

消化系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002104

CD8⁺ T 淋巴细胞抑制基因多态性与 HBV 突变的相互作用对慢性 HBV 感染进展的影响

李治颖¹, 彭 洪¹, 郭进军², 李青岭¹

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016;

2. 重庆大学附属中心医院、重庆市急救医疗中心、重庆市第四人民医院消化内科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探索与 HBV (hepatitis B virus, HBV) 亚型相关的 CD8⁺ T 淋巴细胞抑制性基因多态性与病毒突变的相互作用对 HBV 感染结局的影响。**方法:**总共纳入 239 例健康对照 (healthy controls, HC) 者, 429 例自发清除 (spontaneous clearance, SR) 患者, 858 例慢性 HBV 感染 (chronic HBV infection, CH) 患者。从 5 个 CD8⁺ T 淋巴细胞抑制性基因中挑选出 28 个标签 SNP (tagging SNP, tgsnp) 进行基因分型。采用直接测序确定 HBV 病毒突变。**结果:**CD8⁺ T 淋巴细胞抑制性基因多态性 (CD244 中的 rs485618, rs4656942, rs3766377 和 BIM 中的 rs6746608) 与 HBV 突变 (T53C, A166C, T216C, A293G, A1762T, G1764A 和 A1762T / G1764A) 的相互作用显著影响肝硬化 (liver cirrhosis, LC) 或肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发生的风险。在多因素降维分析法 (multifactor dimensionality reduction, MDR) 分析中发现类似结果。**结论:**CD244 和 BIM 的基因多态性可能参与调节肝硬化或肝细胞癌相关 HBV 突变的免疫选择, 并且其相互作用可能影响慢性 HBV 感染进展。

【关键词】乙型肝炎病毒; 突变; 基因多态性; CD244 (2B4); Bcl-2 相互作用细胞死亡调节子

【中图分类号】R512.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-18

Influence of interaction between the polymorphisms of CD8⁺ T cell inhibitory genes and hepatitis B virus mutations on the progression of chronic hepatitis B virus infection

Li Zhiying¹, Peng Hong¹, Guo Jinjun², Li Qingling¹

(1. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University;

2. Chongqing University Central Hospital; Chongqing Emergency Medical Center; Department of Gastroenterology, the Fourth People's Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective: To investigate the interaction between the polymorphisms of hepatitis B virus (HBV)-related CD8⁺ T cell inhibitory genes and HBV mutations and its influence on the outcome of HBV infection. **Methods:** A total of 239 healthy controls, 429 patients with spontaneous clearance, and 858 patients with chronic HBV infection were enrolled. A total of 28 tagging single nucleotide polymorphisms were selected from 5 CD8⁺ T cell inhibitory genes for genotyping. Direct sequencing was performed to determine HBV mutations. **Results:** The interactions between the polymorphisms of CD8⁺ T cell inhibitory genes (rs485618, rs4656942, and rs3766377 in CD244 and rs6746608 in BIM) and HBV mutations (T53C, A166C, T216C, A293G, A1762T, G1764A, and A1762T/G1764A) had a great influence on the risk of liver cirrhosis (LC) or hepatocellular carcinoma (HCC). Similar results were obtained by multifactor dimensionality reduction analysis. **Conclusion:** The polymorphisms of CD244 and BIM genes might be involved in the regulation of immune selection of LC- or HCC-related HBV mutations, and the interactions between them may affect the progression of chronic HBV infection.

【Key words】 hepatitis B virus; mutation; polymorphism; CD244 (2B4); Bcl-2 homolog

作者介绍: 李治颖, Email: lizhiying1991@163.com,

研究方向: 病毒性肝炎、肝硬化及肝癌的研究和治疗。

通信作者: 李青岭, Email: liqingling1974@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81071338)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190505.1724.010.html>

(2019-05-06)

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球重大的健康问题。全世界的慢性 HBV 感染患者约有 2.5 亿人^[1]。每年死于 HBV 相关肝硬化(liver cirrhosis, LC)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的患者人数分别在 20 万和 30 万以上^[2]。大约三分之一的 LC 病例和超过一半的 HCC 病例是由慢性 HBV 感染引起的^[3]。

病毒特异性 CD8⁺T 细胞在 HBV 感染的免疫应答中起着至关重要的作用。慢性 HBV 感染患者中,病毒特异性 CD8⁺T 细胞的数量减少并且功能受损^[4],其确切的机制尚不清楚。研究显示多种免疫抑制性基因参与上述机制的调控,如细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白结构域相关分子 3(Tim-3)、程序性死亡受体 1(PD-1)、与 Bcl2 相互作用的细胞死亡调节子(Bim)和 CD244^[5-9]。

高病毒载量(>10⁴ 拷贝/mL),乙型肝炎病毒 e 抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)表达,HBV C 型感染,活动性肝脏炎症以及前 S1/S2/S 区和增强子 II/基础核心启动子/前 C 区(enhancer II/basal core promoter/precore, Enh II/BCP/PC)突变对严重肝脏疾病,特别是肝细胞癌的发病率有很大影响^[10-13]。在慢性 HBV 感染过程中,突变逐渐积累。在发生肝细胞癌之前可能出现一些突变^[14]。突变可以造成肝细胞癌发生风险并且促进肝癌细胞增殖^[15-16]。因此,HBV 突变可以作为慢性 HBV 感染的肝细胞癌患者诊断和预后的生物标志物。

免疫压力可以影响 HBV 突变的发生^[17]。本课题组既往研究了 CD8⁺T 淋巴细胞抑制性基因多态性与 HBV 感染结局的关系,而忽视了其与 HBV 亚型及病毒突变的关系及相互作用。本研究的目的是确定与 HBV 亚型相关的 CD8⁺T 淋巴细胞抑制性基因多态性与 HBV 病毒突变的相互作用对 HBV 感染结局的影响。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本研究纳入 2011 年 1 月至 2014 年 6 月就诊于重庆医科大学附属第一医院及第二医院的 HBV 相关肝病患者及正

常体检者。总共 1 526 例,其中健康对照组(healthy controls, HC)239 例,HBV 自发清除组(spontaneous clearance, SR)429 例,慢性 HBV 感染组(chronic HBV infection, CH)858 例。慢性 HBV 感染组又分成肝细胞癌(HCC)组 198 例,肝硬化(LC)组 340 例,慢性乙型肝炎(chronic HBV hepatitis, CHB)组 264 例和无症状 HBsAg 携带者(asymptomatic HBsAg carriers, ASC)组 56 例。本研究纳入的所有患者均为乙肝表面抗原(HBsAg)阳性大于 6 个月;纳入标准^[18]:①HC 组:肝功能正常,HBV 病毒血清标志物(-),无肝炎或者其他疾病;②SR 组:HBV 表面抗体(anti-HBs)及核心抗体(anti-HBc)阳性,肝功能正常,无肝炎、肝硬化、肝癌及其他肝病的证;③LC 组与 HCC 组:根据临床症状、生化指标及影像学(CT 或 MRI)诊断;④CHB 组:慢性 HBV 感染者且肝功能间断或者持续异常,没有肝硬化或者肝癌的证据;⑤ASC 组:慢性 HBV 感染者且血生化指标持续正常。排除标准^[18]:①人类免疫缺陷病毒(HIV)或其他非乙肝病毒的其他肝炎病毒感染;②无 HBV 病毒血清标志物检测结果的患者;③仅 HBV 表面抗体(HBsAb)阳性;④其他慢性肝病者:原发性胆汁性肝硬化、中毒性肝炎、自身免疫性肝炎等;⑤严重的系统性疾病患者:系统性红斑狼疮或肿瘤等(非 HBV 相关的 HCC);⑥孕妇或者非汉族人。重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准了该研究方案。研究中所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 HBV DNA 提取、基因分型和突变分析

通过病毒基因组提取试剂盒(Biomed, Beijing, China)提取 HBV DNA。通过实时荧光定量 PCR^[19]检测 HBV 基因分型,并使用 NCBI 基因分型工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)进行确认。使用巢式 PCR 进行 HBV DNA 片段扩增。2815-704 片段扩增:第一轮扩增,引物 2815F(5'-TTTGCGGGTCACCATATTCTTGG-3')和 704R(5'-CGAACCACTGAACAAATGGCACT-3')。程序:3 min 热启动,95 °C 25 s,58 °C 25 s,72 °C 70 s,共 35 个循环。第二轮扩增,使用第一轮产物 0.2 μL,引物 2815F(5'-TTTGCGGGTCACCATATTCTTGG-3')和 272R(5'-TGAGAGAAGTCCACCACGAGT-3')或者 179F(5'-CTAGGACCCCTGCTCGTGTT-3')和 704R(5'-CGAACCACTGAACAAATGGCACT-3')。程序:3 min 热启动,95 °C 25 s,56 °C 25 s,72 °C 50 s,共 30 个循环。1604-2006 片段扩增:第一轮扩增,引物 1604F(5'-TCGCATGGAGACCACCGTGA-3')和 2072R(5'-CCTGAGTGCTGTATG GTGAG-3')。程序:3 min 热启动,95 °C 25 s,57 °C 25 s,72 °C 60 s,共 35 个循环。第二轮扩增,使用第一轮产物 0.2 μL,引物 1604F(5'-TCGCATGGAGACCACCGTGA-3')和 2006R(5'-ATACAGAGCAGAGCGGTAT-3')。程序:3 min 热启动,95 °C 25 s,57 °C 25 s,72 °C 50 s,共 30 个循环。使用 ABI 3730 遗传分析仪(Applied Biosystems, Foster

City, CA) 用于 HBV DNA 测序。

1.3 HBV 序列野生型和突变型的定义

由于野生型菌株传统上来自 HBeAg 阳性患者^[20-21], 所以野生型核苷酸定义为携带血清 HBeAg 阳性的无症状患者中出现频率最高的核苷酸。HBV 突变核苷酸定义为具有每个位点缺失和其他核苷酸替换。“热点突变”定义为在所有 HBV 感染患者中出现频率 > 10% 的突变型。

1.4 DNA 提取、tgSNP 选择及分型、MDR 分析

人基因组 DNA 的提取、标签 SNP (tgSNP) 的选择和基因分型及 MDR 分析已在本课题组之前研究中详细阐述^[18]。

1.5 统计分析

使用 Mann-Whitney U 检验和卡方检验分别分析连续变量和分类变量。HWE 软件用于检查正常组与清除组数据是否符合哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg, H-W)。由于 HBV 感染的各个亚组 (ASC, CHB, LC 和 HCC) 间存在重叠, 因此为了分析 LC 和 HCC 的风险因素, 将慢性 HBV 感染患者划分为如下 4 组: ①无 LC 或 HCC 的患者, 包括 ASC 患者和 (或) CHB; ②LC 和 HCC 患者 (大多数肝癌患者合并有肝硬化); ③无 HCC 的患者, 包括 ASC, CHB 和 (或) LC 患者; ④ HCC 患者。应用二元 logistic 回归分析校正患者的性别与年龄等混杂因素后, 研究基因多态性对 HBV 易感性/清除率/进展以及基因型 B 或 C 的 HBV 突变产生的影响。使用多变量 logistic 回归分析校正患者的性别与年龄等混杂因素后, 评估

SNP 与突变之间的相互作用对肝硬化和肝细胞癌发生的倍增效应, 并计算优势比 (odds ratio, OR)。P 值采用 FDR-BH (Benjamini-Hochberg step up false discovery rate control) 方法校正多重检验。使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ (包括 FDR-BH 校正后的 P 值)。

2 结果

2.1 研究人群的特征

既往研究中描述了研究人群的特征^[18]。本研究进一步发现, LC 和 (或) HCC 组中男性 ($P=0.000$) 和基因型 B ($P=0.000$) 的比例明显高于对照组 (表 1)。

2.2 多态性与 HBV 亚型感染结局的相关性

关于自发清除 (SR vs. CH) 或易感性 (HC vs. CH), 在 HBV 基因型 B 或基因型 C 感染的多重检验校正后, 没有发现 SNP 与疾病有显著相关性。关于 LC (ASC, CHB vs. LC, HCC, 表 2), CD244 rs485618 基因型 GA ($P=0.037$, OR=0.392) 仅在 HBV B 型感染中有显著相关性。关于 HCC (ASC, CHB, LC vs. HCC), BIM rs6746608 基因型 GA ($P=0.035$, OR=5.868) 仅在 HBV B 型感染中有显著相关性 (表 2)。CD244 rs539771 基因型 TG ($P=0.045$, OR=0.262) 和等位基因 G ($P=0.044$, OR=0.357), rs3766377 基因型 AG ($P=0.039$, OR=3.680), rs4656942 基因型 GA ($P=0.039$, OR=3.685) 和等位基因 A ($P=0.028$, OR=

表 1 研究对象的特征

变量	CH (n=858)			P 值
	ASC, CHB (n=320)	LC (n=340)	HCC (n=198)	
平均年龄 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)	51.2 $\pm$ 12.1	50.6 $\pm$ 11.5	52.3 $\pm$ 12.5	0.99/0.15 ^b
男性患者的数量 (%)	208 (65)	240 (70.6)	180 (90.9)	0.000/0.000 ^b
HBV B 型	154	108	50	0.000/0.000 ^b
HBV C 型	64	72	58	—

注: a. ASC, CHB vs. LC, HCC; b. ASC, CHB, LC vs. HCC

表 2 慢性 HBV B 型感染患者 CD244 (rs485618) 和 BIM (rs6746608) 多态性的多变量分析

基因多态性	基因型	ASC, CHB (n=154)	LC (n=108)	HCC (n=50)	^a P/ ^b P (OR)	
					ASC, CHB vs. LC, HCC	ASC, CHB, LC vs. HCC
Rs485618	GG	58	62	26	—	—
	GA	80	32	20	0.000/0.037 (0.392)	0.330/0.723 (0.722)
	AA	14	12	4	0.268/0.646 (0.634)	0.351/0.731 (0.577)
	G	196	156	72	—	—
	A	108	56	28	0.007/0.168 (0.620)	0.238/0.626 (0.864)
Rs6746608	GG	48	44	6	—	—
	GA	66	44	34	0.727/0.996 (1.097)	0.000/0.035 (5.868)
	AA	40	18	10	0.193/0.579 (0.654)	0.026/0.231 (3.499)
	G	162	132	46	—	—
	A	146	80	54	0.237/0.629 (0.824)	0.015/0.207 (1.447)

注: ^aP, 校正年龄和性别的 logistic 回归, 未校正多重检验; ^bP, 校正年龄和性别的 logistic 回归, FDR-BH 校正多重检验

2.855), rs12036670 基因型 AG ($P=0.031$, $OR=0.217$) 在 HBV C 型感染中有显著相关性(表 3)。

2.3 LC 或 HCC 相关的 HBV 突变

HBV Enh II/BCP/PC 和前 S1/S2/S 突变区域的测序成功率分别为 55.48% 和 57.81%。表 4 显示了 HBV Enh II/BCP/PC 和前 S1/S2/S 突变区域的热点突变。因为大多数肝细胞癌患者合并有肝硬化, 所以我们对比 LC, HCC 组和 ASC, CHB 组来进行肝硬化风险的评估。据报道, HBV B 型和 C 型的突变频率可能不同, 所以基于基因型对患者进行了分层。对于

LC, 前 S1/S2/S 区中的 T53C ($P=0.043$, $OR=2.481$)、T216C ($P=0.017$, $OR=2.499$)、Enh II/BCP/PC 区中 A1726C ($P=0.012$, $OR=2.283$)、A1762T ($P=0.008$, $OR=2.485$)、G1764A ($P=0.007$, $OR=2.528$)、A1762T/G1764A ($P=0.012$, $OR=2.787$) 仅在 HBV B 型中有显著相关性。在 HBV C 型中没有任何突变显示出有统计学意义。就 HCC 而言, 前 S1/S2/S 区中的 A166C ($P=0.029$, $OR=5.434$)、A293G ($P=0.010$, $OR=6.654$) 仅在 HBV C 型中有显著相关性。Enh II/BCP/PC 区中的 A1762T ($P=0.006$, $OR=3.261$) 仅在 HBV B 型中有显著相关性。

表 3 CD244 (rs539771、rs4656942、rs3766377 和 rs12036670) 与慢性 HBV C 型感染中 HCC 风险的相关性

基因多态性	基因型	ASC、CHB ($n=64$)	LC ($n=72$)	HCC ($n=58$)	$^aP^bP(OR)$
					ASC、CHB、LC vs. HCC
Rs539771	TT	38	34	42	—
	TG	22	34	14	0.000/0.045 (0.262)
	GG	4	4	2	0.063/0.374 (0.214)
	T	98	102	98	—
	G	30	42	18	0.000/0.044 (0.357)
Rs3766377	AA	30	38	14	—
	AG	30	30	38	0.000/0.039 (3.680)
	GG	4	2	4	0.113/0.454 (3.215)
	A	90	106	66	—
	G	38	34	46	0.004/0.138 (2.056)
Rs4656942	GG	40	48	22	—
	GA	24	22	32	0.000/0.039 (3.685)
	AA	0	2	4	0.010/0.178 (13.417)
	G	104	118	76	—
	A	24	26	40	0.000/0.028 (2.855)
Rs12036670	AA	24	22	34	—
	AG	32	42	20	0.000/0.031 (0.217)
	GG	8	8	4	0.041/0.288 (0.262)
	A	80	86	88	—
	G	48	58	28	0.000/0.052 (0.420)

注: aP , 校正年龄和性别的 logistic 回归, 未校正多重检验; bP , 校正年龄和性别的 logistic 回归, FDR-BH 校正多重检验

表 4 HBV B 型或 C 型中突变与 LC 和 HCC 的相关性

突变	$^aP^bP(OR)$			
	B 型		C 型	
	ASC、CHB vs. LC、HCC	ASC、CHB、LC vs. HCC	ASC、CHB vs. LC、HCC	ASC、CHB、LC vs. HCC
T53C	0.000/0.043 (2.481)	0.011/0.127 (2.341)	0.261/0.776 (1.960)	0.603/1.011 (0.774)
A166C	0.626/1.017 (0.649)	0.270/0.759 (0.370)	0.849/1.177 (1.104)	0.000/0.029 (5.434)
T216C	0.000/0.017 (2.499)	0.366/0.820 (1.333)	0.316/0.822 (0.528)	0.540/0.975 (0.602)
A293G	—	—	0.016/0.208 (6.461)	0.000/0.010 (6.654)
A1726C	0.001/0.012 (2.283)	0.886/1.071 (1.052)	0.903/1.174 (1.114)	0.272/0.674 (2.336)
A1762T	0.000/0.008 (2.485)	0.000/0.006 (3.261)	0.000/0.074 (2.644)	0.228/0.659 (1.618)
G1764A	0.000/0.007 (2.528)	0.354/0.708 (1.372)	0.065/0.307 (2.091)	0.713/0.757 (0.856)
A1762T/G1764A	0.000/0.012 (2.787)	0.014/0.081 (2.408)	0.000/0.118 (3.101)	0.798/1.122 (0.894)

注: aP , 校正年龄和性别的 logistic 回归, 未校正多重检验; bP , 校正年龄和性别的 logistic 回归, FDR-BH 校正多重检验

2.4 SNP 与 HBV 突变之间的相关性

表 5 显示了在 HBV B 型或 C 型中与 LC 或 HCC 相关的 SNP 和突变之间的相关性。在 HBV C 型中,经过多重检验校正后,CD244 rs4656942 基因型 GA 显著影响突变 A166C ($P=0.026$, $OR=6.073$) 的频率。

2.5 SNP 和 HBV 突变之间的相互作用影响 LC 和(或)HCC 的发生

表 6 显示了 SNP 与 HBV 突变的相互作用对 LC 发生的

影响。CD244 rs485618 和前 S1/S2/S 区中的 T53C、T216 与 Enh II/BCP/PC 区中的 A1726C、A1762T、G1764A、A1762T/G1764A 对 LC 发生的影响仅在 HBV B 型中有显著作用。因此,仅在患有 HBV B 型的感染患者中研究 rs485618 与 LC 相关 HBV 突变的相互作用。CD244 rs485618 基因型 GG 和 T53C ($P=0.008$, $OR=3.601$), T216C ($P=0.003$, $OR=3.723$), A1762T ($P=0.000$, $OR=5.979$), G1764A ($P=0.001$, $OR=5.152$)、A1762T/G1764A ($P=0.001$, $OR=5.881$) 对 LC 发生有显著相关性,而

表 5 HBV C 型感染受试者中多态性与 HCC 相关 HBV 突变产生的相关性

基因多态性	基因型	A166C		^a P/ ^b P(OR)
		A	C	
Rs4656942	GG	92	4	—
	GA	54	16	0.000/0.026(6.073)
	AA	6	2	0.064/0.320(5.882)

注:^aP,校正年龄和性别的 logistic 回归,未校正多重检验;^bP,校正年龄和性别的 logistic 回归,FDR-BH 校正多重检验

表 6 HBV B 型感染受试者中 CD244 rs485618 与 LC 相关 HBV 突变的相互作用

基因多态性	HBV 突变	ASC、CHB	LC、HCC	^a P/ ^b P(OR)
Rs485618	T53C			
	GG	42	42	—
	GG	12	42	0.002/0.008(3.601)
	GA	58	26	0.005/0.014(0.393)
	GA	18	20	0.758/0.888(1.131)
相互作用				0.002/0.008(0.710)
Rs485618	T216C			
	GG	40	38	—
	GG	14	48	0.000/0.003(3.723)
	GA	50	28	0.073/0.124(0.546)
	GA	24	22	0.872/0.991(1.064)
相互作用				0.002/0.008(0.727)
Rs485618	A1762T			
	GG	44	38	—
	GG	8	38	0.000/0.000(5.979)
	GA	50	26	0.089/0.148(0.560)
	GA	24	20	0.941/1.023(1.029)
相互作用				0.012/0.028(0.646)
Rs485618	G1764A			
	GG	38	34	—
	GG	10	42	0.000/0.001(5.152)
	GA	42	16	0.016/0.034(0.394)
	GA	32	30	0.735/0.875(1.129)
相互作用				0.000/0.000(0.695)
Rs485618	A1762T/G1764A			
	GG	40	30	—
	GG	8	34	0.000/0.001(5.881)
	GA	42	14	0.025/0.051(0.404)
	GA	24	18	0.974/1.029(1.013)
相互作用				0.012/0.028(0.630)

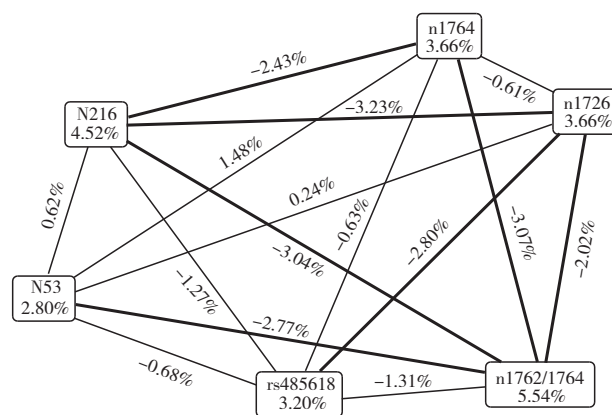
注:^aP,校正年龄和性别的 logistic 回归,未校正多重检验;^bP,校正年龄和性别的 logistic 回归,FDR-BH 校正多重检验

rs485618 G/A 和 n53 野生型 T ($P=0.014$, $OR=0.393$)、n1764 野生型 G ($P=0.034$, $OR=0.394$) 对 LC 发生有显著相关性。与 ASC + CHB 组患者相比,rs485618 (GA vs. GG) 和 T53C ($P=0.008$, $OR=0.710$), T216C ($P=0.008$, $OR=0.727$), A1762T ($P=0.028$, $OR=0.646$), G1764A ($P=5.63E-4$, $OR=0.695$)、A1762T/G1764A ($P=0.028$, $OR=0.630$) 的相互作用明显降低 LC 发生的风险。在 MDR 分析中,对 LC 发生的影响而言 (HBV B 型感染)。

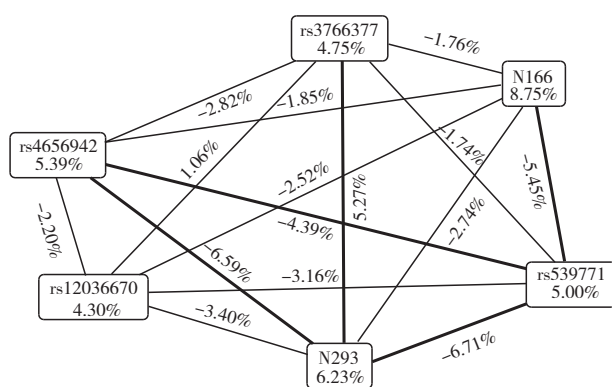
表 7 显示了 2 种相互作用模型—(rs485618-n53-n216-n1726-n1764-n1762/n1764), (rs485618-n53-n216-n1726-n1762-n1764-n1762/n1764)。最佳的相互作用模型是 rs485618-n53-n216-n1726-n1764-n1762/n1764 (TBA=0.7329, CVC: 10/10, $P=0.000$, 如图 1A 所示)。

表 8 显示了 SNP 与 HBV 突变的相互作用对 HCC 发生的影响。CD244 rs539771, rs3766377, rs4656942, rs12036670 和前 S1/S2/S 区中的 A166C、A293G 仅在 HBV C 型中有显著作用。因此,仅在 HBV C 型感染的患者中分析了 rs539771、rs3766377、rs4656942、rs12036670 与 A166C、A293G 的相互作用。CD244 rs4656942 基因型 GA 和 A166C ($P=0.002$, $OR=12.104$)、A293G ($P=0.002$, $OR=56.967$) 对 HCC 发生有显著相关性,而 rs3766377 基因型 AG 和 A166C ($P=0.000$, $OR=36.341$)、A293G ($P=0.000$, $OR=16.294$) 对 HCC 发生有显著相关性。与 ASC+CHB+LC 相比,rs4656942 (GA vs. GG) 与 A166C ($P=0.003$, $OR=2.043$)、A293G ($P=0.000$, $OR=2.633$), rs3766377 (GA vs. GG) 与 A166C ($P=0.000$, $OR=2.635$)、A293G ($P=0.000$, $OR=2.171$) 的相互作用显著增加了 HCC 发生的风险。BIM rs6746608 基因型 GA 和 Enh II/BCP/PC 区的 A1762T 仅在 HBV B 型感染中对 HCC 发生有显著相关性。因此,在 HBV B 型感染中分析了 rs6746608 和 A1762T 的相互作用对 HCC 发生的影响。CD244 rs6746608 基因型 GA 和 A1762T ($P=0.001$, $OR=28.230$) 对 HCC 发生有显著相关性。与 ASC+CHB+LC 相比,rs6746608 (GA vs. GG) 与 A1762T ($P=0.000$, $OR=3.519$) 的相互作用显著增加了 HCC 发生的风险。在 MDR 分析中,对 HCC 发生的影响而言 (HBV C 型感染),表 7 显示了 3 种相

互作用模型—(rs12036670-rs3766377-n166), (rs12036670-rs3766377-n166-n293), (rs12036670-rs3766377-rs4656942-rs539771-n166-n293)。最佳相互作用模型是 rs12036670-rs3766377-rs4656942-rs539771-n166-n293 (TBA=8.505, CVC: 10/10, $P=0.000$, 图 1B)。



A. HBV 突变和 SNP 之间的显著相互作用在 HBV B 型感染中对 LC 风险的影响



B. HBV 突变和 SNP 之间的显著相互作用在 HBV C 型感染中对 HCC 风险的影响

注:节点中的值为主效应,节点之间的值为相互作用

图 1 HBV 突变和 SNP 之间的相互作用图

表 7 MDR 分析相互作用

MDR模型	TBA ^a	CVC ^b	P 值
HBV B 型感染中 ASC、CHB VS LC、HCC			
rs485618-n53-n216-n1726-n1764-n1762/n1764	0.732 9	10/10	0.000-0.001
rs485618-n53-n216-n1726-n1764-n1762/n1764	0.729 5	10/10	0.000-0.001
HBV C 型感染中 ASC、CHB、LC vs. HCC			
rs12036670-rs3766377-n166	0.750 7	9/10	0.000-0.001
rs12036670-rs3766377-n166-n293	0.756 4	9/10	0.000-0.001
rs12036670-rs3766377-rs4656942-rs539771-n166-n293	0.850 5	10/10	0.000-0.001

注:TBA^a,检验平衡准确性;CVC^b,交叉验证一致性;P:1 000 次置换检验后计算的 P 值

表 8 HCC 相关 HBV 突变与 HBV B 型中的 BIM rs6746608 或 C 型中的 CD244 rs4656942 和 rs3766377 的相互作用

基因多态性	HBV 突变	ASC, CHB, LC	HCC	^a P/ ^b P(OR)
C 型				
Rs4656942	A166C			
GG	A	76	14	—
GG	C	2	4	0.060/0.113 (5.731)
GA	A	38	16	0.011/0.027 (3.140)
GA	C	6	12	0.000/0.002 (12.104)
相互作用				0.000/0.003 (2.043)
Rs4656942	A293G			
GG	A	76	16	—
GG	G	6	4	0.131/0.201 (2.997)
GA	A	44	20	0.016/0.034 (2.905)
GA	G	2	8	0.000/0.002 (56.967)
相互作用				0.000/0.000 (2.633)
Rs3766377	A166C			
AA	A	60	8	—
AA	C	2	2	0.188/0.276 (4.280)
AG	A	54	22	0.005/0.014 (3.807)
AG	C	4	14	0.000/0.000 (36.341)
相互作用				0.000/0.000 (2.635)
Rs3766377	A293G			
AA	A	60	10	—
AA	G	4	2	0.200/0.288 (3.377)
AG	A	54	24	0.005/0.014 (3.542)
AG	G	4	10	0.000/0.000 (16.294)
相互作用				0.000/0.000 (2.171)
B 型				
Rs6746608	A1762T			
GG	A	50	2	—
GG	T	28	4	0.062/0.113 (6.021)
GA	A	72	14	0.007/0.018 (10.136)
GA	T	24	16	0.000/0.001 (28.230)
相互作用				0.000/0.000 (3.519)

注:^aP,校正年龄和性别的 logistic 回归,未校正多重检验;^bP,校正年龄和性别的 logistic 回归,FDR-BH 校正多重检验

3 讨 论

本研究发现 CD8⁺T 细胞抑制性基因多态性和 HBV 突变的独立和相互作用对肝硬化和肝细胞癌发生的风险仅在 HBV B 型或 C 型中存在。在 HBV B 型和 C 型中,没有发现 SNP 与易感性(或自发清除)有相关性。

BIM 是一种免疫抑制基因,可以调节 HBV 复制的特异性 CD8⁺T 细胞的缺失,从而导致抑制病毒复

制失败^[9]。与 ASC+CHB+LC 组相比,BIM rs6746608 等位基因 GA 仅在 HBV B 型中显著提高了 HCC 发生的风险。Rs6746608 位于 BIM 基因的第六内含子内,由 G 取代 A(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6746608)。这是 BIM rs6746608 在 HBV 相关肝癌背景下的首次报道。F-SNP 功能预测显示,rs6746608 的转录调节预测分为 0.010。因此,推测其可能为有功能的 SNP。尽管如此,仍然需要更多的功能实验来验证本课题组的发现。

在慢性 HBV 感染中,CD244 作为免疫抑制基

因,损害 T 细胞应答并在残存的病毒特异性 T 细胞里被上调^[22]。本研究发现 rs485618 与 LC 的发生仅在 HBV B 型中存在显著相关性。Rs539771、rs3766377、rs12036670、rs4656942 与 HCC 的发生仅在 HBV C 型中有显著相关性。该发现与 rs3766377、rs485618、rs4656942 与 LC 和 HCC 发生的相关的观点部分一致^[18]。这是 rs539771、rs12036670 与 HBV 相关 LC、HCC 的关联的首次报道。Rs539771 和 rs12036670 分别位于 CD244 基因第一内含子里,由 T 取代 G (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=539771)和 CD244 基因启动子区域里,由 A 取代 G (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=12036670)。F-SNP 功能预测显示,rs539771 的转录调节预测分为 0.010。总体而言,推测其可能为有功能的 SNP,但仍然需要更多的证据来验证我们的发现。

HBV Enh II/BCP/PC 和前 S1/S2/S 区域的突变可促进肝癌细胞的增殖并预测肝细胞癌发生的风险^[15-16,20]。本研究发现仅在 HBV B 型中 T53C、T216C、A1726C、A1762T、G1764A、A1762T/G1764A 与 LC 发生有显著相关性。A166C、A293G 与 HCC 的发生仅在 HBV C 型中显著相关。A1762T 与 HCC 发生仅在 HBV B 型中有显著相关性。A1726C、A1762T 和 G1764A 位于核心启动子区域中^[21],分别导致 HBV X 蛋白(HBx)的 C 端区域中 K118T、K130M 和 V131I 的氨基酸取代。T216C 和 G293A 分别导致在 S 区 C21S 和 T47G 的氨基酸取代。T53C 和 C166A 不会导致氨基酸替换,但可以通过影响潜在的转录因子结合位点来调节病毒活性^[23]。

研究发现,免疫压力影响 HBV 突变的发生^[17],但尚未发现 CD8⁺ T 细胞抑制性基因的遗传多态性与疾病相关的 HBV 突变体的关联。本研究发现,CD244 rs4656942 基因型 GA 显著影响 HCC 相关突变 A166C 的频率(表 6),从而影响 HCC 发生的风险。

本研究的重要发现是在 HBV B 型或 C 型中,CD8⁺ T 细胞抑制性基因(CD244 和 BIM)的多态性与疾病相关的 HBV 突变(A1762T、G1764A、A1762T/G1764A、T53C、A166C、T216C 和 A293G)显著影响

LC 和 HCC 发生的风险。该结果的机制尚不清楚。HBX 可以激活 STAT3^[24]。与野生型 HBX 相比,HBX 突变体可以促进 STAT3 激活^[25]。本课题组猜测 HBX 和 HBsAg 可能与 CD244 和 BIM 相互作用后表达上调,从而影响病毒特异性 CD8⁺ T 细胞的功能。最新研究表明 Bcl-2 功能可能受 HBX 调节^[26],并且 HBsAg 通过调节 BIM 的表达从而在细胞凋亡中起作用^[27],这与本研究观点部分一致,但需要进一步的研究来验证该发现。

综上所述,CD244 和 BIM 的多态性可能参与调节肝硬化或肝细胞癌相关 HBV 突变的免疫选择,从而影响慢性 HBV 感染的结果,它们的相互作用可能会影响疾病的进展。这种基因多态性对病毒突变的选择及相互作用是长期的影响过程,目前尚没有合适的实验方法可以轻易验证这一过程。另外,CD244 和 BIM 与 HBV 突变的相互作用具体机制不明确,这是未来继续研究的重要方向。

参 考 文 献

- [1] Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, et al. Estimations of world-wide prevalence of chronic hepatitis B virus infection; a systematic review of data published between 1965 and 2013[J]. *Lancet*, 2015, 386 (10003): 1546-1555.
- [2] Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B; special emphasis on disease progression and prognostic factors[J]. *Journal of Hepatology*, 2008, 48(2): 335-352.
- [3] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide[J]. *Journal of Hepatology*, 2006, 45(4): 529-538.
- [4] Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, et al. Characterization of hepatitis B virus(HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(8): 4215-4225.
- [5] Lopes AR, Kellam P, Das A, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(5): 1835-1845.
- [6] Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, et al. PD-1; PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8⁺ T lymphocytes in the liver[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 178(5): 2714-2720.
- [7] Raziorrouh B, Schraut W, Gerlach T, et al. The immunoregulatory

- role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8⁺ T-cell function[J]. *Hepatology*, 2010, 52(6): 1934–1947.
- [8] Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. Pillars article:CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation[J]. *J Immunol*, 1994, 157(1):405–413.
- [9] Wu W, Shi Y, Li J, et al. Tim-3 expression on peripheral T cell subsets correlates with disease progression in hepatitis B infection[J]. *Virology*, 2011, 8:113.
- [10] Chan HL, Tse CH, Mo F, et al. High viral load and hepatitis B virus subgenotype cc are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(2):177–182.
- [11] Munoz A, Chen JG, Egner PA, et al. Predictive power of hepatitis B 1762T/1764A mutations in plasma for hepatocellular carcinoma risk in Qidong, China[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(6):860–865.
- [12] Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(3):168–174.
- [13] Yin J, Xie J, Zhang H, et al. Significant association of different preS mutations with hepatitis B-related cirrhosis or hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2010, 45(10):1063–1071.
- [14] Chou YC, Yu MW, Wu CF, et al. Temporal relationship between hepatitis B virus enhancer II/basal core promoter sequence variation and risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2008, 57(1):91–97.
- [15] Huang Y, Tai AW, Tong S, et al. HBV core promoter mutations promote cellular proliferation through E2F1-mediated upregulation of S-phase kinase-associated protein 2 transcription[J]. *J Hepatol*, 2013, 58(6):1068–1073.
- [16] Mun HS, Lee SA, Kim H, et al. Novel F141L pre-S2 mutation in hepatitis B virus increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic genotype C infections[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(1):123–132.
- [17] Maman Y, Blancher A, Benichou J, et al. Immune-induced evolutionary selection focused on a single reading frame in overlapping hepatitis B virus proteins[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(9):4558–4566.
- [18] Peng H, Li QL, Hou SH, et al. Association of genetic polymorphisms in CD8⁺ T cell inhibitory genes and susceptibility to and progression of chronic HBV infection[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2015, 36:467–474.
- [19] Zhao Y, Zhang XY, Guo JJ, et al. Simultaneous genotyping and quantification of hepatitis B virus for genotypes B and C by real-time PCR assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(10):3690–3697.
- [20] Yeh CT, So M, Ng J, et al. Hepatitis B virus-DNA level and basal core promoter A1762T/G1764A mutation in liver tissue independently predict postoperative survival in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 52(6):1922–1933.
- [21] Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus[J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 1999, 6(6):415–427.
- [22] Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection[J]. *Nature Immunology*, 2009, 10(1):29–37.
- [23] Xie JX, Zhao J, Yin JH, et al. Association of novel mutations and haplotypes in the preS region of hepatitis B virus with hepatocellular carcinoma[J]. *Front Med China*, 2010, 4(4):419–429.
- [24] Wang C, Yang W, Yan HX, et al. Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice[J]. *Hepatology*, 2012, 55(1):108–120.
- [25] Bock CT, Toan NL, Koeberlein B, et al. Subcellular mislocalization of mutant hepatitis B X proteins contributes to modulation of STAT/SOCS signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Intervirology*, 2008, 51(6):432–443.
- [26] Jiang T, Liu M, Wu J, et al. Structural and biochemical analysis of Bcl-2 interaction with the hepatitis B virus protein HBx[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(8):2074–2079.
- [27] Wu J, Dan C, Zhao HB, et al. ALDOB acts as a novel HBsAg-binding protein and its coexistence inhibits cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2014, 24(3):181–191.

(责任编辑:张辉洁)