

## 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 基因 - 308 位点多态性与乙型肝炎病毒慢性感染的关系

黎环 潘晨

**【摘要】 目的** 探讨肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$ 基因-308位点多态性与乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染之间的关系。**方法** 运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析法检测90例慢性乙型肝炎(CHB)患者、30例乙型肝炎肝硬化(HC)患者、42例慢性重型乙型肝炎(CSHB)患者以及40例健康对照者的TNF $\alpha$ 基因启动子区-308位点单个核苷酸多态性(SNP),观察其在不同临床类型慢性HBV感染者及健康对照者中的分布频率。**结果** 所检测的CHB、HC、CSHB患者中TNF $\alpha$ -308 G/A基因型频率及TNF $\alpha$  A等位基因频率均显著高于健康对照组,CSHB组更显著。**结论** TNF $\alpha$ -308 G/A多态性可能对转录产生影响,A等位基因能够增强TNF $\alpha$ 转录。TNF $\alpha$ -308 G/A基因型个体HBV感染的风险增高,且与临床类型有关。TNF $\alpha$ -308位点A等位基因可能是乙型肝炎易感性的遗传标记之一。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;启动子;基因多态性

### Association of polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene promoter region - 308 with outcomes of chronic hepatitis B virus infection LI Huan, PAN

Chen. Infectious Diseases Hospital of Fuzhou, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: PAN Chen, Email: lihuan-624@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore whether the TNF $\alpha$  promoter single nucleotide polymorphisms (SNP) were associated with the outcomes of hepatitis B virus (HBV) infection. **Methods** Through a restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay of polymerase chain reaction (PCR) products, the SNP within TNF $\alpha$ -308 site among 90 patients with chronic hepatitis B (CHB), 30 patients with hepatic cirrhosis (HC) and 42 patients with chronic severe hepatitis B (CSHB) as well as 40 healthy controls were analyzed. **Results** The frequencies of TNF $\alpha$ -308 G/A genotype and TNF $\alpha$  allele A were significantly increased in patients with CHB, HC and CSHB compared with healthy controls, especially chronic severe hepatitis B. **Conclusions** TNF $\alpha$ -308 G/A is believed to affect transcription of TNF and allele

基金项目:福州市青年科研基金(2006-2-52)

作者单位:350025 福州市,福州市传染病医院

通讯作者:潘晨,Email: lihuan\_624@163.com

A can increase the activity. The risk of HBV infection may increase in individuals with TNF  $\alpha$  -308 G/A genotype which is associated with the clinical types of patients with chronic hepatitis B. TNF  $\alpha$  allele A at position -308 may be one of the susceptible genetic markers of HBV infection.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Tumor necrosis factor alpha; Promoter; Polymorphism

肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$  基因位于 HLA-B 和 HLA-DR 之间的 MHC III 类基因区域内,其表达受转录和转录后调控。一系列研究表明,慢性 HBV 感染者 TNF  $\alpha$  系统被激活,包括其受体的上游调控<sup>[1]</sup>, TNF  $\alpha$  基因启动子存在单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点,其中 -308、-238 位点的多态性对血清 TNF  $\alpha$  水平有较大影响<sup>[2]</sup>。为了进一步从宿主方面探讨 TNF  $\alpha$  基因多态性与 HBV 慢性感染结果的关系,笔者检测不同临床类型的慢性 HBV 感染者及健康对照者的 TNF  $\alpha$  基因多态性并计算其分布频率。

## 材料与方法

### 一、对象

I 组:慢性乙型肝炎轻中重度患者 90 例,其中男性 71 例,女性 19 例,年龄( $37 \pm 10.4$ )岁; II 组:乙型活动性肝炎肝硬化患者 30 例,男性 25 例,女性 5 例,年龄( $39.1 \pm 12.3$ )岁; III 组:重型乙型肝炎患者 42 例,男性 37 例,女性 5 例,年龄( $36.5 \pm 12.5$ )岁;其中 35 例已行肝脏活组织病理检查,共 162 例,均为福州市传染病医院 2005 年住院患者。

以上各组入选时严格按照 2005 年 5 月中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会关于慢性乙型肝炎防治指南标准执行<sup>[3]</sup>。每个研究对象均排除其他病毒感染、酒精性肝病、脂肪肝、自身免疫性肝病和药物性肝炎等。IV 组:选自福建医科大学附属第一医院健康体检者 40 例,其中男性 30 例,女性 10 例,年龄( $39.2 \pm 10.6$ )岁,无内分泌疾病,无心、肝、肾等重大疾病。

### 二、方法

1. 标本收集:静脉采血 2 ml, EDTA 抗凝, 2500 r/min 离心 10 min。小心吸取上层血浆 0.5 ml 置于离心管中,用于基因组 DNA 提取。

2. 基因组 DNA 的提取:采用基因组 DNA 提取试剂盒(北京天为时代科技有限公司)。严格按照试剂盒操作说明,所得 DNA 样本于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

3. TNF  $\alpha$  -308 位点多态性检测:采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析。正向引物序列:5' -AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', 反向引物序列:5' -ACACTCCCCATCCTCCCGGCT-3', 扩增产物为 117 bp。循环条件:95 $^{\circ}\text{C}$  5 min 预变性;94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min;61 $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min;72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min;共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  终延伸 5 min。在 PCR 产物中加入限制性内切酶 *Nco* I 4U 于 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱中消化 16 h,酶切产物用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,以银染色法在

可见光下分析结果。

### 三、统计学处理

采用 SPSS 12.0 软件分析,基因型频率比较采用  $\chi^2$  检验,等位基因频率采用直接计数法。

## 结 果

### 一、TNF $\alpha$ - 308 基因多态性

1. TNF  $\alpha$  - 308 扩增目的产物酶切:TNF  $\alpha$  - 308扩增目的产物用 *Nco* I 酶切后,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,聚丙烯酰胺凝胶电泳固定、银染、显色后分析基因型(图 1)。G/G 型:97 bp;G/A 型:117 bp,97 bp;A/A 型:117 bp。本实验中未发现 A/A 基因型。

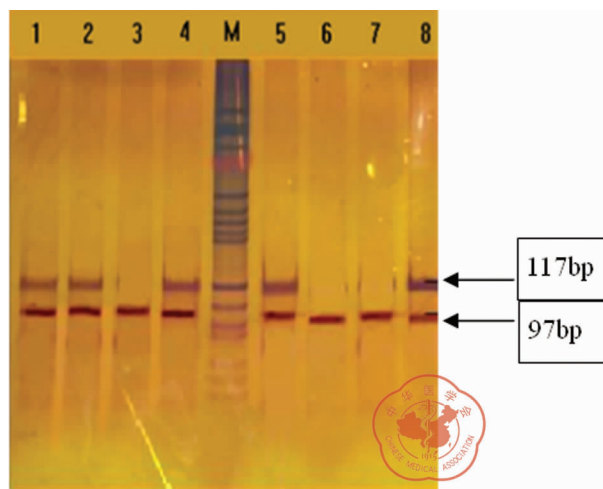


图 1 TNF  $\alpha$  - 308 扩增目的产物酶切  
注:M:Marker;3,6,7 为 TNF  $\alpha$  - 308 G/G 纯合子;1,2,4,5,8 为 G/A 杂合子

2. TNF  $\alpha$  - 308 基因型和等位基因频率分布:各组 TNF  $\alpha$  - 308 G/A 基因型频率分布:I 组中G/A为 0.189;II 组中 G/A 为 0.233;III 组中 G/A 为 0.262;IV 组中 G/A 为 0.050。I 组、II 组、III 组分别与IV 组比较,差异具有统计学意义( $P$  分别为 0.039、0.023、0.009),III 组差异更显著;各组等位基因 A 频率分布:I 组中 A 为 0.094;II 组中 A 为 0.117;III 组中 A 为 0.131;IV 组中 A 为 0.025。I 组、II 组、III 组分别与IV 组比较,差异具有统计学意义( $P$  分别为 0.047、0.029、0.012),III 组差异更显著。见表 1。

表 1 各组 TNF  $\alpha$  - 308 基因型和等位基因频率比较

分组	n	基因型(%)		等位基因(%)	
		G/G	G/A	G	A
I	90	73(81.1)	17(18.9) <sup>a</sup>	163(90.6)	17(9.4) <sup>a</sup>
II	30	23(76.7)	7(23.3) <sup>a</sup>	53(88.3)	7(11.7) <sup>a</sup>
III	42	31(73.8)	11(26.2) <sup>b</sup>	73(86.9)	11(13.1) <sup>a</sup>
IV	40	38(95.0)	2(5.0)	78(97.5)	2(2.5)

注:与IV组比较,<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>: $P < 0.01$

## 讨 论

TNF  $\alpha$  基因位于6号染色体21区3带。目前研究涉及的TNF  $\alpha$  基因多态性包括-1031 T/C、-863 C/A、-857 C/T、-308 G/A和-238 G/A等位点(负数代表位于转录起始位点的上游)<sup>[4]</sup>。当-308位为G时命名为TNF1,为A时命名为TNF2<sup>[5]</sup>,它们可能在转录及转录后水平调控TNF  $\alpha$  表达,结果尚无定论。Hohler等<sup>[6]</sup>对TNF  $\alpha$  启动子基因多态性与不同HBV感染者的关系研究表明,TNF  $\alpha$  基因-238位点TNF  $\alpha$  G/A基因型,在慢性HBV感染者中出现的频率为25%,而在急性感染者中为6% ( $P < 0.05$ ),对照组中为7% ( $P < 0.01$ ),TNF  $\alpha$  G/A基因型与慢性乙型肝炎的关系更为密切,提示该位点单个核苷酸的变化可能影响了病毒的有效清除。在TNF  $\alpha$  基因启动子-308位点,其基因型频率和等位基因频率在各组中的比较差异无统计学意义,认为TNF  $\alpha$  基因启动子-238位点多态性影响TNF基因转录,而且TNF  $\alpha$  低分泌影响HBV的清除,导致HBV慢性感染。而Miyazoe等<sup>[7]</sup>报道TNF  $\alpha$  基因启动子多态性与HBV感染进展无关。

笔者对福建地区162名乙型肝炎患者(其中慢性乙型肝炎患者90例、肝硬化患者30例、慢性乙型重型肝炎患者42例)和40例健康对照者TNF  $\alpha$  基因启动子-308位点G/A多态性研究,发现-308位点基因型和等位基因频率在慢性乙型肝炎患者、肝硬化患者、慢性重型乙型肝炎患者与健康对照者比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),提示该位点的多态性与肝脏炎症损伤有关,特别是与重型肝炎的发生有关。González等<sup>[8]</sup>研究表明,TNF  $\alpha$  基因启动子-308位核苷酸G被A替换后,TNF  $\alpha$  基因转录增加7倍。另外,对TNF  $\alpha$  表达调控机制研究发现,包含TNF  $\alpha$  基因-308位点一段长10 bp的DNA片段可能是激活子蛋白-2(AP-2)的识别序列,当-308位点是G等位基因时,AP-2可以识别该序列并与之结合;若发生G $\rightarrow$ A替换,AP-2无法识别该序列。同时,细胞株的功能性实验也表明AP-2可抑制TNF  $\alpha$  启动子的活性,影响其转录<sup>[9]</sup>。由此可见,TNF  $\alpha$  -308基因多态性可能是通过影响AP-2与TNF基因的结合而调节其转录。产生高水平的血浆TNF  $\alpha$ ,导致过强的免疫应答及炎症反应,从而导致肝细胞严重损伤甚至大量坏死,临床表现为HBV慢性感染甚至重型肝炎,发生各种严重的并发症。

笔者的结论与Hohler报道存在不一致,推测可能与种族差异<sup>[10]</sup>、乙型肝炎病毒基因型不同以及其他基因位点突变对TNF  $\alpha$  表达和分泌的影响有关,需要扩大临床样本进一步研究。TNF  $\alpha$  -308 G/A多态性可能对转录产生影响,但-308 G/A多态性对转录的影响达到什么程度才能产生相关的生物活性改变值得进一步深入探讨。

## 参 考 文 献

- 1 Fang JW, Shen WW, Meager A, et al. Activation of the tumor necrosis factor-alpha system in the liver in chronic hepatitis B virus infection. Am J Gastroenterol, 1996, 91:748-753.

- 2 D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics*, 1994,39:150-154.
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病学杂志*. 2001,19:56-62.
- 4 Guidotti LG, Guilhot S, Chisari FV. Interleukin-2 and alpha/beta interferon down-regulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor-dependent and-independent pathways. *J Virol*,1994,68:1265-1270.
- 5 Gonzalez AR, Garcia MC, Garcia BL, et al. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med*,1994,179:841-848.
- 6 Hohler T, Kruger A, Gerken G, et al. A tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol*,1998,111:579-582.
- 7 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, et al. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol*,2002,97:2086-2092.
- 8 González S, Rodrigo L, Borra JM, et al. TNF- $\alpha$  -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF- $\alpha$  production and inflammatory activity in Crohn' patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterology*,2003,98:1101-1106.
- 9 Kroeger KM, Abraham LJ. Identification of an AP-2 element in the-323 to-285 region of the TNF- $\alpha$  gene. *Biochem Mol Biol Int*, 1996,40:43-51.
- 10 Kim YJ, Suk LH, Hwan YJ, et al. Association of TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Molecul Genet*,2003,12:2541-2546.

(收稿日期:2009-10-25)

(本文编辑:孙荣华)

黎环,潘晨. 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 基因-308位点多态性与乙型肝炎病毒慢性感染的关系[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2010,4(1):6-10.