

肿瘤坏死因子- α 基因启动子区点突变与乙型肝炎相关

周越塑, 王福生, 刘明旭, 金磊, 洪卫国

周越塑, 王福生, 刘明旭, 金磊, 洪卫国, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所生物工程室 北京市 100039

周越塑, 男, 1968-3-4 生, 江苏丰县人, 汉族, 1992 年第二军医大学毕业, 2002 年军医进修学院硕士研究生毕业, 主治医师, 从事传染病临床工作。北京市自然科学基金重点项目资助, No. 01Z094

项目负责人: 王福生, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所生物工程室。fswang@public.bta.net.cn
电话: 010-66933332 传真: 010-63831870

收稿日期: 2004-06-21 接受日期: 2004-12-27

Relationship between susceptibility of hepatitis B virus and gene polymorphism of tumor necrosis factor- α

Yue-Su Zhou, Fu-Sheng Wang, Ming-Xu Liu, Lei Jin, Wei-Guo Hong

Yue-Su Zhou, Fu-Sheng Wang, Ming-Xu Liu, Lei Jin, Wei-Guo Hong, Department of Infectious diseases, Division of Bioengineering, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China.

Correspondence to: Fu-Sheng Wang, Department of Infectious diseases, Division of Bioengineering, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. fswang@public.bta.net.cn

Received: 2004-06-21 Accepted: 2004-12-27

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of point mutation distribution in TNF- α gene promoter region, and to explore the relationship between hepatitis B virus (HBV) infection and the polymorphism of TNF- α gene in Chinese Han Population.

METHODS: The single nucleotide polymorphism (SNP) in TNF- α gene promoter region (-308 G $\rightarrow$ A) was detected in 232 hepatitis B patients and 103 health controls using polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism assay (PCR-RFLP).

RESULTS: The frequency of SNP in TNF- α promoter region (-308 G $\rightarrow$ A) decreased significantly in hepatitis B patients, in comparison with that in controls (4.7% vs 9.7%, $P < 0.05$). The genotypes and SNP frequency showed no significant differences between males and females, among patients with different HBV markers and different HBV DNA.

CONCLUSION: TNF- α gene polymorphism may be related to the susceptibility to hepatitis B virus infection in Chinese Han population.

Key Words: HBV; TNF- α ; Gene polymorphism

Zhou YS, Wang FS, Liu MX, Jin L, Hong WG. Relationship between susceptibility of hepatitis B virus and gene polymorphism of tumor necrosis factor- α . Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;13(2):207-210

摘要

目的: 调查我国汉族健康人群和乙肝患者中 TNF- α 基因启动子区点突变的分布特点, 并探讨 HBV 感染与 TNF- α 基因多态性之间的关系。

方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 的方法对健康人群 (103 例) 与 HBV 患者 (232 例) 的 TNF- α 基因启动子区 -308 G $\rightarrow$ A 单碱基突变多态性进行了分析。

结果: TNF- α 基因启动子区 -308 G $\rightarrow$ A 单碱基突变频率在 HBV 患者中的分布明显低于健康人群 (4.7% vs 9.7%, $P < 0.05$)。不同性别、不同 HBV 血清标记类型、不同 HBV DNA 肝炎患者之间 TNF- α (-308 G $\rightarrow$ A) 基因型与突变频率均无显著性差异。

结论: 我国汉族人群 TNF- α 的基因启动子区 -308 nt 单碱基多态性可能与 HBV 的发病及易感性相关。

关键词: HBV; TNF- α ; 基因多态性

周越塑, 王福生, 刘明旭, 金磊, 洪卫国. 肿瘤坏死因子- α 基因启动子区点突变与乙型肝炎相关. 世界华人消化杂志 2005;13(2):207-210
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/207.asp>

0 引言

HBV 感染, 不同个体的差异可能与多种因素有关, 如病毒本身的因素、宿主免疫因素和遗传因素等^[1]. 免疫应答有关的细胞因子基因的多态性可能对 HBV 感染的病程和结局产生一定的影响, 其中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是重要的细胞因子之一^[2-3]. TNF- α 基因启动子区 -308 nt (相对于转录起始点) 存在一个多态性位点, 即在常见基因型中为 G (-308G/G), 在少见基因型中被 A 取代 (-308G/A 或 -308A/A), 该变异可能与 TNF- α 基因表达程度相关^[4-6], 也与结核等传染病的易感性有关^[7-9], 我们研究了该位点多态性在中国汉族 HBV 感染患者及健康人群中的分布情况, 探讨其与 HBV 感染及病程的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 我院住院血清HBV DNA PCR阳性患者232例,其中男191例,女41例,年龄6-73(32±15)岁.急性肝炎10例,慢性肝炎(轻)70例,慢性肝炎(中)53例,慢性肝炎(重)23例,肝炎肝硬化76例.挑选我院健康体检人员中HBV表面抗原、表面抗体、e抗原、e抗体、核心抗体均为阴性者103例为对照组.2组年龄相当、无自身免疫性疾病或其他慢性病.所有患者及健康人均均为汉族,来自北京及周围省市.

1.2 方法 用QIAGEN公司的基因组DNA提取试剂盒,自外周血200 μL中分离DNA作为PCR模板^[10].聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测:扩增TNF-α启动子区域包含-308 nt的上、下游引物分别为5' AGGCAAT AGGTTTGTAGGGCCAT 3' (对应于-332 nt~-310 nt, 23 mer)及5' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 3' (对应于-245~-226 nt, 20 mer),扩增产物长度107 bp; PCR反应:扩增体系为25 μL,含4×2.5 mmol/L dNTP 1 μL, 12.5 μmol/L上、下游引物各1 μL, 10×PCR缓冲液2.5 μL,基因组DNA 100 ng, Taq DNA聚合酶0.5 U. PCR条件为94℃ 4 min变性,然后再94℃ 1 min, 60℃ 50 s, 72℃ 1 min, 30个循环, 72℃ 10 min;采用RFLP方法判断TNF-α多态性:于8 μL扩增产物中加3 U内切酶Nco I, 37℃ 16 h后,酶切产物以2.5 g/L琼脂糖凝胶电泳(60V 90 min),溴乙锭显色,在紫外线观测仪下观察结果. TNF-308 G/G野生型纯合子的PCR产物被内切酶Nco I完全切断,形成87 bp及20 bp两条片段. TNF-308G/A突变型杂合子的PCR产物仅部分被切断,形成107 bp、87 bp及20 bp三条片段, TNF-308 A/A突变型纯合子的PCR产物因不被切断仅形成107 bp一个片段(20 bp片段分子量较小,电泳时隐入引物带(图1)).

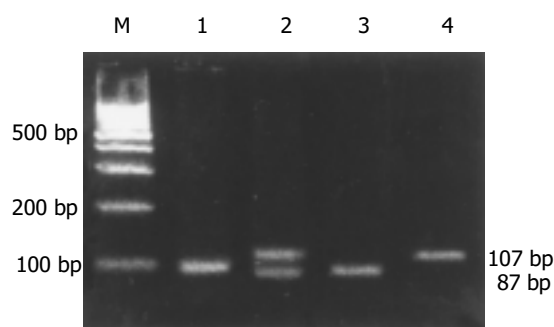


图1 TNF-α-308G/A基因多态性PCR-RFLP电泳分析. 1, 3: 野生型纯合子, 2: 突变型杂合子, 4: 突变型纯合子, M: DNA Marker.

统计学处理 在本组中国汉族人中未见TNF-308 A/A突变纯合子个体,因此在基因型间各临床变量比较时仅将基因型分为TNF-αG/G纯合子及TNF-αG/A杂合子2组.组间频率比较采用行×列表 χ^2 检验或Fisher确切检验,并检验等位基因在群体、性别上的分布是否符合Hardy Weinberg平衡定律.数据处理均用美国Stata软件系统进行.

2 结果

2.1 HBV患者与健康人群间TNF-α的基因多态性-308 G和-308 A等位基因频率在健康人分别为90.3%和9.7%,在HBV患者分别为95.3%和4.7%,经检验符合Hardy Weinberg平衡定律($P > 0.05$).健康人及HBV患者中-308 A均为杂合子,未能发现TNF-308 A/A突变纯合子个体.健康人群的TNF-308 A基因频率、TNF G/A基因型频率均高于HBV患者($P < 0.05$).根据第5次全国传染病与寄生虫病学术会讨论修订的“病毒性肝炎防治方案”试行标准,我们将实验组分为急性肝炎组、慢性肝炎组和肝硬化组,慢性肝炎组、肝硬化组与健康人群组之间TNF-308A基因频率、TNF G/A基因型频率经统计学处理有显著性差异($P < 0.05$).急性肝炎组因例数较少,未作统计学分析(表1).

2.2 男、女间TNF-α的基因多态性比较 所有研究对象男、女间TNF-308A基因频率比较: $\chi^2 = 0.12$,

表1 HBV患者与健康人TNF-α基因型及基因频率比较分析

分组	n	TNF-α基因型频率(%)			TNF-α基因频率(%)	
		G/G	G/A	A/A	-308G	-308A
HBV患者	232	210(90.5)	22(9.5)	0	95.3	4.7
急性肝炎	10	7(70.0)	3(30.0)	0	85.0	15.0
慢性肝炎	146	130(89.0)	16(11.0)	0	94.5	5.5
肝硬化	76	73(96.1)	3(3.9)	0	98.0	2.0
健康人群	103	3(80.6)	20(19.4)	0	90.3	9.7

^a $P < 0.05$ vs 健康人群.

$P = 0.73$, TNF G/A 基因型比较: $\chi^2 = 0.13$, $P = 0.71$; HBV 患者组男、女间 TNF-308A 基因频率比较 $\chi^2 = 0.26$, $P = 0.60$, TNF G/A 基因型比较: $\chi^2 = 0.27$, $P = 0.61$; 对照组男、女之间 TNF-308A 基因频率比较 $\chi^2 = 0.003$, $P = 0.95$, TNF G/A 基因型比较: $\chi^2 = 0.004$, $P = 0.95$, 以上统计资料说明男、女之间 TNF-308A 基因频率、TNF G/A 基因型频率无显著差异。

2.3 不同 HBV 血清标记类型肝炎 TNF- α 基因型比较 根据患者 HBV 血清标记 (HBVM) 的不同, 将实验组分为大三阳组 (HbsAg, HbeAg, 抗 HBc 均阳性)、小三阳组 (HbsAg, 抗 Hbe, 抗 HBc 阳性)、1, 5 阳组 (HbsAg, 抗 HBc 阳性)、5 阳组 (抗 HBc 阳性), 4 组之间 TNF-308 A 基因频率经统计学处理无显著型差异 ($P > 0.05$)。

2.4 不同 HBV DNA PCR 定量检测值肝炎 TNF- α 基因型比较 实验组共有 166 例进行了 HBV DNA RT-PCR 定量检测 (试剂盒由安达公司提供), 将这些病例分为检测基因拷贝值 $> 1 \times 10^{13}$ /L 组和 $< 1 \times 10^{13}$ /L 组, 比较两组 TNF- α 基因型与基因频率, 以探讨 TNF-308 A 基因频率在不同 HBV 载量肝炎患者之间分布的差别, 结果两组之间 TNF-308 A 基因频率经统计学处理无显著型差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

目前认为 HBV 急性感染中 90% 的病毒由非溶细胞机制清除, TNF- α 可以选择性地加速 HBV mRNA 的降解, 抑制 HBV 基因的表达和复制而不损伤肝实质细胞^[11-12]。因而 TNF- α 表达不足可能是引起 HBV 病毒感染慢性化的重要因素之一^[13-15]。Louis *et al* 发现 TNF-308 G/A 突变杂合体的 TNF- α 产量比 TNF-308 G/G 野生纯合体高 (平均值分别为 929 ng/L 和 521 ng/L, $P < 0.05$); 另外几个实验也显示 TNF-308 G $\rightarrow$ A 单碱基突变可能与 TNF- α 高表达有关^[16-17]。我们研究结果显示, 实验组 TNF-308 A 等位基因频率明显低于健康对照组, 即 TNF-308 A 等位基因与 HBV 感染呈负相关。进一步比较不同临床类型乙型肝炎, 发现肝硬化组明显低于其他各组 ($P < 0.01$), 并且肝硬化组 $<$ 慢性肝炎组 $<$ 健康对照组, 提示 TNF-308 A 等位基因可能与阻止 HBV 感染及慢性化有关。Hohler *et al* 对德国白种人群的研究结果表明, TNF-308 A 的基因频率在 HBV 患者与健康人群中分别为 19.0% (27/142) 和 16.2% (32/198), 未能发现两组之间的差异^[18-19]。Fong *et al* 研究了 89 名新加坡健康华人, TNF-308 A 等位基因频率为 11.8% (21/178)^[20], 与本结果 (9.71%) 相比无显著差异 ($P > 0.05$)。我们与 Hohler 的研究结果不同, 其原因可能是种族、对照组选择及标本量不同, 本研究实验组 232 例, Hohler 的实验是 71 例。

我们比较分析了 TNF-308 A 等位基因频率在不同 HBV 血清标记类型及不同 HBV DNA 定量检测值肝炎患者中的分布, 各组间无显著性差异, 是否提示乙肝患者 HBV 血清标记类型及体内病毒载量与 TNF-308 G $\rightarrow$ A 单碱基突变可能无关尚需进一步研究。必须指出的是, HBV DNA 定量检测值与血清 HBV 含量并不呈绝对的线性相关, 因为系统误差可使定量检测值相差 2-4 倍。因此, 在今后的研究中, 应采用更精确的方法测定病毒载量, 以更准确地探讨 TNF-308 G $\rightarrow$ A 单碱基突变与不同 HBV 载量肝炎患者之间的相关性。总之, 在本研究中, HBV 患者的 TNF-308 A 基因频率显著低于健康人群, 提示 TNF-308 A 等位基因可能与 HBV 感染呈负相关。由于 TNF- α 因位于具有高度多态性的 MHC III 类抗原基因区, 同 HLA 基因或其他基因之间是否存在连锁不平衡尚有争论, 这一标记究竟是单独发挥作用还是与其他致病或易感基因连锁并协同其他基因发挥作用尚不清楚^[21-22]。

4 参考文献

- 1 王福生. 病毒性肝炎防治存在的问题和宿主易感基因的研究. 传染病信息 2001;14:97-98
- 2 Thursz MR. Host genetic factors influencing the outcome of hepatitis. *J Viral Hepat* 1997;4:215-220
- 3 洪卫国, 王福生, 徐安龙. 乙型病毒性肝炎相关人体基因研究的策略. 世界华人消化杂志 2001;9:1356-1359
- 4 Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-452
- 5 Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000;50:216-228
- 6 Wilson AG, Vires N, Pocot F. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993;2:557-560
- 7 Hill AVS, Ruwende C, McGuire W. Association of the TNF-238 promoter polymorphism with susceptibility to tuberculosis and malaria in Africa. *Hum Immunol* 1996;47:118-121
- 8 McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994;371:508-510
- 9 Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999;282:561-568
- 10 王福生, 蒋建东, 金磊, 汪悦, 雷周云, 徐东平, 施红, 张冰. 中国人 HIV-1 感染相关的基因 CCR5 多态性检测和不同方法提取的基因组 DNA 的比较. 中国性病艾滋病防治 2000;6:5-8
- 11 施红, 王福生. 影响 HBV 感染慢性化的宿主因素及其在乙型肝炎防治中的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:66-69
- 12 Guidotti LG, Rosemary R, Chung J. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-829
- 13 Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci* 1997;94:8093-8098
- 14 Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene poly-

- morphisms on TNF α production and disease. *Hum Immunol* 2001;62:1191-1199
- 15 周越塑, 王福生, 刘明旭. TNF- α 基因多态性对肝炎及其他感染性疾病的影响, 世界华人消化杂志 2002;10:812-815
- 16 Louis E, Franchimont D, Piron A. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113:401-406
- 17 Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanska B, Tronczynska E, Plucienniczak A, Selmaj K. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol* 1998;84:198-206
- 18 Hohler T, Kruger A, Gerken G. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998;111:579-582
- 19 Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996;103:391-396
- 20 Fong KY, Howe HS, Tin SK. Polymorphism of the regulatory region of tumornecrosis factor alpha gene in patients with systemis lupus erythematosus. *Ann Acad Med Singapore* 1996;25:90-93
- 21 Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F, Rieckmann P. Gene polymorphism at position-308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and it's influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci Lett* 1996;215:75-78
- 22 Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-3199

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 2005 年由半月刊改为周刊

本刊讯 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从 2005 年开始, *World Journal of Gastroenterology*(WJG)由半月刊改为周刊出版. 每月 7, 14, 21, 28 日出版, 50 元/期, 全年 48 期, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行. 2002-10-11 获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金. 2003-01 获得第二届国家期刊奖百种重点期刊. 2003-01-15 由月刊改为半月刊. 2003-04-15 WJG(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)全文电子版免费开通, 截至 2004-06-15 点击次数为 1816277. 2003-04-15 世界胃肠病学杂志社稿件处理系统开发成功, 并开始使用. 作者通过用户名和密码在网上查找到稿件的全部处理记录. 2004-05-06 自然出版集团出版的《*Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*》收录 WJG. 经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评审推荐, WJG 被收录为国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊, 时间为 2004-03/2006-03. 1998-01-15 / 2004-03-01 ISI SCI 收录期刊 389 种引用 WJG 出版的论文 687 篇分布 39 个国家. 引用 WJG 的 SCI 高影响因子期刊包括自然医学 28.740 (Nature Medicine), 细胞 27.254 (Cell), 自然神经科学综述 24.047 (Nature Reviews Neuroscience), 自然细胞生物学 20.699 (Nature Cell Biology), 基因与发育 (Genes & Development) 18.772, 柳叶刀 15.397 (Lancet), 自然神经科学 14.857 (Nature Neuroscience), 神经元 13.846 (Neuron), 自然癌症综述 13.625 (Nature Reviews Cancer), 胃肠病学 13.440 (Gastroenterology), 肝脏学 9.825 (Hepatology), 等国际顶级期刊. 引用 WJG 的作者分布于 687 个机构, 其中包括华盛顿大学医学院 (Washington Univ, Sch Med), 耶鲁大学 (Yale Univ), 康奈尔大学 (Cornell Univ), 明尼苏达大学 (Univ Minnesota), 斯坦福大学医学中心 (Stanford Univ, Ctr Med), 加州大学旧金山分院 (Univ Calif San Francisco), 美国国立卫生研究院 (National Institute of Health), 伦敦帝国大学等国际著名大学或研究机构. 2004-06-11 被 CAB Abstracts, CAB Global Health 收录. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

《中国生物学文摘》收录 WJG 和世界华人消化杂志

本刊讯 经专家评估和遴选, *World Journal of Gastroenterology*(WJG)和世界华人消化杂志被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库收录. 中国生物学文献数据库在期刊的基础上开发建设, 数据量已达 20 万多条, 并形成了期刊、光盘、网络版系列产品. 《中国生物学文摘》1998 年获得第六次全国科技期刊文献检索出版物评比一等奖. (世界胃肠病学杂志 2004-05-05)