
- [13] SHALABY S M, RADWAN M I, ABDELAZIM S, et al. Interleukin-4 polymorphisms and response to combination therapy in Egyptian chronic hepatitis C patients [J]. Cell Immunol, 2012, 276 (1-2):110 - 113.
- [14] ZHENG Z, LI X, LI Z, et al. IL-4 -590C/T polymorphism and susceptibility to liver disease: a meta-analysis and meta-regression [J]. DNA Cell Biol, 2013, 32 (8):443 - 450.
- [15] CHEN T Y, HSIEH Y S, WU T T, et al. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection [J]. Transl Res, 2007, 150 (2):116 - 121.

(2015 - 01 - 03 收稿)