

论著·临床研究

难治性慢性丙型肝炎中医证型与 HLA-DP 基因 SNP 的相关性研究^{*}韩竖霞^{1,2}, 郑毅^{1,2}, 彭晓明^{1,2}, 赵友云^{1,2,△}

(1. 湖北省中医院检验科, 湖北武汉 430061; 2. 湖北省中医药研究院, 湖北武汉 430074)

摘要:目的 探讨难治性慢性丙型肝炎(RCHC)中医证型与人类白细胞抗原(HLA)DP 基因单核苷酸多态性(SNP)的相关性,寻找中医证型的分子标志物,为中医辨证提供科学依据。方法 收集湖北省中医院收治的 200 例 RCHC 住院患者的一般临床资料、中医证型和肝功能指标[丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、清蛋白(ALB)]、丙型肝炎病毒(HCV) RNA、HCV 基因型、凝血酶原时间(PT)及血小板计数(PLT)检测结果;同时以 100 例该院其他科室收治的非 RCHC 患者为对照,采用双重荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术对 RCHC 不同中医证型和对照组的 HLA-DP 基因 rs9277535 位点进行基因分型,统计分析各数据与中医证型的相关性。结果 200 例 RCHC 中医证型中,肝郁脾虚证最多(100 例, 50.0%),然后依次是非肝郁脾虚型包括湿热内阻证(48 例, 24.0%)、肝肾阴虚证(32 例, 16.0%)和淤血阻络证(20 例, 10.0%);肝郁脾虚型与非肝郁脾虚型之间,年龄、肝功能指标和 HCV 基因型及 HCV-RNA 水平差异无统计学意义($P>0.05$),但 PT 差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组相比,RCHC 患者的肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组的 HLA-DP 基因 rs9277535 基因型 GG 和 AA 分布差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 HLA-DP 基因 rs9277535 位点基因型 GA 杂合型和 AA 突变型在 RCHC 患者不同中医证型之间差异无统计学意义;但等位基因 G 和 A 的分布在肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组有差异趋势,值得进一步研究。

关键词:难治性慢性丙型肝炎; 中医; 证型; HLA-DP 基因; 单核苷酸多态性; 丙型肝炎病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.002

中图法分类号:R512.6

文章编号:1673-4130(2019)01-0004-04

文献标识码:A

The correlation analysis between syndrome types of traditional Chinese medicine and HLA-DP gene polymorphisms in patients with refractory chronic hepatitis C^{*}

HAN Shuxia^{1,2}, ZHENG Yi^{1,2}, PENG Xiaoming^{1,2}, ZHAO Youyun^{1,2,△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Hubei Provincial Hospital of Traditional

Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China; 2. Hubei Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between syndrome types of traditional Chinese medicine (TCM) and HLA-DP gene polymorphisms in patients with refractory chronic hepatitis C (RCHC), and to find suitable molecular markers for TCM syndromes and provide scientific basis for TCM syndrome differentiation. **Methods** A total of 200 RCHC patients of Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine were enrolled retrospectively. Their general characteristics, TCM syndromes, data of liver function (ALT, AST, ALP and ALB), HCV RNA, HCV genotypes, PT and PLT were collected. At the same time, 100 patients from other departments of the hospital were enrolled as control group. FQ-PCR was used to detect the genotypes of the HLA-DP gene rs9277535 sites of the RCHC patients with different TCM syndromes and the patients of control group. The correlation between the data and TCM syndromes was statistically analyzed. **Results** Among 200 patients in the study, the pattern of liver-depression and spleen-deficiency was maximum (100 cases, 50.0%), while the remaining syndromes were dampness and heat resistance (48 cases, 24.0%), yin deficiency of liver and kidney (32 cases, 16.0%) and obstruction of collaterals by blood stasis (20 cases, 10.0%). For age, data of liver function index and HCV RNA, there was no statistical difference between the liver-depression and spleen-deficiency type and other TCM syndromes ($P>0.05$). But the difference of PT

^{*} 基金项目:中国中医科学院中医基础理论研究所“院所协同创新”专项基金资助项目(YZ-1606)。

作者简介:韩竖霞,女,主管技师,主要从事临床分子诊断检验研究。△ 通信作者,E-mail:zhaoyy206@163.com。

本文引用格式:韩竖霞,郑毅,彭晓明,等.难治性慢性丙型肝炎中医证型与 HLA-DP 基因 SNP 的相关性研究[J].国际检验医学杂志, 2019,40(1):4-7.

was significant between liver-depression and spleen-deficiency type and other TCM syndromes ($P < 0.05$). Compared with control group, there was no significant difference between the HLA-DP gene rs9277535 genotype GG and AA in the liver depression spleen deficiency group and the non-liver depression spleen deficiency group in the RCHC patients ($P > 0.05$). **Conclusion** There was no significant difference between the genotypes of HLA-DP gene rs9277535 genotype GA heterozygous genes and AA homozygous genes in the different TCM syndromes of RCHC patients. However, the distribution of alleles G and A in liver depression spleen deficiency group and non-liver depression spleen deficiency group showed a different trend, which is worthy of further study.

Key words: refractory chronic hepatitis C; traditional Chinese medicine; syndrome; HLA-DP; polymorphisms; HCV

丙型肝炎是嗜肝病毒中丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种肝炎,感染后可以导致肝脏炎症性坏死甚至导致肝硬化和肝癌,由于其进展隐匿、慢性率高及预后不良而备受关注^[1]。以干扰素为基础的治疗方案在临床上一度居于主导地位,但由于疗程长、有效率低、不良反应大等许多问题仍未得到根本解决,使得在治疗过程中,存在治疗无应答者、不耐受者、停药后复发者等,即难治性慢性丙型肝炎(RCHC)的产生^[2]。

中医以其整体观和辨证论治的特点,在治疗 RCHC 上有一定的优势,可以通过分析不同患者的中医证型来进行个体化用药。然而,由于目前缺乏统一明确的丙型肝炎辨证分型标准,临床分型存在一定程度的主观性和随意性^[3]。因此,需要寻找一种可重复、准确可靠的分子标志物以揭示中医证型的内涵,以此更好地指导临床医生个体化用药。白细胞抗原(HLA)DP 基因编码 HLA-DP 抗原,此抗原的多少直接影响抗原递呈与免疫应答的过程。因此,本研究旨在探索人类 HLA-DP 基因单核苷酸多态性(SNP)常见位点的基因型与 RCHC 中医证型是否存在相关性,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 200 例 RCHC 患者均为 2015 年 1 月至 2016 年 12 月在湖北省中医院住院的患者,按中医证型分为肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组(含肝肾阴虚型、湿热内阻型、淤血阻络型)。其中肝郁脾虚组男 55 例,女 45 例,年龄 20~80 岁,平均 54.45 岁;非肝郁脾虚组男 53 例,女 47 例,年龄 26~80 岁,平均 59.05 岁。100 例对照人群为湖北省中医院骨科、肛肠科、耳鼻喉科住院患者,性别和年龄与 RCHC 患者差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 诊断标准 RCHC 的诊断均参考《丙型肝炎防治指南(2015 最新版)》^[4];肝郁脾虚型、肝肾阴虚型、湿热内阻型、淤血阻络型的中医证型分型参考 2017 年中华中医药学会肝胆病专业委员会制订的《病毒性肝炎中医辨证标准(2017 年版)》^[5],以上判定均由两位主治医师共同判断,并由一位主任医师审核确定。

1.3 纳入与排除标准 纳入标准:符合上述 RCHC 诊断标准且符合中医证型者,均签有知情同意书。排

除标准:合并 HIV 和(或)其他嗜肝病毒感染的肝炎;伴有心、肾、肺、内分泌、血液、代谢及胃肠道严重原发病;不能合作者或精神病患者;哺乳、妊娠或正准备妊娠的妇女,以及过敏体质者。

1.4 检测指标

1.4.1 常规指标 肝功能相关指标[丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、清蛋白(ALB)]由 RoCH moduleP800 全自动生化分析仪完成;HCV RNA 检测采用美国 ABI Dx 全自动荧光定量 PCR 仪完成;血小板计数(PLT)由贝克曼 DxH 800 完成;凝血酶原时间(PT)检测采用沃芬 ACLTOP700 完成。

1.4.2 基因组 DNA 的提取及 HLA-DP 基因分型 按湖北省中医院用户手册标准采集所有研究对象外周静脉 EDTA 抗凝血液 5 mL;依照基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根公司生产)操作说明书的步骤提取人类基因组 DNA;再采用超微量核酸分析仪(Eppendorf 公司,德国)测定 DNA 浓度;根据 HCV 基因组 5'-UTR、C/E1 和 NS5B 的序列及 HLA-DP 基因 rs9277535 位点 G/A,采用 Vector NTI11.0 软件设计引物和探针序列,送上海生工生物工程有限公司合成引物和探针序列,见表 1。采用优化后的双重 FQ-PCR 技术同步检测标本中 HLA-DP 基因 rs9277535 位点 G 或 A。优化后的双重荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)反应体系:2xTaqMan Fast qPCR Master Mix 5.00 μ L, 10 μ mol/L 正向引物 0.25 μ L, 10 μ mol/L 反向引物 0.25 μ L, 10 μ mol/L A-、G-探针各 0.20 μ L, DNA 模板 0.20 μ L, ddH₂O 2.10 μ L。

1.5 统计学处理 采用 SPSS20.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析和 t 检验分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验。计数资料如基因型和等位基因型等以百分率(%)描述,组间比较采用 χ^2 检验分析。所有统计采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RCHC 中医证型的分布 200 例 RCHC 中医证型中,肝郁脾虚证最多(100 例),占 50.0%;其次分别是湿热内阻证(48 例),占 24.0%;肝肾阴虚证(32

例),占 16.0%;瘀血阻络证(20 例),占 10.0%。

2.2 RCHC 肝郁脾虚证和非肝郁脾虚证的基本信息和常规指标 RCHC 肝郁脾虚证与非肝郁脾虚证相比,肝功能指标、HCV RNA 含量及其基因型差异均无统计学意义($P>0.05$);其中 RCHC 患者不同证型的 HCV 基因型均以 1b 型为主,凝血系统中 PT 指标差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 HLA-DP 基因 rs9277535 位点的 FQ-PCR 引物及探针序列	
项目	序列(5'~3')
引物	
正向引物	AAT GGT GAG CAG ACT GCA AAT
反向引物	TGA TAA AAC ATG CTC TCA GTA AGG T
探针	
A-探针	6-FAM-TAG GAC CCA TAT TC-BHQ-X
G-探针	VIC-ATA GGA CCC GTA TTC-BHQ-X

2.3 RCHC 不同证型患者 HLA-DP 基因 rs9277535 多态性 HLA-DP 基因 rs9277535 位点中,与野生纯合型 GG 相比,GA 杂合型和 AA 突变基因型在对照

组、肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组 3 组中的差异均无统计学意义($P>0.05$);等位基因 G、A 的分布在 3 组中差异也均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 2 不同中医证型 RCHC 患者基本信息和常规指标比较

项目	肝郁脾虚组 (n=100)	非肝郁脾虚组* (n=100)	χ^2/t	P
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	54.45±13.78	59.05±12.75	3.302	0.071
ALT(IU/mL, $\bar{x}\pm s$)	58.98±45.19	53.10±44.12	0.459	0.499
AST(IU/mL, $\bar{x}\pm s$)	55.11±28.37	56.73±44.12	0.064	0.801
ALP(IU/mL, $\bar{x}\pm s$)	96.84±35.70	91.30±31.41	0.726	0.396
ALB(g/L, $\bar{x}\pm s$)	41.09±6.01	39.39±6.50	2.169	0.143
PT(s, $\bar{x}\pm s$)	14.25±2.50	15.70±2.01	5.825	0.018
PLT($\times 10^9/L$, $\bar{x}\pm s$)	142.15±66.81	125.16±56.54	1.851	0.176
HCV RNA(log U/mL, $\bar{x}\pm s$)	6.35±1.27	6.05±1.08	1.732	0.190
HCV 基因型				
1b 型[n(%)]	73(73.00)	72(72.00)	0.025	0.874
非 1b 型[n(%)]	27(27.00)	28(28.00)		

注:*表示肝肾阴虚型或湿热内阻型或瘀血阻络型中任一证型均归为非肝郁脾虚组

表 3 RCHC 不同证型患者 HLA-DP rs9277535 多态性的分布情况[n(%)]						
项目	对照组(n=100)	肝郁脾虚组(n=100)	非肝郁脾虚组*(n=100)	P [#]	P [△]	P [▲]
基因型						
GG	38(38.0)	34(34.0)	45(45.0)			
GA	45(45.0)	50(50.0)	45(45.0)	0.489	0.579	0.207
AA	17(17.0)	16(16.0)	10(10.0)	0.904	0.121	0.101
GA+AA	62(62.0)	66(66.0)	55(55.0)	0.556	0.315	0.112
等位基因						
G	121(60.5)	118(59.0)	135(67.5)	0.76	0.145	0.078
A	79(39.5)	82(41.0)	65(32.5)			

注:*为非肝郁脾虚组指肝肾阴虚型或湿热内阻型或瘀血阻络型;#为对照组与肝郁脾虚组比较;△为对照组与非肝郁脾虚组比较;▲为肝郁脾虚组与非肝郁脾虚组比较

3 讨 论

近年来,人们对于慢性丙型肝炎的认识不断深入,国家卫生健康委员会疾病预防控制局官网发布的数据显示,每年该病的发病率和病死率也呈上升趋势。虽然中医、西医对慢性丙型肝炎的研究已经取得了很大的进展,治疗方面也取得了很大的突破,已有聚乙二醇干扰素(Peg-IFN)联合利巴韦林(RBV)的标准化治疗方案和 DAA 治疗方案,特别是 DAA 的上市是丙型肝炎治疗的一次飞跃,使其治愈率大大提高^[6]。但由于我国丙型肝炎患者的高 SVR 率、居民经济承受能力、卫生经济学因素、DAA 高昂的价格、未知的远期耐药、复发和药物间相互作用等诸多原因,使得 Peg-IFN 联合 RBV 治疗仍然是我国现阶段丙型肝炎抗病毒治疗的主要方案^[7]。在治疗过程中存在治疗无应答者、不耐受者、停药后复发者;HCV 的基因型为 1 型者;伴有肝炎肝硬化、非酒精性脂肪肝、代谢综合征、胰岛素抵抗者;HBV/HCV、HIV/

HCV 重叠感染者;器官移植患者等,均导致了 RCHC 的产生^[8-10]。因此,RCHC 已成为目前困扰肝病领域的重要科学问题。

HLA-DP 分子主要分布于抗原递呈细胞(APC),如巨噬细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞、胸腺上皮细胞和活化的 T 细胞等的表面。HLA-DP 基因属于 HLA-Ⅱ类基因,位于染色体 6p21.23,其基因多态性与机体免疫应答相关,在肝硬化基因研究中,HLA 基因逐渐受到关注。有学者通过 Meta 分析发现 HLA-DP 基因 rs9277535 位点 A 等位基因为 HBV 感染的保护因素,可显著增加 HBV 自发清除^[11]。HUANG 等^[12]研究证实,HLA-DP rs9277535 基因突变型与 HCV 持续感染和丙型肝炎慢性化进展速度相关,同时该基因还与肺癌、卵巢癌的发生风险,儿童 HBV 易感性,系统性红斑狼疮易感性等密切相关。

中医证型是 RCHC 辨证施治的关键。HLA-DP 基因多态性与 HCV 持续感染密切相关,其个体化理

念与中医辨证施治高度相似,课题组提出 HLA-DP 基因多态性与 RCHC 中医证型相关性的科学假说,寻找中医证型的分子标志物,为中医辨证提供科学依据。本研究结果显示,RCHC 肝郁脾虚证与非肝郁脾虚证相比,肝功能、HCV-RNA 水平及其基因型差异均无统计学意义($P>0.05$),但 HCV 基因型均以 1b 型为主;同时年长的 RCHC 患者更易出现非肝郁脾虚证,即肝肾阴虚型或湿热内阻型或淤血阻络型;凝血系统中 PT 指标差异有统计学意义($P<0.05$)。

研究发现,HLA-DP 基因 rs9277535 位点中,与野生纯合型 GG 相比,GA 杂合型和 AA 突变基因型在对照组、肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组 3 组间均无显著性差异;但等位基因 G 和 A 的分布在肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组 2 组间有差异趋势,可作为中医证型分型的潜在标志物,对于传统中医理论研究具有一定的创新价值,可进一步研究。

4 结 论

本课题组在 RCHC 中医证型分子分型研究中,发现肝郁脾虚证最多,肝脏功能损伤程度及病毒水平在不同证型之间差异无统计学意义。HLA-DP 基因 rs9277535 位点中等位基因 G 和 A 的分布在不同证型间有一定的差异趋势,因此,推断 rs9277535 位点中等位基因 G 和 A 可能是 RCHC 不同中医证型的潜在标志物,值得关注。本研究虽然得出了可能与 RCHC 中医证型密切相关的 HLA-DP 等位基因,但仍然难以明确定论。同时,由于本研究病例仅来自湖北省中医院,各种证型的病例数偏少,不够全面。因此,为更准确地反映 HLA-DP 基因 SNP 与 RCHC 中医证型的相关性,尚有待进一步扩大样本量,开展多地域、多民族的深入研究,以探索中医证型的分子机制。

参考文献

[1] 李杰,陈杰,庄辉. 丙型肝炎的流行病学[J]. 实用肝脏病

杂志,2012,15(5):379-381.
[2] 薛博瑜. 难治性慢性丙型肝炎的中医辨证论治[J]. 南京中医药大学学报,2015,31(1):1-3.
[3] 王成宝,陈逸云,聂红明,等. 基于循证医学的慢性丙型肝炎患者病毒基因分型与中医证候之间的关系探讨[J]. 中西医结合肝病杂志,2014,24(5):259-261.
[4] 中华医学会肝病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 肝脏,2015,33(12):933-949.
[5] 中华中医药学会肝胆病分会. 病毒性肝炎中医辨证标准(2017 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志,2017,27(3):193-194.
[6] 谢尧,李明慧. 难治性丙型肝炎治疗现状及发展趋势[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17(7):484-486.
[7] 陈新月,尚佳,杨瑞锋. 难治性慢性丙型肝炎初治患者优先治疗后的病毒学应答率研究[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(6):412-417.
[8] FRIED M W, JENSEN D M, RODRIGUEZ-TORRES M, et al. Improved outcomes in patients hepatitis C with difficult-to-treat characteristics: randomized study of higher doses of peginterferon alpha-2a and ribavirin[J]. Hepatology, 2008, 48(4):1033-1043.
[9] 冯晓霞,聂苑霞,梁海林. 益气解毒化瘀方联合抗病毒治疗对难治性慢性丙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群和炎症细胞因子的影响[J]. 实用肝脏病杂志,2016(6):674-677.
[10] 沈健,陈建杰,商斌仪,等. 丙肝冲剂治疗难治性丙型肝炎研究[J]. 现代中西医结合杂志,2013,22(18):1947-1949.
[11] 刘娟娟. HLA-DP 多态性与乙型肝炎病毒感染及其不同结局相关性 Meta 分析[D]. 昆明:昆明医科大学,2017.
[12] HUANG P, FAN H, TIAN T, et al. The relationship between human leukocyte antigen-DP/DQ gene polymorphisms and the outcomes of HCV infection in a Chinese population[J]. Virol J, 2017, 14(1):235-241.

(收稿日期:2018-06-25 修回日期:2018-09-16)

(上接第 3 页)

[5] CHEN C J, YANG H I, SU J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level[J]. JAMA, 2006, 295(1):65-73.
[6] VALSAMAKIS A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3):426-439.
[7] 王清,曾勇彬,林锦骝,等. 福州地区乙型肝炎患者 HBV P 区突变模式与其基因型及血清标志物的关系[J]. 中华检验医学杂志,2016,39(2):85-89.
[8] 吴云,庞丽君,李宁. 乙型肝炎病毒耐药突变位点连锁分析[J]. 北京医学,2015,37(12):1146-1148.
[9] 常静霞,汪茂荣. 乙型肝炎病毒基因耐药变异研究进展[J]. 实用肝脏病杂志,2013,16(5):467-470.
[10] MA J, ZHANG Y, CHEN X Y, et al. Association of pre-

existing drug-resistance mutations and treatment failure in hepatitis B patients[J]. PLoS One, 2013, 8:e67606.
[11] YANG J X, LIU B M, LI X G, et al. Profile of HBV antiviral resistance mutations with distinct evolutionary pathways against nucleoside/nucleotide analogue treatment among Chinese chronic hepatitis B patients[J]. Antivir Ther, 2010, 15(8):1171-1178.
[12] 孙晶,贾志远,常军霞,等. 北京地区 HBV 基因型的分布及其与临床表现关系的初步研究[J]. 中国实验和临床病毒学杂志,2013,27(1):39-41.
[13] CHEN X L, LI M, ZHANG X L. HBV genotype B/C and response to lamivudine therapy: a systematic review [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:672614

(收稿日期:2018-05-15 修回日期:2018-07-29)