

STAT4基因多态性与慢性乙型肝炎患者细胞因子分泌水平的相关性研究

岳雯溪¹, 马国伟², 闫俊芳², 殷瑞¹, 陈洁^{2*}

¹大理大学药学院, 云南 大理

²昆明市第三人民医院, 云南省传染性疾病预防医学中心, 云南 昆明

收稿日期: 2023年12月4日; 录用日期: 2023年12月28日; 发布日期: 2024年1月5日

摘要

目的: 通过检测慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B virus, CHB)患者信号转导与转录激活因子4 (signal transducer and activator of transcription 4, STAT4)基因的rs7574865位点突变情况, 探究CHB患者STAT4表达与细胞因子分泌水平的相关性。方法: 收集昆明市第三人民医院2020年8月至2022年8月确诊的300例CHB患者和300例健康体检者为研究对象。采用实时荧光定量PCR技术检测两组STAT4 rs7574865位点的基因多态性。采用酶联免疫吸附法检测CHB患者外周血清IL-21、IL-35、IL-37和TGF- β 水平。结果: CHB患者组STAT4基因rs7574865位点的GT、GG基因型高于对照组($P < 0.01$), G等位基因频率显著高于对照组($P < 0.01$)。GT型CHB患者IL-21及IL-35水平明显高于TT及GG型($P < 0.05$)。结论: STAT4基因多态性与CHB的发生存在一定相关性, GT型患者IL-21、IL-35水平明显升高, 临床可通过检测CHB患者STAT4基因多态性及IL-21、IL-35水平评估CHB发生的风险性。

关键词

慢性乙型肝炎, STAT4, 多态性, 细胞因子

The Correlation Study between STAT4 Gene Polymorphism and Cytokine Secretion Levels in Patients with Chronic Hepatitis B

Wenxi Yue¹, Guowei Ma², Junfang Yan², Rui Yin¹, Jie Chen^{2*}

¹College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan

²The Clinical Medical Center for Infectious Diseases of Yunnan, The Third People's Hospital of Kunming, Kunming Yunnan

*通讯作者。

文章引用: 岳雯溪, 马国伟, 闫俊芳, 殷瑞, 陈洁. STAT4 基因多态性与慢性乙型肝炎患者细胞因子分泌水平的相关性研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(1): 80-85. DOI: 10.12677/acm.2024.141011

Abstract

Objective: To detect the rs7574865 mutation of signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) gene in patients with chronic hepatitis B (CHB), and explore the correlation between STAT4 expression and cytokine secretion level in CHB patients. **Method:** A total of 300 CHB patients and 300 healthy individuals diagnosed from August 2020 to August 2022 at Kunming Third People's Hospital were collected as research subjects. Real time fluorescence quantitative PCR technology was used to detect gene polymorphism at the STAT4 rs7574865 locus in two groups. The IL-21, IL-35, IL-37 and TGF- β in peripheral blood of CHB patients were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** The GT and GG genotypes at rs7574865 of STAT4 gene in patients with CHB were higher than those in the control group ($P < 0.01$), and the frequency of G allele frequency was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The levels of IL-21 and IL-35 in GT type CHB patients were significantly higher than those in TT and GG types ($P < 0.05$). **Conclusion:** There is a certain correlation between STAT4 gene polymorphism and the occurrence of CHB. The levels of IL-21 and IL-35 are significantly increased in GT type patients. Clinical evaluation of the risk of CHB can be achieved by detecting STAT4 gene polymorphism and IL-21 and IL-35 levels in CHB patients.

Keywords

Chronic Hepatitis B, STAT4, Polymorphism, Cytokine

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乙型病毒性肝炎(hepatitis B virus, CHB)是由乙型肝炎病毒(chronic hepatitis B virus, HBV)引起的一种世界性疾病。据统计,全球每年超过100万人死于病毒性肝炎,其感染人数是艾滋病人数的10倍以上。我国是病毒性肝炎高度流行区域,近20年来,其死亡率一直位居我国法定传染病报告的前列,我国也成为了世界上为此所付出社会成本最多的国家[1][2]。因此,病毒性肝炎的防治一直是我国医疗卫生管理部门重点关注的问题。我国病毒性肝炎感染人群中,CHB感染者基数尤其巨大。感染乙肝病毒的患者极易转为慢性感染,并进一步进展为肝硬化、肝癌等疾病,危害人体健康。目前,我国CHB死亡数仍占病毒性肝炎的70%以上,远高于其他型病毒性肝炎[3][4]。中国疾控中心数据显示,2008~2017年云南省昆明市西山区血源及性传播疾病以CHB为首,年均发病率69.03%/10万,报告4985例,占血源及性传播疾病发病总数的46.41%,占乙类传染病报告总数的30.02%,占病毒性肝炎报告总数的60.29%,截至2022年2月,云南省共报告法定传染病15,912例,其中共报告16种乙类传染病,病毒性肝炎的报告发病数居第2位,作为CHB患者高发省份,需积极探索有助于CHB诊疗的手段,提高CHB患者的生活质量[5][6]。CHB患者肝脏受到损伤时,会导致以胶原蛋白为主的细胞外基质的合成与降解失衡。该过程是一系列细胞信号转导通路和网络共同控制的结果,其中酪氨酸蛋白激酶-信号传导和转录激活因子(Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription, JAK-STAT)信号通路在这个过程中发挥着重要的

作用[7]。多项研究表明, STAT4 基因 rs7574865 位点的多态性与肝损伤(CHB)的发生有一定的关联性。本研究探讨 CHB 与 STAT4 rs7574865 基因多态性的相关性, 以期对于具有 STAT 基因易感性的 CHB 患者提供早期干预与延缓病情发展具有指导意义。

2. 材料与方法

1) 研究对象收集昆明市第三人民医院 2020 年 8 月至 2022 年 8 月确诊的 300 例 CHB 患者为研究对象; 选取同期本院 300 例健康体检者为对照组。本研究已通过昆明市第三人民医院伦理委员会批准。所有患者均来自同一地区, 均签署知情同意书。

2) 诊断标准参照《慢性乙型肝炎诊断标准(2015 年版)》[8]中有关 CHB 的诊断标准。

3) 纳入及排除标准: 纳入标准: a) 年龄 16~60 岁, HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者: 血清乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性、乙型肝炎病毒 e 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)阳性、HBV DNA 阳性, ALT 持续或反复升高, 或有肝组织学病变; HBeAg 阴性慢性乙型肝炎: 血清 HBsAg 阳性, HBeAg 阴性, HBV DNA 阳性, ALT 持续或反复升高, 或有肝组织学病变。b) 慢性 HBV 携带者: 血清 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 阳性者, 1 年内连续随访 3 次以上均显示血清 ALT 和 AST 在正常范围, 肝组织学检查无明显异常。c) HBsAg 阳性肝硬化患者。d) HBsAg 阳性肝癌患者。e) 签署知情同意书。对照组的筛选标准: a) 乙肝疫苗未接种。b) 感染指标(HBsAb、HBcAb、HBeAb、HBeAg、HBsAg)是阴性。血生化和血常规正常。排除标准: a) 艾滋病或非乙肝病人。b) 乙肝两对半不明确。c) 疫苗接种者只有 HBsAb (+)。d) 其他肝病: 例如个体免疫性肝病, 毒性传染导致的肝病等。e) 重症系统免疫性疾病如系统性红斑狼疮等。f) 非云南省汉族人。

4) 样品基因多态性检测采用实时荧光定量 PCR 技术检测 STAT4rs7574865 基因多态性。正向引物序列: 5'-GACTTACGGGTCATTTAGGC-3'; 反向序列: 5'-TAACAGGGATGGTTCAATAA-3' PCR 反应条件: 96℃预变性 5 min, 95℃变性 45 s, 51℃退火 55 s, 72℃延伸 90 s, 共 32 个循环。酶切反应体系为 25 μ l, 其中包括 10 μ l PCR 产物、1 μ l HpaI 内切酶、2 μ l 酶切反应缓冲液、双蒸水 12 μ l; 37℃酶切 12 h。酶切产物通过 2%琼脂糖凝胶进行基因型分型。

5) ELISA 方法检测细胞因子 IL-21、IL-35、IL-37、TGF- β 在空腹条件下抽取 4 mL 静脉血液, 抽取后立即行血清分离, 于-20℃条件下保存待检。采用 ELISA 法检测对照组及 CHB 患者血清细胞因子 IL-21、IL-35、IL-37、TGF- β 水平, 试剂盒购自青岛瑞斯凯尔生物科技有限公司, 严格按照说明书进行操作。

6) 统计学方法用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。对研究对象的基因型及等位基因分布频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐数据的两组间比较用独立样本 t 检验; 多组间比较采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD-t 检验; 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验; 基因型与生物化学指标间的关系采用 Logistic 回归分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. CHB 患者组和对照组 STAT4 基因多态位点、等位基因分布情况及相关性分析

经测序 STAT4 rs7574865 有 TT、GT、GG 3 种基因型。CHB 患者组和健康对照组的 STAT4 基因 rs7574865 位点的基因型及等位基因的检测结果见表 1。在患者组和对照组中的 rs7574865 的基因型及等位基因频率分布经卡方检验, 均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$), 这表明所研究的群体具有代表意义。表 1 中的结果表明 CHB 患者 rs7574865 位点的 GT、GG 基因型高于对照组($P < 0.01$), G 等位基因频率均显著高于对照组($P < 0.01$), 分析结果表明该位点的多态性与 CHB 的发生存在显著的相关性。

Table 1. Genotype and allelic distribution and correlation of STAT4 gene rs7574865 locus in the CHB group and control group**表 1.** STAT4 基因 rs7574865 位点在 CHB 组与对照组的基因型和等位基因分布及相关性

组别	例数	基因型(例)			等位基频数	
		TT	GT	GG	T	G
对照组	300	54	18	28	126	74
CHB 组	300	13	44	43	70	130
χ^2 值			39.16			31.37
<i>P</i> 值			<0.01			<0.01

3.2. CHB 患者组(TT、GT 及 GG 基因型) IL-21、IL-35、IL-37、TGF- β 水平比较

GT 型 CHB 患者 IL-21 水平明显高于 TT 及 GG 型, 差异有统计学意义($P < 0.05$); GT 型 CHB 患者 IL-35 水平显著高于 TT 及 GG 型, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 3 种基因型患者的 IL-37、TGF- β 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

Table 2. Comparison of cytokine levels in CHB patients with TT, GT, and GG genotypes**表 2.** TT、GT 及 GG 基因型 CHB 患者细胞因子水平比较

基因型	IL-21 (ng/ml)	IL-35 (ng/ml)	IL-37 (ng/ml)	TGF- β (ng/ml)
TT	289.2 \pm 107.7	155.4 \pm 36.24	38.41 \pm 11.91	63.90 \pm 27.02
GT	414.3 \pm 217.5	209.0 \pm 77.00	39.08 \pm 22.61	54.46 \pm 30.12
GG	320.1 \pm 139.4	171.7 \pm 66.92	35.56 \pm 14.35	54.53 \pm 23.18
<i>F</i>	3.935	3.483	-	-
<i>P</i> 值	0.023	0.036	>0.05	>0.05

4. 讨论

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)是人类基因组变异的最常见形式, 通过改变与转录因子、miRNA 的结合数量或强度以及通过对 mRNA 的剪接等影响靶基因的表达水平。大量的流行病学研究显示 SNP 改变可以影响肿瘤形成、侵袭、转移以及预后等过程。在宿主遗传背景方面, SNP 会影响个体对疾病的易感性和对药物治疗的反应, 这已经在多种疾病中得到证实。特别在乙型肝炎, MHC I、MHC II、TNF- α 甘露糖相关蛋白等基因的 SNPs 能影响宿主的免疫系统和抗病毒反应, 从而影响疾病的进程(如耐受状态, 感染慢性化等)和治疗反应。因此, 对 SNPs 的研究可以发现预测慢性乙型肝炎患者对干扰素治疗反应的重要因素, 从而在预测患者可能无法获得良好应答的情况下, 避免不必要的药物不良反应和节省医疗费用。信号传导与转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)是由 Janus 蛋白酪氨酸激酶(janus pro-teín tyrosine kinase, JAK)活化的一类转录因子在 JAK-STAT 信号通路中, 信号传导与转录激活因子-4 (STAT4)已经被证实与肝损伤存在一定的相关性[9]。STAT4 是 STAT 家族中的近年来发现的一类转录因子, 可以调节白细胞介素以及控制辅助性 T 细胞 1 (helper T cell 1, Th1)和辅助性 T 细胞 17 (helper T cell 17, Th17)的活性影响炎症疾病的发生与发展[10]。STAT4 基因位于人的染色体

2q32.2-2q32.3; STAT4 基因存在多个单核苷酸多态性位点, 其中 rs7574865 位点可能通过影响基因的表达而发挥作用[11]。

现代医学研究表明 HBV 感染所引起的免疫损伤以细胞免疫为主, Th1、Th2、Th17 及 Treg 细胞的水平异常, 及 Th1/Th2、Th17/Treg 比值失衡, 是免疫紊乱的关键环节[12]。Th17 细胞是促进 HBV 感染患者肝脏炎症及纤维化发生的重要因素, Treg 细胞则介导免疫耐受, 主要抑制免疫反应, 减轻免疫损伤, 导致机体不能及时清除病毒, 致 HBV 持续感染。Th17 和 Treg 细胞比例失衡, 可引起免疫应答异常, 介导肝脏炎症反应, 导致 CHB 发病和病情进展至肝硬化、肝癌[13]。IL-21 是近年来新发现的, 由 Th17 细胞分泌的促炎细胞因子。有学者报道 CHB 患者 IL-21 水平随着 Th17 细胞增多而升高, IL-21 水平和 Th17 细胞频数与谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilimbin, DBIL)水平呈正相关, 提示 IL-21 和 Th17 细胞与肝损伤严重程度紧密相关[14]。IL-35 是由 Treg 细胞分泌的新发现的抑炎细胞因子, 具有抑制 Th17 细胞的增殖和分化的功能, 进而减少 IL-17 和 IL-22 等促炎细胞因子的分泌[15] [16]。有研究发现在慢性 HBV 感染相关疾病中 IL-35 可能介导 Treg 细胞对免疫应答的负向调节作用, 其通过抑制 IL-17/IL-22 的产生, 减轻炎症反应, 影响 HBV DNA 的清除, 造成 HBV 慢性感染[17] [18]。由此可见, IL-21、IL-35 参与了 CHB 疾病的发病过程, 在 HBV 感染慢性化过程中发挥重要作用。IL-37 作为一种新型细胞因子, 是 Toll 样受体的配体和促炎因子的天然抑制剂[19], 其表达与免疫细胞和炎症反应密切相关。实验证明在 CHB 患者中 IL-37 水平呈现高表达, 同时发现 IL-37 可能参与 HBeAg 血清学转化。TGF- β 主要包括 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3, 在调控免疫系统和抗病毒感染中发挥双重作用。一方面, TGF- β 可以增强 Treg 活性介导抗炎作用; 另一方面, TGF- β 促进 Th17 分化并分泌促炎因子。许多证据表明 HBV 感染能够提高 TGF- β 的表达, 促进细胞外基质沉积, 进而破坏肝脏结构引起肝损伤。但也有研究[20]表明, TGF- β 通过激活脱氨基反应诱导病毒 cccDNA 的降解。

本研究结果显示, CHB 患者组 STAT4 基因 rs7574865 位点的 GT、GG 基因型高于对照组, G 等位基因频率显著高于对照组。GT 型 CHB 患者 IL-21 及 IL-35 水平明显高于 TT 及 GG 型。综上 STAT4 基因多态性与 CHB 的发生存在一定相关性, 且 GT 型患者 IL-21、IL-35 水平明显升高, 可能基因型与细胞因子分泌有关, 但其具体机制仍需进一步研究。

基金项目

云南省科技厅基金项目(202001BA070001-092); 云南省科技人才和平台计划——云南省孔令义专家工作站(2019IC047)。

参考文献

- [1] 李娜. 外泌体在乙肝病毒传播及其相关免疫反应中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(11): 2837-2842.
- [2] 吴瑛, 王涛. 慢性乙型肝炎流行病学特征及影响因素分析[J]. 现代实用医学, 2022, 34(5): 686-687.
- [3] Furuta, M., Tanaka, H., Shiraishi, Y., *et al.* (2018) Characterization of HBV Integration Patterns and Timing in Liver Cancer and HBV-Infected Livers. *Oncotarget*, 9, 25075-25088. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25308>
- [4] 杨红梅, 邱铖, 黄宇超, 孙文峰. 恩替卡韦联合甘草酸二铵肠溶胶囊治疗慢性乙型肝炎的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(17): 2440-2444.
- [5] 潘莉, 付贤翠. 2008-2017 年昆明市西山区甲乙类传染病流行病学特征分析[J]. 应用预防医学, 2019, 25(1): 18-22.
- [6] 余婷婷, 王红英, 张润武, 白经, 普冬, 李冬玲. 昆明地区 1452 例低病毒载量慢乙肝患者耐药突变相关位点的分析[J]. 昆明医科大学学报, 2022, 43(9): 43-47.
- [7] Zhou, H., Jia, X., Hu, K., *et al.* (2021) TMEM2 Binds to CSNK2A3 to Inhibit HBV Infection via Activation of the

JAK/STAT Pathway. *Experimental Cell Research*, **400**, Article ID: 112517.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112517>

- [8] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2015 年版) [J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(6): 384-386.
- [9] 朴金梅, 刘梦, 李成成, 等. STAT4 rs7574865GG 基因型与 GT+TT 基因型肝癌患者相关危险因素对比分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(2): 84-86.
- [10] Korman, B.D., Kastner, D.L., Gregersen, P.K., *et al.* (2008) STAT4: Genetics, Mechanisms and Implications for Autoimmunity. *Current Allergy and Asthma Reports*, **8**, 398-403. <https://doi.org/10.1007/s11882-008-0077-8>
- [11] Lamana, A., Pezsantalla, M., Castillogonzalez, R., *et al.* (2015) The Minor Allele of rs7574865 in the STAT4 Gene Is Associated with Increased mRNA and Protein Expression. *PLOS ONE*, **10**, e0142683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142683>
- [12] 郗燕, 常培叶, 杜立平, 赵乌云. Th17/Treg 比例联合 FIB-4 和 APRI 评分对 HBV 相关肝纤维化的评估价值分析[J]. 热带医学杂志, 2023, 23(1): 50-53.
- [13] 付海洋, 时维平, 付广明, 张蓓, 史海磊, 李雪健. Th17/Treg 值在慢性乙型肝炎肝纤维化进展中的意义[J]. 中外医疗, 2020, 39(8): 180-183.
- [14] Liu, B., Gao, W., Zhang, L., *et al.* (2017) Th17/Treg Imbalance and Increased Interleukin-21 Are Associated with Liver Injury in Patients with Chronic Severe Hepatitis B. *International Immunopharmacology*, **46**, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.019>
- [15] 邓昭敏, 刘琳, 熊颖妮, 等. IL-35 在慢性乙型肝炎发病过程中的免疫抑制作用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(19): 2376-2378, 2382.
- [16] 王新伟, 杨道坤, 梁海军, 等. 白细胞介素-35 对慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞的影响及其临床意义[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(10): 885-890.
- [17] Yang, L.L., Jia, S.N., Shao, X., *et al.* (2019) Interleukin-35 Modulates the Balance between Viral Specific CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} Regulatory T Cells and T Helper 17 Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Virology Journal*, **16**, Article No. 48. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1158-0>
- [18] Shi, Y.Y., Dai, M.J., Wu, G.P., *et al.* (2015) Levels of Interleukin-35 and Its Relationship with Regulatory T-Cells in Chronic Hepatitis B Patients. *Viral Immunology*, **28**, 93-100. <https://doi.org/10.1089/vim.2014.0058>
- [19] Gravano, D.M. and Vignali, D.A. (2012) The Battle against Immunopathology: Infectious Tolerance Mediated by Regulatory T Cells. *Cellular & Molecular Life Sciences*, **69**, 1997-2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0907-z>
- [20] Qiao, Y., Han, X., Guan, G., *et al.* (2016) TGF- β Triggers HBV cccDNA Degradation through AID-Dependent Deamination. *FEBS Letters*, **590**, 419-427. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12058>