

型干扰素受体启动子多态性与慢性乙型肝炎易感性的相关性研究

周 婕¹ 吕力为² 张 斌³ 王 松³ 陈 煜⁴ 潘国文¹ 姜世勃⁵ 郑伯建¹

【摘要】 目的 研究 型干扰素受体启动子(IFNAR1)的基因多态性在不同个体间的差异,以及它们与慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染之间的相关性。方法 对320例慢性乙型肝炎患者、148例自发康复者、148例健康对照和114例正常高加索人的IFNAR1进行基因分型,分析基因的多态性与慢性HBV感染的易感性之间的相关性;构建IFNAR1启动子-荧光素酶报告基因载体,比较不同IFNAR1启动子变异体的转录活性。结果 在-568,-408,-77和-3位点发现基因多态性,其中-568和-77位点,以及-408和-3位点之间存在等位基因连锁。相关性分析结果表明,-568G/-408C和单体型-568G/-408C/-3C/-77(M)与病毒清除有关,-568C/-408T和单体型-568C/-408T/-3T/-77(L)与HBV感染的慢性化有关。启动子-荧光素酶报告基因载体的检测显示,-408和(或)-3位点的多态性可影响调节IFNAR1启动子的转录水平,而-568位点的多态性总体上对转录活性无明显的影响。-77(9)在高加索人中明显多见,携带这一基因型启动子的转录活性明显高于其他基因型启动子的转录活性。**结论** IFNAR1的基因多态性与慢性HBV感染的易感性有相关性。

【关键词】 单核苷酸多态性; 病毒清除; 慢性乙型肝炎病毒感染; 转录活性

Genetic variations of type I interferon receptor 1 promoter and their association with chronic hepatitis B virus infection

ZHOU Jie, LV Li-wei, ZHANG Bin, WANG Song, CHEN Yu, PAN Guowen, JIANG Shi-bo, ZHENG Bojian (Dept. Microbiology, Hongkong University)

【Abstract】 Objective Exposure to the hepatitis B virus (HBV) follows a distinct clinical course that is related to host genetic variability. The antiviral effect of type I interferons on HBV, which is elicited by binding of these cytokines to their receptor, has been demonstrated both *in vitro* and in animal models. In the current study, we aimed to determine a relationship between type I interferon receptor 1 promoter polymorphisms and individual differences in susceptibility to chronic HBV infection. **Methods** We examined type I interferon receptor 1 promoter polymorphisms in four groups of participants: 320 chronic hepatitis B patients, 148 spontaneously recovered individuals, 148 healthy Chinese donors and 114 healthy Caucasian donors. **Results** Four polymorphic sites were identified at loci -568, -408, -77 and -3. Polymorphisms at -568 and -77, as well as -408 and -3 were in complete linkage. Association analysis revealed that alleles -568G, -408C and haplotype -568G/-408C/-3C/-77 contained more GT repeats and were resistant to chronic HBV infection, whereas alleles -568C, -408T and haplotype -568C/-408T/-3T/-77 contained fewer GT repeats and were associated with chronic hepatitis B infection. We then constructed a promoter reporter gene system and performed a luciferase assay to validate these genetic associations. It was indicated that a single -408 and/or -3 nucleotide polymorphism did, in fact, confer altered transcriptional activity, whereas a -568G/C polymorphism did not significantly modulate transcriptional levels. Interestingly, we observed that an allele with 9 GT repeats, which is much more prevalent in Caucasians than Chinese, appeared to exhibit a higher transcriptional level than all other promoter variants. **Conclusion** It is suggested that type I interferon receptor 1 promoter polymorphisms contribute to variable outcomes of HBV infection.

【Key words】 Single nucleotide polymorphism; Viral clearance; Chronic HBV infection; Transcriptional activity

世界卫生组织推测全球有4亿慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染的患者。亚洲太平洋地区的感染率最高,这一地区的多数国家感染率高达10%。HBV感染会导致不同的临床结果及并发症,其中包括急性肝炎后自限性康复、无症状慢性携带者、慢性肝炎、肝硬化及肝癌。这种临床预后的多样性与宿主

的免疫因素和遗传因素有关^[1,2]。在遗传因素中,多个基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)被认为与HBV感染后不同的临床转归有关^[3,4]。

干扰素(IFN)的分泌是病毒感染后机体最先启动的防御机制,在细胞培养体系及动物模型中,IFN可以抑制多种DNA及RNA病毒的复制^[5]。用/-IFN(-型IFN)处理表达HBV的肝细胞系,可以有效地抑制HBV的复制^[6]。外源性注射及内源性/-IFN可以抑制转基因小鼠的HBV的表达水平^[7]。在目前活动性乙型肝炎的治疗中,-IFN仍旧是主要

作者单位:1. 香港大学微生物系;2. 香港大学病理系;3. 深圳市东湖医院;4. 北京市佑安医院;5. 美国纽约血液中心 Linsley F. Kimball 研究所

通讯作者:郑伯建,E-mail:bzheng@hrucc.hku.hk

的治疗手段之一^[8]。

基于 IFN 对 HBV 显著的抑制作用,我们推测这类细胞因子可能与慢性乙型肝炎的发病有相关性,一种可能是:某些患者在感染了 HBV 后,未能诱导足够的这类细胞因子以抑制病毒的复制;然而,观察发现,病毒感染后自限性康复者与慢性患者的 -IFN 分泌水平无明显差异^[9]。另一种可能是:这些细胞因子受体方面的差异可能会影响慢性乙型肝炎的易感性。

型 IFN 的受体(IFNAR)由 2 个亚单位组成:IFNAR1 和 IFNAR2^[10],两者协同作用,介导型 IFN 的各种生物效应^[11]。IFNAR1 抗体可以阻断所有型 IFN 对人体细胞的结合,表明 IFNAR1 对于型 IFN 的结合有重要的作用^[12]。小鼠敲除 IFNAR1 基因后对于多种病毒的易感性增加,/-IFN 的抗增生

作用也被完全阻断^[13]。IFNAR1 启动子的基因多态性已有报道,并发现其与一些疾病的发病有关^[14]。本项研究旨在对 IFNAR1 启动子进行基因分型,并分析其与慢性乙型肝炎的易感性的相关性。

材料和方法

1. 研究对象及标本的采集 研究对象包括 616 例中国成人,其中包括 320 例慢性乙型肝炎患者(CP),148 例自限性康复者(SR)及 148 例健康对照(HBD)。此外,我们还收集了 114 例正常高加索人(HC)的血样。慢性乙型肝炎的诊断标准以及对照个体的资料见表 1。CP 组患者的血样来自香港玛丽医院、香港伊丽莎白医院、深圳东湖医院和北京佑安医院。SR 和 HBD 组的血样来自香港红十字会血库,HC 组的血样来自纽约血库。

表 1 慢性乙型肝炎患者及对照组个体的统计和血清学资料

Tab 1. Demographic and serological profiles of chronic hepatitis B patients and control subjects

Groups	Number	Male/ Female	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc	ALT normal/ elevated
CP	226	138/ 88	+	-	+	-	+	34/ 192
	94	50/ 44	+	-	-	+	+	11/ 83
SR	140	65/ 77	-	+	-	-	+	NA
	8	5/ 3	-	-	-	-	+	NA
HBD	113	47/ 66	-	+	-	-	-	NA
	35 *	20/ 15	-	-	-	-	-	NA

CP:chronic hepatitis B patient; SR:spontaneously recovered individuals; HBD:healthy blood donors.

* : We can not exclude persons with occult HBV infection or non-responders of HBV vaccination in these 35 HBV serological negative healthy blood donors.

2. HBV 抗原和抗体的检测 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(Biohit, Spain)用以检测血清 HBsAg、HBeAg、抗-HBs、抗-HBe 和抗-HBc, 检测方法见试剂盒说明书。

3. IFNAR1 启动子基因突变的检测 研究样本的血样用以提取基因组 DNA(QIAamp DNA blood mini kits, Qiagen, Valencia, CA)。正向引物 5'-TCT CTC CAA GGG ACC ATC TCG 3', 反向引物 5'-AGG AGG ACG ACC ATC ATC TG 3' 和 GC rich PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) 扩增了 755 bp 包含了 IFNAR1 启动子的片段,纯化的聚合酶链反应(PCR)产物用相同的引物及 Big-Dye Terminator version 2 (Applied Biosystems) 进行测序。所得的基因序列与 X60459 (GenBank 序列号) 的序列进行比对。

4. 确定等位基因连锁 -408 与 -3 之间的等位基因连锁用 2 对等位基因特异性的引物进行扩

增:-408C 反向引物 5'-AAG AGC GCC GGG CCG CGA CC-3', -408T 正向引物 5'-AAG AGC GCC GGG CCG CGA CT-3', -3C 正向引物 5'-AAG TCA CAC CCC CCC TCT GCG 3' 和 -3T 反向引物 5'-TAA GTC ACA CCG CCC CTC TGC A-3'。2 对引物交叉结合用于 PCR(GC-RICH PCR system Roche Diagnostics, USA) (图 1)。

5. 构建 IFNAR1 启动子-荧光素酶报告基因载体 IFNAR1 启动子 5 种单体型的变异型用 1 对引物进行 PCR 扩增,正向引物 5'-AAT ACCCGT GGG CCC GTG GCT GTT CTC T-3' 和反向引物 5'-GC AGATCT CTA AGT CAC ACC GCC CCT CT-3', 引物中包含了 Mlu 和 Bgl 的酶切位点(下划线标识)。扩增的片段克隆到 T 载体(Invitrogen),然后用 T4 连接酶(Roche)亚克隆到 pGL3-Basic 载体(Promega, Madison, WI),后者是 1 个商业化的荧光素酶报告基

因载体。基因测序以确定插入片段的正确性。

6. 基因转染和荧光素酶活性测定 将 5 种 IFNAR 启动子-荧光素酶报告基因载体(225 ng/孔)、阴性对照空白的 pGL3-Basic(225 ng/孔)及内源性对照 pRL-CMV(25 ng/孔)用磷酸钙沉淀法^[15]转染 96 孔板的 293T 细胞。转染后继续培养 48 h, 然后用 Dual-Glo luciferase kit(Promega) 测定 firefly 和 Renilla 荧光素酶的表达活性。实验独立进行 3 次。计算荧光素酶指数(LI = firefly 荧光度/Renilla 荧光度)并与空 pGL3-Basic 质粒转染进行比较。

7. 统计分析 数据的比较用卡方及独立样本 t 检验进行。用回归分析(SPSS, version 13.0)确定每 1 种单体型、等位基因和基因型的概率比(odds ratio, OR)。OR 用以反映如果某一个体为慢性 HBV 感染者, 他(她)所携带 1 种基因标识的可能性, 如果 OR 值 > 1 表明其携带该标识的个体易患慢性乙型肝炎, < 1 则表明该个体倾向清除病毒。在所有的分析中, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

结 果

1. IFNAR1 启动子基因多态性的发现 在研究样本中发现了 IFNAR1 启动子的 4 个多态性位点, 分别为 -568 位点 G/C 突变, -408 和 -3 位点 C/T 突变及 -77 位点 GT 重复序列的不稳定性。我们新发现的等位基因(allele) -568C 在中国人群中是一种颇为普遍的等位基因。GT 重复序列不稳定性在研究个体中变异很大(表 2), 5 个 GT 重复在中国人群中最为常见, 其次是 14 个和 15 个 GT 重复, GenBank 所公布的 9 GT 重复在中国人群中极为少见。

在高加索人群中, 5 个 GT 重复也是最常见的类型, 其次是 9、14 和 8 个 GT 重复。值得注意的是: 8、9 和 10 个 GT 重复在高加索人群中明显增多, 而 14 和 15 个 GT 重复在中国人群中的比例显著增高。其他 3 个位点等位基因和基因型出现的概率在 2 个不同种族的人群中无显著差异。

2. 多态性位点的连锁不平衡性及单体型的发现 测序的结果发现在 4 个多态性位点之间出现 2 个连锁, -568 SNP 被发现与 -77 GT 重复序列不稳定连锁, 即 -568C 与较少的 GT 重复(5、6 个 GT)、-568G 与较多的 GT 重复(9~21 个 GT)同时出现; 其中唯一的例外是 8 个 GT 重复, -568G/-77 GT(8)与 -568C/-77 GT(8)均可以在研究样本中发现。在测序结果中, -408 和 -3 的同源性携带者在

此 2 个位点之间也出现完全连锁, -408T 和 -3T, -408C 和 -3C 同时出现。-408 与 -3 之间的完全连锁也在等位基因特异性引物的 PCR 分析中被证实(图 2)。所有的多态性位点的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。-568 与 -408 位点之间出现显著的连锁不平衡性, 所以, 出现 3 种单体型类型(haplotype), 分别是单体型 [-568G/-408C/-3C/-77GT(M), 或 CCC(M)], 单体型 [-568C/-408C/-3C/-77GT(L), 或 CCC(L)] 和单体型 [-568C/-408T/-3T/-77GT(L), 或 CTT(L)]。

表 2 基因标识在中国人和高加索人中的频率分布

Tab 2. Frequency of genetic markers in Chinese and Caucasian subjects

Polymorphisms	Chinese	Caucasian	P value *
Genotypes			
-568G/G	0.180 2	0.131 6	0.207 0
-568G/C	0.454 5	0.482 5	0.582 8
-568C/C	0.365 3	0.386 0	0.673 8
-408C/C	0.607 1	0.552 6	0.275 4
-408C/T	0.318 2	0.394 7	0.110 3
-408T/T	0.074 7	0.052 6	0.400 6
Alleles			
-568G	0.407 5	0.372 8	0.326 8
-568C	0.592 5	0.627 2	0.326 8
-408C	0.766 2	0.750 0	0.596 1
-408T	0.233 8	0.250 0	0.596 1
(GT)n			
5	0.594 6	0.552 6	0.232 1
6	0.007 0	0.004 4	0.666 5
8	0.000 7	0.083 3	<0.000 1
9	0.001 4	0.136 0	<0.000 1
10	0.000 0	0.008 8	0.000 3
12	0.000 7	0.004 4	0.131 1
13	0.059 3	0.039 5	0.228 4
14	0.143 1	0.092 1	0.037 1
15	0.138 9	0.048 2	0.000 2
16	0.025 8	0.026 3	0.932 6
17	0.019 5	0.004 4	0.109 6
18	0.007 7	0.000 0	0.188 3
19	0.000 7	0.000 0	0.692 5
21	0.000 7	0.000 0	0.692 5

* chi-square test was applied for comparison. Statistically significant values are in bold.

3. IFNAR1 启动子多态性对慢性 HBV 感染的易感性的影响 IFNAR1 启动子单体型、等位基因和基

因型在 3 组研究个体中的分布见表 3。单体型 [GCC(M)] 在 SR 组 (OR = 0.687, 95% CI 0.520~0.909, P = 0.009) 明显增多, 而单体型 [CTT(L)]

在 CP group (OR = 1.794, 95% CI 1.269~2.535, P = 0.001) 显著增加。单体型 [CCC(L)] 与慢性 HBV 感染无显著的相关性。

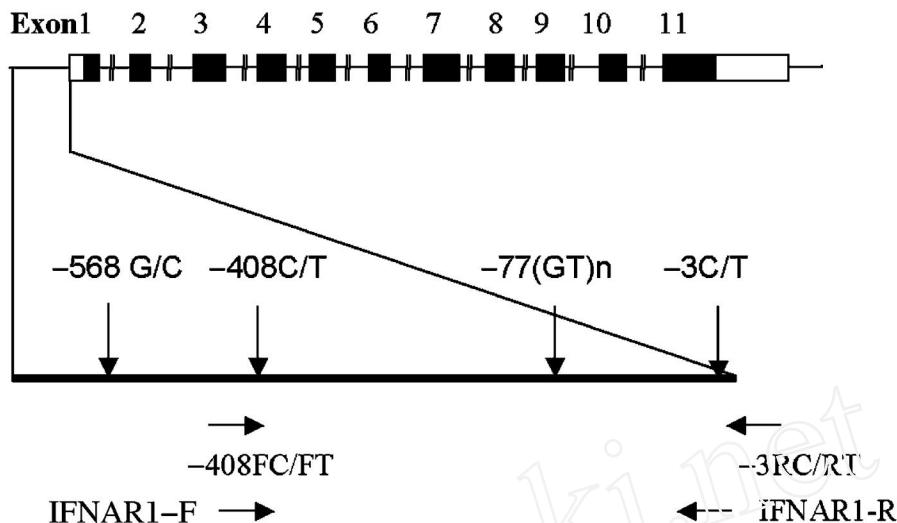


图 1 IFNAR1 基因及启动子和开放读码框架区的基因多态性

Fig 1. Schematic representation of IFNAR1 gene and single nucleotide polymorphisms located in promoter and open reading frame

Promoter was amplified and sequenced using primers IFNAR1-F/R. Allele-specific primers, -408FC/FT and -3RC/RT were used to confirm allelic linkage between -408 and -3. Eleven exons are represented as black boxes and 5' and 3' UTR as white boxes.

为了进一步确定单体型 和单体型 对慢性 HBV 感染的易感性的影响, 我们在 CP 与 SR 组之间比较了等位基因和基因型分布的差异。慢性 HBV 感染者中等位基因 -568C (OR = 1.455, 95% CI 1.100~1.924, P = 0.009) 和 -408T (OR = 1.794, 95% CI 1.269~2.535, P = 0.001) 出现的概率显著增高, 而等位基因 -588G (OR = 0.687, 95% CI 0.520~0.909, P = 0.009) 和 -408C (OR = 0.557, 95% CI 0.394~0.788, P = 0.001) 则在 SR 组明显多见。基因型 -568 G/G 与病毒清除 (OR = 0.522, 95% CI 0.320~0.851, P = 0.009) 相关, 而 -568 C/C 则趋向于与慢性感染有关 (OR = 1.419, 95% CI 0.943~2.134, P = 0.098)。基因型 -408 T/T 与慢性感染相关 (OR = 2.448, 95% CI 0.996~6.017, P = 0.051), 这种相关性在杂合子 C/T 基因型更为明显 (OR = 1.556, 95% CI 1.014~2.388, P = 0.043)。其原因可能是由于 T/T 基因型在人群中出现很少而产生的抽样误差。除了基因型 -568 C/C 外, 健康对照组的所有单体型、等位基因和基因型的出现概率位于 CP 和 SR 组之间。

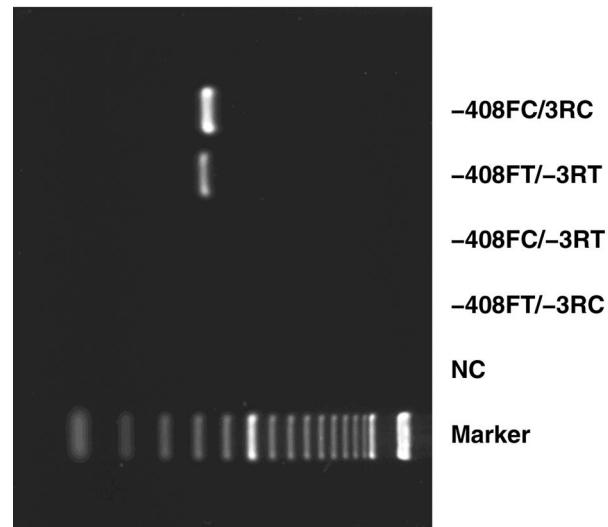


图 2 在杂合子个体中, PCR 确定-408与-3 位点的基因连锁

Fig 2. PCR confirmation of allelic linkage between loci -408 and -3 in a heterozygote (genotype C/T).

PCR performed with a pair of allele-specific primers -408FC/-3RC and -408FT/-3RT showed strong bands which correspond to a 446bp amplicon. PCR using other primer combinations, -408FC/-3RT and -408FT/-3RC did not show products. The 100 bp marker was used as reference. NC: negative control.

表 3 中国人中,基因表识在患者和对照个体中的分布情况
Tab 3. Distribution of genetic markers in Chinese patients and controls

Polymorphisms	CP	SR	HBD	CP versus SR			CP versus HBD		
	(n = 320)	(n = 148)	(n = 148)	OR	95 % CI	P	OR	95 % CI	P
Haplotypes									
(GCC _M)	0.366	0.456	0.449	0.687	0.520-0.909	0.009	0.706	0.534-0.934	0.015
a (GCC ₁₅)	0.125	0.151	0.156	0.803	0.541-1.191	0.276	0.772	0.515-1.157	0.210
b (GCC ₁₄)	0.128	0.178	0.141	0.679	0.466-0.990	0.044	0.893	0.590-1.352	0.593
c (GCC ₉)	0.003	0	0	5064184	0	0.995	5064184	0	0.995
(CCC _L)	0.358	0.368	0.351	0.956	0.718-1.273	0.757	1.029	0.771-1.372	0.848
(CTT _L)	0.277	0.176	0.199	1.794	1.269-2.535	0.001	1.536	1.100-2.144	0.012
Alleles									
-568G	0.366	0.456	0.449	0.687	0.520-0.909	0.009	0.706	0.534-0.934	0.015
-568C	0.634	0.544	0.551	1.455	1.100-1.924	0.009	1.416	1.070-1.873	0.015
-408C	0.723	0.824	0.801	0.557	0.394-0.788	0.001	0.651	0.466-0.909	0.012
-408T	0.277	0.176	0.199	1.794	1.269-2.535	0.001	1.536	1.100-2.144	0.012
Genotypes									
-568G/G	0.144	0.243	0.196	0.522	0.320-0.851	0.009	0.737	0.438-1.242	0.252
-568G/C	0.444	0.426	0.507	1.076	0.726-1.595	0.714	0.776	0.525-1.147	0.204
-568C/C	0.413	0.331	0.297	1.419	0.943-2.134	0.093	1.660	1.094-2.518	0.017
-408C/C	0.541	0.689	0.669	0.531	0.352-0.801	0.003	0.582	0.388-0.875	0.009
-408C/T	0.366	0.270	0.264	1.556	1.014-2.388	0.043	1.611	1.047-2.478	0.030
-408T/T	0.094	0.041	0.068	2.448	0.996-6.017	0.051	1.428	0.679-3.004	0.348

Binary logistic regression models were applied for calculating the odds ratios, 95 % confidential interval and corresponding P values. Significant associations are in bold. N is the total number of participants in each group. Denotation of haplotype accorded to the allelic variants in order of -568, -408, -3 and -77. Due to the complete linkage between -408 and -3 alleles, frequencies and statistic of -3 alleles were represented by those of -408. So does -77 alleles. Statistics of 3 subtypes of Haplotype (Ia, Ib and Ic) were specified. Due to decreased sample number and possibly larger sampling error, Haplotype Ia (GCC15) did not remain significant association with viral resolution. Since Haplotype Ic (GCC9) is extremely rare (the frequency is 0.31 %) in Chinese population, its analysis result is apparently unrepresentative and biased. CP: chronic HBV patients, SR: spontaneously recovered individuals, HBD: healthy blood donors.

总之,这一结果提示,突变型 -568C (及 -77 GT(L)) , -408T (及 -3T) , 和单体型 [-568C/-408T/-3T/-77 GT(L)] 的携带者可能与慢性 HBV 感染有关,而野生型 -568G (及 -77 GT(M)) , -408C (及 -3C) 和单体型 [-568G/-408C/-3C/-77 GT(M)] 则与病毒清除有关。

4. 不同 IFNAR1 启动子变异型的转录活性的评价 为了评价以上所提到的 IFNAR1 启动子多态性与慢性 HBV 感染的相关性的功能学意义,我们在 IFNAR1 启动子-荧光素酶报告基因载体体系中测定了不同 IFNAR1 启动子变异型的转录活性。所有的 IFNAR1 启动子-荧光素酶报告基因载体的荧光素酶活性均高于 pGL3-Basic 空载体,增高幅度为 33~65 倍。单体型 a [GCC(15)] 和单体型 [CCC(5)] 的

启动子活性明显高于单体型 [CTT(5)] (P 0.011)。但单体型 a 和单体型 b 报告基因表达水平无显著性差异 (P > 0.05) (图 3)。

为了确定 -77 位点不同的 GT 重复是否会影响 IFNAR1 启动子的功能,我们构建了单体型另外 2 种亚型的报告基因载体,分别为 14GT(单体型 b) 和 9GT(单体型 c) 重复。在中国人群极为少见的单体型 c (9GT) 启动子的转录活性显著高于单体型 a,但单体型 b 与单体型 a 的启动子活性的水平相当。

这些结果表明, -408 和 (或) -3 多态性和 -77 位点的重复序列不稳定性影响 IFNAR1 的启动子活性。等位基因 -408C 和 (或) 基因型 -408 C/C 以及 -77 9/9 GT 重复序列可以赋予 IFNAR1 启动子更高

的转录活性。而 568 G/C 对转录功能无明显影响。

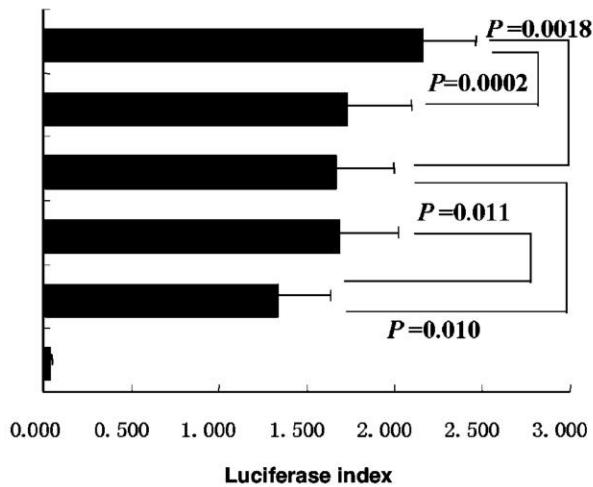


图 3 在 293T 细胞中比较 IFNAR1 启动子变异体的转录活性

Fig 3. Comparison of transcriptional activity among IFNAR1 promoter variants in 293T cell

Promoter variants haplotype a (-568G/-408C/-3C/-77GT₁₅) , haplotype b (-568G/-408C/-3C/-77GT₁₄) , haplotype c (-568G/-408C/-3C/-77GT₉) , haplotype d (-568G/-408C/-3C/-77GT₅) , haplotype e (-568G/-408T/-3T/-77GT₃) were cloned into pCL3 to construct vectors for evaluation of their transcriptional activity. Luciferase indexes (LI) were compared among promoters with haplotype variants. LI = firefly luminescence/Renilla luminescence. Significant *P* values are shown.

讨 论

慢性 HBV 感染在亚洲和非洲地区是一种常见的传染病而在高加索人中比较少见。调节炎症与免疫的细胞因子参与了机体对 HBV 感染的免疫^[16] , 而这些细胞因子的基因在不同人种间有很大的差异^[17] , 因此 , 我们推测不同人种对慢性乙型肝炎不同的易感性可能源于机体对病毒免疫的遗传学差异。型 IFN 可以有效地抑制 HBV 的复制 , 它们的抗病毒作用由受体的 2 个亚单位 IFNAR1 和 IFNAR2 所介导。英国高加索人以及其他人种 IFNAR1 启动子的基因多态性已有报道 , 但在中国人中无相应的报道 , 目前对于 IFNAR1 启动子是否会影响 HBV 感染后病情的进展尚无定论。我们收集了 616 例中国人的血样 , 其中包括 320 例慢性 HBV 感染患者 , 148 例自限性康复者 , 148 例健康携带者 ; 此外 , 我们得到了 114 例健康高加索人的血样标本。在 IFNAR1 启动子区域发现了 4 个多态性的位点 , 它们分别是 - 568 、 - 408 和 - 3 位点的单核苷酸多态性以及 -

77 位点的 GT 重复序列不稳定性 , 其中 - 568 位点的多态性为首次报道 , - 408 和 - 3 , 以及 - 568 和 - 77 位点的多态性有连锁。

我们分析了 IFNAR1 启动子的等位基因、单体型和基因型在 3 组中国人群中的分布 , 结果显示 IFNAR1 启动子的多态性与慢性乙型肝炎的易感性具有相关性 , - 568C 及 GT(L) , - 408T 及 - 3T , 和单体型 [- 568C/-408T/-3T/-77 GT(L)] 的携带者在 HBV 感染后易于慢性化 ; 而 - 568G 及 GT(M) , - 408C 及 - 3C 和单体型 [- 568G/-408C/-3C/-77 GT(M)] 的携带者在感染 HBV 后倾向于清除病毒。

在 IFNAR1 启动子-荧光素酶报告基因载体体系中 , 我们证实了 - 408 和 (或) - 3 的单核苷酸多态性可影响启动子功能。C/T 突变明显降低了 IFNAR1 启动子的转录活性 , 这一观察与遗传相关性分析的结果相吻合。临幊上 , 乙型肝炎患者中 - 408T/-3T 等位基因明显多于自发康复者。据报道 , 细胞表面 IFNAR1 的表达水平可以通过与 -IFN 结合亲和力的不同而影响这一细胞因子的作用效果^[18] 。由此推断 , 决定遗传学多态性与 HBV 感染后不同的临床预后之间的相关性机制可能在于 : 遗传学多态性调节了 IFNAR1 的表达水平 , 不同的 IFNAR1 表达水平又直接影响了型 IFN 的抗病毒作用 , 进而出现不同的临床结果。

虽然我们的分析结果显示 - 568 的单核苷酸多态性与 HBV 感染后不同的临床结果有关联 , 报告基因的数据表明 , 单体型 [- 568G/-408C/-3C/-77 GT(M)] 和单体型 [- 568C/-408C/-3C/-77 GT(L)] 启动子的转录活性差异无显著性 , 所以 , - 568 和 - 77 位点的基因多态性对 IFNAR1 的转录调节没有明显的影响。它们与不同的临床表现型的相关性可能是与其他决定性因素存在连锁不平衡。我们也研究了 IFNAR1 的开放阅读框架 , 其中发现 1 个单核苷酸多态性与 - 568 单核苷酸多态性存在明显的连锁不平衡 , 所以有必要进一步研究在 IFNAR1 编码序列的这一单核苷酸多态性的功能学意义。

因为 9 、 14 和 15 个 GT 重复均与 - 568G 等位基因连锁 , 它们被归于同一等位基因组进行统计学分析。为了明确这一组的启动子的转录活性确实无明显差异 , 9 、 14 和 15 个 GT 重复的 IFNAR1 启动子被插入报告基因载体以比较它们的启动子活性。结果显示 14 和 15 个 GT 重复对 IFNAR1 启动子活性的调

节无明显差异,因此我们认为在中国人群中,定义为 GT(M) 的 -77 等位基因在功能上具有一致性,可以归为一组进行数据处理。

值得注意的是,-77 GT(9) 在 616 位中国人中仅以 2 个杂合子携带者(5/9 和 9/14)的形式出现,概率为 0.0014,但它在高加索人群中出现的概率明显升高(概率为 0.136)。报告基因载体的检测显示 -77 GT(9) 启动子的转录活性明显高于携带 5、14 和 15 个 GT 重复的启动子。也就是说,-77 GT(9) 启动子可能会使得细胞膜表达更多的 IFNAR1 分子,从而介导更强的抗病毒作用。-77 GT(9) 启动子可能是慢性 HBV 感染在高加索人群中较为少见的原因之一。

慢性 HBV 感染是由多种因素促成的疾病,宿主的免疫学因素尚未完全被揭示,但抗原呈递细胞,辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞的缺陷均被认为与慢性 HBV 感染有关^[19,20]。人类基因组学的迅速进展为发现与疾病易感性相关的基因变异提供了很好的基础,一些多样本的病例对照研究发现了许多与慢性 HBV 感染有关联的遗传学因素。我们的研究揭示出 IFNAR1 启动子的多态性是慢性 HBV 感染易感性的遗传学因素之一。

参 考 文 献

- Jung MC ,Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. Lancet Infect Dis ,2002 ,2 :43~50
- Guidotti LG ,Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. Annu Rev Immunol ,2001 ,19 :65~91
- Deng G ,Zhou G ,Zhai Y ,et al. Association of estrogen receptor alpha polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. Hepatology ,2004 ,40 :318~326
- Kim YI ,Lee HS ,Yoon JH ,et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. Hum Mol Genet ,2003 ,12 :2541~2546
- Muller U ,Steinhoff U ,Reis LF ,et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science ,1994 ,264 :1918~1921
- Pasquetto V ,Wieland SF ,Uprichard SL ,et al. Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. J Virol ,2002 ,76 :5646~5653
- McClary H ,Koch R ,Chisari FV ,et al. Inhibition of hepatitis B virus replication during schistosoma mansoni infection in transgenic mice. J Exp Med ,2000 ,192 :289~294
- Lok AS ,Wu PC ,Lai CL ,et al. A controlled trial of interferon with or without prednisone priming for chronic hepatitis B. Gastroenterology ,1992 ,102 :2091~2097
- Chu CM ,Sheen IS ,Yeh CT ,et al. Serum levels of interferon alpha and gamma in acute and chronic hepatitis B virus infection. Dig Dis Sci ,1995 ,40 :2107~2112
- Novick D ,Cohen B ,Rubinstein M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. Cell ,1994 ,77 :391~400
- Langer JA ,Cutrone EC ,Kotenko S. The Class I cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. Cytokine Growth Factor Rev ,2004 ,15 :33~48
- Mogensen KE ,Lewerenz M ,Reboul J ,et al. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. J Interferon Cytokine Res ,1999 ,19 :1069~1098
- Muller U ,Steinhoff U ,Reis LF ,et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science ,1994 ,264 :1918~1921
- Aucan C ,Walley AJ ,Hennig BJ ,et al. Interferon-alpha receptor 1 (IFNAR1) variants are associated with protection against cerebral malaria in the Gambia. Genes Immun ,2003 ,4 :275~282
- Zheng BJ ,Graham FL ,Prevec L. Transcription units of Ela ,Elb and pIX regions of bovine adenovirus type 3. J Gen Virol ,1999 ,80 :1735~1742
- Wang C ,Tang J ,Song W ,et al. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. Hepatology ,2004 ,39 :978~988
- Hoffmann SC ,Stanley EM ,Cox ED ,et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. Am J Transplant ,2002 ,2 :560~567
- Dondi E ,Pattyn E ,Lutfalla G ,et al. Down modulation of type I interferon responses by receptor cross competition for a shared Jak kinase. J Biol Chem ,2001 ,276 :47004~47012
- Livingston BD ,Alexander J ,Crimi C ,et al. Altered helper T lymphocyte function associated with chronic hepatitis B virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans. J Immunol ,1999 ,162 :3088~3095
- Zheng BJ ,Zhou J ,Qu D ,et al. Selective functional deficit in dendritic cell—T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. J Viral Hepat ,2004 ,11 :217~224

(收稿日期:2006-10-31)