

论著 · 临床研究

# TNF- $\alpha$ 、CD40 基因多态性与乙肝肝硬化的相关性研究

吴应冬,周宝勤,谢 群,周安琪  
(海安市人民医院感染科,江苏海安 226600)

**摘 要:****目的** 探讨 TNF- $\alpha$ 、CD40 基因多态性与乙肝肝硬化的相关性研究。**方法** 运用 PCR-RFLP 结合测序的方法,测定 150 例健康对照者与 150 例乙肝肝硬化患者血细胞中的 TNF- $\alpha$ -308G/A、CD40-rs1883832、CD40-rs4810485 的基因多态性,并确定其基因型的分布。**结果** 乙型肝炎后肝硬化患者和健康对照者相比较,肝硬化患者的 TNF- $\alpha$ -308G/A 的 GA 基因型明显高于健康者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。肝硬化患者的 CD40-rs1883832 的 CT、TT 基因型明显高于健康者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。TNF- $\alpha$ -308G/A 的 AA、GG 基因型、CD40-rs1883832 的 CC 基因型、CD40-rs4810485 的基因型差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** TNF- $\alpha$ 、CD40 基因多态性与乙肝肝硬化的遗传易感性有关。

**关键词:** 乙肝肝硬化; TNF- $\alpha$ ; CD40; 多态性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.18.010

**中图法分类号:**R446.9

**文章编号:**1673-4130(2019)18-2215-04

**文献标识码:**A

## Association of TNF- $\alpha$ and CD40 gene polymorphism with hepatitis B cirrhosis

WU Yingdong, ZHOU Baoqin, XIE Qun, ZHOU Anqi

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Haian City, Haian, Jiangsu 226600, China)

**Abstract:****Objective** To investigate the relationship between TNF- $\alpha$ , CD40 gene polymorphism and hepatitis B cirrhosis. **Methods** The polymorphism of TNF- $\alpha$ -308G/A, CD40-rs1883832, CD40-rs4810485 in the blood cells of 150 healthy controls and 150 patients with hepatitis B cirrhosis were determined, and the genotype distribution was determined. **Results** The GA genotype of TNF- $\alpha$ -308G/A in patients with post-hepatitis B cirrhosis was significantly higher than that in healthy controls ( $P<0.05$ ). The CT, TT genotypes of CD40-rs1883832 in cirrhotic patients were significantly higher than those in healthy subjects ( $P<0.05$ ). The AA, GG genotype of TNF- $\alpha$ -308G/A and the CC genotype of CD40-rs1883832 were significantly higher than those of healthy subjects ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in genotype of CD40-rs4810485 ( $P>0.05$ ). **Conclusion** the polymorphism of TNF- $\alpha$  and CD40 gene is associated with the susceptibility to hepatitis B cirrhosis.

**Key words:** hepatitis B cirrhosis; TNF- $\alpha$ ; CD40; polymorphism

乙型病毒性肝炎(乙肝)作为我国最常见的传染病,在慢性乙肝的进展中,随着肝小叶结构的破坏及肝纤维化的形成,最终会导致肝硬化的发生<sup>[1-2]</sup>。既往研究发现 HBV 感染过程中,肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )可以通过核因子-B 细胞  $\kappa$  链(NF- $\kappa$ B)使细胞毒性 T 淋巴细胞激活,抑制甚至清除乙肝病毒;其次, TNF- $\alpha$  的水平与乙肝的病情程度及临床类型也密切相关<sup>[3-4]</sup>。TNF- $\alpha$  基因长约 2 676 bp,因为在细胞中不存在,在刺激时它是由细胞合成的。因此, SNP 基因启动子区具有重要意义。目前, TNF- $\alpha$  基因多态性多见于不同位点比如 308 位点、238 位点等。启动子 308 多态性与慢性乙型肝炎、肝硬化患者、肝癌患

者等密切相关<sup>[5]</sup>。亦有研究证实肝硬化与 CD40-CD40L 信号转导途径相关<sup>[6]</sup>。此次研究中检测 TNF- $\alpha$ 、CD40 基因多态性与乙肝肝硬化的关系,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 12 月至 2017 年 12 月本院收治的 150 例经过肝硬化患者作为观察组。肝硬化诊断标准参考“病毒性肝炎防治方案”<sup>[7]</sup>。另外选取同期 150 例体检健康者作为对照组,两组患者的年龄、性别差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 分别抽取观察组及对照组的全血

**作者简介:**吴应冬,男,主治医师,主要从事肝脏疾病相关的研究。

**本文引用格式:**吴应冬,周宝勤,谢群,等. TNF- $\alpha$ 、CD40 基因多态性与乙肝肝硬化的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(18): 2215-2218.

1 mL,用 EDTA 抗凝。4 ℃,3 000 r/min 离心 5 min,分离上清,收集细胞沉淀用于基因组 DNA 检测。

| 表 1 两组患者的一般资料比较        |            |            |            |          |
|------------------------|------------|------------|------------|----------|
| 项目                     | 观察组        | 对照组        | $\chi^2/t$ | <i>P</i> |
| 性别( <i>n</i> )         |            |            | 0.251      | 0.616    |
| 男                      | 106        | 102        |            |          |
| 女                      | 44         | 48         |            |          |
| 年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁) | 53.45±2.21 | 58.41±3.87 | 1.023      | 0.187    |

**1.2.2 基因型鉴定** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)结合测序。(1)PCR 扩增:包括 308 位点的 TNF-α、sl883832 位点及 rs48 10485

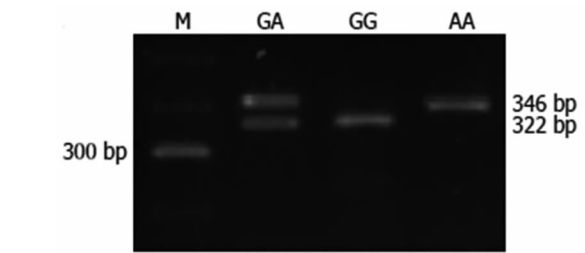
位点的 CD40。聚合酶链反应总体积为 20 μL,基因组 DNA 为 2 μL,下游引物 1 μL(序列见表 2),Taq 酶 1 U,10×PCR 缓冲液 2 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μL,25 mmol/L dNTPs 2 μL,去离子水 9.8 μL。程序设定:先 94 ℃ 5 min;然后 94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s 循环;72 ℃ 10 min。在含 EB 代用品的 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,用紫外分光光度法观察结果。(2)PCR 扩增产物在含 EB 替代物的 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,用 UV 灯观察,并与标记物进行酶切比较。(3)PCR 产物直接作为酶切底物,反应的步骤和方法参照各内切酶的说明,在 30 g/L 琼脂糖凝胶上电泳 2 h。

| 表 2 引物序列       |                                                                                                |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 基因名称           | 引物序列                                                                                           |
| TNF-α-308      | 上游引物:5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'<br>下游引物:5'-GAG CGT CTG CTG GCT GGG TG-3'             |
| CD40-rsl883832 | 上游引物:5'-CCC ATG GGC ACA GCA AGA TGC GTC CC-3'<br>下游引物:5'-CCC ATG GGC CTT CTC ATT CCC CAC TC-3' |
| CD40-rs4810485 | 上游引物:5'-ACC GTA TCT TGG GTG TTC CA-3'<br>下游引物:5'-CTG CTT CCC TTC CCT TCC TT-3'                 |

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 分析,以 Hardy-Weinberg 平衡检验分析研究样本的群体代表性计算每组的基因型频率和等位基因频率。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

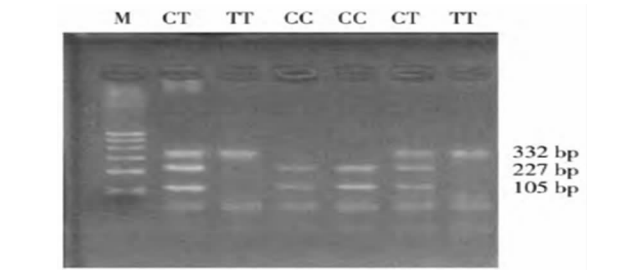
**2.1 TNF-α-308G/A 多态性的分析** 利用 TNF-α-308G/A 多态性扩增了含-308 位点的 α,扩增产物为 346 bp,如果-308 位点为 G,则将其切成 24 bp 和 322 bp 两个片段,因为该 24 bp 片段太小,不能在琼脂糖上看到,因此,只有一个 322 bp 的片段,如果-308 位点是一个,就不会出现。用 NCOI 内切酶切,片段长度为 346 bp,纯合子 GA 基因型为 322 bp,杂合子基因型为 322 bp/346 bp,纯合子 AA 基因型为 346 bp1,见图 1。



注:M 为 DNA 标记物  
图 1 TNF-α-308G/A 位点的酶切结果

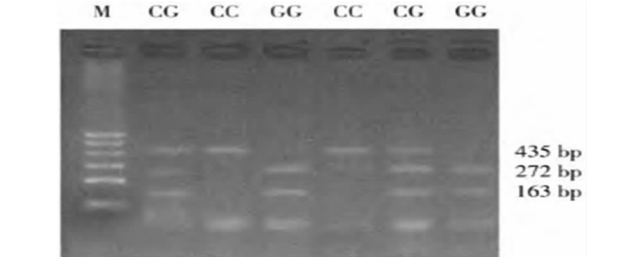
**2.2 CD40-rsl883832 位点的酶切结果** 在 CD 40 基因的 rsl883832 位点上,C 或 T 碱基发生了变化,根据

限制性内切酶 NCO I 限制性内切酶片段,有多种基因型,见图 2。



注:M 为 DNA 标记物  
图 2 CD40-rsl883832 位点的酶切结果

**2.3 CD40-rs4810485 位点的限制性酶切** CD 40 基因的 rs4810485 位点有 C 或 G 的变化。根据限制性内切酶 MSPL 片段,有 3 个基因型:GG (272,163 bp) 和 CC(435 bp)、CG (435,272,163 bp),见图 3。



注:M 为 DNA 标记物  
图 3 CD40-rs4810485 位点的酶切结果

**2.4 TNF-α-308G/A、CD40-rsl883832、CD40-rs4810485**

位点的多态性分析 乙型肝炎后肝硬化患者和健康对照者相比较,肝硬化患者的 TNF- $\alpha$ -308G/A 的 GA 基因型明显高于健康者,差异有统计学( $P<0.05$ )。肝硬化患者的 CD40-rsl883832 的 CT、TT 基

因型明显高于健康者,差异有统计学( $P<0.05$ )。TNF- $\alpha$ -308G/A 的 AA、GG 基因型、CD40-rsl883832 的 CC 基因型、CD40-rs4810485 的基因型差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 3。

表 3 TNF- $\alpha$ -308G/A、CD40-rsl883832、CD40-rs4810485 位点的多态性分析( $n$ )

| 基因型                   | 健康者( $n=150$ ) | 肝硬化患者( $n=150$ ) | $P$   | OR    | 95%CI       |
|-----------------------|----------------|------------------|-------|-------|-------------|
| TNF- $\alpha$ -308G/A |                |                  |       |       |             |
| GA                    | 22             | 15               | 0.012 | 2.994 | 1.623~5.453 |
| AA                    | 44             | 39               | 0.092 | 1.345 | 0.854~4.549 |
| GG                    | 84             | 96               | 0.056 | 2.765 | 1.349~5.653 |
| CD40-rsl883832        |                |                  |       |       |             |
| CC                    | 73             | 32               | 0.082 | 2.321 | 1.236~5.054 |
| CT                    | 46             | 72               | 0.002 | 2.165 | 0.764-4.127 |
| TT                    | 31             | 46               | 0.001 | 1.718 | 1.053~2.653 |
| CD40-rs4810485        |                |                  |       |       |             |
| CC                    | 66             | 103              | 0.133 | 2.021 | 1.041~3.183 |
| CG                    | 69             | 14               | 0.321 | 1.105 | 0.764~2.152 |
| GG                    | 15             | 33               | 0.178 | 1.763 | 1.003~2.217 |

3 讨 论

乙型肝炎后肝硬化的发病机制主要与乙肝病毒的感染和侵袭有关,也与患者的遗传易感性和免疫功能有关,在研究乙肝后肝硬化的遗传易感性过程中,TNF- $\alpha$ 的产生受遗传因素的控制,TNF- $\alpha$ 是第一种由炎性反应机制产生的细胞因子<sup>[8]</sup>。TNF- $\alpha$ 主要由以下几个部分组成:单核细胞 Kupffer 细胞与其他细胞因子共同促进肝星状细胞的增殖和纤维增殖,抑制肝细胞的生长,阻止肝细胞的再生,参与肝硬化的形成和发展。持续高水平的  $\alpha$  诱导可促进肝星状细胞的增殖和纤维增生,体外研究表明肿瘤坏死因子- $\alpha$  启动子-308a 的等位基因与肝硬化的增加有关<sup>[9]</sup>。此次研究结果显示乙型肝炎后肝硬化患者和健康对照者相比较,肝硬化患者的 TNF- $\alpha$ -308G/A 的 GA 基因型明显高于健康者,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示 TNF- $\alpha$ -308G/A 可作为肝硬化的诊断及治疗疗效评估。既往研究显示 HBVDNA 阳性患者的 TNF- $\alpha$  含量明显高于阴性组,且提示 TNF- $\alpha$  启动子区-308G/A 基因型及等位基因在健康人与乙肝肝硬化以及慢重肝 3 种不同 HBV 慢性感染临床类型中分布频率之间的差异。且在重度乙肝、乙肝肝硬化、慢性重型肝炎及原发性肝癌患者的血清学检测发现 TNF- $\alpha$  均处于高活性状态,其含量明显高于慢乙肝轻度患者,并且发现它的含量与病毒复制活跃有关。汉族人群中 TNF- $\alpha$  基因多态性与不同慢性肝病的关系本研究在一定程度上反映了 TNF- $\alpha$ -308G/A 的 GA 基因型可以作为肝硬化的预测指标<sup>[10]</sup>。

乙型肝炎的发病机制非常复杂,目前认为宿主免疫功能障碍是其病理损害的主要原因,而 T 细胞是免疫系统的重要组成部分,它的激活不仅需要直接刺激外源抗原,还需要细胞间表面分子的相互作用来传递共刺激信号<sup>[11-12]</sup>。CD40-CD40L 通路是另一种重要的途径,它不仅参与和维持正常生理状态中许多重要的生理功能,许多病理过程往往是由该通路的失调或紊乱以及低或无能力引起的<sup>[13]</sup>。单用 CD 40 单克隆抗体也能促进 B 细胞的增殖,使 B 细胞表面的许多黏附分子具有较高的亲和力,导致细胞聚集,从而促进 T 细胞的相互作用<sup>[14]</sup>。此次研究结果提示 CD40-rsl883832 可作为肝硬化的诊断及治疗疗效评估。肝硬化患者的 CD40-rsl883832 的 CT、TT 基因型明显高于健康者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。既往研究显示 CD40 的阳性表达在正常脾脏与巨脾组织中存在显著差异,而且其表达随肝功能不全的加重和巨脾分级增高而逐渐降低。这表明肝硬化门静脉高压症时巨脾的免疫功能状态处于明显低下的状态,CD40 有可能成为一种术前判定肝硬化及脾脏免疫功能的有价值的检测指标,对于指导肝硬化门静脉高压症术中脾脏的处理方式提供了一定的试验依据<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$ -308G/A 的 AA、GG 基因型、CD40-rsl883832 的 CC 基因型、CD40-rs4810485 的基因型差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

4 结 论

综上所述,乙型肝炎后肝硬化患者的 TNF- $\alpha$ -308G/A 的 GA 基因型明显高于健康者,TNF- $\alpha$ -308

a、CD40-rsl883832 基因可以选为肝硬化易感基因的遗传标记,应用前景广泛。

参考文献

[1] 王秀珍,刘雪峰. 2 041 例肝硬化病因及并发症分析[J]. 浙江医学,2017,39(1):37-39.

[2] 古川,宋关怡,孙文静,等. 2016 年肝硬化领域基础与临床研究进展[J]. 中华肝脏病杂志,2017,25(1):4-8.

[3] 杨雪亮,张凯,孔颖,等. 胸腺素 α1 对急性肝衰竭大鼠血浆 TNF-α 与 IL-10 的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版),2017,38(5):665-668.

[4] 李艳秋,朱波,欧超,等. 广西壮族人群 TNF-α 基因多态性及其表达与原发肝癌的相关性研究[J]. 检验医学,2017,32(1):35-40.

[5] 任利,路越晴,程冠,等. 青海地区藏族人群 IFN-γ、TNF-α 及 IL-10 基因多态性与乙型肝炎病毒感染易感性的关系[J]. 实用预防医学,2017,20(7):814-818.

[6] 张志强,单军奇,吴刚,等. CD40/CD40L 信号通路的抗肿瘤研究进展[J]. 包头医学院学报,2017,33(4):134-137.

[7] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000,19(6):324-329.

[8] 徐峰,王娟,王静,等. 乙肝后肝硬化中医证型与 IL-6、IL-

28B 及 TNF-α 表达的相关性研究[J]. 现代中医学结合杂志,2017,26(3):245-248.

[9] 张桐桐,闫振武,褚瑞海,等. TNF-α 及 PCT 对乙型肝炎肝硬化并发自发性细菌性腹膜炎诊断价值[J]. 潍坊医学院学报,2017,39(1):77-78.

[10] 栾梅,栾博,赵丽娟,等. 老年肝硬化患者血清一氧化氮、肿瘤坏死因子-α、白细胞介素-1 的水平变化及意义[J]. 中国老年学医学,2017,37(3):656-658.

[11] 刘顺洪. 乙肝病毒对非酒精性脂肪肝生化及免疫系统的影响研究[J]. 心理医生,2017,23(31):61-62.

[12] 李雪莹,沈宇清. 髓源抑制性细胞参与慢性乙型肝炎免疫抑制的机制[J]. 中国免疫学杂志,2017,33(1):152-155.

[13] 俞虹. CD40、CD40L、CD8 和 CD28 在慢性乙肝患者外周血细胞表达的研究[J]. 临床合理用药,2011,4(8C):22-23.

[14] 李婷,唐筱潇,阳海平,等. Tfh 通过 CD40/CD40L 轴在介导儿童过敏性紫癜发病中的作用与机制初探[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(1):47-54.

[15] 刘恩照,路利平,刘运龄. microRNA-145 通过 CD40 对泡沫细胞免疫炎症反应的影响[J]. 天津医药,2017,45(12):1233-1236.

(收稿日期:2019-01-12 修回日期:2019-03-04)

(上接第 2214 页)

内营养制剂在维持性血液透析并发营养不良病人中的疗效分析[J]. 肠外与肠内营养,2016,5(5):112-114.

[4] 董梅,代正燕,翁敏,等. 营养不良-炎性反应综合征对维持性血液透析患者生活质量的影响研究[J]. 中国全科医学,2016,19(28):232-234.

[5] 李雪,孙晓晶. 维持性血液透析患者自我感受负担及相关因素[J]. 中国心理卫生杂志,2016,30(4):258-263.

[6] 黄兰,周瑾,王小丽,等. 维持性血液透析患者血 25(OH)D 水平与慢性炎症状态及营养不良的关系[J]. 实用医学杂志,2016,32(20):3318-3320.

[7] 叶琼,邵国建,刘琦,等. 维持性血液透析患者血钠水平与营养状态的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志,2016,26(14):213-215.

[8] 黄丽娅,李少华,翁敏. 维持性血液透析病人骨骼肌减少症发生率和危险因素研究[J]. 肠外与肠内营养,2017,24(2):78-81,85.

[9] 张萌,陈兴强,陈洁,等. 中老年维持性血液透析患者透析前血清钠水平与营养状态的关系[J]. 中国老年学杂志,2017,37(13):3314-3316.

[10] 王艺萍,覃莲香,杨乃宁,等. 老年维持性血液透析患者短期死亡因素分析[J]. 军事医学,2016,40(8):672-675.

[11] KARA E,SAHUTOGLU T,AHBAP E,et al. The pre-

dictive value of malnutrition-inflammation score on 1-year mortality in Turkish maintenance hemodialysis patients[J]. Clin Nephrol,2016,86(2):94-99.

[12] COSTA BORGES M C,VOGT B P,MARTIN L C,et al. Malnutrition inflammation score cut-off predicting mortality in maintenance hemodialysis patients[J]. Clin Nutrition Espen,2017,17(2):63-67.

[13] 曾小庆,柳园,程懿,等. 不同年龄,性别血液透析患者体成分及营养状况分析[J]. 现代预防医学,2018,4(6):232-234.

[14] 施凌云,何华平,倪松,等. 维持性血液透析患者营养状况及营养不良的影响因素分析[J]. 现代生物医学进展,2016,16(6):1135-1138.

[15] 翁丽娜,崔益鸿,徐玮. 维持性血液透析患者营养状况及其影响因素分析[J]. 海南医学,2018,4(5):341-343.

[16] 施凌云,季黎明,何华平,等. 终末期肾脏病患者行维持性血液透析的营养状况及影响因素分析[J]. 现代生物医学进展,2016,16(3):478-480.

[17] 王勇,罗明霞,郑冬冬. 维持性血液透析患者营养不良的影响因素分析[J]. 国际护理学杂志,2018,4(6):774-777.

(收稿日期:2019-02-21 修回日期:2019-06-11)