

MHC II 类分子反式激活因子基因多态性与慢性乙型肝炎易感性的关联

苏明宽[#], 郑锦利, 杨虹, 陈宏斌, 黄建成, 郭建峰, 陈勇[#]

(福建医科大学附属闽东医院 检验科, 福安 355000)

摘要: 反式激活因子(class II transactivator, CII TA)是调控 MHC II 类基因表达水平的限速因子, 故将 CII TA 作为慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)候选基因, 分析其单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与 CHB 易感性的关联。以福建医科大学附属闽东医院汉族患者为基础进行病例对照研究, 其中 596 例 CHB 患者为病例组, 313 例 HBV 自限性感染者为对照组。采用 Haploview 4.2 软件筛选出 CII TA 基因的 15 个标签 SNP, 再用多重高温连接酶检测反应对所选标签 SNP 进行基因型检测。结果显示, CII TA 基因内含子 rs13333382(TT+TA vs AA; $P=0.003$, $OR=0.65$, 95%可信区间(confidence interval, CI)为 0.49~0.87]和 rs4780335(CC+CG vs GG; $P=9.40\times 10^{-5}$, $OR=0.55$, 95%CI 为 0.41~0.74)多态性与 HBV 自限性感染呈正相关, 而 3'非翻译区 rs1139564 (TT+TC vs CC; $P=0.002$, $OR=1.61$, 95%CI 为 1.19~2.16)多态性可增加 CHB 风险。因此, 作者认为 CII TA 基因多态性与 HBV 感染结局存在关联。

关键词: 乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; 反式激活因子; 单核苷酸多态性; 表达数量性状位点

中图分类号: R394.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)03-0184-05

HBV 感染呈世界性流行, 是全球重大公共卫生问题之一^[1]。全球约有 2.4 亿慢性 HBV 感染者^[2], 我国约占 9 300 万, 其中慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者约 2 000 万^[3]。CHB 是一种由遗传、病毒感染与环境因素共同作用导致的复杂疾病, 具有高度的遗传异质性^[4]。2009 年, Kamatani 等^[5]开展了一项针对日本和泰国人群的全基因组关联研究(genome wide association study, GWAS), 发现 HLA-DP 基因座上的多个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与慢性 HBV 感染有关, 其研究结果已得到后续 GWAS 的验证^[6-8]。MHC II 类分子反式激活因子(class II transactivator, CII TA)是调控 MHC II 类基因表达水平的限速因子, 其通过调控 MHC II 类分子表达水平而决定宿主对外来病原体感染产生免疫应答的程度^[9]。因此, 本研究将 CII TA 作为 CHB 的候选基因, 分析其基因内含

子、外显子、3'非翻译区(3'untranslated region, 3'UTR)的标签 SNP 与 CHB 易感性是否存在关联。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集 2014 年 10 月至 2018 年 5 月在福建医科大学附属闽东医院住院治疗的 596 例 CHB 患者为病例组, 选取同期 313 例 HBV 自限性感染者为对照组, 以上研究对象均为相互间无血缘关系的福建宁德汉族人群。CHB 的诊断标准参考中华医学会 2015 年版《慢性乙型肝炎防治指南》, 具体如下: 血清 HBsAg 和/或 HBV DNA 阳性 6 个月以上, 且 ALT 持续或反复异常或肝组织学检查显示有肝炎病变。为排除可能存在疫苗接种史的人群, 纳入对照组的对象必须为 HBsAg 阴性, HBsAb 和 HBcAb 同时阳性, 肝功能各项指标均正常。研究对象另有排除标准: (1) HIV 和/或 HCV 检测阳性者; (2) 存在其他原因导致的肝脏病变, 如酒精性肝病、自身免疫性肝病等。研究对象一般资料见表 1。

1.2 标签 SNP 的选择 利用在线工具(<http://grch37.ensembl.org/index.html>)下载 CII TA 基因(第 16 号染色体: 10971055~11018840)所有突变的基因型数据, 导入 Haploview 4.2 软件进行分析。标签 SNP 的选择标准如下: 最小等位基因频

收稿日期: 2018-10-09

基金项目: 福建省自然科学基金(2016J01596); 宁德市科技计划项目(20150013)

作者简介: 苏明宽(1982—), 男, 硕士生, 主管技师, 主要从事分子生物学研究

通信作者: 陈勇(E-mail: 285980355@qq.com); 苏明宽(E-mail: mingkuansu@qq.com); # 为共同通信作者

率 ≥ 0.15 、 $r^2 \geq 0.5$ 、哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 检验 ≥ 0.05 。

表 1 研究对象的一般资料特征

特征	自限性感染组 ($n=313$)	CHB 组 ($n=596$)
性别		
男 (%)	134 (42.8%)	352 (59.1%)
女 (%)	179 (57.2%)	244 (40.9%)
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	48.5 \pm 14.1	43.3 \pm 13.3
血清学检测		
HbsAg (-/+)	313/0	0/596
HBsAb (-/+)	0/313	596/0
HBeAg (-/+)	313/0	458/138
HBeAb (-/+)	142/171	138/458
HBcAb (-/+)	0/313	0/596

1.3 实验方法 空腹采集所有纳入对象静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸二钾抗凝, TIANamp 血液基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取基因组 DNA。采用多重高温连接酶检测反应(improved multiplex ligation detection reaction, iMLDR)对所选的 15 个标签 SNP 分型, 该技术是基于传统连接酶反应并经改进的多重 SNP 分型方法。引物设计、合成及基因分型均由上海天

昊生物科技有限公司完成。

1.4 统计学处理 连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)检验由 Haploview 4.2 软件完成, $r^2 < 0.80$ 表示不存在较强的 LD。采用显性遗传模型分析 C//TA 基因多态性与 CHB 的风险, 用二元 Logistic 回归分析校正年龄和性别等影响因素。相对危险度以 OR 和 95% 可信区间(confidence interval, CI)表示。使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 所有检验均为双侧。通过引入 Bonferroni 法校正多重假设检验增加 I 类错误的风险, 以 $P < 0.0033(0.05/15)$ 为差异有统计学意义。

1.5 生物信息学分析 使用在线工具 HaploReg v4.1 分析具有统计学意义的标签 SNP 是否为表达数量性状位点(expression quantitative trait loci, eQTL), 或者是否存在转录因子的结合基序。利用 PolymiRTS Database 3.0 预测 3'UTR 的标签 SNP 功能, 判断其是否具有 miRNA 结合靶位。

2 结果

2.1 标签 SNP 选择结果及 LD 检验 根据标签 SNP 的选择标准, 共筛选出 15 个 SNP, 每个 SNP 的染色体位置见表 2。对自限性感染组 15 个标签 SNP 进行 LD 检验, 结果显示任意两点之间的 $r^2 < 0.80$, 未发现较强的 LD(图 1)。

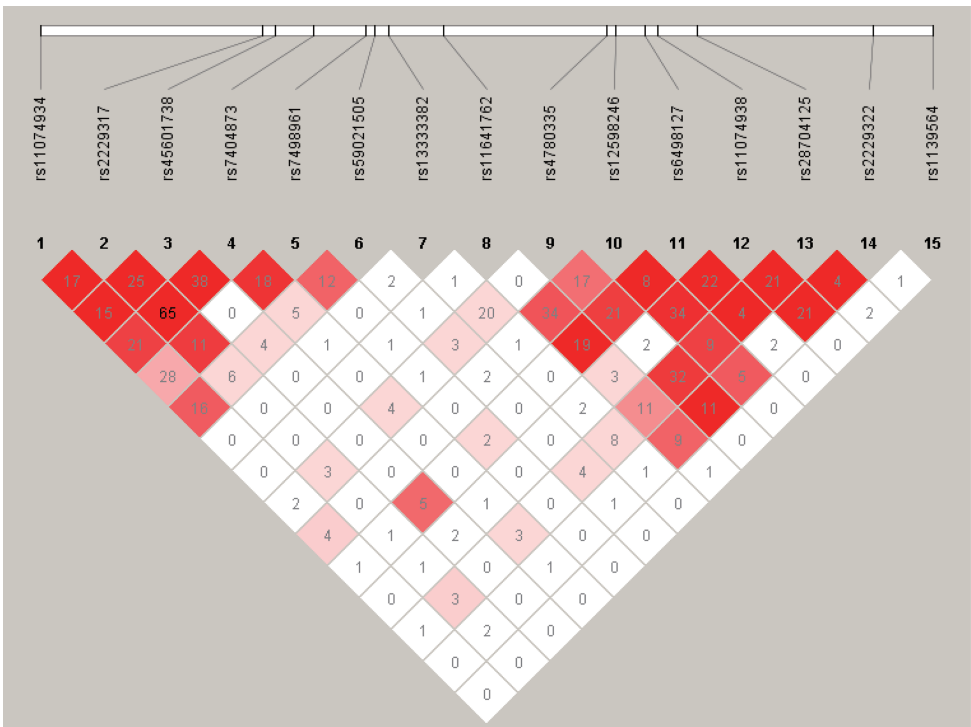


图 1 C//TA 基因 15 个标签 SNP 的 LD 分析

2.2 CⅡTA 基因多态性与 CHB 风险的关联 自限性感染组与 CHB 组相比,在显性模型中 rs13333382(TT+TA *vs* AA: $P=0.003$, $OR=0.65$, 95%CI 为 0.49~0.87)和 rs4780335(CC+CG *vs* GG: $P=0.000$, $OR=0.55$, 95%CI 为

0.41~0.74)多态性均与 HBV 自限性感染呈正相关,而 rs1139564 多态性可增加 CHB 风险(TT+TC *vs* CC: $P=0.002$, $OR=1.61$, 95%CI 为 1.19~2.16)。其余 12 个标签 SNP 均与 CHB 风险不存在关联($P>0.05$)。(表 2)

表 2 CⅡTA 基因多态性与 CHB 风险的关联

位点	染色体位置	等位基因 (V/W)	自限性感染组 ($n=313$)			CHB 组($n=596$)			P 值	OR(95%CI)
			VV	VW	WW	VV	VW	WW		
rs11074934	10979440	C/T	21	112	180	36	214	346	0.736	0.95(0.71~1.26)
rs2229317	10989219	G/C	34	153	126	75	263	258	0.242	0.84(0.63~1.12)
rs45601738	10989770	T/C	30	137	146	75	250	271	0.794	1.03(0.78~1.38)
rs7404873	10991449	T/G	70	144	99	126	272	198	0.683	0.94(0.69~1.27)
rs7498961	10993766	A/G	14	91	208	15	165	416	0.538	0.91(0.67~1.23)
rs59021505	10994136	C/T	59	158	96	106	319	171	0.685	1.06(0.78~1.45)
rs13333382	10994759	T/A	42	146	125	45	243	308	0.003	0.65(0.49~0.87)
rs11641762	10997168	T/G	69	163	81	170	276	150	0.697	1.06(0.77~1.48)
rs4780335	11004328	C/G	39	173	101	99	228	269	0.000	0.55(0.41~0.74)
rs12598246	11004732	T/C	33	136	144	89	219	288	0.638	0.93(0.70~1.24)
rs6498127	11006011	A/G	3	91	219	21	157	418	0.970	1.01(0.74~1.37)
rs11074938	11006543	A/G	63	155	95	141	271	184	0.714	0.94(0.69~1.28)
rs28704125	11008280	C/A	18	96	199	30	162	404	0.229	0.83(0.62~1.12)
rs2229322	11016045	T/C	9	75	229	24	144	428	0.593	1.09(0.79~1.50)
rs1139564	11018622	T/C	9	97	207	34	228	334	0.002	1.61(1.19~2.16)

注:二元 Logistic 回归分析均校正性别与年龄等影响因素,以 $P<0.0033$ 为差异有统计学意义;采用显性(VV+VW *vs* WW)遗传模型分析 CⅡTA 基因多态性与 CHB 的风险;V:突变等位基因,W:野生等位基因

2.3 生物信息学分析 通过生物信息学分析发现 rs13333382 和 rs4780335 存在 Hbp 1、Sox-3、AIRE 1、Hmbox 1 等蛋白结合基序,rs4780335 还是靶基因的 eQTL。而 rs1139564 则存在 hsa-miR-4433a-5p、hsa-miR-4449 等 miRNA 结合靶位。

3 讨论

CⅡTA 为非 DNA 结合蛋白,其通过与其他转录因子如 RFX、CREB 和 NF- κ B 的特异性相互作用募集至 MHC II 类基因启动子区域,在 MHC II 类基因的转录激活过程中以协同激活分子的形式发挥主导开关作用,对 MHC II 类分子的表达起到严格且专一的调控^[10]。除此之外,CⅡTA 还调节超过 60 种免疫相关基因的转录,包括 *IL-4*、*IL-10* 和各种甲状腺特异性基因^[11]。CⅡTA 基因包括 4 个不同的启动子(P I~P IV),每个启动子作用的发

挥存在组织细胞特异性^[12],如 P I 主要调节 CⅡTA 在巨噬细胞和 DC 中的表达,P IV 则调控 CⅡTA 在胸腺上皮细胞的表达。Zhang 等^[13]发现 CⅡTA 基因 P IV 区域 rs12928665(-1350C/T)和 rs12932187(-944G/C)多态性与慢性 HBV 感染有关,其研究结果显示 TG 单倍型具有较高的启动子活性,可促进 CⅡTA 基因 mRNA 的表达。Vargas-Alarcón 等^[14]研究发现 CⅡTA 基因第 3 内含子 rs8048002 TC+CC 基因型可以增加急性冠脉综合征风险。通过对北京人群(千人基因组计划数据库)的分析发现 rs12928665 与 rs45601738($r^2=0.511$)、rs12932187 与 rs2229317($r^2=0.531$)、rs45601738 与 rs8048002($r^2=0.872$)存在不同程度的 LD,然而本研究并未发现 rs45601738 和 rs2229317 多态性与 CHB 风险有关联。另外 He 等^[15]和 Su 等^[16]也未发现 CⅡTA 启动子多态性与慢性 HBV 感染有

关联,可能因为以上研究所纳入的不同地域人群存在遗传异质性。

文献报道 *C//TA* 基因第 5 内含子 rs6498122 多态性与口腔扁平苔藓相关^[17]。本研究所选标签 SNP rs7498961、rs59021505、rs13333382 均位于第 5 内含子,这 4 个突变均落在 1 000 bp 碱基距离之内,而且 rs7498961 与 rs6498122 ($r^2=0.526$) 存在中等强度的 LD,然而只发现 rs13333382 多态性与 CHB 风险有关联。另外标签 SNP rs4780335、rs12598246、rs6498127、rs11074938、rs28704125 均位于 *C//TA* 基因第 13 内含子,这 5 个突变的距离不超过 4 000 bp 碱基。Bae 等^[18] 发现 rs11074938 多态性与哮喘患者鼻息肉风险存在关联,但其关联并未在 CHB 人群中得到重复。目前 GWAS 所发现的与复杂性状或疾病相关的遗传易感位点多位于基因组的非编码区^[19],这些易感位点可能是相应基因的 eQTL,如 Machiela 等^[20] 发现染色体 6p25.1 区域的 rs7742053 A 等位基因会提高尤因肉瘤 *RREB1* 基因的表达水平。本研究发现 rs4780335 不仅是 eQTL,还存在转录因子 Hmbox 1 结合基序, Hmbox1 表达增高可通过 NKG2D/DAP 10 信号通路抑制 NK 细胞的杀伤活性^[21],其基因表达水平可能与肿瘤发生有关^[22]。生物信息学分析显示 *C//TA* 基因 3'UTR rs1139564 存在 miRNA 结合靶位,miRNA 是一种内源性非编码微小 RNA,它通过碱基互补配对原则识别靶基因 mRNA 的 3'UTR,并根据碱基互补程度抑制目标 mRNA 翻译或引起 mRNA 降解,发挥转录后调控作用^[23]。

综上,本研究采用病例对照关联研究分析了 *C//TA* 基因 15 个标签 SNP 与 CHB 易感性的关联,通过显性遗传模型分析发现 rs13333382 TT+TA 和 rs4780335 CC+CG 基因型与 HBV 自限性感染正相关,而 rs1139564 TT+TC 基因型可以增加 CHB 风险。

参考文献

- [1] Locarnini S, Hatzakis A, Chen DS, *et al.* Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1): S76-S86.
- [2] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, *et al.* Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. *Vaccine*, 2012, 30(12): 2212-2219.
- [3] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J].中国肝脏病杂志(电子版),2015,9(3):1-18.
- [4] 苏明宽,黄建成,陈宗云,等.慢性乙型肝炎易感基因的全基因组关联研究进展[J].现代免疫学,2017,37(1):74-79.
- [5] Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi HA, *et al.* A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 591-595.
- [6] Hu Z, Liu Y, Zhai X, *et al.* New loci associated with chronic hepatitis B virus infection in Han Chinese[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1499-1503.
- [7] Nishida N, Sawai H, Matsuura K, *et al.* Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39175.
- [8] Kim YJ, Kim HY, Lee JH, *et al.* A genome-wide association study identified new variants associated with the risk of chronic hepatitis B[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(20): 4233-4238.
- [9] Chiu E, Gold T, Fettig V, *et al.* Identification of a nuclear export sequence in the MHC CII TA[J]. *J Immunol*, 2015, 194(12): 6102-6111.
- [10] Schärer CD, Choi NM, Barwick BG, *et al.* Genome-wide CII TA-binding profile identifies sequence preferences that dictate function versus recruitment[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(6): 3128-3142.
- [11] Devaiah BN, Singer DS. CII TA and its dual roles in MHC gene transcription[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 476.
- [12] Yau AC, Piehl F, Olsson T, *et al.* Effects of C2ta genetic polymorphisms on MHC class II expression and autoimmune diseases[J]. *Immunology*, 2017, 150(4): 408-417.
- [13] Zhang X, Hong X, Deng G, *et al.* Single nucleotide polymorphisms and functional analysis of class II transactivator (CII TA) promoter IV in persistent HBV infection[J]. *J Clin Virol*, 2007, 40(3): 197-201.
- [14] Vargas-Alarcón G, Posadas-Romero C, Posadas-Sánchez R, *et al.* The variant rs8048002 T > C in intron 3 of the MHC2TA gene is associated with risk of developing acute coronary syndrome[J]. *Cytokine*, 2015, 71(2): 268-271.
- [15] He Y, Zhao Y, Zhang S, *et al.* Not polymorphism but methylation of class II transactivator gene promoter IV associated with persistent HBV infection[J]. *J Clin Virol*, 2006, 37(4): 282-286.
- [16] Su MK, Chen HJ, Zeng YB, *et al.* Association of genetic variation of CII TA and NTCP with chronic hepatitis B virus infection in Han Chinese populations[J]. *Hepat Mon*, 2017, 17(6): e33646.
- [17] Wu D, Wang L, Sun M, *et al.* CII TAr5774 and rs6498122 polymorphisms are associated with oral lichen planus in Chinese people: A case-control study[J]. *Eur J Oral Sci*, 2013, 121(2): 69-75.
- [18] Bae JS, Pasaje CF, Park BL, *et al.* Genetic association analysis of CII TA variations with nasal polyp pathogenesis in

- asthmatic patients[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(3): 927-934.
- [19] Westra HJ, Peters MJ, Esko T, *et al.* Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(10): 1238-1243.
- [20] Machiela MJ, Grünwald TGP, Surdez D, *et al.* Genome-wide association study identifies multiple new loci associated with Ewing sarcoma susceptibility[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3184.
- [21] Wu LY, Zhang C, Zhang J. HMBOX1 negatively regulates NK cell functions by suppressing the NKG2D/DAP10 signaling pathway[J]. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8(5): 433-440.
- [22] Yu YL, Diao NN, Li YZ, *et al.* Low expression level of HMBOX1 in high-grade serous ovarian cancer accelerates cell proliferation by inhibiting cell apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(2): 380-386.
- [23] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, *et al.* Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 402.

Association of SNP of *C/TA* gene with susceptibility to chronic hepatitis B in Han nationality of Fujian province

SU Ming-kuan[#], ZHENG Jin-li, YANG Hong, CHEN Hong-bin, HUANG Jian-chen, GUO Jian-feng, CHEN Yong[#] (*Department of Laboratory Medicine, Mindong Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuan 355000, China*)

Abstract: To investigate the possible association between the single nucleotide polymorphism (SNP) of *C/TA* (class II transactivator) and the susceptibility to chronic hepatitis B(CHB), a hospital-based case-control study was conducted in 596 patients with CHB, and 313 patients with HBV self-limiting infection served as the control group. All individuals were of Han nationality. The 15 tag SNP of *C/TA* were screened by Haploview 4.2 software, and the selected SNP were genotyped by iMLDR method. The results showed that the *C/TA* gene intron rs1333382 (TT+TA *vs* AA; $P=0.003$, $OR=0.65$, 95% CI , 0.49-0.87) and rs4780335 (CC+CG *vs* GG; $P=9.40 \times 10^{-5}$, $OR=0.55$, 95% CI , 0.41-0.74) polymorphisms were positively correlated with HBV self-limiting infection, while the 3' untranslated region rs1139564 (TT+TC *vs* CC; $P=0.002$, $OR=1.61$, 95% CI , 1.19-2.16) polymorphism could increase the risk of CHB. Therefore, our study suggests that the *C/TA* gene polymorphism is associated with the outcome of HBV infection.

Key words: hepatitis B virus; chronic hepatitis B; class II transactivator; single nucleotide polymorphism; expression quantitative trait loci