doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.12.016

论著 · 临床研究

IL-19 基因多态性与儿童乙型肝炎病毒易感性研究

范捷¹ 牟李红¹ 周莉¹ 黄歆¹ 黄延凤²

(1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院 / 医学与社会研究中心 / 健康领域社会风险预测治理协同创新中心, 重庆 400016;
2. 重庆医科大学附属儿童医院, 重庆 400014)

[摘要] **目的** 探讨白介素 19 (IL-19) 基因的单核苷酸多态性 (SNP) 与儿童乙型肝炎病毒 (HBV) 易感性的关系。**方法** 采用病例对照研究, 收集 HBsAg 阳性儿童 136 例 (病例组), HBsAg 阴性的健康儿童 297 例 (对照组), 应用 PCR 聚合酶链反应和 DNA 测序法进行基因分型。**结果** IL-19 基因的 rs1798 位点的基因型在病例组和对照组人群中频率分布差异有统计学意义, 病例组的 CG 基因型的比例显著高于对照组 ($P < 0.05$); IL-19 基因的 rs2243191 位点的基因型和等位基因在 HBV 感染高危儿童感染组和未感染组人群中频率分布差异有统计学意义, 感染组 TC、CC 基因型以及 C 等位基因的比例显著高于未感染组 ($P < 0.05$)。**结论** IL-19 基因 SNP 位点 rs1798 的基因多态性可能与儿童乙型肝炎易感性相关; rs2243191 的基因多态性可能与 HBV 感染高危儿童突破感染易感性相关。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(12): 1277-1281]

[关键词] 乙型肝炎; 白介素 19; 基因型; 儿童

Association between IL-19 gene polymorphisms and hepatitis B virus susceptibility in children

FAN Jie, MU Li-Hong, ZHOU Li, HUANG Xin, HUANG Yan-Feng. School of Public Health and Management, Chongqing Medical University/Research Center for Medicine and Social Development/Innovation Center for Social Risk Governance in Health, Chongqing 400016, China (Mu L-H, Email: 1097123703@qq.com)

Abstract: Objective To study the association between the single nucleotide polymorphisms (SNP) of interleukin (IL)-19 and susceptibility to hepatitis B virus (HBV) infection in children. **Methods** A case-control study was performed, and 136 children with positive HBsAg (case group) and 297 healthy children with negative HBsAg (control group) were enrolled. PCR and DNA sequencing were used for genotyping. **Results** There were significant differences in the frequencies of genotypes of IL-19 rs1798 between the case and control groups. The case group also had a significantly higher proportion of children with CG genotype than the control group ($P < 0.05$). There were significant differences in the frequencies of genotypes and alleles of IL-19 rs2243191 between the HBV infection and non-infection groups among children who born to HBV-positive mothers. The infection group had significantly higher proportions of children with TC and CC genotypes and C allele than the non-infection group ($P < 0.05$). **Conclusions** The SNP of IL-19 rs1798 may be associated with susceptibility to hepatitis B in children, and the SNP of IL-19 rs2243191 may be associated with susceptibility to breakthrough HBV infection in children at a high risk of HBV infection.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(12): 1277-1281]

Key words: Hepatitis B; Interleukin-19; Genotype; Child

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是一个全球性的重大公共卫生问题, 也是导致慢性肝炎、肝硬化、肝癌等严重疾病的主要原因^[1]。

据世界卫生组织统计, 我国有超过 1.3 亿人感染过 HBV, 2400 万发展成以肝功能损害和病毒复制为主要临床症状的慢性乙型肝炎 (简称乙肝)。有

[收稿日期] 2016-07-01; [接受日期] 2016-08-11

[基金项目] 重庆市科委科技计划项目 (cstc2014jcyjA10015); 重庆医科大学优秀青年学者资助项目 (CYYQ201304)。

[作者简介] 范捷, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 牟李红, 女, 教授。

报道指出, 小于 6 岁的儿童感染 HBV 最容易发展为慢性感染, 新生儿乙肝慢性化率为 80%~90%, 年龄小于 6 岁儿童为 25%~30%, 而成年人慢性化率不超过 5%^[2]。HBV 感染的转归与宿主的遗传易感性密切相关, 大量研究证实基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与 HBV 感染的转归密切相关^[3-6]。

白介素 (interleukin, IL) 19 属于 IL-10 家族, 是一种重要的免疫调节因子。近年来, IL-10、IL-22 等 IL-10 家族成员被报道与 HBV 感染和进展有关^[7]。大量研究表明, IL-19 参与免疫系统的调节功能, 与炎症和感染、自身免疫性疾病相关联^[8]; IL-19 可以诱导单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和 IL-6^[9]。以上研究结果提示 IL-19 可能会影响 HBV 感染, 但是国内尚没有关于 IL-19 基因多态性与儿童 HBV 易感性的相关报道。因此本研究旨在对 IL-19 基因多态性与儿童 HBV 遗传易感性的关系进行初步探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2013 年 10 月至 2015 年 5 月在重庆医科大学附属第一医院、重庆医科大学附属儿童医院和重庆市渝中区妇幼保健院三所医院门诊、住院的患儿中随机选择年龄 6 个月至小于 6 岁的 136 例乙肝儿童 (病例组) 和 297 例健康儿童 (对照组) 作为研究对象。乙肝诊断均符合 2005 年中华医学会肝病学会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[10] 诊断标准, 且未合并其他病毒性肝炎及免疫相关性疾病等。本研究获得重庆医科大学附属儿童医院医学伦理委员会批准和家长 (监护人) 书面知情同意。

1.2 DNA 的提取

取外周静脉血 3~5 mL, 经 2000 rpm 离心分离后, 使用凝固血基因组 DNA 提取试剂盒 (北京百泰克生物有限公司, DP6101) 提取 DNA; 4℃ 冰箱过夜, 使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定 DNA 浓度, DNA 保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.3 PCR

使用 AssayDesigner 3.1 软件进行引物设计。扩增位点 rs1798 的正向引物为 5'-ACGTTGGATGC

AGGCCCTTTCAGCAGATAG-3', 反向引物为 5'-ACGTTGGATGAGGCTGTCTTATTCCGCTTG-3', 延伸引物为 5'-TCTTATTCCGCTTGAAAATAG-3'。扩增位点 rs2243193 的正向引物为 5'-ACGTTGGATGATCCTGGGACTAAAGGGCTG-3', 反向引物为 5'-ACGTTGGATGTCACTTGGCTCACATCACAG-3', 延伸引物为 5'-ACAGACATGGACTATATGACTT-3'。rs2243191 的正向引物为 5'-ACGTTGGATGCATTAATCCCTGGGAGAGC-3', 反向引物 5'-ACGTTGATGACTATACAGGTTCCCTTGTC-3', 延伸引物为 5'-CCTTGTGCATCAAGCTGAG-3'。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 15 min; 94℃ 变性 20 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 45 个循环; 再 72℃ 延伸 3 min; 最后 4℃ 恒温。

1.4 基因分型

由博森生物科技 (北京) 有限公司采用 Sequenom Mass Array 系统完成样本的基因分型。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 计数资料以百分率 (%) 表示, 两组间率的比较采用 χ^2 检验; 采用 Fisher 确切概率法检测对照组哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium); 应用非条件 logistic 回归模型分析等位基因和基因型的影响。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

病例组平均年龄 2.6 ± 1.6 岁, 对照组平均年龄 2.4 ± 1.4 岁, 两组间年龄比较差异无统计学意义 (P>0.05)。病例组中男 89 例, 女 47 例, 对照组中男 175 例, 女 122 例, 两组间性别分布差异无统计学意义 (P>0.05)。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

经检验, 对照组人群中 rs1798、rs2243193、rs2243191 均达到连锁不平衡 (P>0.05), 表明选取的研究对象为达到遗传平衡的群体, 具有群体代表性。

2.3 IL-19 基因多态性与儿童 HBV 感染关联分析

分析结果显示: 位于 IL-19 基因上的 rs1798 的基因型在病例组和对照组间的分布有显著性差

异, 病例组的 CG 基因型的比例显著高于健康对照组 ($OR=1.581$, $95\%CI: 1.017\sim 2.459$, $P<0.05$)。提示与 rs1798 CC 基因型相比, CG 基因型可能增加儿童 HBV 感染的风险。而 rs2243193 和 rs2243191 各基因型在病例组和对照组中的分布差

异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

IL-19 基因上的 3 个位点 rs1798、rs2243193、rs2243191 的等位基因在病例组和对照中分布差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 1 IL-19 基因 3 个位点的基因型频率分布 [n (%)]

组别	例数	rs1798			rs2243193			rs2243191		
		CC	CG	GG	AA	GA	GG	TT	TC	CC
对照组	297	136(47.2)	113(39.2)	39(13.5)	148(50.9)	116(39.9)	27(9.3)	145(50.2)	123(42.6)	21(7.3)
病例组	136	51(37.5)	67(49.3)	18(13.2)	58(43.0)	64(47.4)	13(9.6)	60(46.2)	60(46.2)	10(7.7)
χ^2 值		-	4.137	0.399	-	2.425	0.307	-	0.560	0.115
P 值		-	0.042	0.528	-	0.119	0.579	-	0.454	0.734

注: 基因分型结果存在缺失值, 统计分析以实际检出基因型例数为准。“-”示此列为参照。

表 2 IL-19 基因 3 个位点等位基因的分布 [n (%)]

组别	例数	rs1798		rs2243193		rs2243191	
		C	G	A	G	T	C
对照组	297	385(66.8)	191(33.2)	412(70.8)	170(29.2)	413(71.5)	165(28.5)
病例组	136	169(62.1)	103(37.9)	180(66.7)	90(33.3)	180(69.2)	80(30.8)
χ^2 值		1.805		1.477		0.428	
P 值		0.179		0.224		0.513	

注: 统计分析以实际检出例数为准。

2.4 IL-19 基因多态性与 HBV 感染高危儿童感染关联分析

本研究中, HBV 感染高危儿童定义为出生于乙肝表面抗原 (HBsAg) 阳性的母亲的儿童。这些儿童出生 24 h 内肌注乙肝免疫球蛋白 (HBIG), 剂量为 100~200 IU, 且按计划接种了乙肝疫苗。病例组和对照组中分别有 34 例及 132 例 HBV 感染高危儿童, 采用非条件 logistic 回归模型分析 IL-19 基因上的各多态位点与 HBV 感染高危儿童感染的关联, 分析结果显示, rs2243191 的基因型在 HBV 感染高危儿童 HBV 感染组和未感染组的分布差异有统计学意义, 感染组 TC、CC 基因型的比例显著高于未感染组 ($OR=3.679$, $95\%CI: 1.453\sim 9.317$; $OR=6.190$, $95\%CI: 1.401\sim 27.361$, 均 $P<0.05$)。见表 3。

IL-19 基因上 rs2243193、rs2243191 的等位

基因在 HBV 感染的高危儿童感染组和未感染组中分布差异有统计学意义 ($P<0.05$), 感染组 rs2243191 的等位基因 C 和 rs2243193 的等位基因 G 的比例显著高于未感染组, rs2243193 的等位基因 G 和 rs2243191 的等位基因 C 可能增加 HBV 突破感染的风险 ($OR=1.897$, $95\%CI: 1.088\sim 3.309$; $OR=2.333$, $95\%CI: 1.322\sim 4.116$), 见表 4。

2.5 单倍型分析

将位于 IL-19 基因上的 3 个多态位点 (rs2243191、rs1798 和 rs2243193) 导入 Phase 2.0 软件, 病例组和对照组中分别构建了 7 种和 8 种单倍型, 两组中发现频率 >5% 的单倍型共 6 种, 分别为 TCA、TGA、TCG、CCA、CGA、CCG。采用非条件 logistic 回归分析显示, 与频率最高的 TCA 单倍型相比, 其他各单倍型与儿童 HBV 感染的危险性均差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 5。

表 3 IL-19 基因 3 个位点的基因型在 HBV 感染高危儿童中的频率分布 [n (%)]

组别	例数	rs1798			rs2243193			rs2243191		
		CC	CG	GG	AA	GA	GG	TT	TC	CC
未感染组	132	60(47.6)	54(42.9)	12(9.5)	70(54.7)	47(36.7)	11(8.6)	65(52.4)	53(42.7)	6(4.8)
感染组	34	16(47.1)	15(44.1)	3(8.8)	12(35.3)	16(47.1)	6(17.6)	7(21.9)	21(65.6)	4(12.5)
χ^2 值		-	0.010	0.008	-	2.595	3.772	-	7.552	5.781
P 值		-	0.920	0.927	-	0.107	0.052	-	0.006	0.016

注：基因分型结果存在缺失值，统计分析以实际检出基因型例数为准。“-”示此列为参照。

表 4 HBV 感染高危儿童 IL-19 基因 3 个位点等位基因的分布 [n (%)]

组别	例数	rs1798		rs2243193		rs2243191	
		C	G	A	G	T	C
未感染组	132	174(69.0)	78(31.0)	187(73.0)	69(27.0)	183(73.8)	65(26.2)
感染组	34	47(69.1)	21(30.9)	40(58.8)	28(41.2)	35(54.7)	29(45.3)
χ^2 值		0.000		5.090		8.551	
P 值		0.991		0.024		0.003	

注：统计分析以实际例数为准。

表 5 IL-19 基因单倍型与儿童 HBV 易感性的关系 [n (%)]

组别	例数	单倍体型					
		TCA	TGA	TCG	CCA	CGA	CCG
对照组	280	74(0.262)	68(0.242)	58(0.207)	31(0.111)	26(0.094)	23(0.082)
病例组	129	25(0.192)	34(0.264)	31(0.242)	12(0.095)	15(0.116)	12(0.091)
χ^2 值		-	1.574	2.043	0.110	1.805	1.047
P 值		-	0.210	0.153	0.741	0.179	0.306

注：SNP 位点的顺序：rs2243191、rs1798、rs2243193。“-”示此列为参照。

3 讨论

研究报道遗传因素（如人类白细胞抗原），在 HBV 感染中扮演很重要的角色^[11]。本研究结果表明 IL-19 基因的 rs1798 位点的基因型在病例组和对照组人群中频率分布差异有统计学意义，病例组的 CG 基因型的比例显著高于对照组，IL-19 基因的 rs2243191 位点的基因型和等位基因在 HBV 感染高危儿童感染组和未感染组人群中频率分布差异有统计学意义，感染组 TC、CC 基因型以及 C 等位基因的比例显著高于未感染组。

近年来，IL-10 被报道与 HBV 感染有关^[7]；IL-10 基因多态性与 HBV 感染和进展有关^[12-14]。Moudi 等^[15]报道在印度人群中，IL-10 的基因启动子多态性与 HBV 易感性和 HBV 感染的临床转归有关。IL-10 家族对免疫系统发挥着多种多样的调节

作用，IL-10、IL-19 等都属于 IL-10 家族^[7]。目前国内尚没有关于 IL-19 基因多态性与儿童 HBV 易感性的相关报道，国外关于 IL-19 与 HBV 的报道主要集中于其单倍型与 HBV 感染的关系。Truelove 等^[16]曾报道 IL-10、IL-20 基因多态性会影响 HBV 感染的结局，而在美国人中 IL-19（rs2243168、rs2243176、rs2243191）的单倍型与 HBV 感染无关。Ryckman 等^[17]在 IL-19（rs12409415、rs2056225、rs2243158）的单倍型分析中表明，与 AAC 单倍型相比，ATG、GTG 能增加乙肝表面抗体的水平。本研究显示，与 rs1798 CC 相比，rs1798 CG 基因型可能增加儿童 HBV 感染的风险。目前国内外未见 rs2243193 和 rs2243191 位点的多态性与 HBV 感染相关报道，但 Yamamoto-Furusho 等^[18]曾报道 rs2243193 的多态性与溃疡性结肠炎的发病有关。本研究结果显示 rs2243193 和 rs2243191 位点的

等位基因和基因型在两组间差异无统计学意义,说明 rs2243193 和 rs2243191 位点的多态性对儿童 HBV 感染没有影响。本研究还通过单倍型分析发现, IL-19 基因 3 个位点 (rs2243191、rs1798、rs2243193) 的单倍型差异无统计学意义,表明 IL-19 的单倍型对儿童 HBV 感染没有影响。

本研究中有 166 例 HBV 感染高危儿童,出生时均接种 HBIG 和乙肝疫苗,但仍然有 34 例儿童感染 HBV。研究表明,免疫预防失败突破感染主要与产妇血清 HBeAg 阳性和高病毒载量有关^[19]。但也有报道显示,相同年龄、性别、种族的儿童群体都暴露于高水平病毒载量的孕产妇,也出现不一致的临床结果,因此考虑宿主的遗传变异可能导致免疫预防的失败^[20]。本研究进一步探讨 IL-19 基因的 rs2243191、rs1798 和 rs2243193 多态性和 HBV 感染高危儿童突破易感性的关系,发现 rs2243191 的多态性与 HBV 感染高危儿童感染 HBV 有关,携带 TC 和 CC 基因型与 TT 基因型相比可能增加 HBV 感染高危儿童突破感染的风险。由于基础资料的部分缺失,本文尚没有分析孕产妇 HBV DNA 载量、HBeAg 阳性等高危因素对于乙肝疫苗和 HBIG 联合免疫阻断失败的影响,存在一定的不足。

综上所述,本研究结果表明, IL-19 基因 SNP 位点 rs1798 的多态性可能与儿童 HBV 感染易感性有关,而 IL-19 基因 rs2243191 的多态性可能与 HBV 感染高危儿童感染易感性有关。由于本研究样本量较小,存在一定的局限性,今后尚需进一步扩大样本作深入探讨。

志谢:感谢重庆医科大学附属第一医院、重庆医科大学附属儿童医院、重庆市渝中区妇幼保健院医务人员以及研究对象对本课题的支持。

[参 考 文 献]

- [1] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2009, 373(9663): 582-592.
- [2] Komatsu H, Inui A. Hepatitis B virus infection in children[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(4): 427-450.
- [3] Zeng Z. Human genes involved in hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(24): 7696-7706.
- [4] 周琴, 郜玉峰, 赵小苗, 等. IL-4 基因多态性与 HBV 遗传易感性的研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(10): 968-971.
- [5] Motavaf M, Safari S, Alavian SM. Interleukin 18 gene promoter polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B infection: a review study[J]. Hepat Mon, 2014, 14(7): e19879.
- [6] Wu L, Chen L, Zhou L, et al. Association of interleukin 18 gene promoter polymorphisms with HBV recurrence after liver transplantation in Han Chinese population[J]. Hepat Mon, 2011, 11(6): 469-474.
- [7] 费筠, 陈月, 吴文苑. 白细胞介素与 HBV 感染的关系 [J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(2): 174-177.
- [8] 夏旭, 杨钦河. 白细胞介素 -19 的研究近况 [J]. 国外医学 (免疫学分册), 2002, 25(6): 324-328.
- [9] Liao YC, Liang WG, Chen FW, et al. IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha[J]. J Immunol, 2002, 169(8): 4288-4297.
- [10] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(6): 421-431.
- [11] Zhang PA, Wu JM, Li Y, et al. Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han population[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(11): 1594-1598.
- [12] 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[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(8): 2086-2092.
- [13] Shin HD, Park BL, Kim LH, et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(8): 901-906.
- [14] Zhu QR, Ge YL, Gu SQ, et al. Relationship between cytokines gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(19): 1604-1609.
- [15] Moudi B, Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, et al. Association between IL-10 gene promoter polymorphisms (-592 A/C, -819 T/C, -1082 A/G) and susceptibility to HBV infection in an Iranian population[J]. Hepat Mon, 2016, 16(2): e32427.
- [16] Truelove AL, Oleksyk TK, Shrestha S, et al. Evaluation of IL10, IL19 and IL20 gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection outcome[J]. Int J Immunogenet, 2008, 35(3): 255-264.
- [17] Ryckman KK, Fielding K, Hill AV, et al. Host genetic factors and vaccine-induced immunity to HBV infection: haplotype analysis[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12273.
- [18] Yamamoto-Furusho JK, Álvarez-León E, Fragoso JM, et al. Protective role of interleukin-19 gene polymorphisms in patients with ulcerative colitis[J]. Hum Immunol, 2011, 72(11): 1029-1032.
- [19] Shao ZJ, Zhang L, Xu JQ, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus: a Chinese experience[J]. J Med Virol, 2011, 83(5): 791-795.
- [20] Yucesoy B, Talzhanov Y, Johnson VJ, et al. Genetic variants within the MHC region are associated with immune responsiveness to childhood vaccinations[J]. Vaccine, 2013, 31(46): 5381-5391.

(本文编辑:王庆红)